



**HAL**  
open science

# Localisations et rôles des polysaccharides de paroi au cours du développement de deux modèles d'algues brunes : le zygote de *Fucus* et *Ectocarpus*

Amandine Siméon

► **To cite this version:**

Amandine Siméon. Localisations et rôles des polysaccharides de paroi au cours du développement de deux modèles d'algues brunes : le zygote de *Fucus* et *Ectocarpus*. Biologie végétale. Sorbonne Université, 2018. Français. NNT : 2018SORUS233 . tel-02479684

**HAL Id: tel-02479684**

**<https://theses.hal.science/tel-02479684>**

Submitted on 14 Feb 2020

**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.



# Sorbonne Université

Ecole doctorale Complexité du Vivant – ED515

*Station Biologique de Roscoff / UMR8227 LBI2M / Equipe Glycobiologie Marine*

## **Localisations et rôles des polysaccharides de paroi au cours du développement de deux modèles d'algues brunes, *le zygote de Fucus et Ectocarpus***

Par Amandine Siméon

Thèse de doctorat de Biologie marine

Dirigée par Bernard Kloareg et Cécile Hervé

Présentée et soutenue publiquement le 13/04/2018

Devant un jury composé de :

Dr. Marie-Christine Ralet, Directrice de recherche, Rapporteur

Dr. Sylvia Collic-Jouault, Chercheur Ifremer, Rapporteur

Dr. Azeddine Driouich, Professeur des universités, Examineur

Dr. François-Yves Bouget, Directeur de recherche, Président du jury

Dr. Cécile Hervé, Chargée de recherche CNRS, Co-directrice de thèse

Dr. Bernard Kloareg, Professeur des universités, Directeur de thèse



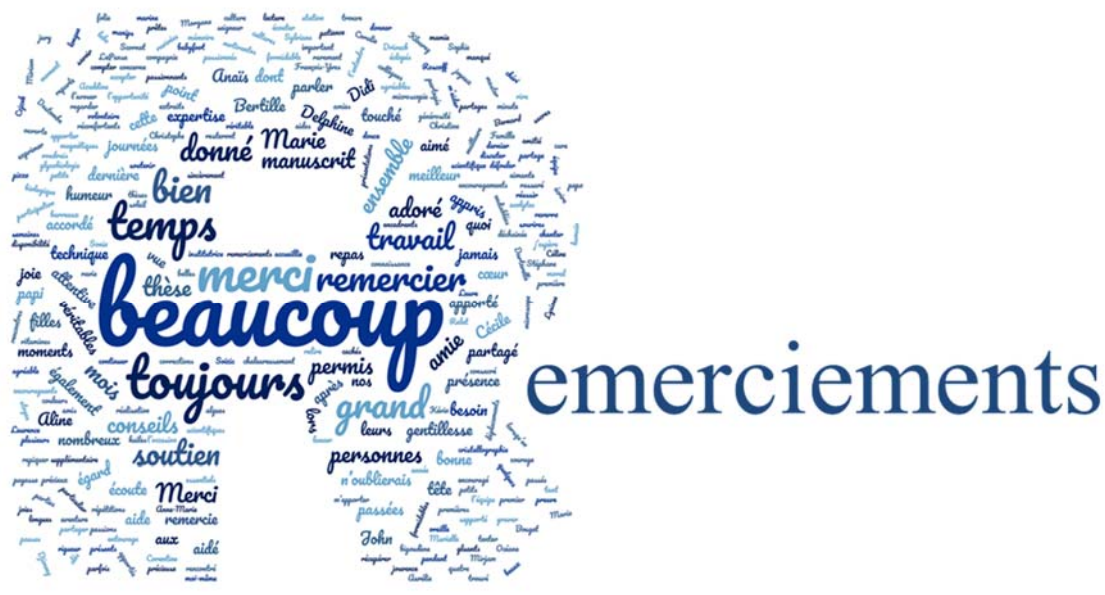
Except where otherwise noted, this work is licensed under <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/>

*Je dédie cette thèse à celui qui m'a toujours apporté tout son soutien durant mes études,  
celui qui m'a toujours fait confiance et cru en moi,  
mon papi.*

*L'imagination est plus importante que la connaissance.*

*Albert Einstein*





## Remerciements

En premier lieu, je tiens à exprimer mes plus vifs remerciements à mes encadrants de thèse, Bernard Kloareg et Cécile Hervé, pour m'avoir donnée l'opportunité de me lancer dans cette aventure à la station biologique de Roscoff, de m'avoir accordée du temps et pour leurs remarques constructives. Cécile, encore un grand merci pour ta disponibilité, tes conseils et la patience dont tu as fait preuve à mon égard. Ta rigueur scientifique et ton expertise m'ont beaucoup appris.

Je tiens à remercier Marie Christine Ralet, Sylvia Collic-Jouault, François-Yves Bouget et Azeddine Driouch d'avoir accordé de leur temps à la lecture de mon manuscrit et pour leur participation à ce jury.

Merci à Simon Dittami, Laurence Dartevelle et Delphine Scornet et Sophie Lepanse pour leurs conseils leurs expertises scientifiques, notamment en ce qui concerne la culture des algues et la microscopie.

Je voudrais remercier très chaleureusement toutes les personnes de l'équipe de glycobiologie marine et en particulier Mirjam Czjzek de m'avoir accueillie dans son équipe et de m'avoir donnée le temps supplémentaire à la réalisation de mon travail. Merci beaucoup pour ton écoute attentive et tes nombreux sourires réconfortants. Merci à tous d'avoir été présents pour m'aider ou pour discuter. Murielle, tu as toujours été là pour m'apporter un soutien technique et tu m'as parfois relayée à la dernière minute. Kévin, un grand merci d'avoir toujours été volontaire pour tenir mon sac lors de nos déplacements. Delphine, tu m'as apportée une aide précieuse au labo. J'ai beaucoup aimé partager sur mon travail et parler avec toi. Tu m'as beaucoup manquée la dernière année de ma thèse.

Durant cette thèse, j'ai eu l'occasion de faire de jolies rencontres. Plus que des collègues, j'ai trouvé de véritables amis qui m'ont tous beaucoup apporté.

Un grand merci à toutes les filles qui ont partagé le bureau 351 avec moi. Maria, tu as été la première dont j'ai fait la connaissance. J'ai adoré t'entendre chanter les soirs. Merci d'avoir pris soin de nous avec tes petits sucres aux huiles essentielles lorsqu'on était malade. Tu as été une vraie mère pour nous. Laure, ... que dire..., tu es la plus déchainée de nous toutes. Je n'oublierais jamais ta douce folie et ta bonne humeur, qui je dois l'avouer, sont très motivantes. Miriam, je pense que l'on partage plusieurs points de vues ensemble et ça m'a beaucoup rassurée de parler avec toi. Ta gentillesse m'a beaucoup touchée et j'espère vraiment que l'on se reverra dans l'est après nos thèses.

Céline, mes longues journées passées au microscope m'ont parue plus courtes en ta présence. Les pauses repas aussi bien sous la pluie, que sous le soleil ont toujours ravivé mes journées.

Aurélié, tu es une amie formidable. Je n'oublierai jamais mes partages de pizza avec ma petite bigoudène. Je tiens vraiment à te remercier sincèrement pour tous tes conseils, ton soutien et ton écoute à mon égard.

Simon, merci de toujours avoir été disponible pour répondre à mes questions et me donner des conseils. J'ai beaucoup aimé aller t'embêter dans ton bureau pour parler entre doctorants en pleine rédaction.

Sonia, toi aussi tu m'as beaucoup aidée, aussi bien d'un point de vue technique que moral. J'ai adoré repiquer mes cultures avec toi. On a beaucoup partagé. Je serais ravie qu'on monte le club des éclopés ensemble.

Anaïs et John, de vrais passionnés de la cristallographie comme on en trouve peu. Le temps passé avec vous deux a été très agréable. Anaïs, merci pour les parties de babyfoot endiablées qui m'ont permises de me défouler entre deux manips. John, merci pour tes nombreux encouragements et ton oreille attentive.

Ma clique de trois filles : Marie, Aline et Bertille, tous ses joyeux repas que l'on a partagé ensemble resteront gravés dans ma mémoire. Vous êtes vraiment des amies formidables, toujours prêtes à me soutenir, à écouter mes répétitions de présentations, ... Mes plus beaux moments de joie ont été passés en votre présence. C'est toujours agréable de savoir que je peux compter sur vous pour quoi que ce soit. Marie, mon amie de payasse. J'ai aimé regarder les belles couleurs de tes extraits un peu gluants et tenter de récupérer les barreaux magnétiques. Aline, ta joie et ta bonne humeur ont été des véritables cachets de vitamines. Bertille, merci pour ton aide. Les moments passés avec toi en tête à tête ces derniers mois m'ont donnée du courage pour écrire ce manuscrit.

Je tiens également à remercier mes acolytes d'un mois, Sylviane et Stéphane. Les quatre semaines passées en votre compagnie ont été une véritable cure de jouvence. Vous m'avez beaucoup apportée sur le plan humain, à un moment où j'en avais bien besoin. Votre amitié, gentillesse, soutien et générosité m'ont permis de mener à bien ce travail. Coralie et Morgana, j'ai adoré rire de bon cœur avec vous. Soizic, ton grand cœur m'a beaucoup touchée. J'ai rarement rencontré des personnes aussi ouvertes et aimantes que toi.

Un grand merci aux personnes qui m'ont beaucoup appris lors de mes deux stages de master. Corentine, Lysiane et Anne-Marie, vous m'avez donnée les premières clés pour réussir ce travail. Les quelques mois que j'ai passé à vos côtés ont été des plus encourageants et

passionnants. Je vous dois mes passions scientifiques. Vous m'avez toujours encouragée, soutenue et permis de donner le meilleur de moi-même.

Ma Didi, en tant que meilleure amie, tu as été d'un soutien précieux. Tu as toujours répondu présente pour moi et tes quelques visites en Bretagne m'ont fait le plus grand plaisir. Je te remercie beaucoup pour le temps que tu as consacré à relire ce manuscrit et à apporter tes corrections. Comme quoi, on a toujours besoin d'une institutrice dans son entourage.

Mon chéri, s'il y en a un que je dois remercier c'est bien toi. Tu m'as supportée tous les jours avant et pendant ma thèse. Tu as écouté mes nombreuses répétitions et répondu à mes nombreux questionnements. Tes sourires tous les jours m'ont permis d'avancer et me rendent heureuse à chaque minute. Encore merci pour ta patience et ton soutien pendant ces trois années et demie.

Je voudrais également remercier les personnes de ma famille et plus particulièrement mon petit papi. Depuis que je suis née, tu as toujours été présent pour moi, à n'importe quelle heure de la journée et n'importe quel jour de la semaine. Tu m'as transmis le goût des études et de la nature, et tu m'as appris à parler avec mon cœur. La plus grande partie de l'énergie qui m'a été nécessaire durant toutes mes études, je te la dois. Je n'y serais jamais arrivée sans ton soutien, ta patience et ton amour. Si j'en suis arrivée là aujourd'hui, c'est bien grâce à toi. Mon seul regret est que je ne pourrais jamais te remercier comme tu le mérites pour tous ce que tu m'apportes tous les jours.

Encore une fois, merci à tous !

# Sommaire

<b>Remerciements</b> .....	<b>4</b>
<b>Sommaire</b> .....	<b>7</b>
<b>Abréviations</b> .....	<b>9</b>
<b>Chapitre 1 : Introduction</b> .....	<b>3</b>
I. Les algues : généralités et place dans l'arbre du vivant .....	3
A. Les algues : un groupe polyphylétique .....	3
B. Les algues brunes : morphologie générale.....	6
II. La paroi : un système dynamique et complexe.....	9
A. La paroi : une composition essentiellement polysaccharidique.....	9
B. Organisation générale de la paroi .....	23
C. Origine et évolution des principaux polysaccharides de paroi .....	23
D. Biosynthèses et remodelage des principaux composés de paroi.....	26
III. Les nombreuses fonctions de la paroi.....	29
A. La paroi : une interface d'échange avec le milieu extérieur .....	31
B. Le rôle de la paroi dans le développement.....	34
IV. Modèles d'étude pour le développement précoce chez les algues brunes.....	35
A. Le zygote de <i>Fucus</i> : un modèle historique en biologie du développement.....	35
B. <i>Ectocarpus</i> : un modèle émergent.....	45
V. Les méthodes d'analyses de la paroi chez les algues brunes.....	51
A. La majorité des connaissances chez les algues brunes proviennent de méthodes chimiques .....	51
B. L'immunohistochimie pour détecter les polysaccharides de paroi à un niveau tissulaire et cellulaire.....	52
VI. Présentation du travail de thèse .....	55
<b>Chapitre 2 : Matériels &amp; Méthodes</b> .....	<b>58</b>
I. Modèles d'études.....	59
A. Le modèle zygote de <i>Fucus</i> : isolation des gamètes & cultures des zygotes.....	59
B. Le modèle <i>Ectocarpus</i> : souches & production des parthénosporophytes.....	60
II. Extraction et détection des AGPs .....	62
III. Milieux de culture.....	64
IV. Immuno-détection & imagerie <i>in situ</i> des polysaccharides de la paroi des algues brunes.....	67
<b>Chapitre 3 : Mise en évidence des arabinogalactanes protéines (AGPs) dans la paroi des algues brunes</b> .....	<b>69</b>
Présentation de l'article .....	69
Compléments à l'étude.....	71
<b>Chapitre 4 : Dynamique de la paroi au cours du développement précoce du zygote de <i>Fucus</i></b> .....	<b>75</b>
Présentation de l'article .....	75
<b>Chapitre 5 : Premières études ciblées sur les parois de deux espèces modèles d'<i>Ectocarpus</i></b> .....	<b>78</b>
Introduction .....	78
I. La paroi de la souche marine d' <i>E. siliculosus</i> .....	78
A. Analyse des AGPs chez <i>Ectocarpus</i> : difficultés techniques.....	79
B. La présence de ManC5-E dans le milieu de culture altère le développement des parthénosporophytes d' <i>E. siliculosus</i> .....	80
C. Imagerie de la paroi des jeunes parthénosporophytes d' <i>E. siliculosus</i> .....	84

II.	La souche Bft15b d' <i>E. subulatus</i> : morphologie et développement.....	90
A.	Morphologie générale des parthénosporophytes d' <i>E. subulatus</i> .....	90
B.	Le développement des jeunes parthénosporophytes d' <i>E. subulatus</i> s'effectuent également par croissance apicale .....	91
<b>Chapitre 6 : la sulfatation des fucanes intervient dans la croissance apicale chez <i>Ectocarpus</i> .....</b>		<b>95</b>
Présentation de l'article : .....		95
<b>La sulfatation des fucanes intervient dans la croissance apicale chez <i>Ectocarpus</i> .....</b>		<b>97</b>
Liste des abréviations .....		98
Introduction .....		99
Matériels et méthodes.....		101
Modèles d'étude et production des parthénosporophytes .....		101
Milieux de cultures.....		102
Analyses de la croissance et de la morphologie.....		102
Détection des polysaccharides pariétaux et microscopie à fluorescence .....		102
Résultats .....		104
1.	Les parthénosporophytes d' <i>E. subulatus</i> réalisent plus de branchements lorsqu'ils sont cultivés à forte salinité.....	104
2.	La teneur en sulfate dans le milieu influence la capacité d' <i>E. subulatus</i> à produire des branchements .....	105
3.	Les fucanes très sulfatés sont préférentiellement localisées dans les zones de croissance apicale.....	106
4.	Le dépôt des fucanes sulfatés BAM4 est altéré par l'absence de sulfate dans le milieu.....	107
Discussion .....		108
1.	Les cellules apicales d' <i>Ectocarpus</i> présentent des gradients opposés de fucanes hautement sulfatés et de cellulose.....	108
2.	La sulfatation des fucanes est un processus de développement dynamique .....	110
3.	Le milieu environnant influence la plasticité architecturale d' <i>Ectocarpus</i> .....	112
Références .....		114
<b>Chapitre 7 : Conclusions et perspectives.....</b>		<b>120</b>
I.	Les anticorps monoclonaux : des outils essentiels à la biologie pariétale .....	120
II.	La biologie de la paroi dans le développement du zygote de <i>Fucus</i> et des sporophytes d' <i>Ectocarpus</i> .....	122
III.	Origine et nature des AGPs chez les algues brunes.....	124
<b>Annexes .....</b>		<b>128</b>
Annexe 1 : .....		128
Avantages et limites des deux organismes modèles utilisés dans cette étude : le zygote de <i>Fucus</i> et <i>Ectocarpus</i> .....		128
Annexe 2 : .....		129
Le génome d' <i>E. subulatus</i> : une algue brune très tolérante au stress.....		129
Annexe 3 : .....		130
Commentaire sur l'origine des AGPs chez les végétaux ("Delving in the deep for the origin of plant cell surface proteoglycans").....		130
<b>References bibliographiques .....</b>		<b>132</b>
<b>Table des illustrations .....</b>		<b>148</b>
<b>Table des tableaux.....</b>		<b>150</b>

## Abréviations

μM : micromolaire

*A. nodosum* : *Ascophyllum nodosum*

*A. thaliana* : *Arabidopsis thaliana*

AGP : Arabinogalactane protéine

Ara : Arabinose

ASC : complexe de stabilisation de l'axe  
(axis stabilizing complex)

BAMs : anticorps monoclonaux d'algues  
brunes (Brown Alga Monoclonal)

BSA : sérum albumine bovine (Bovine  
serum albumin)

CA : cellule apicale

CBM : modules de liaison à des  
polysaccharides (Carbohydrate Binding  
Module)

CE : cellule allongée (elongated)

Ci : cellule initiale

CI : cellule intermédiaire

CoMPP : Profilage de polymères sur  
micro-puces (Comprehensive Microarray  
Polymer Profiling)

CR : cellule ronde

CW : calcofluor white

DHP : dihydropyridine

*E. siliculosus* : *Ectocarpus siliculosus*

*E. subulatus* : *Ectocarpus subulatus*

edmA : eau de mer artificielle

edmN : eau de mer naturelle

etl : mutant étoile

*F. serratus* : *Fucus serratus*

FP : filament primaire

FS : filament secondaire

FS : fucosyltransférases

Fuc : Fucose

G : acide guluronique

GAG : glycosyl-amino glycanes

Gal : galactose

GH : glycosides hydrolases

GT : glycosides transférases

Glu : glucose

GMD1 : GDP-mannose 6-déshydrogénase

*L. hyperborea* : *Laminaria hyperborea*

M : acide mannuronique

ManC5-E : Mannuronane C5-épimérase

MLG : Mixed-Linkage-Glucans

mM : millimolaire

Oro : mutant ouroboros oro

PBS : tampon phosphate salin (phosphate  
bufferes saline)

PL : pluriloculaire

PSP : parthénosporophyte

RMN : spectrométrie par résonance  
magnétique nucléaire

RNAi : RNA interférence

*S. latissima* : *Saccharina latissima*

SDS : sodium dodecyl sulfate

ST : sulfotransférases

TBO : bleu de toluidine O

UL : uniloculaire

βGalY : β-D-galactosyl

βGluY : β-D-glucosyl





# **Chapitre I**

## **Introduction générale**

# Chapitre 1 : Introduction

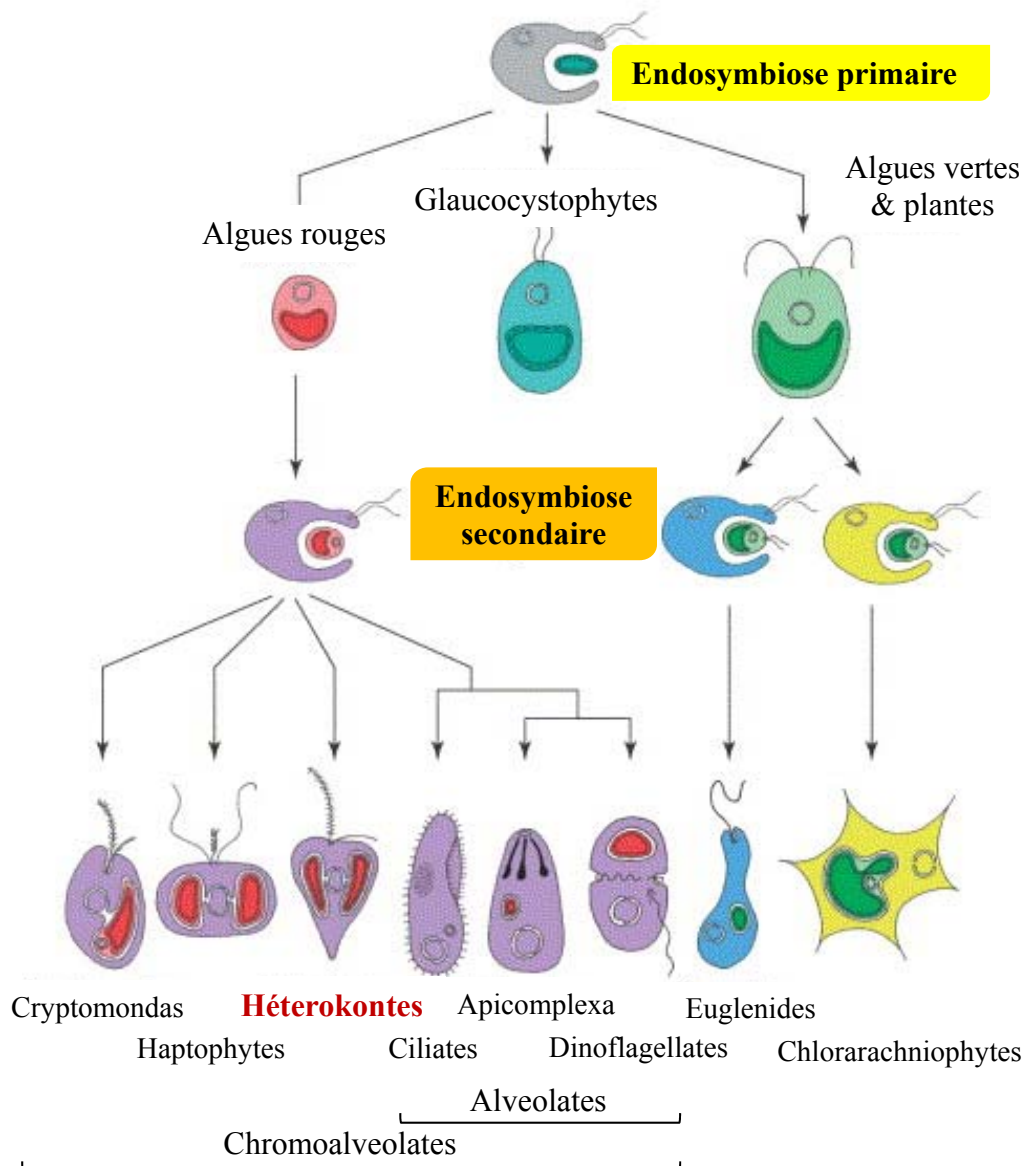
## I. Les algues : généralités et place dans l'arbre du vivant

### A. Les algues : un groupe polyphylétique

Les algues constituent une part importante de la biodiversité, de l'écologie et de l'environnement aquatique. Ce sont des organismes eucaryotes photosynthétiques autotrophes généralement aquatiques. Ces organismes ne constituent pas un groupe phylogénétique unique (Fig. 1). Ils sont répartis sur l'ensemble de l'arbre de vie des eucaryotes et forment ainsi un groupe polyphylétique. La majorité des algues identifiées sont unicellulaires et composent le phytoplancton à la base des chaînes alimentaires des eaux marines, douces et saumâtres. Les groupes des Euglénophytes, Cryptophytes, Haptophytes, Glaucophytes et Dinoflagellés possèdent uniquement des espèces algales unicellulaires. En revanche, les groupes des Straménopiles, Rhodophytes et Chlorophytes sont constitués à la fois d'espèces unicellulaires et multicellulaires simples ou complexes. Dans ce manuscrit, nous nous intéresserons uniquement aux algues multicellulaires complexes, c'est-à-dire les macro-algues.

Les macro-algues forment également un groupe polyphylétique. Elles sont réparties parmi trois grandes lignées : les algues vertes (Chlorophytes), les algues rouges (Rhodophytes) et les algues brunes (Phaeophycées) (Fig. 1). Ces trois derniers sont avec les animaux, les champignons et les plantes vertes, les seuls grands groupes d'Eucaryotes constitués d'organismes multicellulaires complexes. L'acquisition d'une multicellularité complexe a été réalisée de manière indépendante. Les Chlorophytes et les Rhodophytes appartiennent tout comme les plantes terrestres au phylum des Archaeplastida alors que les algues brunes appartiennent à l'embranchement des Straménopiles ou Hétérokonta (Baldauf, 2008). Ce phylum a émergé il y a plus d'un milliard d'années à partir d'un ancêtre eucaryote unicellulaire commun à toutes les lignées eucaryotes connues (Yoon *et al.*, 2004) et qui contient également les oomycètes et des diatomées (Baldauf, 2008). Les différentes caractéristiques de ce groupe ont été acquises au cours de plusieurs évènements endosymbiotiques (Fig. 2).

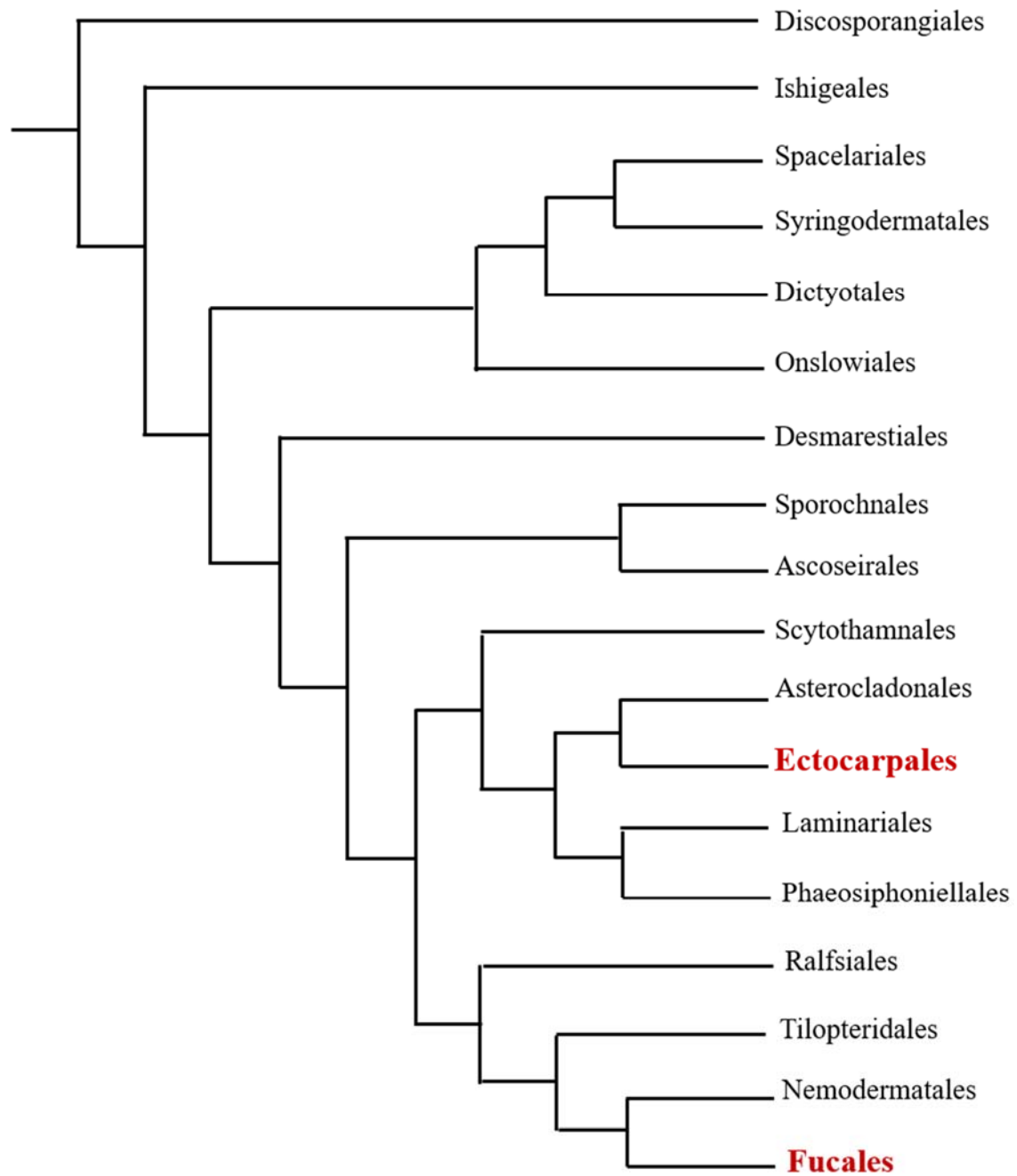




**Figure 2 : Origine et évolution des plastes acquis par endosymbiose primaire puis secondaire** (adapté d'Archibald & Keeling 2002). Les trois lignées possédant un plaste primaire (algues rouges, Glaucocystophytes et lignée verte) ont évolué à partir d'une endosymbiose primaire entre une cellule eucaryote hétérotrophe et une cyanobactérie. Une endosymbiose secondaire à partir d'une algue verte a conduit à l'évolution des Euglènes alors qu'une autre est à l'origine des Chlorarachniophytes. Une endosymbiose secondaire avec une algue rouge a conduit à l'évolution des Alvéolates et des Chromoalvéolates dont les Hétérokontes.

## B. Les algues brunes : morphologie générale

Les algues brunes sont constituées de 18 ordres (Silberfeld *et al.*, 2014) (Fig. 3). Les organismes qui constituent ces ordres sont morphologiquement très diversifiés (Fig. 4). Chez certaines espèces, la morphologie est également variable selon la saison, comme *Desmarestia aculeata*, ou encore du cycle de développement, comme *Himanthalia elongata*. Si, certaines espèces sont constituées de filaments unisériés tels qu'*Ectocarpus*, d'autres sont plus complexes et possèdent un crampon solidement accroché au substrat leur permettant de résister aux courants et marées. La morphologie du crampon permet une adhésion adaptée en fonction du substrat et de l'environnement. Contrairement aux plantes terrestres, le crampon des algues a uniquement un rôle d'adhésion. Ce crampon peut être relié au thalle *via* un stipe (fausse-tige). Le thalle constitue la partie végétative de l'algue. Sa pigmentation importante assure la photosynthèse afin de subvenir aux besoins énergétiques du plant. Les algues brunes peuvent également porter des cellules spécialisées comme des poils ou des pseudos-poils.



**Figure 3 : Arbre phylogénétique des algues brunes** (adapté de Silberfeld *et al.*, 2014). Les noms en rouge représentent les deux ordres d'appartenance des deux organismes modèles utilisés lors de cette thèse : *Ectocarpus* et le zygote de *Fucus*. La longueur des branches n'est pas proportionnelle à la date de divergence des lignées.





**Figure 4 : Diversité morphologiques des algues brunes.** a) Frondes ramifiées rubanées de *Dictyota dichotoma*. b) Thalle creux de *Colpomenia peregrina*. c) Frondes spongieuses à aspect d'écouvillon de *Cladostephus spongiosus*. d) Frondes ramifiées aplaties d'*Himanthalia elongata*. e) Thalle non ramifié de *Saccharina latissima*. f) Thalle encroutant de *Ralfsia verrucosa*. Sources a-e : <http://doris.ffessm.fr/> ; f : <http://seaweeds.uib.no>

## II. La paroi : un système dynamique et complexe

Une des particularités associée à l'émergence de la multicellularité est l'évolution d'une matrice extracellulaire élaborée ou paroi chez les végétaux (Popper *et al.*, 2011). La paroi constitue le compartiment cellulaire le plus extérieur. Par ses propriétés d'adhésion cellulaire, la paroi a favorisé le passage d'une forme de vie unicellulaire libre à un assemblage cellulaire et tissulaire complexe.

### A. La paroi : une composition essentiellement polysaccharidique

Comme la paroi des plantes, la paroi des algues est principalement constituée de polysaccharides. Cependant la nature des polysaccharides varie en fonction du groupe phylogénétique auquel appartient l'organisme. Contrairement aux plantes terrestres, les parois des algues marines ont toutes la particularité de contenir des polysaccharides sulfatés. (Tab. 1). Les polysaccharides sulfatés sont présent dans la plupart des groupes taxonomique marins. Ces derniers sont ainsi retrouvés dans les trois grands groupes d'algues (rouges, vertes et brunes) : des fucanes sulfatés pour les Phéophycées, des carraghénanes et des agars chez les Rhodophycées, et des ulvanes chez les Chlorophycées. Si ils sont absents des parois de plantes terrestres, des galactanes sulfatés ont été mis en évidence dans la paroi cellulaire des plantes marines *Ruppia maritima* et *Zostera marina* (Aquino *et al.*, 2005 ; Olsen *et al.*, 2016). Les polysaccharides sulfatés de la paroi joueraient un rôle dans la régulation ionique chez les organismes vivants. Des analyses chimiques ont également révélé la présence de polysaccharides sulfatés chez la plante d'eau douce *Eichornia crassipes*, montrant que leur présence est plus commune que prévue (Dantas-Santos *et al.*, 2012). Comme pour les algues, la présence de polysaccharides sulfatés dans les feuilles et les pétioles de ces plantes pourrait jouer un rôle protecteurs contre la perte d'eau (Michel *et al.*, 2010 ; Dantas-Santos *et al.*, 2012). Gal : galactose ; Glu : glucose ; Ara : Arabinose et Fuc : Fucose. Un récapitulatif de la présence des polysaccharides sulfatés et leur composition en monosaccharides dans les différents types de végétaux est représenté da figure 5. Dans ce chapitre, seule la paroi des algues brunes sera abordée.

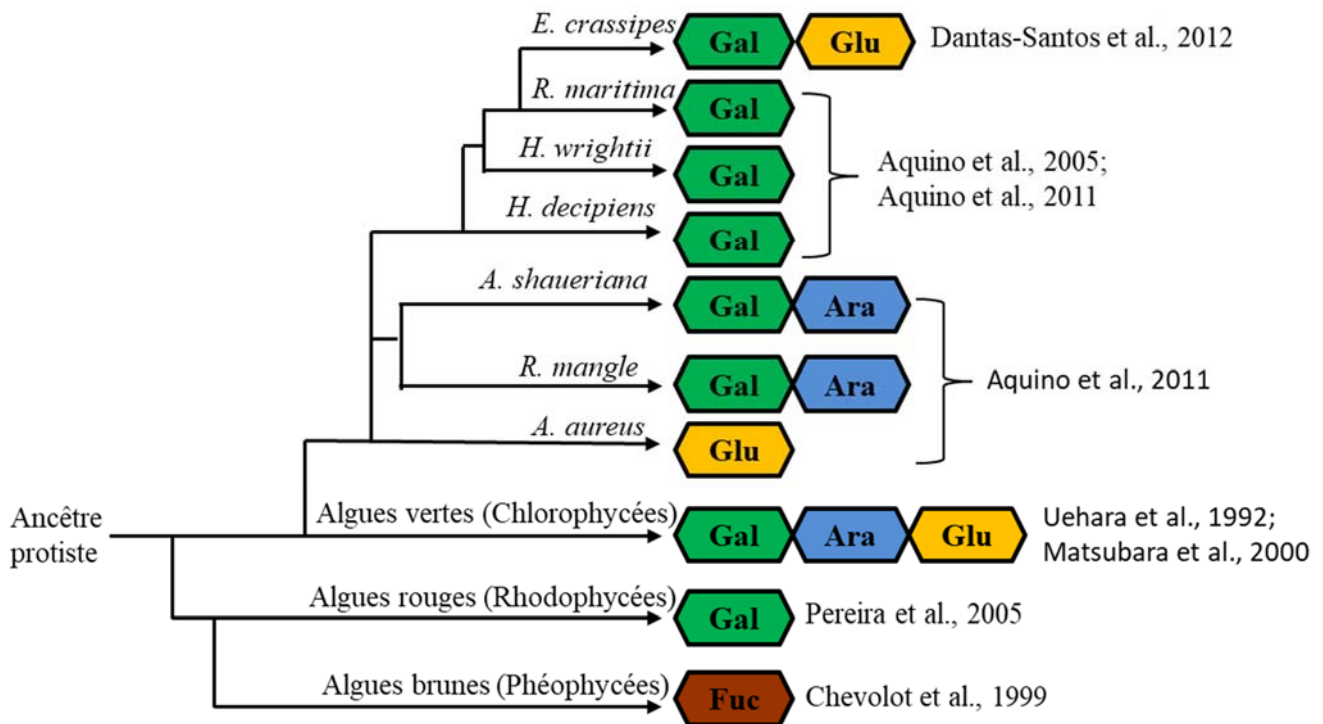
La caractérisation de la paroi des algues brunes est complexe. En effet, des variations de composition sont observées en fonction de différents facteurs comme l'habitat, la saison de récolte, l'espèce, l'organe analysé ou encore le stade de développement (Raimundo *et al.*, 2016). Néanmoins, on considère que la paroi des Phéophycées est constituée d'une phase



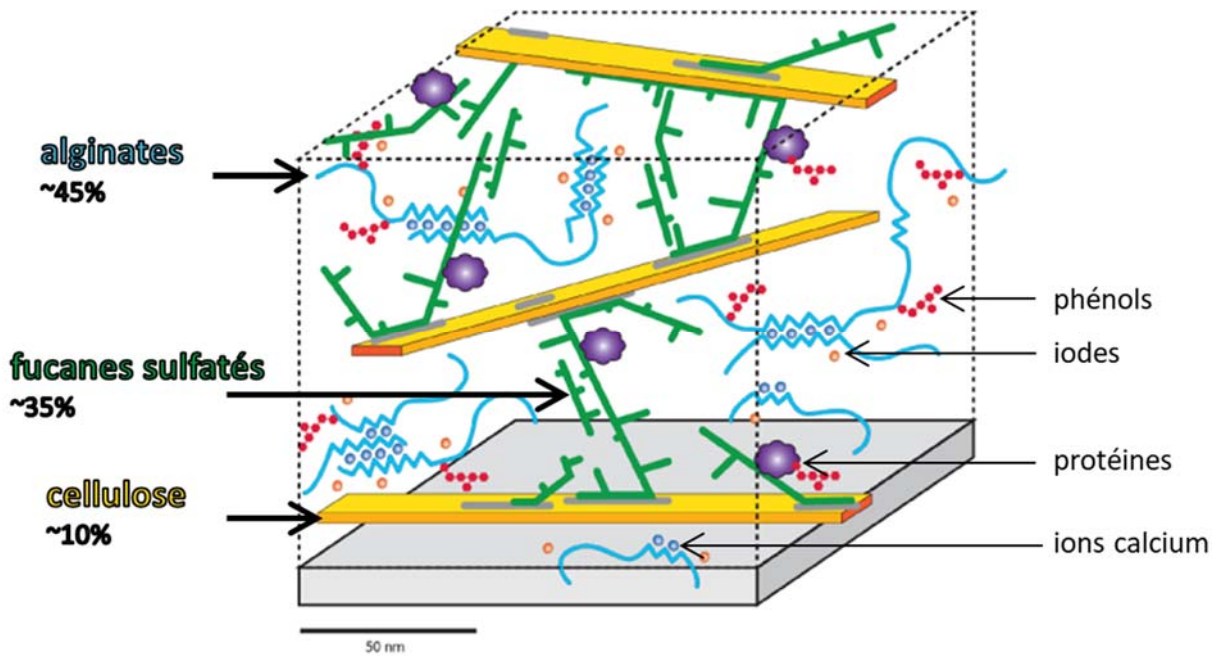
matricielle majoritaire et d'une phase squelettique moindre (Fig. 6). La phase matricielle est composée d'alginate et de fucanes dont l'ensemble peut représenter jusqu'à 45% du poids sec de l'algue (Deniaud-Bouet *et al.*, 2014). La phase squelettique est quant à elle, constituée de cellulose et représente entre 1 et 8 % du poids sec (Deniaud-Bouet *et al.*, 2014). Quantitativement, ces trois polysaccharides sont les composants majoritaires de la paroi des algues brunes. Récemment, d'autres composés polysaccharidiques plus minoritaires ont été identifiés : des arabinogalactane-protéines (AGP) (Hervé *et al.*, 2016 : présenté dans le chapitre 3), des  $\beta$ -1-3-glucanes (Raimundo *et al.*, 2016) et des  $\beta$ (1-3)(1-4) glucanes ou glucanes à liaisons mixtes (MLG) (Salmeán *et al.*, 2017).

	<b>Embryophytes</b> (plantes terrestres)	<b>Charophytes</b> (algues vertes d'eau douce)	<b>Chlorophytes</b> (algues vertes marines)	<b>Rhodophytes</b> (algues rouges marines)	<b>Phaeophycées</b> (algues brunes marines)
<b>Polysaccharides cristallins</b>	cellulose	cellulose	cellulose	cellulose (1→4)- $\beta$ -D-mannane (1→4)- $\beta$ -D-xylane (1→3)- $\beta$ -D-xylane	$\beta$ -1-3-glucanes MLG
<b>Hemicelluloses</b>	xyloglucane mannane xylane MLG	xyloglucane	xyloglucan glucuronan	glucomannane MLG (1→3),(1→4)- $\beta$ -D-xylan	Xylofucoglucane xylofucoglucuronane
<b>Polysaccharides carboxyliques</b>	pectine	pectine	ulvane	-	alginate
<b>Polysaccharides sulfatés</b>	-	-	ulvane	agar carrageenan porphyran	homofucane

**Tableau 1 :** Répartition des différents polysaccharides de la paroi en fonction des différentes lignées de végétaux (adapté de Popper *et al.*, 2011). MLG : Mixed-Linkage-Glucans



**Figure 5 :** Présence des polysaccharides sulfatés et leur composition en monosaccharides dans les différents types de végétaux (adapté d'Aquino *et al.*, 2011 et Nguyen *et al.*, 2014).



**Figure 6 :** Représentation schématique de la paroi des Fuciales (adaptée de Deniaud-Bouët *et al.*, 2014). Les alginate et les fucanes forment la plus grande partie des polymères de la paroi cellulaire des Fuciales. Les microfibrilles de cellulose sont plus rares. La paroi contient également des protéines, des phénols et de l'iode.

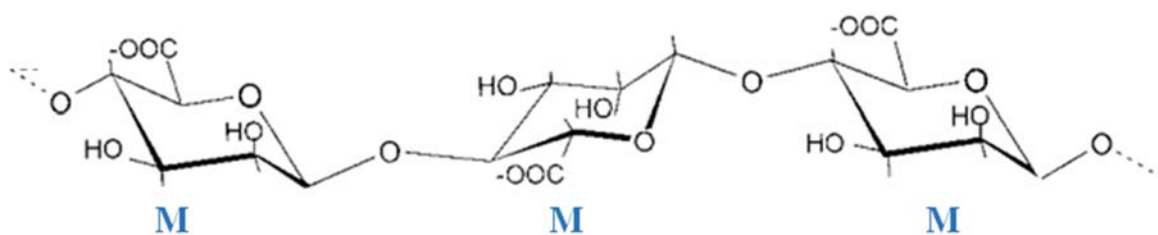
## 1.Caractéristiques des polysaccharides de paroi des algues brunes

### a. Les alginates

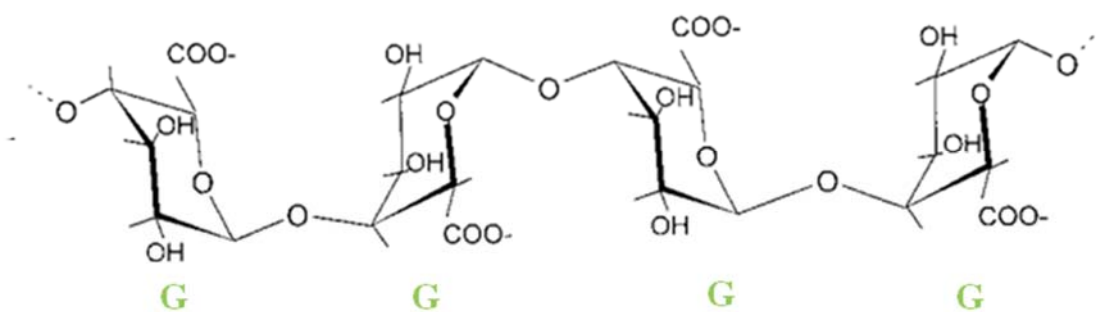
#### i. Composition et propriétés des alginates

Les alginates sont des polymères linéaires composés de deux épimères : le  $\beta$  (1-4)-D-mannuronate (M) et l' $\alpha$  (1-4)-L-guluronate (G). Ces deux acides uroniques sont disposés en bloc le long de la chaîne polysaccharidique. Ils sont présents sous forme d'homopolymères MM ou GG ou sous forme d'hétéropolymères MG (Fig. 7). Les alginates sont d'abord déposés sous forme de polymannuronates. Les acides mannuroniques peuvent ensuite être convertis en acides guluroniques dans la paroi par une réaction d'épimérisation catalysée par l'enzyme Mannuronane C5-épimérase (ManC5-E). Les blocs GG ont la particularité de pouvoir s'associer à des cations divalents, généralement le calcium, et de former des jonctions de type « boîte à œufs » (Fig. 8) (Grant *et al.*, 1973), de façon analogue à ce qui est observé pour les pectines dé-estérifiées chez les plantes (Grant *et al.*, 1973). La formation de deux chaînes antiparallèles augmente ainsi la résistance mécanique du gel (Draget *et al.*, 2005). Différentes propriétés rhéologiques sont observées selon la proportion entre les deux motifs M et G. La proportion en motifs M et G est variable chez un même individu en fonction du stade de développement, de l'âge du tissu et du type d'organe. Des variations saisonnières ont été observées, comme chez *Undaria pinnatifida* où une proportion en blocs GG est plus importante au cours du printemps et de l'été, période de croissance soutenue de l'algue (Skriptsova *et al.*, 2004). Enfin, de nombreux facteurs environnementaux tels que la pollution, les vagues, le courant, la lumière ou encore la température de l'eau peuvent influencer la structure des alginates (Percival & McDowell, 1967 ; Andrade *et al.*, 2010).

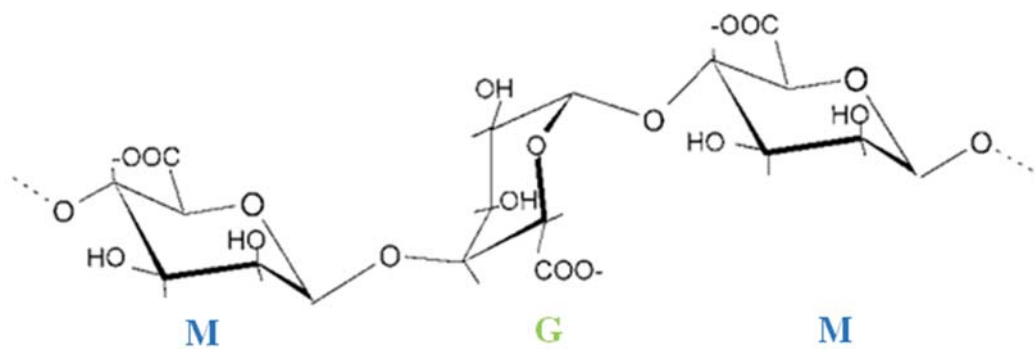
### Bloc homopolymérique d'acide mannuronique (M)



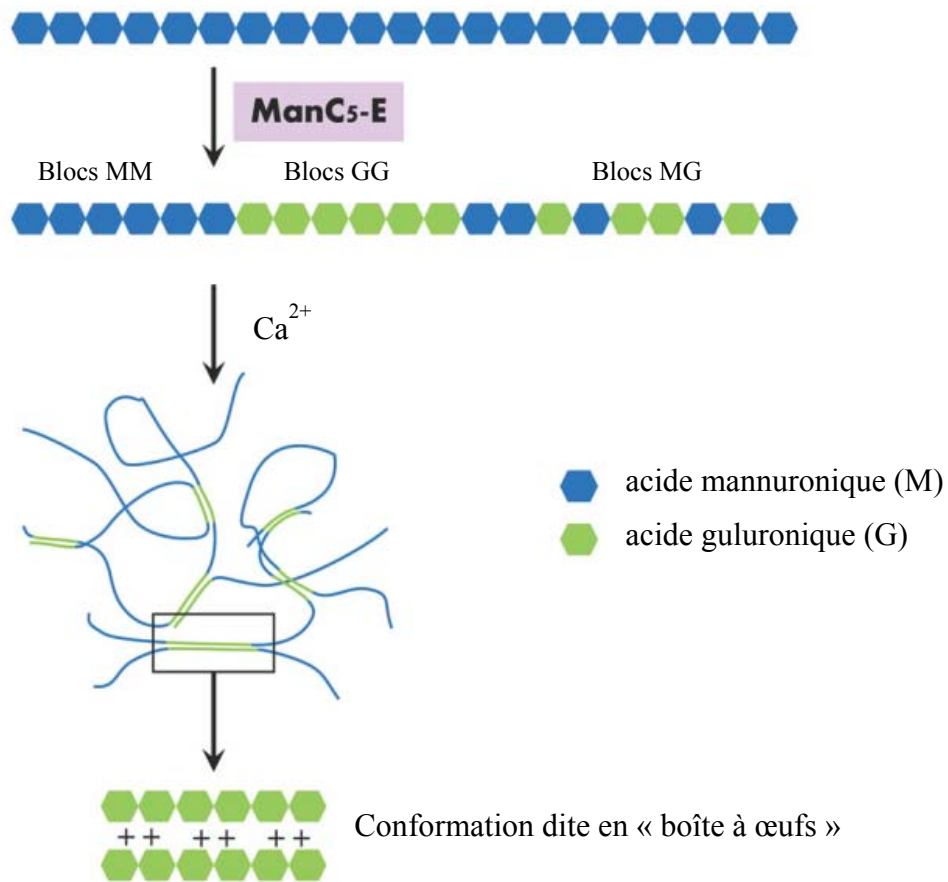
### Bloc homopolymérique d'acide guluronique (G)



### Bloc hétéropolymérique MG



**Figure 7 :** Structure chimique de l'alginate (adapté de Küpper *et al.*, 2001).



**Figure 8 :** Représentation schématique de l'effet des enzymes ManC5-Es sur la structure des alginates (d'après Fischl *et al.*, 2016).

## ii. Intérêts industriels des alginates

Les propriétés des alginates ont été étudiées pour la première fois en 1881 (E.C.C Stanford, 1881). Ces phycocoloïdes sont des agents texturants polyvalents particulièrement appréciés dans de nombreuses industries, où ils sont utilisés comme épaississants, gélifiants, émulsifiants et stabilisants. Leurs propriétés rhéologiques sont utilisées dans de nombreux domaines. Dans l'industrie agro-alimentaire, les alginates sont utilisés en tant qu'additifs alimentaires (E 400 à E 405) et sont présents dans une large gamme de produits comme les denrées glacées où ils contrôlent la formation de cristaux lors de la congélation et participent aux propriétés organoleptiques (goût et texture en bouche), ou encore dans la bière où ils sont utilisés comme stabilisateurs de mousses. Dans le domaine médical et pharmacologique, les alginates sont par exemple utilisés en tant que biomatériaux, ou encore comme agents enrobants pour des molécules actives. Par exemple, ces capsules peuvent servir à libérer des médicaments, mais aussi de l'ADN lors de thérapies géniques, des cellules vivantes lors de traitements contre le cancer ou le diabète (Basta *et al.*, 1995 ; Pannier & Shea 2004 ; Hao *et al.*, 2005 ; Matricardi *et al.*, 2008). Dans l'industrie cosmétique, ils sont souvent présents dans les crèmes hydratantes ou encore les pâtes dentifrices. On les retrouve également dans l'industrie textile pour la fixation des colorants ou encore dans la papeterie pour les traitements de surface des papiers comme le glaçage. Les informations données ici ne sont pas exhaustives, mais donnent un aperçu de l'importance des alginates dans l'industrie.

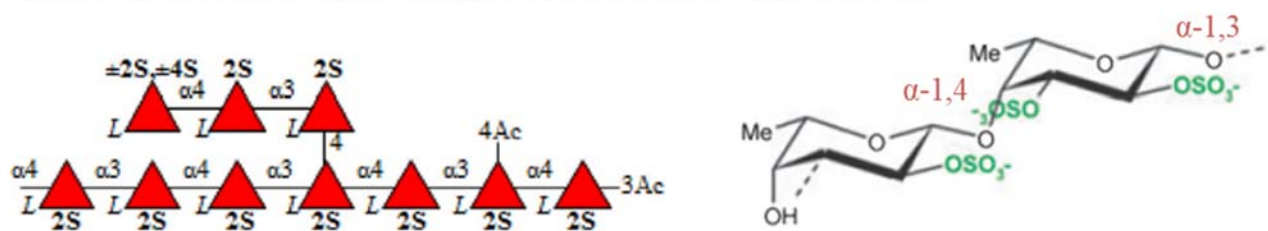
### b. Les fucanes

#### i. Définition et composition des fucanes

Différentes définitions ont été utilisées au cours du temps et dans différentes revues. Le terme "polysaccharides sulfatés contenant du fucose" (FCSPs) est un terme généraliste utilisé pour parler des fucanes et fucoïdanes sulfatés chez les algues brunes (Ale & Meyer, 2013 ; Deniaud-Bouët *et al.*, 2014 ; Deniaud-Bouët *et al.*, 2017). Ici, nous emploierons le terme « fucanes » au sens large pour parler des polysaccharides sulfatés contenant du fucose présents dans la paroi des algues brunes. Les fucanes sulfatés sont des polysaccharides très hétérogènes et complexes. Ils sont constitués de résidus d' $\alpha$ -L-fucosyl, plus ou moins ramifiés, substitués et sulfatés (Deniaud-Bouët *et al.*, 2014). Ces polymères sont riches en acides uroniques et peuvent être branchés avec des résidus de xyloses, de galactoses ou de fucoses (Ficko-Blean *et al.*,

2015). Selon les espèces, la phase du cycle de vie et de la saison, de nombreuses variations de leurs structures chimiques ont été reportées (Anastyuk *et al.*, 2012 ; Deniaud-Bouët *et al.*, 2017). Ces variations concernent à la fois les liaisons glycosidiques de la chaîne principale, la nature et la position des ramifications. Le groupement sulfate peut être localisé en O2, O3 ou O4 (Ale *et al.*, 2011) et certains auteurs ont décrit des phénomènes d'acétylation (Chizhov *et al.*, 1999 ; Pomin & Mourao 2008). Ainsi, les fucanes des Fucales sont composés de nombreuses répétitions de résidus fucoses liés alternativement en  $\alpha$ -1,3 et  $\alpha$ -1,4 et sulfatés en C2 et/ou C3, alors que ceux des Ectocarpales et des Laminariales sont constitués de résidus fucoses liés en  $\alpha$ -1,3 et sulfatés en C4 (Fig. 9) (Chevolot *et al.*, 2001 ; Berteau & Mulloy, 2003 ; Bilan *et al.*, 2006 ; Michel *et al.*, 2010 ; Deniaud-Bouët *et al.*, 2017).



#### Exemple d'un fucane sulfaté typique observé dans l'ordre des Fucales



#### Exemple d'un fucane sulfaté typique observé dans l'ordre des Ectocarpales



Clé:

 Fucose	 Acide glucuronique	<b>S</b> : Sulfate	<b>Ac</b> : Acétyl
--	--	--------------------	--------------------

**Figure 9** : Structures chimiques des fucanes sulfatés constituant la paroi des Fucales et des Ectocarpales (adapté de Michel *et al.*, 2010 ; Deniaud-Bouët *et al.*, 2017).



## ii. Exemples de valorisation des fucanes

Comme d'autres polysaccharides sulfatés d'algues et d'invertébrés, les fucanes d'algues brunes ont diverses fonctions biologiques. Par exemple, ces molécules d'intérêt biomédical sont des agents anticoagulants puissants du sang de mammifères et représentent une source potentielle de composés pour les thérapies antithrombotiques (Colliec *et al.*, 1991 ; Nishino *et al.*, 1991 ; Cumashi *et al.*, 2007 ; Pomin & Mourão 2008 ; Deniaud-Bouët *et al.*, 2017). Ils sont étudiés pour leurs effets anticancéreux avec des fonctions dans l'apoptose, les métastases, l'angiogenèse et le mécanisme du signal de croissance sur le cancer (Senthilhumar *et al.*, 2013 ; Anastyuk *et al.*, 2017 ; Deniaud-Bouët *et al.*, 2017). Par exemple, en limitant l'angiogenèse, c'est-à-dire la fabrication des vaisseaux sanguins irrigant la tumeur cancéreuse, les fucanes réduisent l'alimentation en sang de la tumeur qui cessera alors de se développer. En inhibant le recrutement des leucocytes, les fucanes ont des fonctions anti-inflammatoires (Cumashi *et al.*, 2007 ; Deniaud-Bouët *et al.*, 2017). Ils ont également des fonctions dans la régulation des réponses immunitaires, dans l'homéostasie, des propriétés anti-oxydantes, anti-infectieuses ou encore anti-adhésives (Cumashi *et al.*, 2007 ; Deniaud-Bouët *et al.*, 2017).

## c. Les $\beta$ -glucanes

### i. La cellulose

Dans la paroi, la cellulose forme une petite fraction cristalline. Elle est constituée de motifs de cellobiose, c'est-à-dire de monomères de glucoses reliés par des liaisons  $\beta$ -1,4. La continuité de ces motifs forme des polymères linéaires qui s'associent entre eux pour constituer des microfibrilles de cellulose. Leur cohésion est assurée par des liaisons hydrogènes qui s'établissent d'une macromolécule à l'autre et offrent à la paroi une propriété de résistance importante. Alors que la paroi des plantes contient en moyenne 30% de cellulose, la paroi des algues brunes en contient moins de 8% du poids sec (Cronshaw *et al.*, 1958).

### ii. Les $\beta$ -1-3-glucanes

Les  $\beta$ -1-3-glucanes sont connus sous le nom de callose chez les plantes terrestres où ils peuvent se former en réponses à des plaies ou des infections (Underwood, 2012). La callose est

également présente dans la paroi des algues vertes, rouges et des champignons. Récemment, ce composé a été mis en évidence chez les algues brunes *et* auraient également un rôle lors de réponses infectieuses (Tsirigoti *et al.*, 2014 ; Raimundo *et al.* 2016)

### iii. Les « Mixed-Linkage-Glucans »

Les Mixed-Linkage-Glucans (MLG) identifiés chez les algues brunes sont des unités trisaccharidiques de résidus de glucoses contigus et liés par des liaisons  $\beta$ -1,4 (Salmeán *et al.*, 2017). Ces trisaccharides sont reliés entre eux par des liaisons  $\beta$ -1,3. Leur conformation très régulière permet a priori un alignement des molécules et la formation d'une fraction polysaccharidique cristalline (Salmeán *et al.*, 2017).

### d. Les AGPs

Les AGPs constituent une famille de macromolécules complexes qui sont parfois comparées par analogie aux mucines et aux glycosaminoglycanes (GAG) présents à la surface des cellules animales (Bacic *et al.*, 2000). Elles sont constituées d'une partie peptique minoritaire et d'une partie polysaccharidique majoritaire (Fig. 10). Le corps peptidique représente entre 1 et 10% de la masse moléculaire (Osman *et al.* 1995). Ce dernier est riche en alanine, thréonine, glycine, sérine et en proline/hydroxyproline. Les prolines sont hydroxylées au niveau du réticulum endoplasmique en hydroxyprolines *via* l'enzyme prolyl 4-hydroxylase. Ces hydroxyprolines permettent les futures glycosylations. La partie glycanique peut représenter jusqu'à 90% de la masse de la molécule, et est associée au corps peptidique *via* des O-glycanes fixées aux hydroxyprolines. Elle est majoritairement composée de monosaccharides d'arabinoses et de galactoses. Chez les plantes, les AGPs peuvent être divisées en deux catégories : les AGPs « classiques » et les AGPs « non classiques » (Schultz *et al.*, 2000). Les AGPs classiques ont un corps protéique constitué d'un peptide signal à l'extrémité N-terminale et d'une ancre Glycosyl-Phosphatidylinositol (GPI) à l'extrémité C-terminale. Cette ancre permet un ancrage des AGPs au niveau membranaire. Les AGPs non classiques ne possèdent pas d'ancre GPI et possèdent des corps protéiques constitués, en plus de domaine riche en proline/hydroxyproline, de motifs riches en cystéine, lysine ou asparagine.

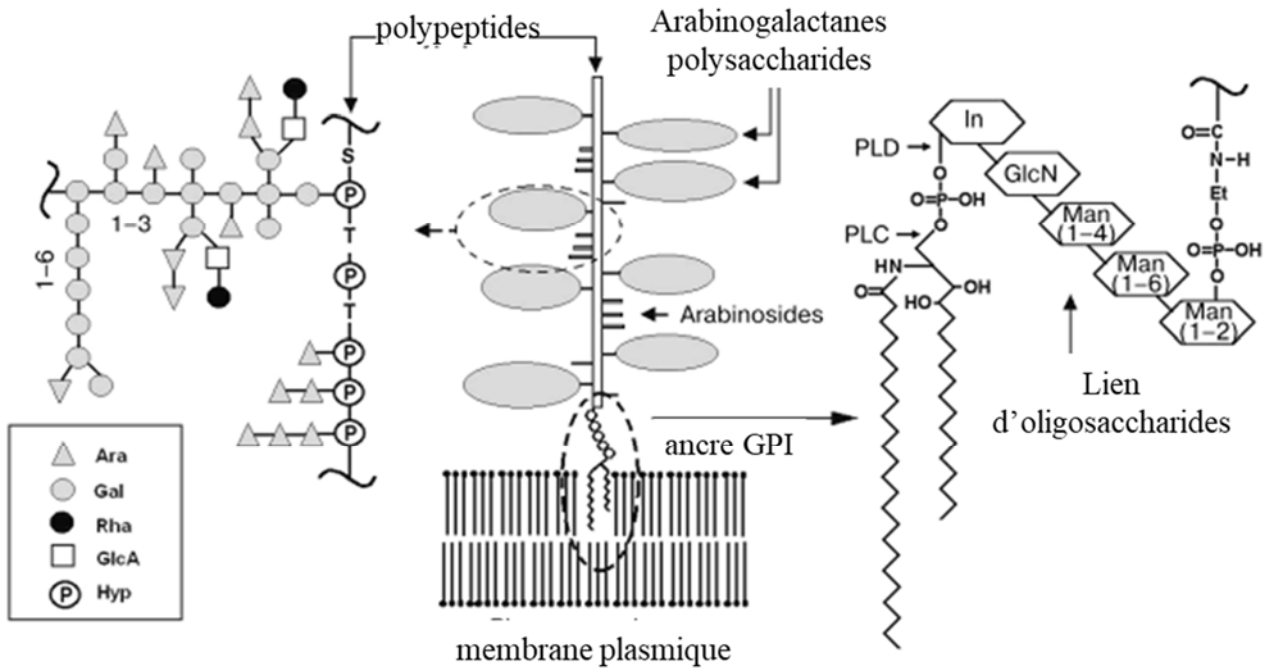
Afin d'étudier la localisation et les fonctions des AGPs, différents outils sont disponibles. Les AGPs peuvent être détectés dans la paroi *via* une coloration avec des réactifs de Yariv (Yariv *et al.*, 1962) ou *via* des anticorps anti-AGPs spécifiques d'une fraction polysaccharidique ou peptidique du protéoglycane (Seifert & Roberts, 2007). Les réactifs de Yariv sont des phénylglycosides. Les réactifs  $\beta$ -D-galactosyl ( $\beta$ GalY) et  $\beta$ -D-glucosyl ( $\beta$ GluY) de Yariv se lient spécifiquement aux AGPs et les précipitent (Yariv *et al.*, 1962 ; Yariv *et al.*, 1967). En revanche, les réactifs  $\alpha$ -D-mannosyl et  $\alpha$ -D-galactosyl de Yariv ne se lient pas aux AGPs et peuvent être utilisés comme contrôles négatifs. La précipitation des AGPs donnera une coloration rouge-orangée aux tissus contenant ces glycoprotéines. Les réactifs de Yariv peuvent être utilisés en histochimie pour détecter la présence d'AGPs. Ils sont également utilisés pour quantifier les AGPs dans des extraits. Ajouté dans les milieux de cultures, ils inhibent l'action des AGPs *in vivo* dans la paroi des organismes, permettant d'étudier leurs fonctions. Cependant, les interactions entre les AGPs et ces réactifs restent assez mal connus (Yariv *et al.*, 1967). Les anticorps anti-AGPs sont beaucoup plus spécifiques que les réactifs de Yariv et vont reconnaître des motifs peptidiques ou polysaccharidiques particuliers. Plusieurs anticorps polyclonaux et monoclonaux sont disponibles et couramment utilisés. Par exemple, l'anticorps JIM13 reconnaît le motif de carbohydrates  $\beta$ -D-GlcA-(1,3)- $\alpha$ -D-GalA-(1,2)- $\alpha$ -L-Rha (Yates *et al.*, 1996), alors que l'anticorps PAP est spécifique d'un domaine peptidique riche en lysine (Gao *et al.*, 1999). L'utilisation des réactifs de Yariv et des anticorps anti-AGPs offrent un certain panorama de la distribution et des possibles fonctions des AGPs. Des approches génétiques peuvent également être utilisées et permettent des analyses plus fines et plus précises de ces molécules.

Chez les plantes, ces molécules particulières sont localisées au niveau des membranes plasmiques, des espaces inter-cellulaires, dans les exsudats et les milieux de cultures liquides (Anderson *et al.*, 1977 ; van Hengel *et al.*, 2001 ; Borderies *et al.*, 2004). Chez les plantes, la distribution des AGPs est variable en fonction de l'organe, des tissus ou du stade de développement (Schinder *et al.*, 1995). De nombreuses fonctions biologiques sont associées aux AGPs telles que la défense des plantes, la signalisation hormonale, la tolérance au sel ou encore les interactions avec des micro-organismes (Li & Showalter, 1996; Suzuki *et al.*, 2002; Park *et al.*, 2003; Lamport *et al.*, 2006 ; Cannesan *et al.*, 2012). Les AGPs interviennent également dans les processus de croissance et de développement. Elles ont par exemple une implication dans la croissance du tube pollinique (Mollet *et al.*, 2002 ; Wu *et al.*, 2000), dans l'embryogénèse ou encore la différenciation cellulaire (Schinder *et al.*, 1995;

Zhang *et al.*, 2004). Différents modes d'actions des AGPs ont été proposés, dont 5 modèles par Showalter (2001). Les AGPs pourraient agir comme des molécules de signalisation :

- par libération d'un oligosaccharide
- par liaison directe ou indirecte d'une AGP et d'un ligand
- par l'interaction d'une AGP d'une cellule avec un récepteur appartenant à une autre cellule (signalisation intercellulaire)
- par libération de l'ancre GPI après action d'une phospholipase C ou D

Elles pourraient également participer à l'adhésion cellulaire et jouer un rôle dans les interactions entre la membrane plasmique et la paroi. La mise en évidence des AGPs chez les algues brunes et une étude fonctionnelle associée sont plus amplement détaillées dans le chapitre 3 de ce manuscrit.



**Figure 10** : Structures des arabinogalactanes protéines (Rumyantseva, 2005).

## 2. Des polysaccharides, mais pas seulement ...

Outres ces constituants saccharidiques, la paroi cellulaire contient une minorité de protéines (Quatrano & Stevens, 1976), de composés phénoliques halogénés et / ou sulfatés connus sous le nom de phlorotannins (Vreeland *et al.* 1998 ; Schoenwaelder & Wiencke 2000 ; Meslet-Cladière *et al.*, 2013), ainsi que des composés halogénés comme l'iodure (Deniaud-Bouët *et al.*, 2014, Verhaeghe *et al.*, 2008) (Fig. 6).

### B. Organisation générale de la paroi

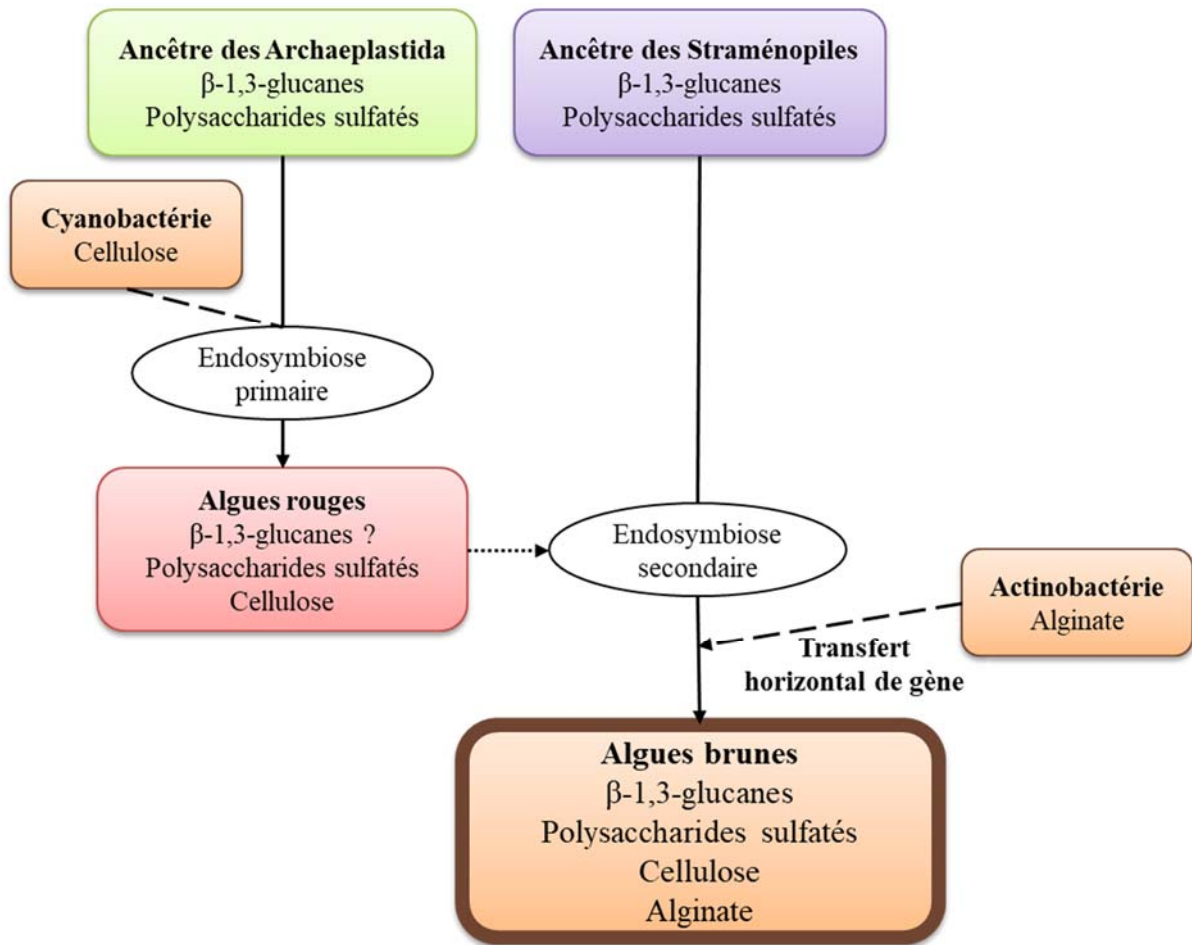
Si de nombreuses études ont été réalisées pour comprendre l'architecture globale et l'agencement des différents composés de la paroi chez les plantes terrestres, très peu sont disponibles pour la paroi des algues brunes. A ce jour, la connaissance de l'architecture de la paroi chez les algues brunes est encore partielle. En 2014, une étude réalisée chez 5 espèces de Fucales a permis d'appréhender l'architecture pariétale de la paroi des algues brunes (Fig. 6) (Deniaud-Bouët *et al.*, 2014). Cette étude a révélé une association entre des fucanes sulfatés, des protéines et de la cellulose alors que les alginates seraient plutôt associés à des composés phénoliques. Une autre étude indique que les épitopes de MLG pourraient-être associées aux alginates (Salméan *et al.*, 2017).

### C. Origine et évolution des principaux polysaccharides de paroi

Les composés polysaccharidiques qui constituent la paroi des algues brunes ont des histoires évolutives complexes (Michel *et al.*, 2010). En effet, l'évolution des différentes lignées photosynthétiques dans l'arbre de vie des eucaryotes s'explique par différents évènements endosymbiotiques (Fig. 2). L'apparition des premiers organismes photosynthétiques oxygéniques résulte de l'acquisition des plastes il y a entre 1,5 et 2 milliards d'années. Cette acquisition a été permise par une endosymbiose primaire. Elle résulte de l'absorption d'une bactérie photosynthétique (cyanobactérie) par une cellule eucaryote unicellulaire. Cette endosymbiose primaire est à l'origine de la lignée verte (algues vertes et plantes terrestre), des rhodophytes et des glaucophytes. Il y a environ 1 milliard d'années, une endosymbiose secondaire a permis l'émergence des lignées Rhizaria, Alvéolés et

Straménopiles. Elle est le résultat de l'intégration d'une algue rouge unicellulaire par une cellule autotrophe eucaryote primitive. Néanmoins, des études récentes sous-entendent que plusieurs évènements endosymbiotiques secondaire ou tertiaire pourraient avoir contribué à la lignée des Straménopiles (Facchinelli *et al.*, 2013 ; Archibald, 2015). En effet, des restes génétiques d'une possible incorporation antérieure d'une algue verte, endosymbiose cryptique, avant l'évènement endosymbiotique avec une algue rouge ont été identifiés.

A partir du génome d'*Ectocarpus*, une analyse des voies putatives de synthèse des principaux polysaccharides de la paroi des algues brunes a été effectuée (Fig. 11) (Michel *et al.* 2010). Les travaux présentés par Michel et collaborateurs mettent en évidence une acquisition des étapes terminales de la biosynthèse de l'alginate (ManC5-E) par un transfert horizontal de gènes à partir d'une Actinobactérie, qui se serait produit après l'évènement d'endosymbiose secondaire. La cellulose, commune aux Oomycètes et aux algues brunes, a probablement été acquise au moment de l'endosymbiose secondaire, et aurait pour origine une algue rouge. Enfin, la voie de biosynthèse des polysaccharides sulfatés, les fucanes chez les algues brunes, serait une voie ancestrale, conservée avec les animaux. Contrairement au milieu marin, le milieu terrestre est pauvre en sulfate. L'adaptation fonctionnelle des plantes terrestres à cet habitat a probablement générée l'évolution d'autres composés ou des effets de compensations, et entraîné la perte des gènes nécessaires à la sulfatation des polysaccharides pariétaux (Michel *et al.*, 2010 ; Olsen *et al.*, 2016).



**Figure 11 :** Origine et évolution des principaux polysaccharides de la matrice extracellulaire des Straménopiles (adapté de Michel *et al.*, 2010).



#### D. Biosynthèses et remodelage des principaux composés de paroi

Les analyses récentes du génome d'*E. siliculosus* (Cock *et al.*, 2010), de *S. japonica* (Ye *et al.*, 2016) et de *C. okamuranus* (Nishitsuji *et al.*, 2016) ont permis d'identifier des gènes candidats des voies de biosynthèses des polysaccharides pariétaux chez les algues brunes. Pour le moment, l'étape terminale de la voie de biosynthèse des alginates (ManC5-E) est la mieux connue.

Chez tous les organismes vivants, les enzymes responsables de la synthèse (glycosyltransférases (GT)), de la dégradation et de la modification des glucides (glycosides hydrolases (GH), polysaccharides lyases (PL), carbohydrate-estérases (CE) et enzymes auxiliaires à activité redox (AA)) sont regroupés sous le terme de CAZymes (Carbohydrate active enzymes). Une partie des voies et des gènes impliqués dans la biosynthèse de ces polysaccharides ont respectivement été prédites à partir de l'analyse des voies de synthèses des polysaccharides bactériens et eucaryotes (Michel *et al.*, 2010). Les étapes de biosynthèse prédites des alginates et des fucanes chez les algues brunes sont disponibles dans la [figure 12](#).

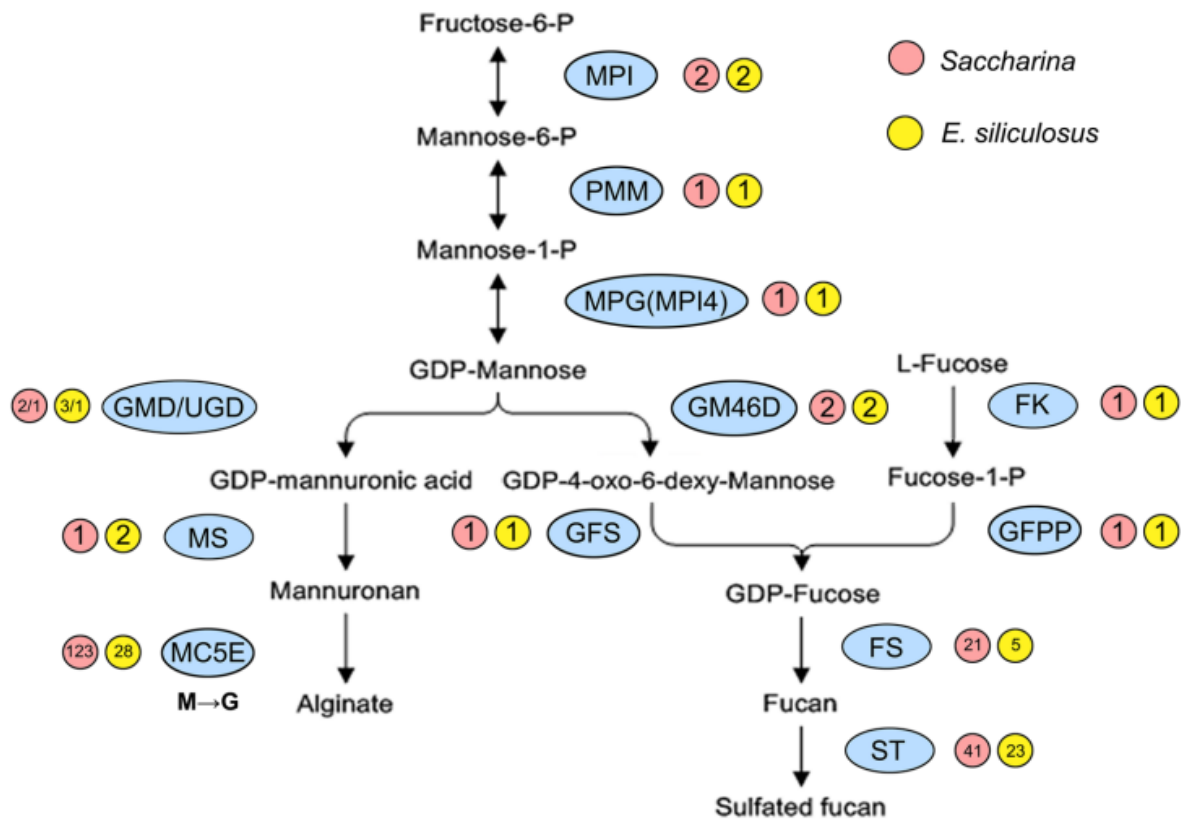
Si entre *E. siliculosus* et *C. okamuranus*, les nombres de gènes prédits pour la biosynthèse des alginates et des fucanes sont similaires (Nishitsuji *et al.*, 2016), les gènes impliqués dans l'étape terminale, c'est-à-dire les ManC5-Es, les fucosyltransférases (FSs) et les sulfotransférases (STs) sont plus nombreux dans le génome de *S. japonica* (Ye *et al.*, 2016) ([Fig. 12](#)). Les FT et les ST sont respectivement impliqués dans le transfert d'un fucose d'un donneur à un accepteur et l'addition de groupement sulfate sur des substrats carbonés. Cette différence peut être expliquée par la complexité plus importante de ses tissus et de ses organes (Ye *et al.*, 2016).

Actuellement, la connaissance des mécanismes impliqués dans le remodelage de la paroi cellulaire chez les algues brunes est assez limitée. Parmi les gènes prédits, seuls trois ont fait l'objet d'analyses confirmant leurs fonctions. Une seule GDP-mannose 6-déshydrogénase (GMD1) (Tenhaken *et al.*, 2011) et deux ManC5-E ont été isolées et caractérisées (Fischl *et al.*, 2016 ; Inoue *et al.*, 2016). La disponibilité de protéines hétérologues actives offre la possibilité de confirmer la prédiction de leurs rôles respectifs et d'étudier leurs fonctions. Toutefois, l'expression d'enzymes algales dans des systèmes hétérologues reste difficile (Fischl *et al.*, 2016). Jusqu'à présent, outre les ManC5-E, les STs et les sulfatases (qui catalysent l'hydrolyse de groupements sulfates), aucune cellulase, alginates lyase ou encore fucanase n'a

été identifiée dans les génomes des algues brunes séquencés (Cock *et al.*, 2010; Michel *et al.*, 2010; Nishitsuji *et al.*, 2016 ; Ye *et al.*, 2016 ).

A ce jour, les enzymes connues pour dégrader les alginates et les fucanes, respectivement les alginates lyases et les fucanases ont toutes une origine bactérienne. Il est possible que les enzymes de dégradation des polysaccharides algaux connues soient trop divergentes pour trouver des homologues de séquences avec les protéines bactériennes et pourraient constituer de nouvelles familles (Michel *et al.*, 2010). Les bactéries marines sont capables de dégrader la paroi de différentes algues, et peuvent utiliser de nombreux polysaccharides comme seule source de carbone. A partir de ce potentiel de dégradation, différentes enzymes ont été produites de manières hétérologues. Par exemple, une fucanase FcnA originaire de *Marineflexile fucanivorans* (Colin *et al.*, 2006), une alginate M-lyase issus de *Pseudoalteromonas alginovora* (Lundqvist *et al.*, 2012) et une G-lyase AlyA1 de *Zobellia galactanivorans* (Thomas *et al.*, 2013) peuvent être utilisées pour dégrader *in situ* certaines fractions polysaccharidiques de la paroi des algues brunes.

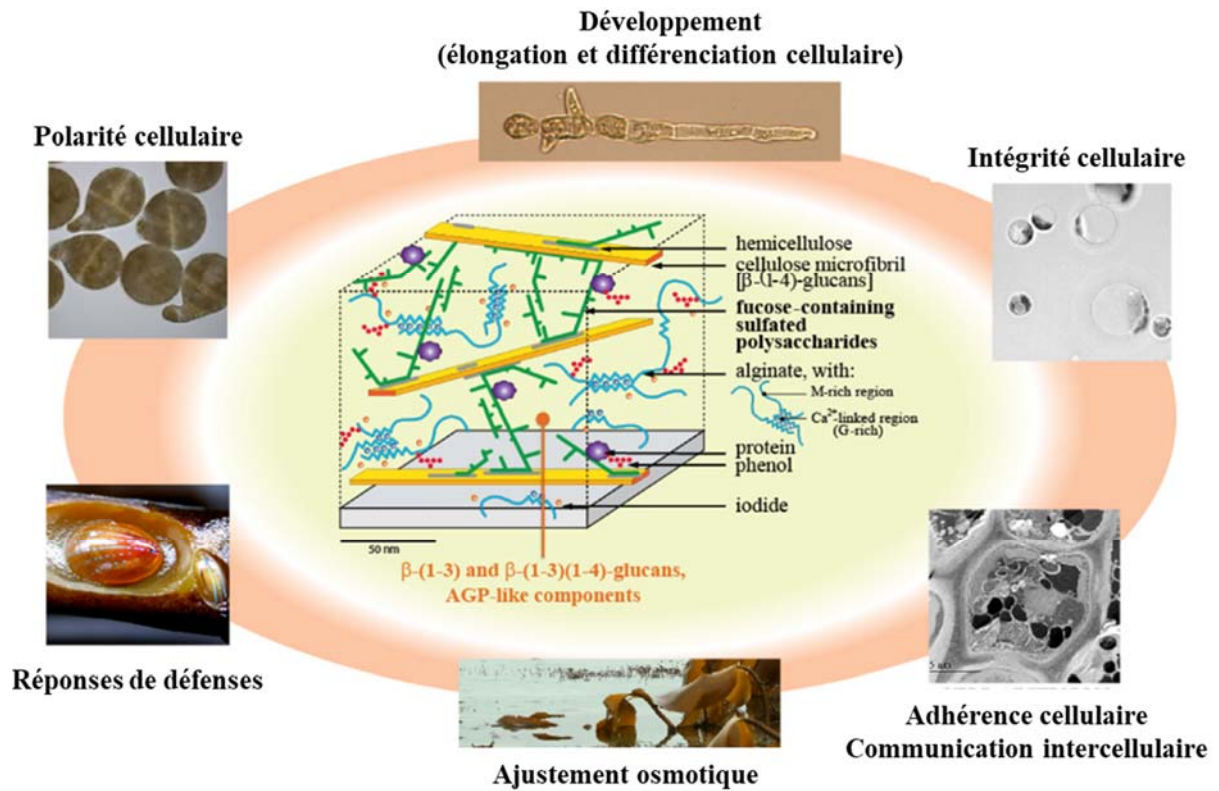
Que ce soit chez les plantes ou chez les algues, le compartiment pariétal intervient dans de nombreuses fonctions autorisées par la complexité et la dynamique de sa composition.



**Figure 12 :** Voies prédites de biosynthèse des alginates et des fucanes sulfatés chez les algues brunes (Chi *et al.*, 2017). Pour le moment, aucun gène homologue de la MPG n'a été identifié dans le génome des algues brunes séquencées. Les nombres de gènes identifiés dans le génome de *Saccharina* et d'*E. siliculosus* sont mentionnés à côté de chaque enzyme. MPI : mannose-6-phosphates isomérase ; PMM : phosphomanno-mutase ; MPG : mannose-1-phosphate guanylyltransférase ; GMD/UGD : GDP-mannose déshydrogénase / UDP-glucose 6-déhydrogenase ; ManC5-E : Mannuronane-C5-épimérase ; GM46D : GDP-mannose 4,6-déhydratase ; GFS : GDP-fucose synthétase ; FK : fucokinase ; GFPP : GDP-fucose pyrophosphorylase ; FS : fucosyltransférase ; ST : sulfotransférase.

### III. Les nombreuses fonctions de la paroi

Le compartiment pariétal joue de nombreux rôles biologiques essentiels (Fig. 13). D'un point de vue physique, la paroi des végétaux joue un rôle structurant primordial. En apportant une résistance importante, elle confère une forme à la cellule qu'elle entoure. Elle contribue également à la cohésion cellulaire nécessaire à la multicellularité. Chez les algues brunes, la paroi intervient dans les mécanismes de défense face à des stress biotiques, c'est-à-dire causés par d'autres organismes vivants (Davison & Pearson 1996; Potin *et al.*, 1999 ; Küpper *et al.*, 2001). Les algues brunes sont les proies de nombreux brouteurs, pathogènes, épiphytes, endophytes ou parasites. Les pathogènes et les parasites peuvent être de différentes natures : animaux, algues, champignons, bactéries. La paroi est essentielle dans la mise en place de mécanismes de résistance face à ces stress. Par exemple, chez *L. digitata*, des fragments de paroi, et plus particulièrement des oligo-(GG) induisent des réponses de défenses *via* un burst oxydatif (Küpper *et al.*, 2001). Ce burst oxydatif génère une production rapide, massive et transitoire de peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) et permet à l'algue de lutter contre les organismes brouteurs qui dégradent sa paroi. La paroi intervient également dans les réactions de défense face à des stress abiotiques, c'est-à-dire des variations physico-chimique de l'environnement (Davison & Pearson 1996), et dans les mécanismes du développement (Kropf *et al.*, 1988 ; Berger *et al.*, 1994 ; Bail *et al.*, 2011 ; Arun *et al.*, 2013). Ces deux fonctions sont abordées plus en détail ci-dessous.



**Figure 13 :** Représentation schématique des rôles clés joués par la paroi des algues brunes (Deniaud-Bouët *et al.*, 2017). Les rôles biologiques sont illustrés par des photographies avec : des zygotes de *Fucus serratus* (polarité cellulaire), la croissance d'*E. siliculosus* (développement), des protoplastes dérivés d'*E. siliculosus* (intégrité tissulaire), des cellules corticales d'un stipe de *Saccharina latissima* (adhérence cellulaire), des laminaires à marée basse dans la baie de Roscoff en Bretagne (ajustement osmotique), des helicostomes qui se nourrissent principalement de laminaires en creusant une cavité (réponses de défenses).

## A. La paroi : une interface d'échange avec le milieu extérieur

### 1. Le milieu marin : un environnement particulier

Si environ 80% des algues vertes sont retrouvées en eau douce, les algues rouges et les algues brunes sont essentiellement marines. Les algues brunes sont très rares en eau douce (Guiry & Guiry 2015). Sur environ 2000 espèces, seulement 7, soit 0.35% ont été trouvées en eau douce (Dittami *et al.*, 2017).

L'eau douce est définie avec une salinité  $\leq 5$ g de sel dissous par litre (international Symposium for the Classification of Brackish Water 1958). Généralement les lacs et rivières contiennent une salinité d'environ 0,12 g/L de sel (Wetzel, 2001 ; Dittami *et al.*, 2017). La composition de l'eau douce est beaucoup plus variable que celle de l'eau de mer, et dépend de l'environnement terrestre qui l'entoure (Dittami *et al.*, 2017). De nombreux facteurs influencent la composition chimique de l'eau douce comme : les interactions chimiques avec le sol, le contexte géologique, l'érosion, la qualité et la quantité des précipitations, la température, le débit d'écoulement, l'absorption des nutriments et les transformations chimiques et biologiques (Feller, 2009 ; Dittami *et al.*, 2017).

Contrairement à l'eau douce, le milieu marin possède une forte salinité. La composition de l'eau de mer est un mélange complexe d'anions, de cations et de molécules. On considère que l'eau de mer est constituée de 11 constituants majeurs qui sont par ordre décroissant : le chlorure, le sodium, le sulfate, le magnésium, le calcium, le potassium, le bicarbonate, le bromure, l'acide borique, le carbonate et le fluorure. Les compositions générales de l'eau douce et du milieu marin sont comparées dans le [tableau 2](#). La salinité de l'eau de mer varie à la surface du globe terrestre, en fonction de la latitude, de l'ouverture des mers vers les océans, de leurs dimensions ou encore des apports terrestres et des courants. Cependant, il est généralement admis que la salinité de la majorité des eaux de mer du globe a une valeur proche de 35 g/kg. Certains environnements marins comme la mer Noire ou la mer Morte ont des salinités très différentes avec respectivement des valeurs de 12 g/kg et 275 g/kg. Si la salinité du milieu marin est relativement constante à travers les océans ouverts, elle est fortement variable dans les estuaires et les eaux côtières. Dans ces systèmes, la salinité dépend du bilan évaporation-précipitations-écoulement.

		Eau de mer	Eau douce
Salinité globale		30-70 g/L	< 0,5g/L
Anions	Chlorure (Cl <sup>-</sup> )	540 mM	0,27 mM
	Sulfate (SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> )	28 mM	0.12 mM
	Bicarbonate (HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )	2,8 mM	<16 mM
	Bromure (Br <sup>-</sup> )	800 μM	<12 μM
	Nitrate (NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )	0,01-50 μM	< 1mM
	Nitrite (NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> )	0,01-5 μM	<100 μM
	Phosphate (PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> )	2,5 μM	<10 μM
	Silicate (SiO <sub>4</sub> <sup>4-</sup> )	0-180 μM	1-500 μM
	Iodure (I <sup>-</sup> )	0,5 μM	0,1-40 nM
Cations	Sodium (Na <sup>+</sup> )	500 mM	0,27 mM
	Magnésium (Mg <sup>2+</sup> )	54 mM	0,17 mM
	Calcium (Ca <sup>2+</sup> )	10 mM	0,37 mM
	Potassium (K <sup>+</sup> )	9,7 mM	0,06 mM
	Strontium (Sr <sup>2+</sup> )	90 μM	< 50 μM
	Ammonium (NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> )	0,1 -5 μM	<20μM

**Tableau 2 : Composition de l'eau de mer et de l'eau douce** (selon [Dittami et al., 2017](#)).

En milieu marin, si certaines macro-algues brunes géantes (les kelps) comme les Laminaires restent majoritairement totalement immergées et ne sont que rarement soumises aux fluctuations des marées, la majorité des algues brunes vivent dans une zone particulière, la zone intertidale, où les pressions abiotiques sont quotidiennes et fortement variables. Cette zone, également appelée estran représente une zone intermédiaire entre le milieu terrestre et le milieu marin. Les organismes qui y vivent sont soumis aux balancements quotidiens des marées, et par conséquent à des changements physico-chimiques réguliers et importants.

## 2. Adaptation aux contraintes abiotiques de l'environnement

En étant la première interface avec l'environnement, le compartiment pariétal joue un rôle essentiel dans les mécanismes de défenses face aux stress abiotiques générés par les nombreuses variations mécaniques et physico-chimique de l'environnement. Parmi ceux-ci, on peut citer les stress mécaniques, lumineux, de dessiccation, les variations de température et de salinité (Davison & Pearson 1996), dont les 5 derniers sont fortement influencés par les conditions climatiques. Les stress mécaniques sont générés par l'hydrodynamisme de l'eau qui est créé à la fois par le phénomène de marée et par l'action du vent créant des vagues. Le stress lumineux est principalement observé à marée basse. En effet, lors de l'immersion des algues, l'eau absorbe les rayons lumineux dont les UVs qui peuvent être à l'origine de dommages importants par la production de radicaux libres ou de cassures des brins d'ADN. Selon la marée et les conditions météorologiques, la température peut varier jusqu'à 10°C dans la même journée pouvant entraîner chez les organismes exposés, des changements moléculaires importants. Enfin, les périodes de marées basses entraînent des stress de dessiccation et de salinité importants. Tout comme la dessiccation, une forte salinité reflète une forme de privation d'eau. Alors que la dessiccation conduit à une forte déshydratation cellulaire, le stress salin modifie le potentiel hydrique. Les conditions climatiques aggravent fortement ces deux types de stress. Lors de l'émersion, les algues peuvent perdre, de façon réversible, jusqu'à 90% de leur quantité d'eau intracellulaire (During & Brown, 1982). Un stress hyposalin peut être généré par l'eau de pluie, la neige ou de l'eau de fonte. En revanche, un stress hypersalin ou de dessiccation sera engendré par l'évaporation lors de période de forte insolation en été ou de la congélation de l'eau douce en hiver. Ainsi, dans les eaux de l'Arctique, les espèces d'algues peuvent être fortement affectées par l'eau de fonte des glaces (Hanelt *et al.*, 2001; Karsten *et al.*, 2003). Pour ces mêmes raisons, de fortes conditions hypo- ou hypersalines sont également observées dans les trous d'eau formés dans la roche.

La composition de la paroi joue un rôle dans lutte contre ces différentes contraintes. Contre les pressions mécaniques, la paroi intervient par exemple à travers la structure de ces alginates. Ainsi, la richesse en blocs GG du crampon des algues leur permet d'être solidement attachées à leur substrat, alors que les frondes des laminaires sont riches en blocs MM afin de suivre le mouvement des courants. Ainsi, les lames de la Laminaire *S. longicuris* contiennent 40% de blocs MM et 3% de blocs GG, tandis que ces taux dans le stipe sont respectivement de 27% et de 18% (Rioux *et al.*, 2007). Contre les variations physico-chimiques de l'environnement, la



paroi joue un rôle tampon important. Par exemple, les polysaccharides sulfatés forment une matrice anionique offrant une surface d'hydratation importante et une certaine souplesse, permettant aux algues de faire face à la dessiccation, à de fortes vagues océaniques, au stress osmotique et aux fluctuations de pH et de température (Ficko-Blean *et al.*, 2015). L'ensemble de ces données tendent à montrer l'importance de la présence de polysaccharides sulfatés en milieu marin, avec un rôle probable dans la régulation ionique en présence de fortes concentrations de salinité.

## **B. Le rôle de la paroi dans le développement**

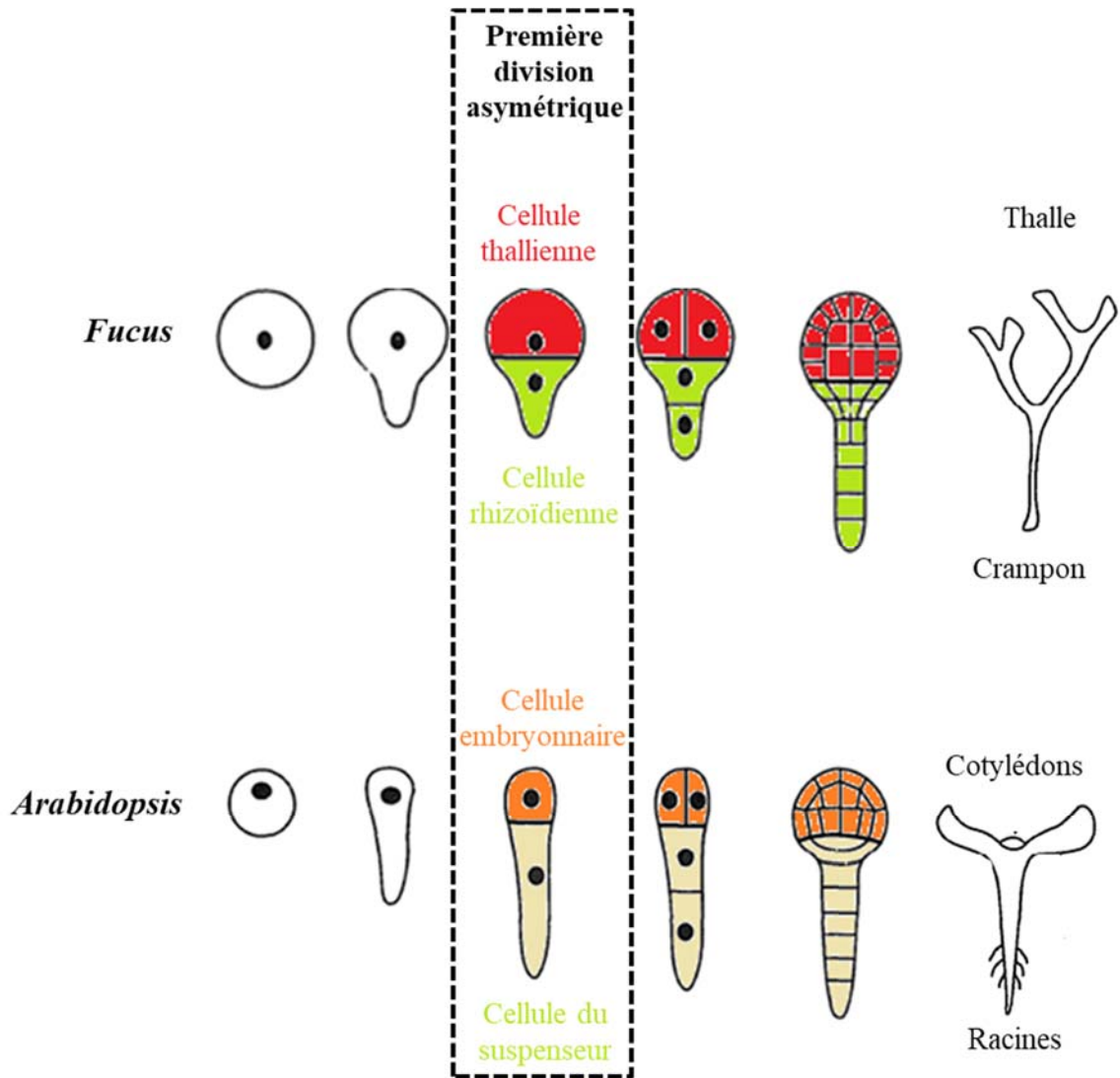
Comme pour les plantes terrestres, le compartiment pariétal a également des fonctions lors du développement de l'algue et est remodelé lors de la croissance cellulaire. Cette enveloppe résistante et extensible subit des modifications structurales et chimiques. Ces modifications contribuent aux phénomènes de différenciation cellulaire à l'origine de la spécificité fonctionnelle de chaque tissu.

Si plusieurs expériences, dont nous en décrivons certaines dans la partie suivante, indiquent un rôle des polysaccharides de paroi dans les processus du développement comme la croissance et la polarisation cellulaire, l'implication des différentes fractions polysaccharidiques dans ces différents processus reste peu connue. L'importance du compartiment pariétal lors des processus du développement chez les algues brunes a été plus particulièrement étudiée chez deux organismes modèles : les zygotes de *Fucales* et *Ectocarpus*. Ces deux organismes, décrits dans la partie suivante de cette introduction, sont adaptés pour étudier la participation des composés de la paroi lors du développement, ou encore en réponse à des modifications abiotiques de l'environnement comme des variations de la salinité.

## IV. Modèles d'étude pour le développement précoce chez les algues brunes

### A. Le zygote de *Fucus* : un modèle historique en biologie du développement

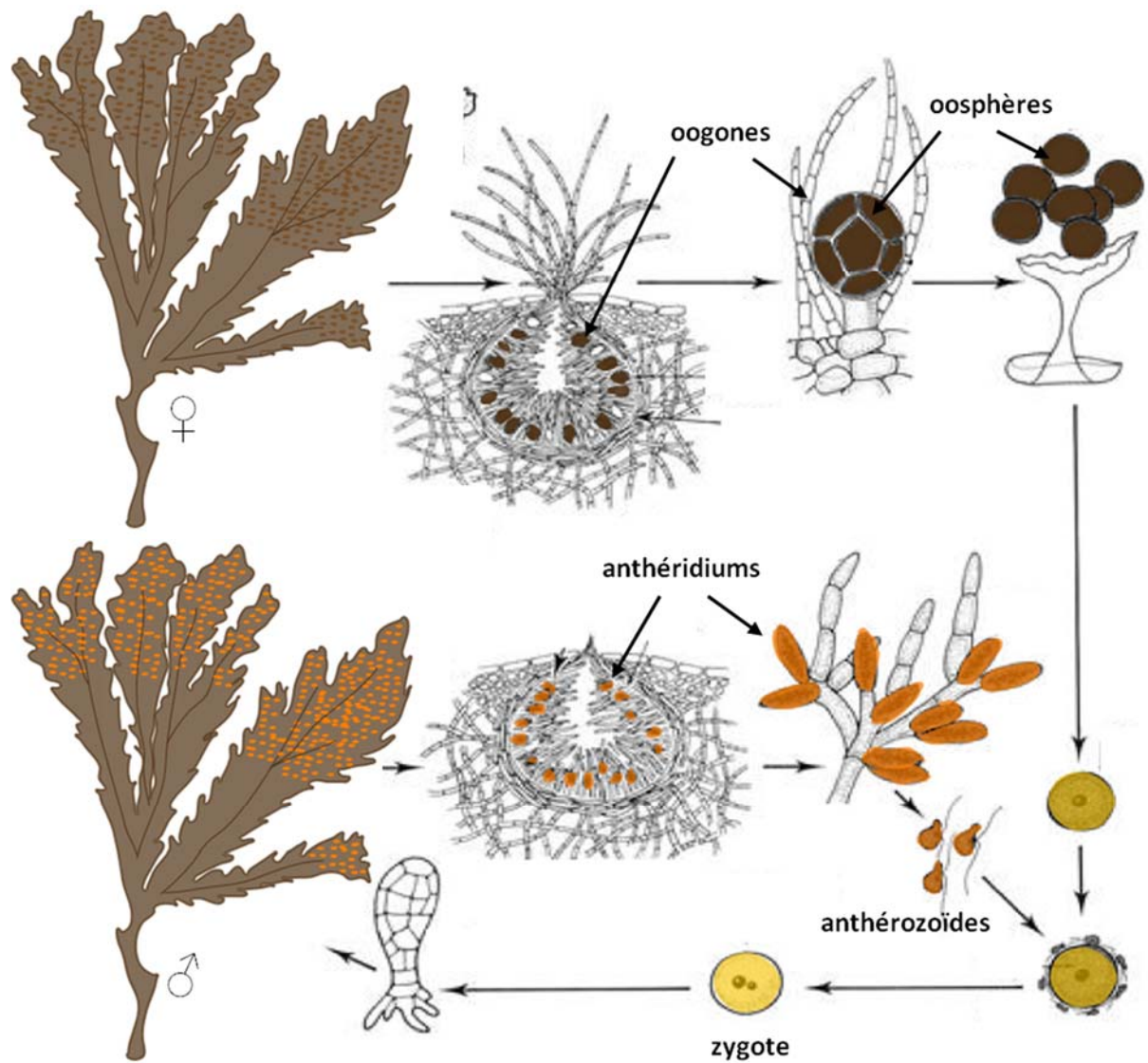
Les différents mécanismes de l'embryogénèse ont été pendant longtemps étudiés chez le zygote de *Fucus*. Les nombreux avantages apportés par cet organisme en font un modèle historique en biologie du développement. Grâce à sa première division asymétrique (Fig. 14), le zygote de *Fucus* est un modèle intéressant pour comprendre les mécanismes de la différenciation cellulaire chez les eucaryotes. Ce modèle a fait l'objet de nombreuses études depuis 1854, où Gustave Adolphe Thuret a pour la première fois observé et décrit la fécondation du *Fucus*. Depuis, nous disposons d'une littérature abondante où les différents mécanismes qui contrôlent la fécondation et l'embryogénèse ont été particulièrement bien analysés. Contrairement aux embryons de plantes, prisonniers dans les tissus maternels, les zygotes se développent librement dans le milieu (Fig. 14), ce qui facilite l'application de traitement biochimique ou pharmacologique. Leur taille importante située entre 80 et 100  $\mu\text{m}$  de diamètre et leur adhérence naturelle au substrat permet des observations et des manipulations aisées. La fécondation est facilement réalisable au laboratoire et génère un grand nombre d'individus. Le développement précoce relativement synchrone des zygotes de *Fucus* permet de suivre facilement chaque étape.



**Figure 14 :** Comparaison de l'embryogénèse de *Fucus* et d'*Arabidopsis* (d'après Brownlee & Berger, 1995).

## A. *Fucus serratus* : morphologie générale et cycle de vie

Dans cette étude, nous portons notre attention sur le zygote de l'espèce *Fucus serratus* plus communément appelée *Fucus* dentelé ou encore varech dentelé. Cette espèce médiolittorale possède l'avantage d'être abondamment présente à proximité de la station biologique de Roscoff. De plus, les réceptacles mâles et femelles sont portés par des plants différents (espèce dioïque), ce qui nous permet de contrôler temporellement le moment de la fécondation, en réunissant les gamètes au moment sélectionné. Cette espèce peut être identifiée sur l'estran par son thalle plat divisé en lames dichotomes munies de frondes aux bords dentés et par sa nervure médiane nettement visible. Ces plants sont solidement fixés au substrat par un court stipe très résistant. Les mâles et les femelles sont uniquement distinguables au moment de la reproduction qui est hivernale. Il est possible de distinguer les deux sexes par une simple analyse visuelle de l'extrémité des frondes avec une couleur orangée des plants mâles et vert-marron pour les femelles. Cette distinction est possible grâce aux pigments caroténoïdes présents dans les chromoplastes des anthérozoïdes. Les *Fucus* possèdent un cycle de vie monogénétique diplophasique dont la phase gamétophytique est réduite aux gamètes (Fig. 15). Les parties reproductrices à l'extrémité des frondes forment de petites 'cryptes', les conceptacles. En milieu naturel, les gamètes sont libérés au moment de la dessiccation qui a lieu lors de l'émersion à marée basse. Les gamètes perlent à l'extérieur des réceptacles et l'immersion à marée haute rompt les enveloppes protectrices des gamètes qui se dispersent alors dans le milieu. Les oosphères sédimentent et émettent une substance chimiotactrice, le fucoserratène qui attire les anthérozoïdes (Müller & Jaenicke, 1973). Ces derniers possèdent un stigma permettant de les diriger vers les œufs par phototaxisme négatif. Lors de la rencontre de deux gamètes, la polyspermie est immédiatement bloquée par la mise en place d'une dépolarisation membranaire jouant le rôle de barrière électrique (Brawley, 1991). Cette dernière est créée par l'activation de différents canaux qui autorisent l'influx de  $\text{Na}^+$  et de  $\text{Ca}^{2+}$ , créant ainsi un potentiel de fécondation et l'efflux de  $\text{K}^+$  afin de rétablir le potentiel membranaire de base (Brawley, 1991; Roberts *et al.*, 1993; Taylor & Brownlee, 1993 ; Roberts & Brownlee, 1995). Lors de cette étape, la membrane passe de -60 mV à -20 mV (Brawley, 1991). La mise en place de la paroi est la barrière définitive à la polyspermie (Kropf *et al.*, 1999).



**Figure 15 :** Cycle de vie de *Fucus serratus*. Les conceptacles à l'extrémité des frondes contiennent selon le sexe du plant, les anthéridiums ou les oogones qui libèrent respectivement les gamètes mâles (anthérozoïdes) ou femelles (oosphères). Un anthérozoïde féconde l'oosphère et forme un zygote. L'embryon se développe et forme un nouveau plant mâle ou femelle.

## B. Développement du zygote de *Fucus*

Durant les quelques premières minutes de la post-fécondation (PF), l'activité respiratoire (Whitaker, 1931 ; Levring, 1952) est doublée pour permettre la synthèse des ARNm et des protéines (Koehler & Linskens, 1967). Environ cinq à six heures post-fécondation (PF), le dépôt de la paroi conduit à la fixation du zygote à son substrat. Durant les premières heures, le zygote de *Fucus* reste parfaitement sphérique (Fig. 16a) et forme un axe de polarité en réponse à différents stimuli environnementaux tels que le vecteur lumineux, des flux laminaires d'eau de mer, des gradients de chaleur, des gradients osmotiques ou ioniques, la gravité, ou encore la présence d'autres embryons à proximité (Kropf, 1992 ; Berger & Brownlee, 1994). Ces différents facteurs, dont le principal est le vecteur lumineux, vont agir en synergie afin d'orienter la croissance du rhizoïde vers le substrat. La sensibilité du zygote par rapport aux différents facteurs environnementaux évolue dans le temps (Jaffe, 1968) et certains vont prédominer sur les autres (Bentrup & Jaffe, 1968). Initialement, le futur pôle rhyzoidien se définit par le point d'entrée d'anthérozoïdes dans l'oosphère, où va rapidement se mettre en place un « patch » d'actine corticale (Hable & Kropf, 2000). En absence de signaux environnementaux, ce site sera utilisé par défaut pour l'orientation du zygote. En présence de signaux environnementaux, le patch d'actine corticale préalablement formé se désassemble et un nouveau se crée en fonction du nouveau vecteur (Alessa & Kropf, 1999 ; Kropf *et al.*, 1999). Au laboratoire, les zygotes sont généralement facilement orientés par l'application d'un vecteur lumineux unidirectionnel, où le rhizoïde se forme et croît du côté ombragé (Hurd, 1920). La polarisation du zygote conduit à la formation d'un pôle rhizoïdien et d'un pôle thallien. Les deux cellules résultantes seront morphologiquement et cytologiquement différentes.

### a. Formation de l'axe de polarité

Durant les 10 premières heures, la mise en place de l'axe de polarisation est labile, c'est la période de formation de l'axe (Fig. 16b). Durant cette période, il est possible de changer l'orientation donnée par le vecteur initial. Pour cela, il suffit d'appliquer un deuxième vecteur lumineux dont l'orientation est modifiée. La mise en place de l'asymétrie dans le zygote de *Fucus* a principalement été observée sous l'influence d'un vecteur lumineux. La localisation de microfilaments d'actine corticale au pôle rhizoïdien implique une sécrétion polarisée. Des expériences réalisées avec différents inhibiteurs de la polymérisation de l'actine ou des microtubules chez des zygotes fucoïdes ont montré que seule l'intégrité du cytosquelette

d'actine, et non celle des microtubules, était indispensable à la formation de l'axe (Nelson & Jaffe, 1973 ; Quatrano, 1973 ; Brawley & Quatrano, 1979 ; Brawley & Robinson, 1985 ; Hable & Kropf, 1998). Des canaux calciques sont déposés par exocytose au pôle rhizoïdien. Leur activation permet la création d'un faible courant trans-cellulaire entrant au pôle rhizoïdien et sortant au pôle thalle (Goodner & Quatrano, 1993). Des canaux calciques sont réorientés du côté de la zone ombragée, c'est-à-dire au niveau du nouveau pôle rhizoïdien au cours de la période de la formation de l'axe (Shaw & Quatrano, 1996). De plus, le calcium intracellulaire élevé au pôle rhizoïdien pourrait favoriser la polymérisation de l'actine et de l'exocytose, agissant par la suite comme une boucle d'amplification qui sera nécessaire au renforcement de l'asymétrie durant la période de fixation de l'axe.

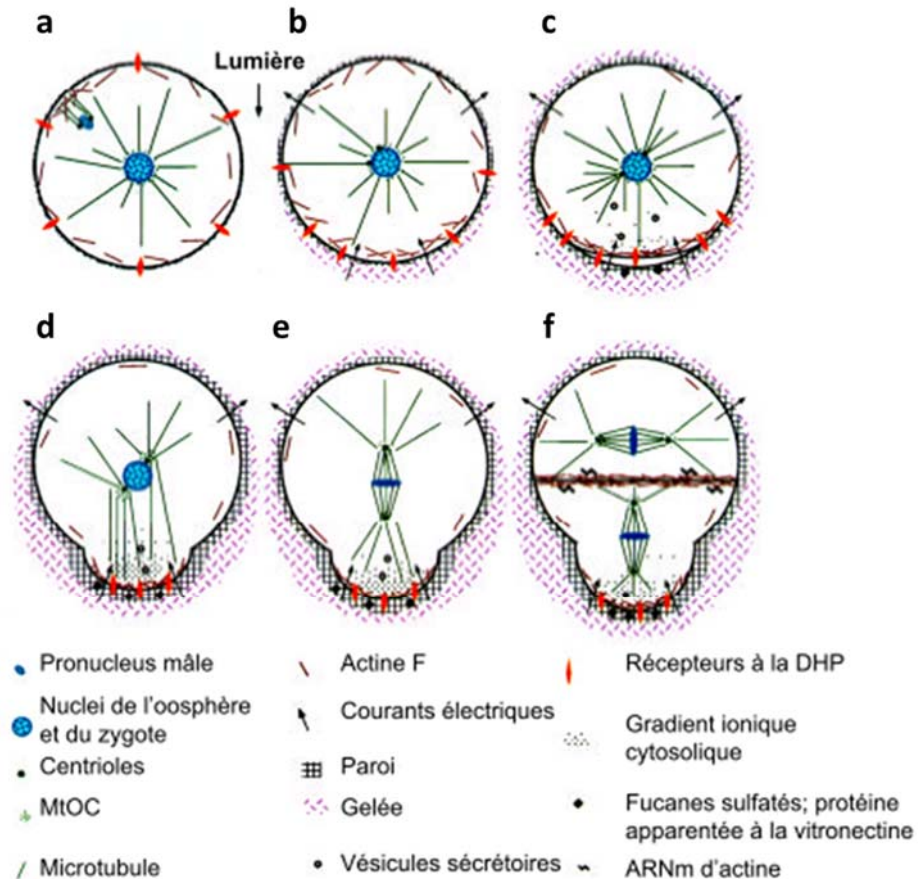
### **b. Fixation de l'axe de polarité**

La fixation de l'axe de polarité s'effectue entre 8 et 16 heures PF (Fig. 16c). Durant cette période pré-germinative, le site d'émergence du rhizoïde est déterminé. Le zygote ne répond plus aux changements d'orientations soumis par les stimuli environnementaux, seule la croissance du rhizoïde continuera par la suite de s'orienter. La fixation de l'axe implique la mise en place d'un « complexe de stabilisation de l'axe » (ASC pour 'axis stabilizing complex') (Quatrano *et al.*, 1991). Ce complexe est à l'origine des interactions entre le cytosquelette, la membrane et la paroi. Des protéines similaires aux vinculines, vibronectines et intégrines responsables du contact focal chez les animaux pourraient agir comme des liens transmembranaires (Quatrano *et al.*, 1991 ; Wagner *et al.*, 1992). Cependant, la nature des composants de ce complexe reste à détailler. Si les composés pariétaux semblent uniformément déposés après la fécondation (Quatrano & Stevens, 1976 ; Quatrano, 1982), de nombreuses exocytoses sécrètent des fucanes sulfatés au pôle rhizoïdien (Quatrano & Stevens, 1976 ; Bisgrove & Kropf, 2001). Ce phénomène est proche de celui observé dans les cellules animales et les levures lors des processus de bourgeonnement et de conjugaison (Cid *et al.*, 1995 ; Craig & Johnson, 1996). Dans chaque cas, on observe une localisation spécifique de l'actine, une exocytose importante au site de polarisation et une intervention de la matrice extracellulaire.

### c. Germination et première division cellulaire asymétrique

Entre 16 et 18 heures PF, on observe la formation d'une petite protubérance où se développera plus tard le futur rhizoïde, c'est la germination (Fig. 16d). Durant cette phase, les sécrétions polarisées augmentent et la paroi est remaniée afin de permettre l'émergence du rhizoïde. L'asymétrie cytoplasmique ne cesse de s'accroître. Des mitochondries, du golgi et des vésicules sécrétoires sont abondantes au niveau du pôle du rhizoïde (Quatrano, 1972 ; Brawley *et al.*, 1977). On observe toujours de nombreux filaments d'actine et un gradient de calcium intracellulaire, nécessaire à la croissance apicale du rhizoïde (Brownlee & Wood, 1986 ; Kropf & Quatrano, 1988 ; Speksnijder *et al.*, 1989). L'exocytose accrue permet l'augmentation du courant intracellulaire par la mise en place de canaux ioniques (Brawley & Robinson, 1985), ce qui provoque en plus de l'influx de  $\text{Ca}^{2+}$ , un influx de  $\text{K}^+$  et de  $\text{Na}^+$  et un efflux de  $\text{Cl}^-$  au pôle du rhizoïde (Jaffe & Nuccitelli, 1974 ; Robinson & Jaffe, 1974). Entre 16 et 24 heures PF, une première division cellulaire asymétrique se produit de manière transversale à l'axe de polarité et génère deux cellules aux modes de croissance et à la physiologie distincte : la cellule thallienne et la cellule rhizoïdienne (Kropf, 1992) (Fig. 16e et f).

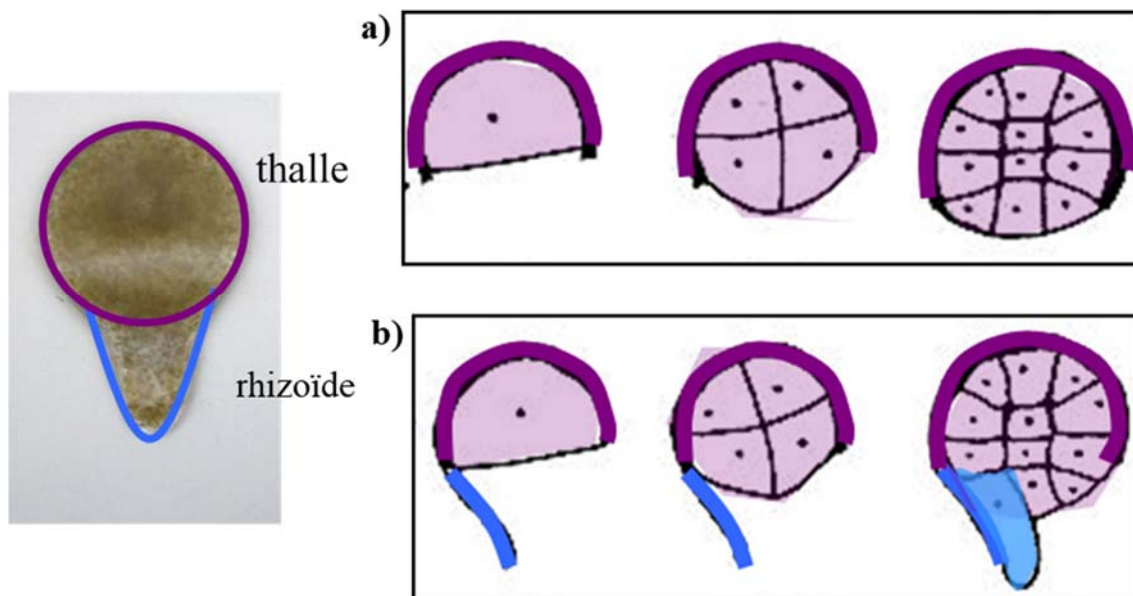




**Figure 16 : Changements physiologiques et structuraux au cours de la polarisation du zygote de *Fucus*** (Corellou, 2000 d'après Kropf, 1997). a) Après la fécondation, le zygote est totalement sphérique et ne présente pas d'asymétrie structurale. b) Durant les 10 premières heures, il y a formation de l'axe. Les courants trans-cellulaires s'établissent, les récepteurs à la DHP et l'actine corticale se redistribuent au futur pôle rhizoïdien et les centrosomes commencent à se séparer. c) Entre 8 et 16 heures PF, il y a fixation de l'axe. Les phénomènes de polarisation s'amplifient et un gradient de  $Ca^{2+}$  est détecté. Les sécrétions polarisées permettent l'ancrage de la polarité. Des composés sulfatés sont mis en place dans la paroi du pôle rhizoïdien. d) Entre 16 et 18h PF, il y a germination. Les sécrétions polarisées s'accroissent, et le remaniement pariétal au pôle rhizoïdien permet l'émergence du rhizoïde. e) La mitose se produit entre 16-20 h PF. Les centrosomes s'alignent avec l'axe de polarité et les chromosomes se séparent. f) Entre 20 et 24 heures, il y a une première division asymétrique. Les nouvelles membranes et parois se forment transversalement à l'axe de polarité. L'actine et les ARNm d'actine sont localisés au plan de division. MtOC, centre organisateur des microtubules. DHP, dihydropyridine.

### 3. Rôle de la paroi dans le développement de l'embryon de *Fucus*

De nombreuses études ont été réalisées chez les *Fucales*. En 1988, Kroft et collaborateur ont mis en évidence l'importance de la paroi lors de la fixation de l'axe de polarité chez le zygote de *Fucus*. En effet, lorsque la paroi est digérée par un traitement enzymatique, aucune fixation de l'axe n'est observée (Kroft *et al.*, 1988). Seule la régénération de la paroi autorise une fixation de l'axe de polarité en fonction du signal lumineux (Kroft *et al.*, 1988). Une autre étude réalisée en 1994 a mis en évidence le rôle de la paroi dans la régulation de la destinée cellulaire (Fig. 17) (Berger *et al.*, 1994). Par microchirurgie laser, les cellules d'un embryon au stade deux cellules ont été isolées, formant ainsi deux pseudo-protoplastes. Malgré l'ablation, une cellule sans paroi en contact d'un fragment de paroi de la cellule amputée est capable de générer des cellules du type cellulaire dont le fragment a été isolé. Ainsi, après ablation, une cellule en contact avec un fragment de paroi de la cellule rhizoïdienne est capable de régénérer une nouvelle cellule rhizoïdienne (Berger *et al.*, 1994). L'embryogénèse pourrait dépendre de fractions de paroi spécifiques qui pourrait agir comme des « marqueurs positionnels ». D'autre part, des études antérieures ont montré une distribution spatio-temporelle particulière des principales classes de polysaccharides de paroi au cours du développement précoce des zygotes *Fucus* (Quatrano & Stevens, 1976 ; Quatrano, 1982). Le rôle de la paroi lors du développement sera plus amplement décrit lors des chapitres suivants.



**Figure 17 : Rôle de la paroi dans la régulation de la destinée cellulaire** (adapté de Berger *et al.*, 1994). a) Lorsque la cellule du rhizoïde est totalement disséquée, seule la cellule du thalle continue à se diviser en cellules thalliennes. b) Lorsque que la cellule du rhizoïde est excisée en laissant un fragment de paroi, la cellule du thalle entre en contact avec le reste de la paroi de la cellule du rhizoïde, ce qui contribue à changer sa destinée cellulaire qui sera identique à la cellule du rhizoïde.

#### 4. Les limites du modèle du zygote de *Fucus*

Grâce à ses nombreux avantages, le zygote de *Fucus* a pendant longtemps été utilisé en biologie du développement. Néanmoins, l'utilisation de ce modèle comporte plusieurs limites. En effet, il est difficile de le cultiver au-delà de 4 semaines post-fécondation, rendant impossible des analyses sur son développement tardif. Son cycle de vie ne pouvant pas être reproduit en laboratoire, la récolte des plants directement dans son environnement est indispensable. Les plants de *Fucus* sont uniquement fertiles en hiver, obligeant la réalisation des expériences uniquement sur une courte période. De plus, hormis une étude analysant la fonction de gènes du cytosquelette par un test de 'gene silencing' par RNAi (RNA interférence) (Farnham *et al.*, 2013), aucun outil génétique et génomique ne sont actuellement disponibles.

## B. *Ectocarpus* : un modèle émergent

### A. Description générale du modèle

*Ectocarpus* a récemment été développé comme organisme modèle pour la lignée des algues brunes et est une petite algue filamenteuse de l'ordre des Ectocarpaceae. Elle est trouvée dans les régions côtières tempérées à travers le monde. Le genre *Ectocarpus* est caractérisé par une grande plasticité morphologique (Ravanko, 1970) et transcriptomique (Dittami *et al.*, 2009).

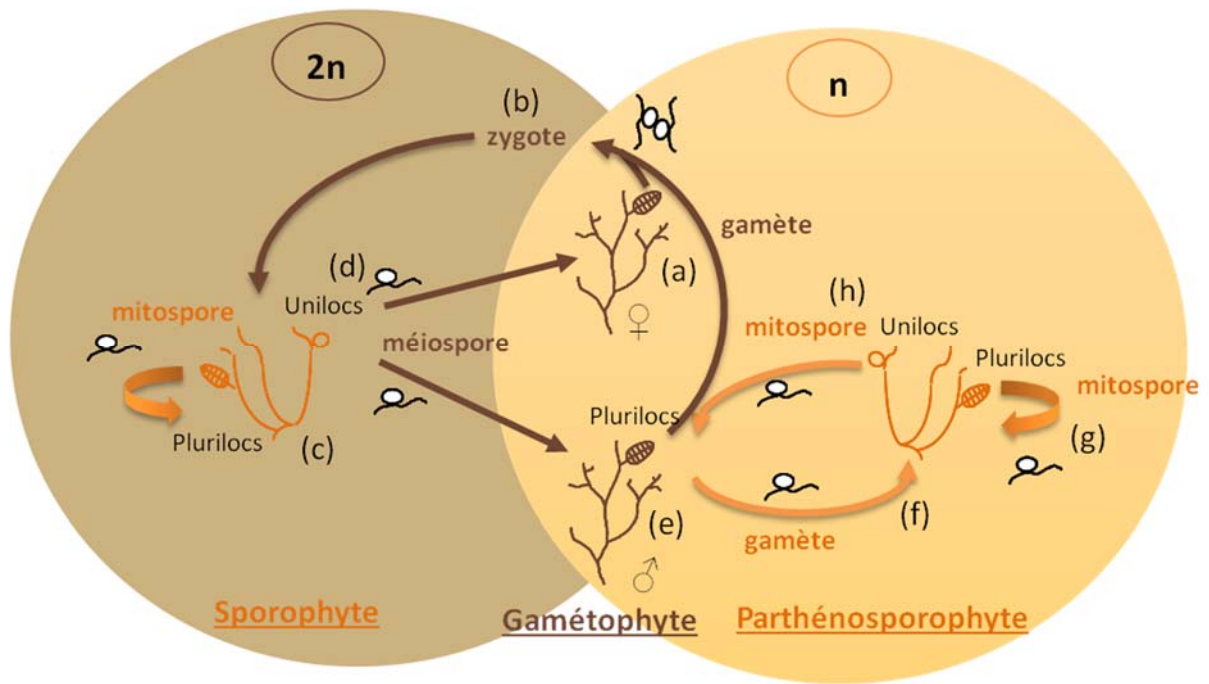
Depuis une trentaine d'année, *Ectocarpus* est un organisme modèle émergent, relativement complémentaire du zygote de *Fucus*. Contrairement à ce dernier, *Ectocarpus* a l'avantage de pouvoir être cultivé toute l'année en laboratoire. Sa fertilité est importante et son cycle de vie court de 3 mois est bien connu et entièrement reproductible en laboratoire (Charrier *et al.*, 2008). Ces avantages techniques ont conduit à établir *Ectocarpus* comme modèle génétique et génomique pour la lignée des algues brunes (Perters *et al.*, 2004 ; Cock *et al.*, 2010). Par rapport à d'autres algues brunes comme *F. serratus* dont la taille du génome est estimée à 1095 Mb, la taille du génome d'*E. siliculosus* de 214 Mb est relativement petite. De nombreux outils et données sont disponibles pour l'étude d'*E. siliculosus*. Outre une séquence génomique complète (Cock *et al.*, 2010), des données transcriptomiques (Dittami *et al.*, 2009) et de nombreuses souches à partir desquelles il est possible de réaliser des croisements sont accessibles. En effet, différents écotypes d'*Ectocarpus* ont été isolés dans des environnements très différents, notamment en termes de salinité. Par exemple, une souche d'*E. siliculosus* a été identifiée dans une section fortement contaminée en sel dans la rivière Werra en Allemagne (Geißler, 1983), alors qu'en Australie, une souche d'*E. subulatus* a été isolée en eau douce (West & Kraft 1996). Plusieurs lignées mutantes ont également été obtenues par mutagenèse chimique ou par UV, et une partie de ces mutants ont été criblés pour des phénotypes particuliers (Coelho *et al.*, 2011 ; Le Bail *et al.*, 2011). Par exemple, le mutant étoile (etl) est le premier mutant de morphogénèse à avoir été décrit de manière exhaustive et est caractérisé par une sur-ramification (Le Bail *et al.*, 2011), alors que le mutant ouroboros (oro) a un cycle de vie altéré et possède une réitération continue de la phase gamétophytique (Coelho *et al.*, 2011). Un résumé des avantages et des limites du modèle du zygote de *Fucus* et d'*Ectocarpus* est disponible en annexe 1.

Actuellement, l'algue brune modèle *Ectocarpus* est utilisée pour étudier un large éventail d'aspects biologiques comme la résistance à des stress abiotiques et biotiques (Dittami *et al.*, 2009), la détermination du sexe et la régulation du cycle de vie (Peters *et al.*, 2008 ; Coelho *et*

*al.*, 2011 ; Macaisne *et al.*, 2017), le développement (Le Bail *et al.*, 2008 ; Le Bail *et al.*, 2011) ou encore le métabolisme des polysaccharides de la paroi (Michel *et al.*, 2010).

## B. Cycle de vie et développement d'*Ectocarpus*

*Ectocarpus* possède un cycle de vie digénétique haplodiplobiontique complexe (Charrier *et al.*, 2008) (Fig. 18). Les gamétophytes forment la phase haploïde du cycle. Le gamétophyte est formé d'un court rhizoïde de quelques cellules qui le maintient faiblement fixé au substrat et de filaments dressés portant des gamétocystes pluriloculaires. Lors de la reproduction, ces gamétocystes libèrent des gamètes mâles ou femelles (espèce dioïque). Les gamètes mâles et femelles fusionnent ensemble pour former un zygote diploïde à l'origine du futur sporophyte. Contrairement au gamétophyte, le sporophyte est fortement fixé au substrat par des filaments prostrés fortement ramifiés sur lesquels se développent les filaments dressés. Ces derniers portent deux structures reproductrices distinctes : des sporocyste pluriloculaires (PL) et uniloculaires (UL). Les mitospores émis par les PL forment de nouveaux sporophytes alors que la méiose réalisée dans les ULs permet de libérer des méio-spores à l'origine d'un gamétophyte mâle ou femelle. Le cycle de vie d'*Ectocarpus* a la particularité de pouvoir générer des parthénosporophytes haploïdes morphologiquement similaires au sporophyte diploïde. En effet, selon l'espèce, le gamète mâle ou femelle n'ayant pas rencontré son partenaire opposé est capable de germer et de générer un parthénosporophyte haploïde (PSP) fonctionnel. Une fois mature, les PSPs portent les mêmes organes reproducteurs que les sporophytes. Les PLs apparaissent généralement avant les ULs.



**Figure 18 : Cycle de vie d'*Ectocarpus*.** Le cercle brun et le cercle orange montrent respectivement les phases diploïdes et haploïdes. (a) Les gamètes haploïdes sont produits dans les sporanges pluriloculaires (plurilocs) des gamétophytes mâles ou femelles (dioïisme). (b) Le gamète mâle fusionne avec le gamète femelle pour former un zygote diploïde qui (c) croît en gamétophyte mâle ou femelle. (d) Le sporophyte produit des méiospores dans les sporanges uniloculaires (unilocs) qui croissent en gamétophytes mâles ou femelles. (e) Les gamètes mâles ou femelles non fusionnés (selon la souche) germent et (f) croissent en parthénosporophytes (PSP) haploïdes, qui sont morphologiquement non distinguables des sporophytes diploïdes. (g) Les sporanges pluriloculaires des PSPs produisent des mitospores qui peuvent germer et former de nouveaux PSPs. (h) Les mitospores produits dans les sporanges uniloculaires peuvent germer pour produire un nouveau gamétophyte.

### C. Le développement précoce des gamétophytes et des sporophytes

Le développement précoce et la morphologie du gamétophyte et du sporophyte mature sont différents, et comprennent une morphologie plus complexe pour la phase sporophytique. Le gamétophyte se développe à partir des méiopores émis par les ULs des sporophytes. Comme chez le zygote de *Fucus*, le méiospore germe puis réalise une première division asymétrique à l'origine de deux cellules distinctes et dont la destinée est différente (Charrier *et al.*, 2008). Une des deux cellules forme la partie rhizoïdienne, alors que l'autre cellule produit les filaments dressés fortement ramifiés. Le rhizoïde est court et permet généralement d'attacher le gamétophyte à son substrat sur une courte période de quelques jours au cours de son développement précoce. Les gamétophytes cultivés au laboratoire se décolent rapidement du substrat et flottent dans le milieu, ce qui rend leurs observations au microscope laborieuses. Les cellules des filaments dressés sont relativement cubiques alors que celles du rhizoïde apparaissent très allongées.

Les sporophytes ou parthénosporophytes se développent respectivement à partir de gamètes mâles et femelles fusionnés ou selon l'espèce, de gamètes mâles ou femelles non fécondés. Contrairement au gamétophyte, après germination, la première division est symétrique. Les jeunes sporophytes d'*Ectocarpus* se développent par croissance apicale à partir de cellules relativement allongées, alors que les cellules plus âgées effectuent une différenciation cellulaire et forment progressivement des cellules rondes (Le Bail *et al.*, 2008). Le premier filament formé est appelé filament primaire (FP). Les cellules les plus âgées du filament sont capables de former de nouvelles ramifications nommées filaments secondaires (FS). De plus, des filaments dressés se développent de manière perpendiculaire au substrat et portent les parties reproductrices PLs dans un premier temps et ULs dans un second temps. Malgré leur morphologie plus complexe et très plastique, le solide attachement des sporophytes à leur substrat facilite leurs observations microscopiques.

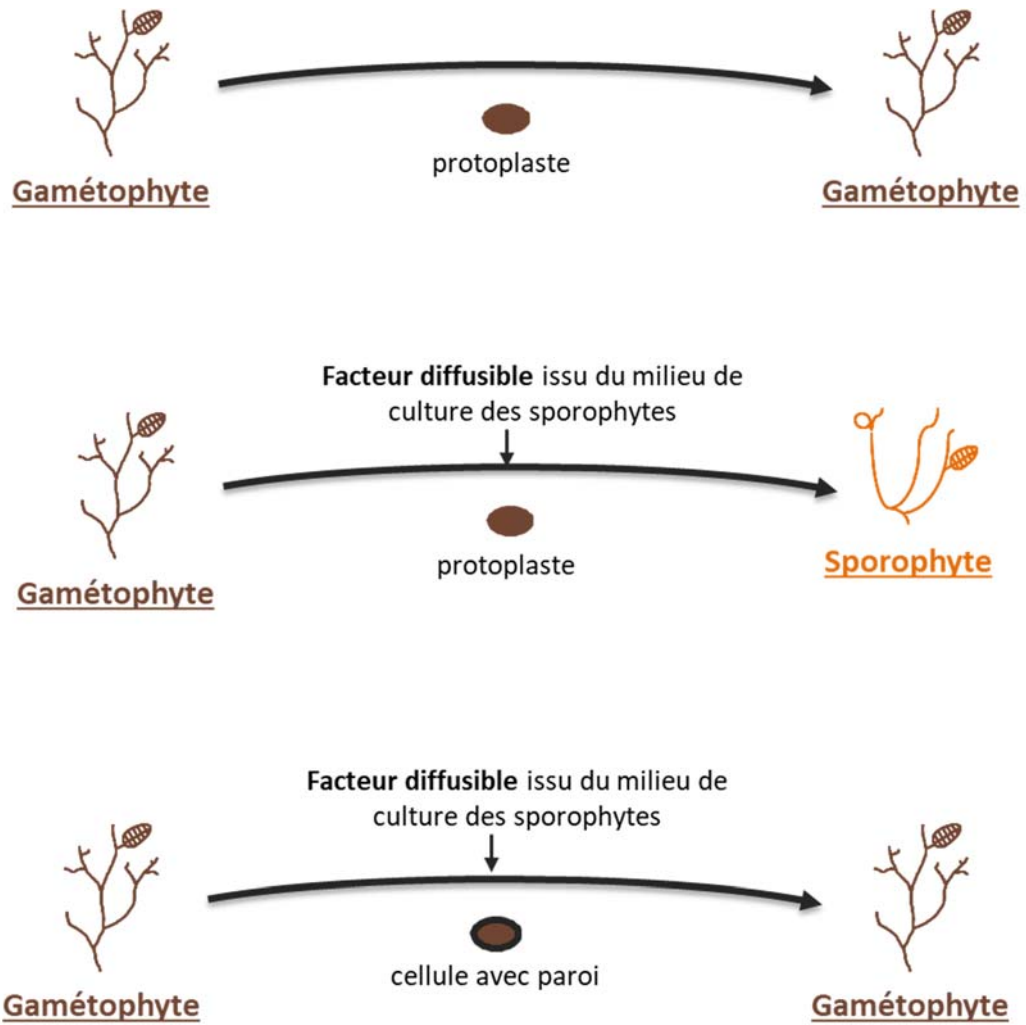
### D. Rôle de la paroi dans le développement chez *Ectocarpus*

Le rôle de la paroi dans les processus du développement a été moins étudié chez *Ectocarpus* que chez le zygote de *Fucus*. Néanmoins, certaines études ont souligné son implication. Chez *E. siliculosus*, un facteur diffusible produit par le sporophyte a été identifié et est capable d'induire une reprogrammation de protoplastes issus de gamétophytes en un sporophyte



fonctionnel (Fig. 19) (Arun *et al.*, 2013). Les auteurs ont identifié que cet effet était uniquement observé lorsque la paroi cellulaire est absente, suggérant un rôle de la paroi dans la capacité des cellules à maintenir un programme de développement déjà engagé (Arun *et al.*, 2013). Une autre étude, réalisée chez le mutant morphogénétique étoile (etl) d'*E. siliculosus* pour lequel les cellules rondes sont surexprimées, a également souligné le rôle du compartiment pariétal dans la communication intercellulaire lors du développement. Dans cette dernière, les auteurs proposent un rôle des fucanes pariétaux dans la régulation de la signalisation intercellulaire *via* la restriction de la diffusion de ligands à certains récepteurs (Le Bail *et al.*, 2011).





**Figure 19 :** Rôle de la paroi dans le maintien du programme de développement chez *Ectocarpus* (adapté de Arun *et al.*, 2013).

## V. Les méthodes d'analyses de la paroi chez les algues brunes

### A. La majorité des connaissances chez les algues brunes proviennent de méthodes chimiques

Aujourd'hui, la majorité des connaissances disponibles sur la paroi des algues brunes ont été obtenues à partir de méthodes chimiques d'extraction et de purification des polysaccharides. Ces méthodes ont contribué à nous représenter une première vue globale de la structure du compartiment pariétal et de la nature de ces composés. Comme la composition polysaccharidique de la paroi varie en fonction de plusieurs critères comme la saison de récolte, l'environnement ou encore l'organe étudié, la comparaison des différentes données disponibles doit être réalisée avec prudence. Ceci est d'autant plus vrai que des variations sont également reportées en fonction des méthodes d'extraction utilisées (Hahn *et al.*, 2012 ; Deniaud-Bouët *et al.*, 2014). De plus, l'utilisation de ces méthodes nécessite une biomasse importante et sont réalisées sur des plants entiers, ce qui ne permet pas de localiser des fractions spécifiques d'intérêts à une échelle cellulaire, ni d'observer quelles sous-structures pourraient-être impliquées dans les différents rôles de la paroi.

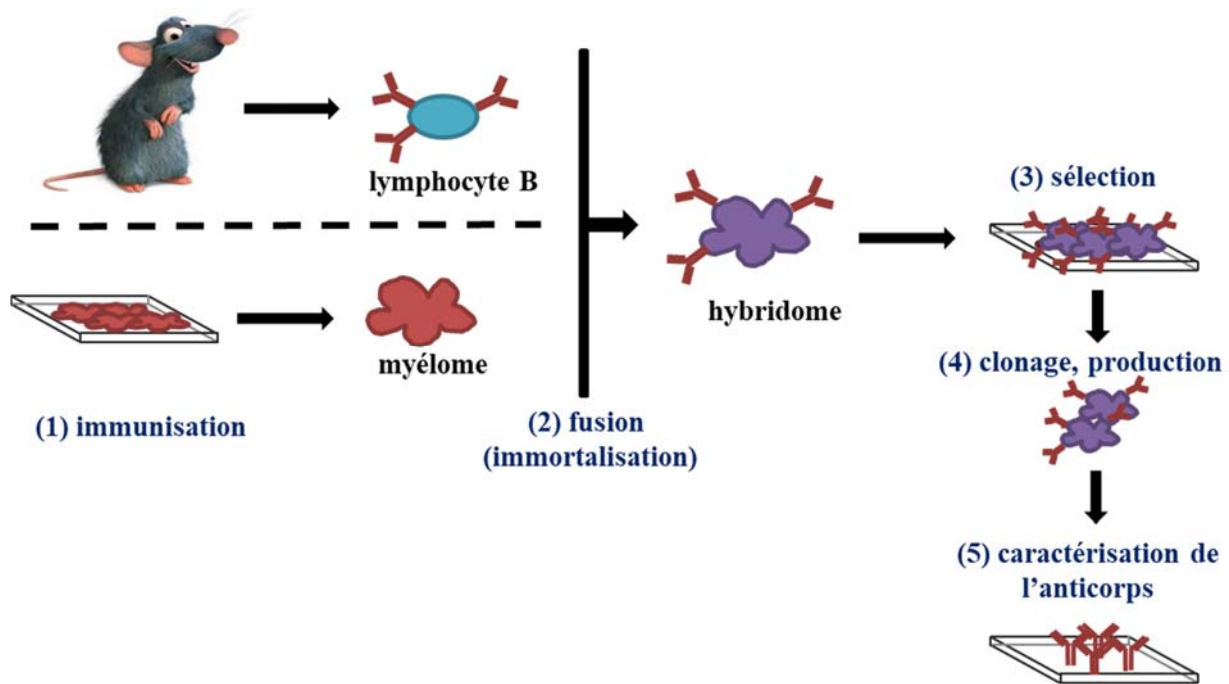
Afin d'obtenir des connaissances sur la configuration *in situ* des composés de la paroi et à un niveau cellulaire, d'autres méthodes couplées à la microscopie peuvent être utilisées. L'utilisation de colorants chimiques permet de détecter la présence de certains composés dans la paroi des algues brunes. Par exemple, le bleu de toluidine O (TBO) a souvent été utilisé pour mettre en évidence des polysaccharides carboxyliques ou sulfatés tels que les alginates et les fucanes. Le TBO a ainsi permis d'observer une répartition asymétrique des polysaccharides dans la paroi de cellule rhizoïdienne des zygotes de *Fucus* (Quatrano & Shaw 1997). Néanmoins, cette méthode simple et rapide est très peu spécifique et ne permet pas de déterminer la nature exacte des polysaccharides ciblés.

## **B. L'immunohistochimie pour détecter les polysaccharides de paroi à un niveau tissulaire et cellulaire**

### **1. Les méthodes immunohistochimiques utilisant des anticorps et des CBMs**

Afin d'étudier individuellement les composés de la paroi, des méthodes immunohistochimiques peuvent être utilisées. Ces dernières reposent sur la localisation de structures spécifiques, ici des fragments polysaccharidiques. Pour cela, la capacité des anticorps à être spécifiques de déterminants génique (épitopes) particuliers est utilisée. Ces anticorps peuvent être polyclonaux ou monoclonaux. Les anticorps polyclonaux reconnaissent différents épitopes. Les anticorps monoclonaux sont spécifiques d'un épitope en particulier et sont ainsi préférés en immunohistochimie. La production des anticorps fait appel à des compétences spécifiques de culture cellulaire (Fig. 20). Généralement, les oligosaccharides reconnus sont composés de 4 à 7 monosaccharides, permettant une spécificité importante (Popper *et al.*, 2011b).

D'autres sondes, développées à partir d'enzymes, ont récemment été développées et peuvent être utilisées comme des sondes analogues aux anticorps monoclonaux. Les enzymes sont spécifiques d'un substrat et sont composées d'un site catalytique et d'un site de liaison à un substrat appelé CBM pour « Carbohydrate Binding Module ». Ces modules de liaison à des polysaccharides sont des éléments d'enzymes capables de se lier spécifiquement à des glucides, ne présentant pas d'activité catalytique, ils permettent de diriger l'enzyme à proximité de son substrat (McCartnez *et al.*, 2006 ; Blake *et al.*, 2006). Grâce à l'expression hétérologue du CBM seul, ces molécules peuvent être utilisées pour détecter des sites spécifiques, cible de l'enzyme à laquelle il est normalement associé (Hervé *et al.*, 2009). Dans le but de permettre leur purification et leur détection immunohistochimique, les CBMs exprimés de façon recombinante sont couplés à une étiquette, par exemple de type polyhistidine.



**Figure 20 : Production d'anticorps monoclonaux.** 1) Un animal (souvent un rat, une souris ou un lapin) est immunisé en injectant un antigène d'intérêt. L'animal produit des lymphocytes qui libèrent des anticorps dirigés contre l'antigène. Les oligosaccharides de par leur petite taille sont peu immunogènes et doivent souvent être couplés avec un immunogène protéique comme de l'albumine de sérum bovin (BSA pour « Bovin Serum Albumin »). 2) Les lymphocytes B sont isolés de la rate de l'animal. Ils sont immortalisés par fusion avec des cellules cancéreuses, les myélomes, aptes à une division cellulaire rapide et immortels. La fusion de ces deux cellules forme un hybridome qui est 3) sélectionné sur un milieu où seules les cellules fusionnées peuvent se reproduire avant 4) d'être clonées. Les anticorps peuvent ensuite être produits 5) et leur spécificité pourra être caractérisée.

## 2. Utilisation des sondes dans l'étude de la paroi

Les anticorps monoclonaux et les CBMs peuvent être utilisés de différentes manières en fonction de ce que l'on cherche à étudier. Par exemples, ces sondes peuvent être utilisées pour réaliser des profilages de la paroi lorsqu'elles sont combinées à des puces ou glycoarrays (CoMPP pour « Comprehensive Microarray Polymer Profiling » ; [Moller et al., 2007](#)). Combinée à la microscopie, l'utilisation de ces sondes par des techniques en immunomarquage permet de localiser *in situ* des fractions spécifiques à l'échelle d'un organe ou d'une cellule. L'utilisation de ces outils offre également l'avantage de pouvoir suivre des fractions

particulières d'une molécule d'intérêt dans le temps et l'espace. Les sondes peuvent être utilisées couplées à des fluorochromes en microscopie optique à fluorescence ou couplées à des billes d'or en microscopie électronique. Grâce à des traitements enzymatiques spécifiques, il est également possible de mettre en évidence des interactions entre différents composés de la paroi (Marcus *et al.*, 2008).

### **3. Les premiers anticorps dirigés contre des polysaccharides de paroi chez les algues brunes**

Chez les plantes terrestres, ces outils dirigés contre les polysaccharides de la paroi comme les pectines, les xylanes ou en encore les xyloglucanes ont été largement développés et utilisés. Aujourd'hui, une centaine d'anticorps caractérisés sont disponibles à la communauté scientifique dans plusieurs pays (Plant probes au Royaume-Uni ; Biosupplies en Australie et CCRC aux États-Unis). Contrairement aux plantes, très peu d'outils sont disponibles pour l'étude de la paroi des algues brunes. Ces inégalités ont principalement été causées par une plus faible activité de recherche sur les algues brunes et des difficultés à fournir des oligosaccharides bien définis pour l'immunisation des animaux.

Des anticorps monoclonaux spécifiques des polysaccharides de la paroi des algues brunes ont toutefois été générés dans les années 1980. Ces derniers ont permis de détecter la présence d'alginate et de fucanes sulfatés dans la paroi de différents tissus de *Fucus* et de *Macrocystis* (Vreeland *et al.*, 1984 ; Green *et al.*, 1993 ; Jones *et al.* 1988 ; Eardley *et al.*, 1990). Cependant, à l'époque, à cause d'un manque de polysaccharides spécifiques, aucune de ces sondes n'a pu être caractérisée. Or, déterminer les épitopes reconnus par ces sondes est essentiel pour déterminer et comprendre les rôles fonctionnels, dans le compartiment pariétal, des différents motifs d'alginate ou de fucanes. De plus, les lignées cellulaires productrices de ces anticorps n'ont pas été maintenues.

Récemment, nous avons produit et caractérisé de nouveaux anticorps monoclonaux anti-alginate et anti-fucanes en collaboration avec l'équipe du Pr. Paul Knox de l'université de Leeds (Torode *et al.*, 2015 ; Torode *et al.*, 2016). Ces nouveaux outils offrent ainsi la possibilité de localiser *in situ* à un niveau cellulaire, la présence de fractions polysaccharidiques particulières dans la paroi des algues brunes. Ces nouveaux outils permettent une nouvelle approche pour étudier les rôles de la paroi chez les algues brunes.

## VI. Présentation du travail de thèse

La thèse présentée dans ce manuscrit a été réalisée au sein de la station biologique de Roscoff, dans l'équipe de Glycobiologie Marine. Ce projet visait à localiser et à comprendre le rôle des polysaccharides de la paroi au cours du développement précoce des macro-algues brunes. Pour cela, le zygote de *Fucus* et les sporophytes d'*Ectocarpus* ont été utilisés comme organismes modèles.

Cette thèse s'est articulée autour de trois principaux objectifs. Le **premier objectif** avait pour but d'améliorer les connaissances sur la composition de la paroi des algues brunes. Ainsi, la présence d'AGPs, composés polysaccharidiques minoritaires de la paroi, ont pour la première fois été mis en évidence dans la lignée des algues brunes. Le **deuxième objectif** fut de valider l'utilisation de nouveaux outils de détection spécifiques de polysaccharides de la paroi des algues brunes. L'organisme modèle zygote de *Fucus*, pour lequel la composition de la paroi est bien détaillée dans la littérature, a été utilisé pour mettre en place et valider des anticorps monoclonaux anti-alginates et anti-fucanes. Grâce à la validation des anticorps monoclonaux nous avons établi une cartographie détaillée de la répartition des polysaccharides de la paroi au cours du développement précoce de nos deux organismes modèles : le zygote de *Fucus* et le sporophyte d'*Ectocarpus*. Le but étant de constituer une base de comparaisons de la structure pariétale précoce entre différentes souches, espèces modèles et en réponse à différents traitements et stress environnementaux. Pour cela, les sondes préalablement sélectionnées ont été utilisées en immunomarquage. Lors de ces étapes, la mise au point de protocoles adaptés pour *Ectocarpus* a été nécessaire. Enfin, le **troisième objectif** était d'étudier les rôles des polysaccharides de la paroi au cours du développement précoce et dans les processus d'adaptation au milieu salin. Pour cela, la morphologie et la répartition des polysaccharides de la paroi en présence de différents traitements et / ou sur différentes souches ont été étudiées chez nos deux organismes modèles. D'une part, l'implication biologique des AGPs et l'impact de leur inhibition sur la distribution des principaux polysaccharides de la paroi ont été étudiés *in situ* chez le zygote de *Fucus*. D'autre part, l'implication de la sulfatation des fucanes de la paroi dans l'adaptation à des variations de salinité et lors de du développement précoce a été étudiée chez les sporophytes d'*Ectocarpus*.

Le travail présenté dans ce manuscrit est organisé de la manière suivante. Le **chapitre 2** apporte quelques compléments de matériels et méthodes, notamment à travers des articles dédiés. Le **chapitre 3** présente à travers un article scientifique les travaux qui ont permis de mettre en évidence la présence d'AGPs dans la paroi des algues brunes et l'implication de ces derniers dans les mécanismes du développement, dont l'élongation cellulaire, chez le zygote de *Fucus*. Un autre article scientifique est présenté dans le **chapitre 4**. Ce dernier valide biologiquement l'utilisation des anticorps chez le zygote de *Fucus* pour lequel une cartographie détaillée a été réalisée au cours de son développement précoce. L'implication de fractions particulières d'alginate et de fucanes lors de la polarisation cellulaire et de l'émergence du rhizoïde chez le zygote de *Fucus* y est confirmée. L'influence des AGPs dans la distribution et l'assemblage des polysaccharides de la paroi a également été montrée. Le **chapitre 5** est avant tout un chapitre de transition. En proposant une cartographie détaillée de la répartition des polysaccharides de la paroi au cours du développement précoce des sporophytes d'*Ectocarpus*, il sous-entend un rôle de certains épitopes, et plus particulièrement de fucanes sulfatés, lors de la croissance des filaments. Les résultats présentés dans ce chapitre ont ainsi conduit à l'étude présentée dans le **chapitre 6**. Dans ce dernier, nous montrons que la présence de sulfate inorganique dans le milieu, indépendamment de la salinité, est nécessaire à la sulfatation des fucanes dans la paroi des algues brunes. De plus, nous révélons que le dépôt de fucanes sulfatés dans la paroi est essentiel à la croissance des filaments d'*Ectocarpus*. Les conclusions générales et les perspectives de l'ensemble de ses études font l'objet du **chapitre 7**. Enfin, trois documents annexes sont disponibles à la fin de ce manuscrit.

# **Chapitre 2**

## **Matériels & Méthodes**



## Chapitre 2 : Matériels & Méthodes

### Préambule

Dans les chapitres de résultats présentés ci-après, une partie matériel et méthodes est disponible dans chaque article. Ce chapitre a pour objet d'apporter quelques compléments aux lecteurs, notamment à travers des articles dédiés. Il est constitué de quatre parties, dont deux sont illustrées par des articles publiés, c'est-à-dire un protocole publié sur le site en ligne « Bio-protocol » et un chapitre de livre soumis en 2017. Les deux autres parties sont présentées pour expliquer le choix des écotypes d'*Ectocarpus* étudiés et la production de parthénosporophytes (PSPs), le détail d'expériences additionnelles sur l'étude des AGPs chez les algues brunes et les milieux de cultures utilisés.

## I. Modèles d'études

### A. Le modèle zygote de *Fucus* : isolation des gamètes & cultures des zygotes

L'article suivant a été publié en 2017 dans le journal en ligne « Bio-protocol ». Cet article fournit les connaissances nécessaires à la production et à l'utilisation du zygote de *Fucus* pour mener des études sur la fécondation, les premières divisions cellulaires et le développement précoce et des fucales en général. Mes premières études ont été menées sur ce modèle. Ces résultats ont été publiés et sont présentés dans les chapitres 3 et 4 de la partie résultats de ce manuscrit.

**Note.** La vidéo proposée dans ce document peut être visionnée en ligne grâce au lien suivant : <http://www.bio-protocol.org/e2408>

## Isolation of *Fucus serratus* Gametes and Cultivation of the Zygotes

Amandine Siméon\* and Cécile Hervé\*

CNRS–UPMC Univ Paris 06, UMR 8227, Integrative Biology of Marine Models, Station Biologique de Roscoff, CS 90074, Roscoff, France

For correspondence: [amandine.simeon@sb-roscoff.fr](mailto:amandine.simeon@sb-roscoff.fr); [cecile.herve@sb-roscoff.fr](mailto:cecile.herve@sb-roscoff.fr)

**[Abstract]** Zygotes of the Fucale species are a powerful model system to study cell polarization and asymmetrical cell division (Bisgrove and Kropf, 2008). The Fucale species of brown algae grow in the intertidal zone where they reproduce by releasing large female eggs and mobile sperm in the surrounding seawater. The gamete release can be induced from sexually mature fronds in the laboratory and thousands of synchronously developing zygotes are easily obtained. In contrast to other eukaryotic models, such as land plants (Brownlee and Berger, 1995), the embryo is free of maternal tissues and therefore readily amenable to pharmacological approaches. The zygotes are relatively large (up to 100 µm in diameter), facilitating manipulations and imaging studies. During the first hours of zygote development, the alignment of the axis to external cues such as light is labile and can be reversed by light gradients from different directions. A few hours before rhizoid emergence, the alignment of the axis and the polarity are fixed and the cells germinate accordingly. At this stage the zygotes are naturally attached to the substratum through the secretion of cell wall adhesive materials (Kropf *et al.*, 1988; Hervé *et al.*, 2016). The first cell division occurs about 24 h after fertilisation and the early embryo is composed of only two cell types that differ in size, shape and developmental fates (*i.e.*, thallus cells and rhizoid cells) (Bouget *et al.*, 1998). The embryo can be successfully cultivated in the laboratory for a few more days (4 weeks maximum) and has an invariant division pattern during the early stages, which allows cell lineages to be traced histologically.

**Keywords:** Asymmetric cell division, Developmental biology, Brown algae, *Fucus serratus*, Zygotes, Embryogenesis

**[Background]** This protocol provides instructions for the isolation of male and female gametes of *Fucus* spp. used for *in vitro* fertilisation and discusses how to monitor the development of the resulting zygotes and early embryos. These instructions are for the use of the dioecious species *Fucus serratus*, but they can be readily adapted to a monoecious Fucale species.

### Materials and Reagents

1. Razor blade (Gillette)
2. Black flat base  
*Note: This can be a black paper base.*
3. Paper towel (Lucart Professional, catalog number: 864043)

4. 100 µm nylon filter (Sigma-Aldrich, catalog number: NY1H00010)
5. Slides
6. Petri dishes (SARSTEDT, catalog number: 82.1472.001)
7. Sexually mature plants of *Fucus serratus*, males and females

*Note: Marine Research Institutes are sometimes equipped with facilities that allow the ordering and sending of such material (see for instance the EMBRC-France website, <http://www.embrc-france.fr/en>) The algae can be transported in moist tissues for a time preferentially no longer than 2 days.*

8. Approximately 1 L of natural seawater

*Note: Alternatively artificial seawater can be prepared or purchased (Sigma-Aldrich, catalog number: S9883).*

### **Equipment**

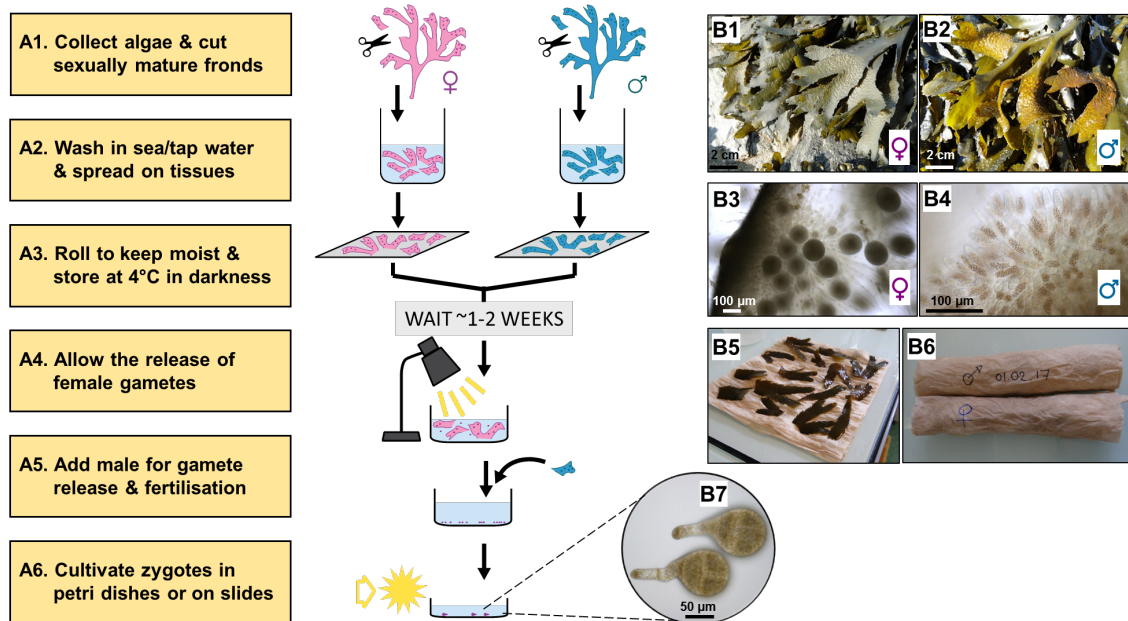
1. Beaker of approximately 250 ml (Fisher scientific)
2. Desk lamp
3. Fridge or cold room
4. Optical microscope equipped with 20x and/or 40x objectives (Olympus)
5. Thermostatic chamber at 13 °C (Pol-Eko Aparatura)
6. White light, ideally 90 µmol m<sup>-2</sup> sec<sup>-1</sup> (Mazda)
7. Hermetic black chamber (optional)

### **Procedure**

#### **A. Isolation of *Fucus serratus* gametes and fertilisation**

1. Collect female and male plants of *Fucus serratus* on the shore (Figure 1, step A1).  
During a certain period of the year (winter time for European coasts), the thallus tips of the Fucale species are swollen into receptacles that contain the fertile conceptacles. On the shore, male plants can be recognized by the orange colour of their conceptacles, due to a carotenoid pigment present in the sperm chromoplasts. The female plants are brown-green in colour (Figure 1B1 and 1B2). Sort female and male plants. To do this, section by hand a conceptacle, mount sections on a microscope slide with a drop of seawater and examine by light microscopy. Typical pictures of female and male conceptacles are shown (Figure 1B3 and 1B4). Isolate all sexually mature fronds in two distinct batches (*i.e.*, male/female).
2. Wash in seawater to remove epiphytes and remaining sand and wash briefly with tap water (Figure 1, step A2).
3. Spread all pieces on paper towel (Figure 1, step A3) making layers, and roll the whole such as for a sushi maki (Figure 1B5 and 1B6). Store at 4 °C in darkness for at least one week.

4. To release the female gametes, unroll the paper towels and transfer the mature fronds into a beaker containing seawater (Figure 1, step A4). Incubate one hour in daylight or under artificial light at room temperature. The oogonium, which contains eight individual eggs in *F. serratus*, will be released first, rapidly rupturing to discharge the eggs. Examine by light microscopy.  
*Note: The stress induced by the abrupt light and osmotic changes (i.e., switching samples from darkness to daylight and back in seawater) favour the gamete release.*



**Figure 1. Overview of the key stages in the isolation of *Fucus* gametes and cultivation of the zygotes.** A. The key stages are listed on the left side. B. Representative pictures are shown on the right side for: B1 and B2. Female and male *Fucus serratus* plants; B3 and B4. Cross sections of their respective gamete-containing conceptacles; B5 and B6. The conditioning of the mature fronds for storage; B7. Typical 4-celled zygotes obtained after 48 h following fertilisation.

5. At this stage the eggs will rapidly settle at the bottom of the beaker. After 2 h incubation gently remove some seawater with a pipette to concentrate the eggs. Filter the remaining solution containing the eggs using a 100 µm nylon mesh filter to remove aggregates. Place one or two small pieces of male fronds in contact with the newly released eggs (Figure 1, step A5). The male gametes exhibit negative phototropism, therefore placing the beaker in full daylight or under artificial light on a black flat base will favour the sperm movement toward the eggs. The female cells release a sexual pheromone to attract the sperm. Fertilisation will occur within 15 min of mixing sperm with oospheres. After 30 min, examine the release and vitality of the male gametes by light microscopy (Video 1).

**Video 1. Fertilisation of a *Fucus serratus* egg by sperm of the same species.** The male gametes are motile and clearly visible as small cells actively swimming in the vicinity of the immotile female egg. Flagella on the male gametes can be detected. The egg is approximately 80 µm large.

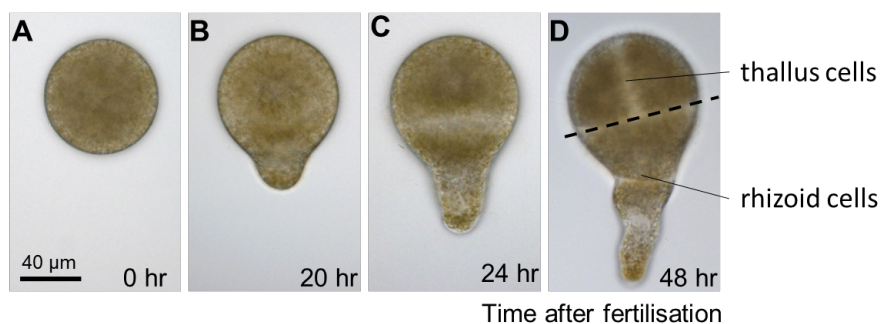


6. After one hour, wash twice by gently removing some of the seawater with a pipette and adding fresh seawater. Filter the remaining solution using a 100 µm nylon mesh filter. Allow the zygotes to grow by placing the beaker at 13 °C with a photoperiod of 12 h of light (90 µmol m<sup>2</sup> sec<sup>-1</sup>) and 12 h of darkness (Figure 1, step A6). The zygotes will naturally adhere to their substratum through the secretion of cell wall adhesive materials.

*Note: To ease future examination, the zygotes can be directly cultivated on microscope slides. To do this, concentrate the zygotes to an appropriate density and drop 250 µl of the solution on the slides. The use of polylysine-coated microscope slides will allow the zygotes and early embryos to stay firmly attached.*

**B. Monitoring development of *Fucus serratus* zygotes and early embryos**

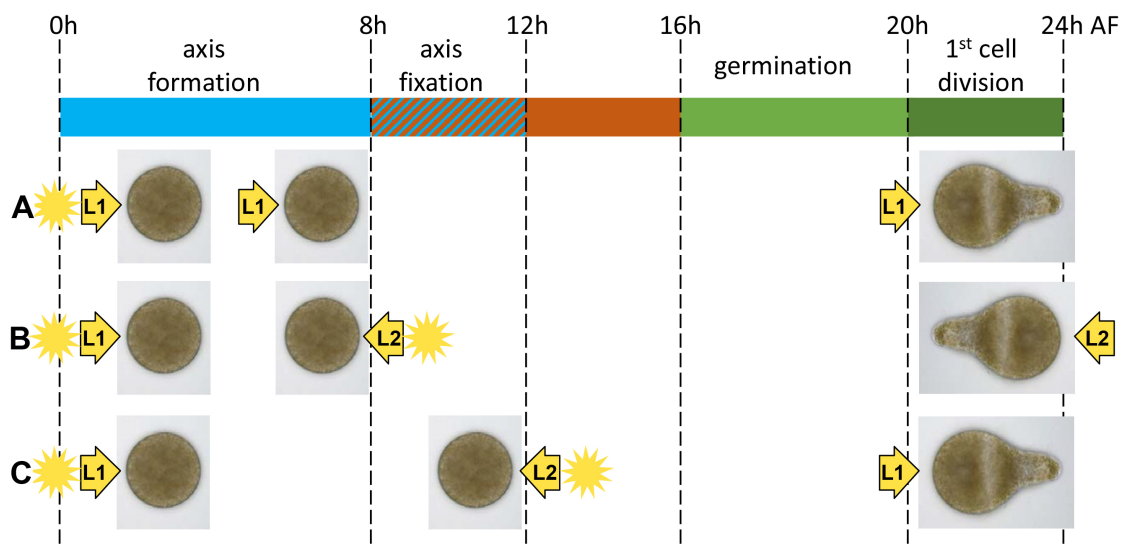
1. Typical growth conditions are 13 °C with a photoperiod of 12 h of light (90 µmol m<sup>2</sup> sec<sup>-1</sup>) and 12 h of darkness. Different stages of early development can be easily observed by light microscopy. The first cell division occurs around 24 h after fertilisation and divides the embryo in two cell types having distinct shapes and fates (Figure 2).



**Figure 2. Early development of *Fucus serratus* zygote and embryo.** A. *Fucus* eggs are spherical in shape with no obvious asymmetries. B. Polarization is first manifested

morphologically, around 20 h after fertilisation, when zygotes elongate and produces a bulge on one hemisphere, the rhizoid. C. When the first cell division occurs, about 24 h after fertilisation, it bisects the zygote transversally into two asymmetrical cells with distinct developmental fates: the apical thallus cell and the rhizoid basal cell. D. During the following cell divisions, the rhizoid cell elongates by apical growth whereas the thallus cell expands by diffuse growth.

2. Regularly change the surrounding seawater to renew nutrients and prevent desiccation. Cultivation in Petri dishes will require the seawater (15-50 ml) to be changed once a week.
3. It is possible to control the orientation of the polar axis formation and fixation by applying a light vector. To do this a unilateral light (L1) should be used (a classical light bulb can be used and should not be positioned above the Petri dish but parallel to the bench base). The rhizoid cell will develop in the opposite direction of the light vector L1 (Figure 3A). In normal conditions, the polarization axis is labile during the first 10 h of development and can therefore be redirected with the use of a second unidirectional light gradient (L2), orientated 180° to the first (Figures 3B and 3C). This property allows ready study of the mechanisms controlling polarization by treatment with pharmacological agents. The use of a hermetic black chamber, equipped with a unilateral bulb light, reduces the impact of possible external and uniform light.
4. The embryos can be easily grown for one week in the laboratory. Beyond this stage the mature embryos are difficult to maintain in lab culture conditions (4 weeks maximum). Unlike other models of brown algae, such as the *Ectocarpus* filamentous alga, the life cycle of *F. serratus* cannot be reproduced in the laboratory.



**Figure 3. Control of the orientation of the polar axis formation and fixation.** A. Starting just after fertilization (AF), the zygotes are cultivated in a unilateral light direction (L1). The rhizoid cell will develop in the opposite direction of L1. B. Zygotes are cultivated in the unilateral light direction (L1) during the first hours AF. Before axis fixation (approximately 8 h AF), a second unilateral light vector (L2) is applied, oriented 180° from L1. The rhizoid cell develop in the

opposite direction of L2. C. If the switch of light directions is applied after axis fixation, the rhizoid cell will develop in the opposite direction of the first light source.

### **Data analysis**

*Fucus* zygotes develop synchronously and the protocol listed above allows the observation of hundreds of individuals at the same time. For data analysis (*i.e.*, morphological results from pharmacological studies) we recommend performing three individual biological replicates. For each replicate a minimum of 30-100 zygotes should be observed. Statistical tests should be applied such as Student's *t*-tests (Hervé *et al.*, 2016).

### **Acknowledgments**

A brief description of this protocol has been recently reported in Hervé *et al.*, 2016 and was mainly based on previously described methods (Kropf *et al.*, 1988; Bouget *et al.*, 1998). We acknowledge funding from the Brittany Region (grant ARED\_8979 ECTOPAR).

### **References**

1. Bisgrove, S. and Kropf, D. L. (2008). [Asymmetric cell divisions: zygotes of furoid algae as a model system](#). In: Verma, D. and Hong, Z. (Eds.). Cell Division Control in Plants. *Springer* pp: 323-341.
2. Bouget, F. Y., Berger, F. and Brownlee, C. (1998). [Position dependent control of cell fate in the \*Fucus\* embryo: role of intercellular communication](#). *Development* 125(11): 1999-2008.
3. Brownlee, C. and Berger, F. (1995). [Extracellular matrix and pattern in plant embryos: on the lookout for developmental information](#). *Trends Genet* 11(9): 344-348.
4. Hervé, C., Siméon, A., Jam, M., Cassin, A., Johnson, K. L., Salmeán, A. A., Willats, W. G., Doblin, M. S., Bacic, A. and Kloareg, B. (2016). [Arabinogalactan proteins have deep roots in eukaryotes: identification of genes and epitopes in brown algae and their role in \*Fucus serratus\* embryo development](#). *New Phytol* 209(4): 1428-1441.
5. Kropf, D. L., Kloareg, B. and Quatrano, R. S. (1988). [Cell wall is required for fixation of the embryonic axis in \*Fucus\* zygotes](#). *Science* 239(4836): 187-190.



## B. Le modèle *Ectocarpus* : souches & production des parthénosporophytes

### 1. Sélection des souches d'*Ectocarpus* utilisées dans cette étude

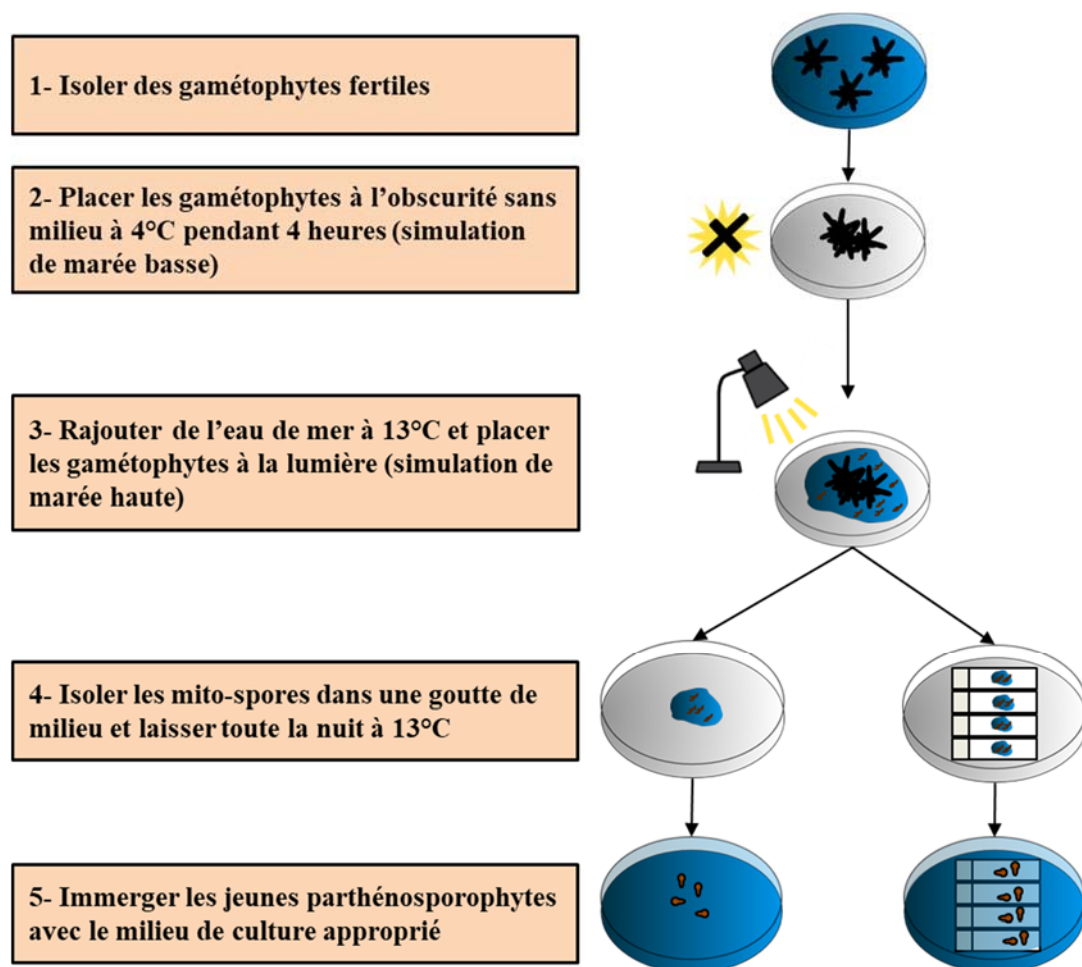
Les parthénosporophytes d'*Ectocarpus* (cf. cycle de vie d'*Ectocarpus* Figure 18 de l'introduction) sont faciles à obtenir et à cultiver au laboratoire. Il s'agit de la phase classiquement étudiée dans la littérature et il existe plusieurs articles publiés sur ce modèle, comme une étude sur la morphologie précoce d'*E. siliculosus* (Le Bail *et al.*, 2008). Au laboratoire, des collections de centaines de souches sont régulièrement cultivées pour répondre aux différents besoins des équipes. Comme décrit dans l'introduction (partie 4), la souche 32 d'*E. siliculosus* (accession CCAP 1310/4, origine San Juan de Marcona, Peru) est une souche marine de référence, alors que la souche Bft15b d'*E. subulatus* (accession CCAP 1310/34, Beaufort, North Carolina, USA) est capable de résister à des variations importantes de salinité. Ces deux souches ont été utilisées comme organismes modèles pour les études présentées dans les chapitres 5 et 6 de ce manuscrit de thèse.

Parmi les rares algues brunes contenant des écotypes résistants aux variations de salinité, la souche Australienne 371 isolée en rivière (accession CCAP 1310/196, origine Hopkins River Falls, Victoria, Australia) a fait l'objet d'études morphologiques et transcriptomiques en réponse à des variations de la salinité, y compris au niveau des polysaccharides de la paroi (Dittami *et al.*, 2012). Cependant, cette souche ne produit pas de parthénosporophytes et est donc difficile à cultiver au laboratoire. De plus, son génome n'a pas pu être séquencé. Les efforts récents se sont tournés vers le second écotype Bft15b dont les parthénosporophytes sont facilement cultivables au laboratoire. Le génome de cette souche a récemment été séquencé et annoté. J'ai d'ailleurs eu l'opportunité de participer à l'annotation de ce dernier. Ce travail est présenté en annexe 2.

### 2. Production de parthénosporophytes

La production des parthénosporophytes est illustrée dans la figure 21. Afin d'induire la libération synchronisée des gamètes, des gamétophytes fertiles étaient placés sans milieu à 4°C et à l'obscurité pendant 4 heures (simulation de marée basse). Les gamétophytes ont ensuite été placés sous une forte luminosité avec de l'eau de mer naturelle (edmN) à 100% (simulation de marée haute). Les gamètes ont été libérés soit dans des boîtes de Petri stériles, soit sur des lames

polysinées stériles de microscopie placées dans des boîtes de pétri de 140 mm de diamètre. Les gamètes ont été isolés des gamétophytes parents en pipetant 30  $\mu\text{l}$  de milieu et en les replaçant dans une goutte de 200  $\mu\text{l}$  de milieu neuf. Quelle que soit la dilution saline testée, les gamètes étaient cultivés pendant 24 heures dans une goutte d'eau de mer 100% (naturelle ou artificielle). Les boîtes étaient placées en chambre de culture à 13°C toute la nuit. Un jour de culture après libération des gamètes, les boîtes de Petri étaient immergées avec le milieu de culture correspondant (eau de mer naturelle ou artificielle / faible ou forte salinité) et étaient replacées en chambre de culture à 13°C.



**Figure 21** : Production de parthénosporophytes d'*Ectocarpus*.

## II. Extraction et détection des AGPs

Les AGPs ont été extraits à partir de 4 espèces d'algues brunes différentes (*Saccharina latissima*, *Ascophyllum nodosum*, *Fucus serratus* et *E. siliculosus*) et d'une plante (*Arabidopsis thaliana*). La souche 32 d'*E. siliculosus* a été cultivée un mois en bidon contenant 10 litres d'eau de mer naturelle enrichie en nutriment provasoli (PES ; [Starr & Zeikus 1993](#)). Entre 4 à 5 plants de *S. latissima*, d'*A. nodosum* et de *F. serratus* ont été récoltés directement sur l'estran devant la station biologique de Roscoff. Les racines d'*A. thaliana* ont été cultivées en hydroponie pendant 12 semaines au « Department of Plant and Environmental Sciences » de l'université de Copenhague. Après récolte, les échantillons ont tous été déshydratés.

Le protocole d'extraction des AGPs d'algues brunes utilisé a été adapté du protocole utilisé chez les plantes ([Popper, 2011](#)). Entre 10 à 20 grammes de matériel végétal étaient broyés dans de l'azote liquide à l'aide d'un mortier et un pilon. Les échantillons étaient ensuite incubés avec 10 ml de tampon d'extraction (50 mM Tris-HCl, pH 8, EDTA 10 mM, 0,1% v / v B-mercaptoéthanol, 1% p / v de Triton X-100) pour 10 g de matériel biologique. L'incubation a été réalisée sur la nuit à 4°C. Le lendemain, les échantillons étaient centrifugés 10 minutes à 4000g. L'extrait de *S. latissima* plus visqueux, était centrifugé 1 heure à 1000g et à 4°C. Après prélèvement du surnageant, les polysaccharides et les glycoprotéines ont été précipités avec 5 volumes d'éthanol à 4°C pendant au moins 16 heures. Suite à une centrifugation de 2 minutes à 2000g, le culot était remis en suspension dans 5 ml de 50 mM Tris-HCl, pH 8 pour 10g d'échantillon. Pour *S. latissima*, 15 ml pour 10 g d'échantillon ont été utilisés. Les échantillons ont ensuite été incubés 24h à 4°C. Après 10 minutes de centrifugation à 4000g, le surnageant a été récupéré. Afin de récolter un maximum de matériel, cette étape était réalisée deux fois. Les extraits d'algues étaient ensuite dialysés une nuit à 4°C (Seuil de coupure de 6-8000 Daltons) avant d'être lyophilisés.

Les échantillons lyophilisés ont tous été re-suspendus dans une solution de NaCl 1%. Les extraits ont été révélés par coloration au réactif de Yariv  $\beta$ -D-galactosyl ( $\beta$ Gal) (30 $\mu$ M en NaCl 1%) après migration par électrophorèse sur un gel dénaturant SDS-PAGE à 8% de polyacrylamide. Le gel était décoloré avec du NaCl 1% en changeant régulièrement le milieu ([Poon et al., 2012](#)). La présence d'AGPs a également été mise en évidence *via* un Western-blot par immuno-révélation avec l'anticorps anti-AGPs JIM13. Le kit Bio-Rad Clarity western (Biorad, USA) a été utilisé. Avant la réalisation du Western-blot, les alginates et les fucanes

des 3 échantillons algaux testés ont préalablement été digérés grâce à un traitement enzymatique de deux heures (0,5 µg/ml d'alginate lyase AlyA1 (Thomas *et al.*, 2012) et de 0,5 µg/ml fucanase (Colin *et al.*, 2006) pour 10 µl d'échantillons). Après transfert sur une membrane de nitrocellulose de 0,2 µm, les sites aspécifiques ont été bloqués pendant une heure avec une solution de PBS-Tween à 0,1% contenant 5% de lait en poudre (PBS-Tween-lait). Après avoir rincé la membrane 3x5 minutes à l'aide de PBS-Tween 0,1%, cette dernière a été incubée pendant 2 heures en présence de l'anticorps primaire JIM13 dilué au 1/10 dans du PBS-Tween-lait. La membrane a été rincée 3x5 minutes avec du PBS-Tween 0,1%, puis incubée en présence d'anticorps secondaires de rat dilués au 1/5000 dans du PBS-Tween-lait. Afin de révéler les sites de fixation des anticorps, les anticorps utilisés étaient conjugués à une molécule HRP (peroxydase de Raifort). La révélation sur la membrane de nitrocellulose a été effectuée en utilisant les réactifs Clarity Western ECL Substrate (Biorad, USA).

### III. Milieux de culture

Les algues ont été cultivées dans des boîtes de Petri en salle de culture à 13°C avec une intensité lumineuse de  $40 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  sur une durée de 14 heures par jour. Les gamétophytes utilisés pour le relâchement des gamètes ont tous été cultivés en eau de mer naturelle enrichie en nutriment Provasoli (PES ; Starr & Zeikus 1993). L'eau de mer naturelle (edmN) a été prélevée au large des côtes de Roscoff, filtrée sur une membrane de  $0,5 \mu\text{m}$  puis autoclavée et conservée à 13°C. Après le relâchement des gamètes, les PSPs d'*E. siliculosus* et d'*E. subulatus* ont ensuite été cultivés en edmN ou artificielle (edmA). Les milieux de culture qui ont été utilisés pour chaque souche sont listés dans le [tableau 3](#). L'edmN a été utilisée telle quelle (edmN 100%) ou diluée à 10% (10% edmN + 90% d'eau distillée). Afin de réaliser des cultures dont les concentrations en sulfate étaient contrôlées, de l'eau de mer artificielle (edmA) a été produite (Brawley & Quatrano 1979 ; Crayton *et al.*, 1974). L'edmA diluée ou non a été testée avec ou sans de sulfate. Afin de préserver le métabolisme protéique des algues cultivées en absence de sulfate, le  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  a été remplacé par 10 mM de méthionine (Brawley & Quatrano 1979 ; Crayton *et al.*, 1974). Des edmA 100% et 10% contenant 16 mM de sulfate ont également été testées. La composition des différentes solutions d'edmA est présentée dans le [tableau 4](#). Tous les milieux de culture ont été enrichis en nutriment Provasoli (PES ; Starr & Zeikus 1993) exempté de source de sulfate. Les cultures ont toutes été réalisées sans contaminants eucaryotes mais dans un milieu non axénique.

<i>E. siliculosus</i> (souche 32)	<i>E. subulatus</i> (souche Bft)
edmN 100%	edmN 100%
edmA 100%% - 16 mM de sulfate	edmN 10%
edmA 100% - 32mM de sulfate	edmA 100% - 16 mM de sulfate
	edmA 100% % - 32mM de sulfate
	edmA 100% sans sulfate
	edmA 10% - 1,6 mM de sulfate
	edmA 10% - 16 mM de sulfate
	edmA 10% sans sulfate

**Tableau 3 :** Milieux de cultures utilisées pour les parthénosporophytes d'*E. siliculosus* et d'*E. subulatus*.

<b>Eaux de mer artificielles</b>						
	<b>100 % [32 mM]</b>	<b>100 % [16 mM]</b>	<b>100 % [0 mM]</b>	<b>10 % [16 mM]</b>	<b>10% [1,6 mM]</b>	<b>10 % [0 mM]</b>
<b>MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O</b>	<b>32 mM</b>	<b>16 mM</b>	<b>/</b>	<b>16 mM</b>	<b>1,6 mM</b>	<b>/</b>
<b>Méthionine</b>	<b>/</b>	<b>/</b>	<b>10 mM</b>	<b>/</b>	<b>/</b>	<b>1 mM</b>
MgCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O	51,6 mM					
KCl	8,85 mM					
NaCl	0,55 M					
CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	10 mM					
NaHCO <sub>3</sub>	1,77 mM					
Iode	0,2 mg/L					
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	30,7 µM					
FeCl <sub>3</sub>	0,3 µM					
EDTA	5,7 µM					
Vitamine B12	6,7 µg/L					
Vitamin B1	0,33 mg/L					
Biotine C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> S	3,3 µg/L					
TRIS C <sub>4</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub>	0,3 g/L					
NaNO <sub>3</sub>	0,27 mM					
C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> Na <sub>2</sub> O <sub>6</sub> P (5H <sub>2</sub> O)	15,4 µM					
pH (avant autoclave)	7.8					

**Tableau 4 :** Composition de l'eau de mer artificielle avec addition de nutriments **Provasoli**. Les vitamines ont été filtrées sur une membrane de 0,2 µm. Toutes les autres solutions ont été autoclavées.

## IV. Immuno-détection & imagerie *in situ* des polysaccharides de la paroi des algues brunes

### Présentation du chapitre

Aujourd'hui, de nouveaux anticorps monoclonaux spécifiques de polysaccharides de paroi des algues brunes (Torode *et al.*, 2015 ; Torode *et al.*, 2016) permettent de localiser finement diverses fractions polysaccharidiques spécifiques dans des tissus complexes lors d'observation en microscopie à fluorescence ou électronique.

Le document présenté ci-après est un chapitre du livre regroupant des protocoles didactiques dédiés aux macro-algues et intitulé : « Protocol Book on Macroalgae ». Ce dernier a été soumis en août 2017 et sera publié en février 2018. Ce volume a pour objectif de proposer et de mettre en commun de nombreux protocoles regroupant plusieurs disciplines telles que la génomique, la physiologie ou encore la microscopie. L'adoption de protocoles communs et facilement utilisables est nécessaire à la comparaison précise de données provenant de sources différentes. Le chapitre que nous y avons soumis concerne l'imagerie des polysaccharides de la paroi chez les algues brunes.

Lors de ma thèse, ces protocoles et en particulier ceux dédiés à la microscopie à fluorescence ont été largement utilisés à la fois chez le zygote de *Fucus* et chez *Ectocarpus*. Ces protocoles m'ont permis d'étudier les relations étroites qui existent entre la composition polysaccharidique de la paroi, les processus de croissance tels que la mise en place de l'axe de polarité chez le zygote de *Fucus* et la réponse à une carence en sulfate chez *Ectocarpus*. Ces résultats sont présentés dans les chapitres 4, 5 et 6 de ce manuscrit.



**Chapitre 3**

**Mise en évidence des**

**arabinogalactanes protéines (AGPs)**

**dans la paroi des algues brunes**

# Chapitre 3 : Mise en évidence des arabinogalactanes protéines (AGPs) dans la paroi des algues brunes

## Présentation de l'article

Les Arabinogalactanes protéines (AGPs) sont des glycoconjugués présents dans la paroi des plantes, et forment l'une des familles les plus complexes de macromolécules. Elles sont constituées à 90% de carbohydrates et contiennent un squelette protéique. Les résidus d'hydroxyprolines constituent les sites primaires de l'O-glycosylation. Ces molécules sont impliquées dans de nombreux processus physiologiques, dont les mécanismes de développement telles que l'expansion et l'élongation cellulaire (Lee *et al.*, 2005; Nguema-Ona *et al.*, 2012 ; Willats & Knox, 1996), l'embryogénèse et la différenciation tissulaire (Schindler *et al.*, 1995; Zhang *et al.*, 2003). Les algues brunes sont phylogénétiquement distantes de la lignée verte et ont acquis leur multicellularité de manière indépendante, ce qui a conduit à différents mécanismes d'attachements et d'expansions cellulaires. Toutefois, ces deux lignées partagent des caractéristiques évolutives communes avec d'autres organismes multicellulaires, y compris une paroi cellulaire riche en glucides, mais dont la composition pariétale diffère selon les groupes.

L'article présenté ci-après a été publié en 2016 dans le journal «*New Phytologist*». Il met pour la première fois en évidence la présence d'AGPs dans la paroi des algues brunes et leurs implications dans les processus de développement. Cet article est le fruit de plusieurs collaborations. En 2010, *Ectocarpus* est le premier organisme de la lignée des algues brunes dont le génome a été séquencé et annoté (Cock *et al.*, 2010). A partir de ce génome et en collaboration avec l'équipe du professeur Antony Bacic de l'université de Melbourne en Australie, 70 gènes candidats codant des domaines AGPs ont été identifiés, posant la question de la présence d'AGPs chez les algues brunes. L'expertise et les programmes bioinformatiques spécifiques de cette équipe ont permis de sélectionner et d'analyser en détail 10 gènes candidats. Une collaboration avec l'équipe du professeur William Willats de l'université de Copenhague au Danemark a ensuite permis de détecter ces composés chez plusieurs Phéophycées. Des extractions séquentielles des polysaccharides de la paroi de 7 Laminariales, 6 Fuciales, 2 Ectocarpales et d'une Dictyotale ont été réalisées afin d'identifier la présence d'AGPs *via* des

techniques de profilages de polymères sur micro-puces (glyco-array). Les sept anticorps monoclonaux anti-AGPs utilisés ont détecté la présence de structures AGPs chez les algues brunes, et ont également mis en évidence des associations différentes avec les composés de la paroi selon l'ordre auquel appartenait l'espèce analysée. A la suite de ces premiers travaux, mon travail dans cette étude a consisté à localiser et analyser le rôle potentiel dans le développement des AGPs présents dans la paroi des algues brunes. Pour cela, j'ai utilisé un organisme modèle en biologie du développement : le zygote de *Fucus*. En précipitant les AGPs avec le réactif de Yariv ( $\beta$ -D-galactosyl ( $\beta$ GalY) et  $\beta$ -D-glucosyl ( $\beta$ GluY)), j'ai pu montrer la présence et la localisation de ces glycoprotéines sur des stades précoces du zygote de *Fucus*. Les réactifs  $\alpha$ -D-mannosyl de Yariv, qui ne se lient pas aux AGPs ont été utilisés comme contrôles négatifs. De plus, en cultivant ces zygotes en présence du même réactif, j'ai montré l'implication des AGPs dans les mécanismes du développement, dont l'élongation cellulaire.

La mise en évidence des molécules d'AGPs dans la lignée des algues brunes et leur implication dans les mécanismes du développement précoce chez le zygote de *Fucus* ouvre la porte à de nombreuses questions, à la fois sur l'origine de ces composés particuliers, leur homologie par rapports aux AGPs de plantes, sur leur rôle exact dans le développement précoce et sur les relations qui existent entre les AGPs et les autres composés polysaccharidiques de la paroi chez les algues brunes. La question de l'origine des AGPs chez les eucaryotes a d'ailleurs fait l'objet d'un commentaire dans le journal « New Phytologist» (Knox 2016). Ce dernier est disponible en annexe 3 de ce manuscrit.

# Arabinogalactan proteins have deep roots in eukaryotes: identification of genes and epitopes in brown algae and their role in *Fucus serratus* embryo development

Cécile Hervé<sup>1,2</sup>, Amandine Siméon<sup>1,2</sup>, Murielle Jam<sup>1,2</sup>, Andrew Cassin<sup>3</sup>, Kim L. Johnson<sup>3</sup>, Armando A. Salmeán<sup>4</sup>, William G. T. Willats<sup>4</sup>, Monika S. Doblin<sup>3</sup>, Antony Bacic<sup>3</sup> and Bernard Kloareg<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, UMR 8227, Station Biologique de Roscoff, Integrative Biology of Marine Models, CS 90074, F-29688 Roscoff, France; <sup>2</sup>CNRS, UMR 8227, Integrative Biology of Marine Models, Station Biologique de Roscoff, CS 90074, F-29688 Roscoff, France; <sup>3</sup>ARC Centre of Excellence in Plant Cell Walls, School of BioSciences, University of Melbourne, Melbourne, Vic, Australia; <sup>4</sup>Department of Plant and Environmental Sciences, Faculty of Sciences, University of Copenhagen, Copenhagen, Denmark

## Summary

Author for correspondence:

Cécile Hervé

Tel: +33 298 29 23 23

Email: cecile.herve@sb-roscoff.fr

Received: 15 September 2015

Accepted: 27 October 2015

New Phytologist (2015)

doi: 10.1111/nph.13786

**Key words:** arabinogalactan proteins (AGPs), brown algae, cell elongation, cell polarity, cell wall, cell wall evolution, *Ectocarpus*, *Fucus* embryo.

• Arabinogalactan proteins (AGPs) are highly glycosylated, hydroxyproline-rich proteins found at the cell surface of plants, where they play key roles in developmental processes. Brown algae are marine, multicellular, photosynthetic eukaryotes. They belong to the phylum Stramenopiles, which is unrelated to land plants and green algae (Chloroplastida). Brown algae share common evolutionary features with other multicellular organisms, including a carbohydrate-rich cell wall. They differ markedly from plants in their cell wall composition, and AGPs have not been reported in brown algae.

• Here we investigated the presence of chimeric AGP-like core proteins in this lineage.

• We report that the genome sequence of the brown algal model *Ectocarpus siliculosus* encodes AGP protein backbone motifs, in a gene context that differs considerably from what is known in land plants. We showed the occurrence of AGP glycan epitopes in a range of brown algal cell wall extracts. We demonstrated that these chimeric AGP-like core proteins are developmentally regulated in embryos of the order Fucales and showed that AGP loss of function seriously impairs the course of early embryogenesis.

• Our findings shine a new light on the role of AGPs in cell wall sensing and raise questions about the origin and evolution of AGPs in eukaryotes.

## Introduction

Arabinogalactan proteins (AGPs) are a heterogeneous class of highly glycosylated proteins found at the cell surface in plants. The carbohydrate moiety accounts for 90–98% (w/w) of the mass of the protein. It consists predominantly of  $\beta$ -1,3-galactan main chains with  $\beta$ -1,6-galactan side chains, to which primarily arabinose and some other auxiliary sugar residues, such as rhamnose and glucuronic acid, are attached at their termini (Tan *et al.*, 2012). The protein backbone of AGPs typically contains repeating motifs rich in the amino acids hydroxyproline/proline, alanine and serine/threonine (PAST), in which the hydroxyproline residues are the primary sites of *O*-glycosylation. Proline hydroxylation in plants is performed by proline 4-hydroxylases (P4Hs) (Gorres & Raines, 2010). Historically, AGPs have been defined by three criteria: the presence of arabinogalactan (AG) chains, a hydroxyproline-rich protein backbone and the ability to bind to a class of synthetic dyes, the  $\beta$ -glucosyl Yariv reagents (Johnson *et al.*, 2003; Gorres & Raines, 2010; Showalter *et al.*, 2010; Tan *et al.*, 2012).

AGPs have been proposed to be involved in a range of biological functions and many are specifically associated with plant development and reproduction. They are either attached to the plasma membrane (Tan *et al.*, 2012) and the cell wall matrix (Tan *et al.*, 2013), or free in the apoplast where they act as signalling molecules. In cell suspension cultures they can be fully or partially secreted into the medium (van Hengel *et al.*, 2001; Borderies *et al.*, 2004). Among other processes, AGPs have been shown to be involved in cell elongation and expansion (Willats & Knox, 1996; Lee *et al.*, 2005; Nguema-Ona *et al.*, 2012), cell differentiation of vascular tissues (Schindler *et al.*, 1995; Zhang *et al.*, 2003) and embryogenesis. In all of the plant embryos studied to date, the spatiotemporal occurrence of AGPs is developmentally regulated, and acts either as positional markers or messengers during cell-fate selection (McCabe *et al.*, 1997; Qin & Zhao, 2006). Occurring in conditioned culture media, some AGPs promote somatic embryogenesis (Kreuger & van Holst, 1993; Borderies *et al.*, 2004). Because of its capacity to bind to and thus inactivate AGPs, the use of the  $\beta$ -glucosyl Yariv reagent in the culture media impairs normal embryo development

(Thompson & Knox, 1998; Qin & Zhao, 2006; Tang *et al.*, 2006; Yu & Zhao, 2012). Although nearly all of these studies were focused on somatic embryogenesis, they provide a strong indication that AGPs are involved in the initiation of embryogenesis. However, their precise biological function(s) in this process still remains elusive.

Brown algae, which together with diatoms and oomycetes form the phylum Stramenopiles, evolved multicellular organisms independently from other macrophytes such as green algae and land plants. As in other multicellular plant organisms, they evolved a diversified extracellular matrix (Popper *et al.*, 2011). Brown algal cell walls are made of fucose-containing sulfated polysaccharides (FCSPs) interlocking a cellulosic microfibril scaffold and embedded within an alginate-phenol network. Cell wall rigidity is controlled by the alginate structure, which depends on the activity of mannuronan-C5-epimerases (Deniaud-Bouët *et al.*, 2014). To date, AGPs have not been reported in brown algae.

In spite of the phylogenetic distance between land plants and brown algae, the zygotes of the brown algae from the order Fucales long served as a model to study molecular mechanisms during early embryogenesis and the initiation of the main body axis (Brownlee & Berger, 1995; Bisgrove & Kropf, 2008). In both *Arabidopsis* and *Fucus* zygotes, the first asymmetrical cell division defines the apical and basal cell lineages (named the thallus and rhizoid cells, respectively, in *Fucus*) and the subsequent cell divisions are similar (Brownlee & Berger, 1995; Bisgrove & Kropf, 2008). In contrast to plants, where the embryos are concealed inside maternal tissues, the zygotes of furoid algae develop freely in seawater, without the influence of maternal material. Furthermore, they are easy to prepare and amenable to experimental manipulations. These properties of furoid algae make them an excellent alternative experimental model with which to study cell polarity and symmetry-breaking mechanisms.

In *Fucus*, several studies have demonstrated the essential role of the cell wall as a source of position-dependent information required for cell polarization. Wall-free zygote protoplasts can form a polar axis, yet they are unable to fix it irreversibly as long as the wall is absent (Kropf *et al.*, 1988). Cellulose and alginates are the first polysaccharides to be deposited uniformly into the wall after fertilization. The FCSPs are deposited at a later stage, during the establishment of the polar axis and specifically at the rhizoid tip (Quatrano & Stevens, 1976; Bisgrove & Kropf, 2001). It is assumed that axis fixation is accompanied by the formation of an axis-stabilizing complex (ASC), which is located at the rhizoid apex and acts as a bridge between the cell wall, the transmembrane 'actors' and the cytoskeleton (Quatrano *et al.*, 1991). The detailed nature of the ASC components remains to be determined. Proteins similar to those found in focal contact in animal cells (i.e. integrin and vitronectin) were proposed to act as a transmembrane link connected to FCSPs in the wall (Quatrano *et al.*, 1991; Wagner *et al.*, 1992). At the two-celled embryo stage, the cell wall influences another developmental process in *Fucus*, where contact with the wall is sufficient to induce switching from thallus to rhizoid cell fate (Berger *et al.*, 1994), but the nature of the underlying molecular components remains unknown.

The occurrence of AGPs is considered as a synapomorphy of the green lineage. They are found exclusively throughout Chloroplastida, from the marine and freshwater green algae (Estevez *et al.*, 2009; Domozych *et al.*, 2012) to the bryophytes (Lee *et al.*, 2005) and angiosperms (Tan *et al.*, 2012). They have never been reported outside the plant lineage, except recently in some cyanobacteria, the ancestors of chloroplasts (Jackson *et al.*, 2012). We demonstrate here that chimeric AGP-like core proteins are present in the genome sequence of the brown algal model *Ectocarpus* (Cock *et al.*, 2010). We also report the presence of P4Hs closely homologous to those of land plants. Moreover, we report the occurrence of type II AG epitopes, typical of AGPs, in a range of brown algal cell wall extracts and demonstrate that these chimeric AGPs are developmentally regulated in *Fucus* embryos. Finally, using  $\beta$ -glucosyl Yariv reagent as a potential inhibitor of AGP function, we provide evidence that chimeric AGPs are involved in the control of early embryogenesis in *Fucus*. Our findings provide novel insights into the role of chimeric AGPs in cell wall sensing and raise questions about the origin and evolution of AGPs.

## Materials and Methods

### Phylogenetic analysis of the P4H sequences

The P4H sequences identified in the *Ectocarpus* genome were examined in terms of gene structure and domain predictions. The analysis by Blast queries against the UniProt database of two sequences (Esi0148\_0058 and Esi0187\_0005) revealed that the start codons were incorrectly predicted and that the P4H sequences are likely to be shorter than anticipated. New start codons were predicted and the refined sequences are listed in Supporting Information Table S1. For phylogenetic analyses, full-length deduced amino acid sequences were aligned using the MAFFT program at <http://bioinformatics.uams.edu/mafft/> (Fig. S1). The oomycete (*Phytophthora sojae*, *Phytophthora infestans* and *Saprolegnia diclina*) and diatom (*Thalassiosira pseudonana* and *Thalassiosira oceanica*) P4H sequences were searched using BLAST analyses from whole-genome projects or public expressed sequence tag collections. Two sequences from the cyanobacterium *Synechococcus* were retrieved as well as one more distantly related sequence from the gammaproteobacterium *Thiothrix lacustris*. Unrooted maximum likelihood phylogenetic trees were constructed using MEGA6 (Tamura *et al.*, 2007). There were a total of 61 sequences and 926 positions in the final data set. The robustness of the branches was evaluated using 100 bootstrap replicates. The sequences used for the phylogenetic analysis are listed in Table S1.

### Identification of genes with AGP-like motifs

The proteome of *Ectocarpus siliculosus* is available on the *E. siliculosus* genome website at <https://bioinformatics.psb.ugent.be/gdb/ectocarpus>. These sequences were screened for biased PAST composition using the KONSTANZ INFORMATION MINER v.2.11 (<http://www.knime.org>) and knime-plantcell extension

available via <https://github.com/ozacas/knime-plantcell.git>. Biased composition was detected using an algorithm built in to knime-plantcell. SIGNALP v.4.0 (Petersen *et al.*, 2011) was used to filter these proteins to obtain those containing identifiable secretory pathway signals. These proteins were subject to glycomotif identification, looking for published AGP, extensin and proline-rich protein (PRP) motifs. These motifs were not permitted to overlap and were searched in *a priori* hydroxyproline-rich glycoprotein (HRGP) class deterministic order. All remaining proteins were then augmented with prediction of the glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchor signal using BIGPI (Eisenhaber *et al.*, 2003) and HRGP class using a naïve rule classifier. The rules employed, in order of application, were: the sequences containing either one or more PRP glycomotifs (e.g. PPVQ/K or KKPCPP) or two or more extensin glycomotifs (e.g. YxY, VYH/K or SP3-SP5) were excluded; the sequences containing five or more AGP glycomotifs (e.g. A/V/S/T/GP1-3) resulted in an AGP classification; 5% or higher AGP glycomotif coverage was classified as ‘probable’ AGP.

The putative AGP assigned sequences classified as containing the most classical AGP motifs were analysed further in terms of encoding domains as shown in Fig. 2 (see later) and the corresponding annotated sequences are listed in Fig. S2. The modularity of each sequence was examined using Blast queries against the UniProt database and domain searches against the InterPro server.

### AGP microarray profiling

All samples of algae, except the *Ectocarpus* samples, were collected from natural environments as follows: *Dictyopteris membranacea*, *Undaria pinnatifida* and *Pylaiella littoralis* from Roscoff (France; GPS coordinates: 48.72-3.98), *Himantalia elongata*, *Pelvetia canaliculata*, *Laminaria hyperborea* and *Laminaria digitata* from Plouguerneau (France; 48.62-4.56), *Macrocystis pyrifera* from Chiloé-Dalcahue (Chile; 42.60-73.95), *Fucus spiralis*, *Fucus vesiculosus* and *Fucus serratus* from Aarhus (Denmark; 56.16-10.20), *Ascophyllum nodosum* from Grenaa (Denmark; 56.42-10.88), *Saccharina latissima* and *Laminaria nigripes* from Godthåb/Nuuk (Greenland; 64.18-51.72) and *Saccharina japonica* from Chiba (Japan; 35.61-140.12). *Ectocarpus siliculosus* (marine strain, Ec32) was cultured at Station Biologique de Roscoff as described previously (Torode *et al.*, 2015). The samples were freeze-dried, finely ground and exhaustively washed sequentially in 70% ethanol, 96% ethanol, chloroform : methanol (1 : 1, v/v) and acetone. The resulting alcohol insoluble residues (AIRs) were air-dried overnight. Cell wall polymers were sequentially extracted using a first treatment of 2% CaCl<sub>2</sub> to precipitate most alginates, while they were subsequently extracted using 3% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Samples were centrifuged between each extraction (1500 g for 15 min) and the supernatants were collected. Extracts were plated immediately and printed in four dilutions and four replicates. Arrays were probed as described previously (Moller *et al.*, 2007) and using the following rat anti-AGPs monoclonal antibodies (Plant Probes, Leeds, UK): JIM8, JIM13, JIM16, JIM4, LM2, LM14 and MAC207. These arrays were scanned and signals were quantified using ARRAY-PRO

ANALYZER 6.3 software (Media Cybernetics, Rockville, MD, USA) to be finally converted into heatmaps, in which mean spot signals are correlated to colour intensity.

### Isolation of *Fucus serratus* zygotes and cultivation of the embryos

Sexually mature fronds of *F. serratus* were collected in Roscoff (France; 48.43-3.59). Receptacles were cut, rinsed and dry stored at 4°C in the dark for up to 2 wk. Gametes were released by placing the receptacles in filtered seawater in daylight. Fertilization occurred within 15 min of mixing sperm with oospheres. After 1 h, the resulting zygotes were washed twice in filtered seawater and filtered through a 100-µm nylon mesh. Zygotes were held on microscope slides and allowed to grow in seawater under unidirectional light at 16°C. A photoperiod of 12 h : 12 h, light : darkness was used. The main stages of early embryo division patterns have been largely described previously (e.g. Brownlee & Berger, 1995) and an overview is briefly outlined in Fig. S3.

### Staining of AGPs

Zygotes were fixed for 1 h in seawater containing 4% paraformaldehyde and 10% glycerol and washed twice in phosphate-buffered saline (PBS) before use. Samples were incubated with either β-D-glucosyl (βGlcY) or β-D-galactosyl Yariv (βGalY) reagents (Biosupplies Pty Ltd, Melbourne, Australia) at a concentration of 2 mg ml<sup>-1</sup> in 0.15 M NaCl at room temperature. After overnight incubation, they were carefully washed with 0.15 M NaCl. The β-D-mannosyl Yariv reagent (βManY) was used as a negative control under the same conditions. Slides were mounted with coverslips and examined using an Olympus BX60 microscope (Paris, France) equipped with an EXI Aqua digital camera.

### Effects of Yariv reagents on embryo development

The *Fucus* zygotes were cultivated in the presence of Yariv reagents (Biosupplies Pty Ltd), added to the medium at a final concentration of 40 µM and made using stock solutions dissolved at 2 mg ml<sup>-1</sup> in 0.15 M NaCl. Control tests were performed by omitting the reagent. The first series of incubations started 1 h after fertilization (AF) and continued until the time of observation. A second series of incubations was performed for different periods beginning at distinct time-points AF in order to target distinct molecular events (Fig. S3), namely: 1–8 h AF, 14–20 h AF, and 26 h AF up to the time of observation. At the end of the incubation period, the Yariv reagents were removed by rinsing the samples three times with filtered seawater and zygotes were returned to cultivation. At the time of observation, any zygote with rhizoid outgrowth at 24 h AF was recorded as germinated. At 48 h AF, a zygote or proembryo was scored as developed if any degree of germination and/or cell division was observed. The abnormal phenotypes observed were recorded as follows: ‘short rhizoid’, zygotes showing an elongation rate 60% lower than the average value for the untreated samples; ‘fat rhizoid’, zygotes having a rhizoid with a radial size 25% bigger than the average value



for the untreated samples; 'branched rhizoid', embryos featuring more than one rhizoid outgrowth; and 'abnormal cell division', zygotes featuring supernumerary cell divisions and/or an abnormal orientation of the division plans compared with the untreated samples.

### Photopolarization experiments

Zygotes were cultured in filtered seawater in the presence or absence of 40  $\mu$ M of the Yariv reagents on microscope slides and in unidirectional light (L1) beginning at 1 h AF. At 9 h AF, the Yariv reagents were removed by rinsing the samples three times with filtered seawater and zygotes were allowed to grow in unidirectional light (L2) oriented 180° from the first light source. At 24 h AF, the zygotes were observed for the direction in which rhizoid development had occurred.

## Results

The *Ectocarpus siliculosus* genome contains homologues of plant genes involved in AGP synthesis

**Phylogenetic analysis of the prolyl 4-hydroxylases from *Ectocarpus siliculosus*** Four genes encoding proteins showing similarities to P4Hs were identified in the *Ectocarpus* genome. A screening of public databases also retrieved homologues in other Stramenopiles, such as oomycetes and diatoms. The P4Hs of Stramenopiles can be divided into two clades (Fig. 1). The first clade contains two *Ectocarpus* sequences (Esi0148\_0058 and Esi0206\_0006) and all of the sequences identified so far from Stramenopiles other than brown algae. This clade forms a sister group to the P4H homologues from the green lineage. The second clade contains two *Ectocarpus* sequences (Esi0187\_0005 and Esi0045\_0057) and is more closely related to P4H-like sequences from bacteria, including cyanobacteria (Jackson *et al.*, 2012). P4H candidates were also present in proteobacteria and they are included in Fig. 1. We were unsuccessful in detecting P4H sequences in the sequenced red algal genomes (*Cyanidioschyzon merolae*, *Galdieria sulphuraria*, *Chondrus crispus* and *Pyropia yezoensis*). These four sequences from *Ectocarpus* all contain the catalytically important histidine, aspartate and lysine residues, indicating that the proteins are expected to be active (Fig. S4).

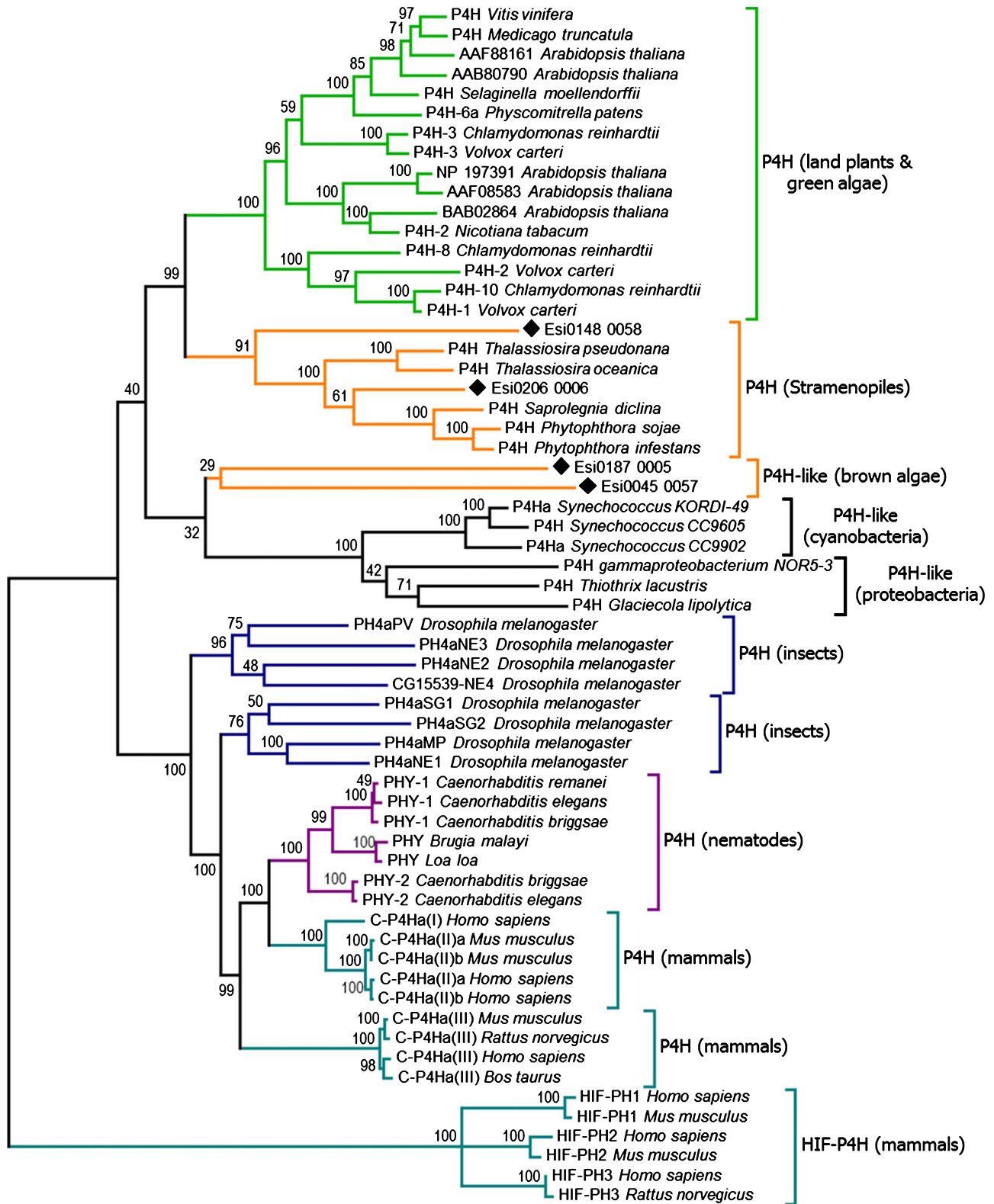
**The *E. siliculosus* genome encodes multi-modular proteins containing AGP protein core domains** AGP protein core domains contain repeating motifs rich in PAST and generally possess low sequence similarity. This prevents their identification through a classical BLAST search and dedicated bioinformatics approaches have been developed (Schultz *et al.*, 2002; Showalter *et al.*, 2010). Application of these methods to the brown algal *Ectocarpus* genome led to the identification of modular proteins that appeared to possess one or several AGP core domains. In contrast to plants, no classical AGPs were detected and all the AGP motifs identified were contained within large proteins of diverse origins and usually flanking the Pfam domains. Most chimeric AGPs described in higher plants are members of either the fasciclin-like

domain containing AGPs (FLAs) or plastocyanin-like domain containing AGPs (PAGs). By contrast, AGP motifs were associated with completely novel domains in *Ectocarpus*. All of these proteins were predicted to contain a signal peptide targeting the protein to the cell surface. A schematic diagram showing the protein structure of the 10 candidates having the most prominent features of AGPs is shown in Fig. 2. None of these proteins were GPI-anchored and the corresponding annotated sequences are listed in Fig. S2.

Based upon the presence of domains of known function, these candidates can be grouped into three functional categories of proteins. They are all associated with cell wall functions related to: carbohydrate metabolism, cell wall sensing, and dual activity or unknown function with interlinks to cell wall components. Of the 10 sequences, two are involved in the metabolism of distinct polysaccharides: Esi0216\_0017 contains three domains of the rare endo- $\alpha$ -1,4-polygalactosaminidase (from glycosyl hydrolase family 114 (GH114)), suggesting the presence of polygalactosamine chains in *Ectocarpus* cell walls (Naumoff & Stepuschenko, 2011); and Esi0303\_0025, which encodes a mannuronan C5-epimerase (ManC5-E), an enzyme involved in the last step of alginate biosynthesis (Michel *et al.*, 2010a). One of the ManC5-E domain-containing sequences (Esi0010\_0210) falls into the category of having two types of functional domains (i.e. involved in both alginate metabolism and cell wall sensing) (Fig. 2). The catalytic ManC5-E domain is associated with two wall sensing component (WSC) domains, known to be involved in cell wall sensing in yeast. Esi0025\_0038 also features two WSC domains along with a domain of unknown function (DUF). In the case of Esi0004\_0156, the protein contains one DUF that shows similarity to the viral sequence of *Ectocarpus* virus (EsV1-166) and two carbohydrate-binding modules from family 1 (CBM1) that bind cellulose. Five of these 10 sequences are related to cell wall sensing exclusively, with four of them encoding leucine-rich repeat receptor-like kinases (LRR-RLKs) (Esi0086\_0013, Esi0173\_0029, Esi0217\_0027 and Esi0186\_0062). The last sequence (Esi0027\_0106) encodes two WSC domains along with a domain showing global homology to the superfamily of the von Willebrand factor type D domain (vWFD), with a closer hit to the Sushi domain (also known as complement control protein (CCP)). The Sushi domain is frequently found in molecules playing important roles in cell–cell and cell–matrix adhesion in mammals (O'Keefe *et al.*, 2005).

### Brown algae express AGP glycan epitopes

In order to examine whether AGP-like motifs are genuinely produced by brown algae, the presence of AGP glycan epitopes was assessed by antibody-based mapping of sequentially extracted cell walls using comprehensive microarray polymer profiling (CoMPP) (Moller *et al.*, 2007). Cell walls were prepared from brown algae of distinct taxonomical groups (Fig. 3). For some Laminariales species, organs were also isolated, including the blade, where growth takes place and which bears the reproductive

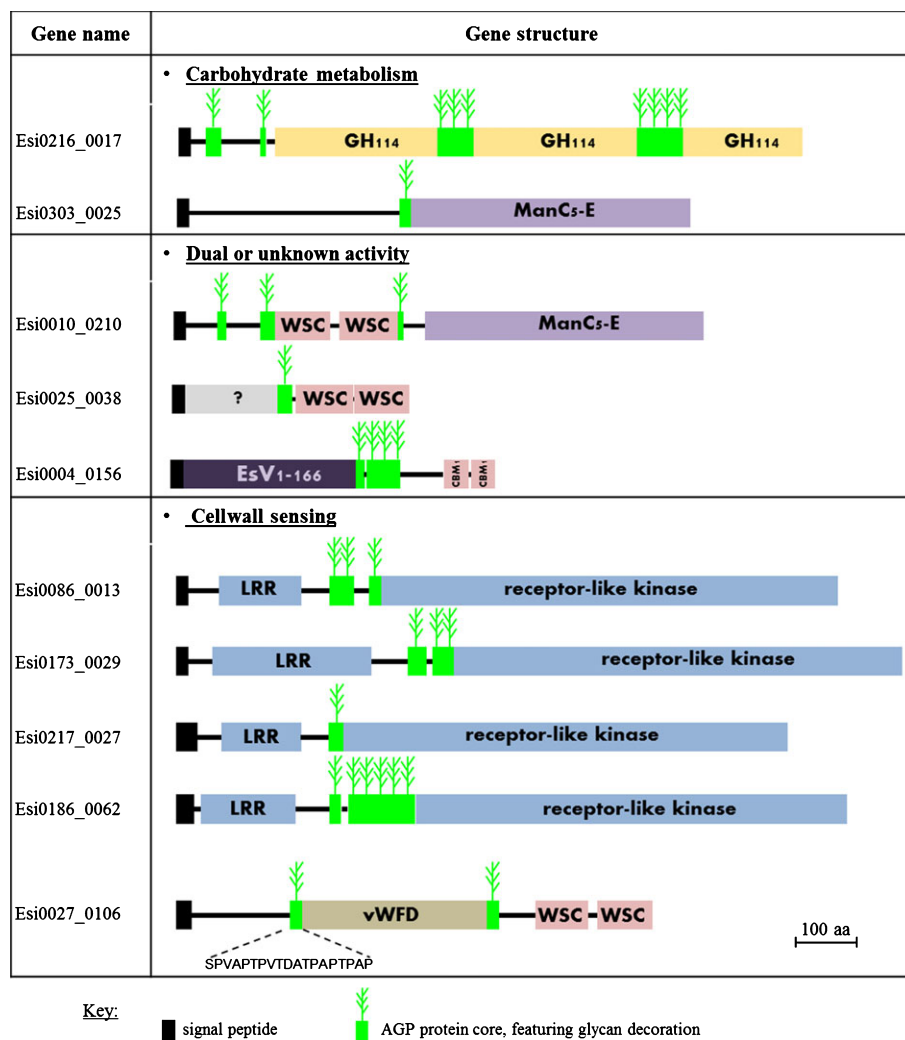


**Fig. 1** Phylogenetic relationships of proline 4-hydroxylases (P4Hs). The phylogenetic tree presented here was constructed using the maximum likelihood approach with the MEGA6 program (Tamura *et al.*, 2007). Numbers indicate the bootstrap values in the maximum likelihood analysis. The full listing of the aligned proteins is reported in Supporting Information Fig. S1. The sequences marked by a black diamond correspond to the *Ectocarpus* proteins.

organs, and the stipe, which anchors the kelps to the rocks. The relative levels of seven AGP-glycan epitopes were assessed and data are presented as a heatmap (Fig. 3).

The heatmap shows the signals obtained for cell wall components sequentially extracted with  $\text{CaCl}_2$  and  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , which, in brown algae, extract predominantly FCSPs and alginates,





**Fig. 2** Structure of the candidate genes encoding putative arabinogalactan protein (AGP) backbones in the *Ectocarpus* genome. The sequence numbers from the *Ectocarpus* database are shown, along with the corresponding gene structure. Signal peptides, putative AGP motifs and protein domains are indicated. Lengths are relatively scaled. The sequences are tentatively assigned to three functional categories. GH, glycosyl hydrolases; ManC<sub>5</sub>-E, mannuronan C<sub>5</sub>-epimerase; WSC, wall sensing component; EsV, *Ectocarpus* virus; CBM<sub>1</sub>, carbohydrate-binding modules from family 1; LRR, leucine-rich repeat; vWFD, von Willebrand factor type D domain.

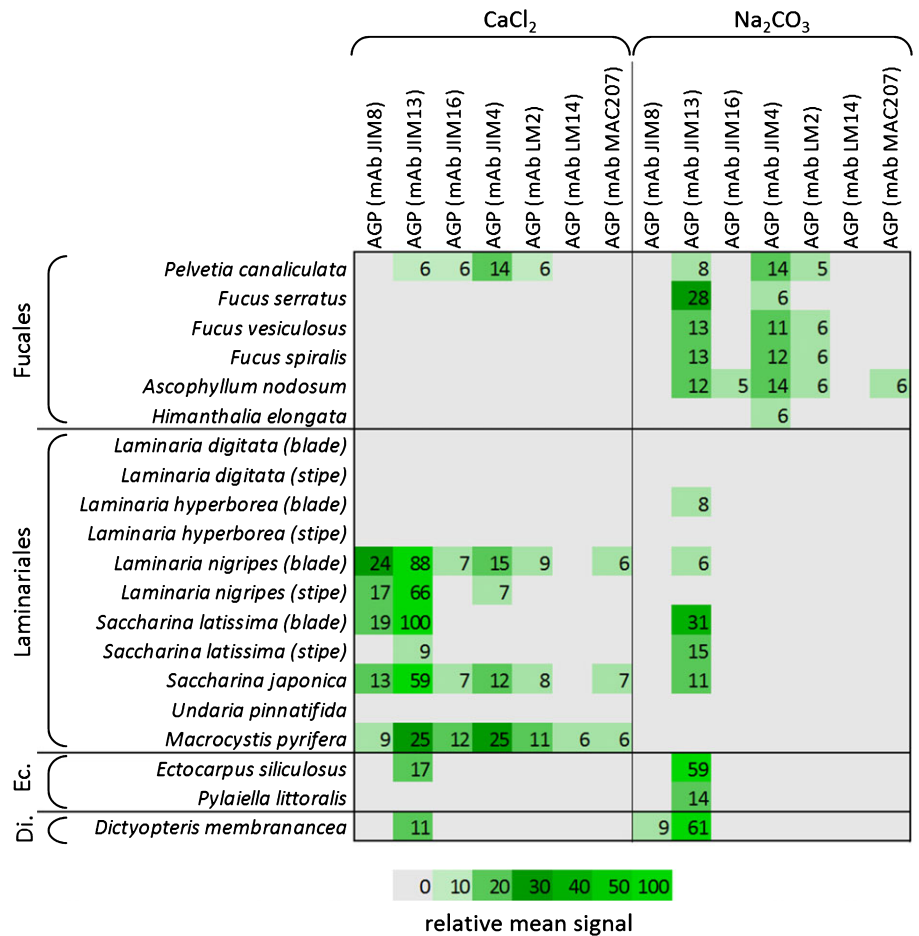
respectively (Deniaud-Bouët *et al.*, 2014). The glycan array indicates that AGP epitopes are present in all the taxonomic groups of brown algae under investigation. They were mostly identified in the Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> extracts for the Fucales and in the CaCl<sub>2</sub> extracts in the case of the Laminariales, while they were present in both fractions for the Ectocarpales and Dictyotales. The monoclonal antibody JIM13 gave the strongest signals of all the tested antibodies and the widest distribution between samples and extracts. By contrast, the epitope recognized by the monoclonal antibody JIM8 (McCabe *et al.*, 1997) was not detected in the Fucales but was present in most of the Laminariales. Other monoclonal antibodies directed against AGPs (JIM16, JIM4, LM2, LM14 and MAC207) produced weaker signals. Within the Laminariales, some organ-specific distribution was evident and there was a general tendency towards more AGP epitopes in the blade compared with the stipe.

The chimeric AGPs are developmentally regulated and functionally involved in early embryogenesis in *Fucus*

Chimeric AGPs are spatiotemporally distributed during early embryogenesis in *Fucus* We examined the distribution of the

chimeric AGPs in *Fucus* embryos using the β-galactosyl (βGalY) and β-glucosyl (βGlcY) Yariv reagents (Fig. 4). Both reagents positively stained the embryos, with βGalY giving a stronger red colouration. No staining was observed at the early developmental stages (8 h AF). At 12 h AF, the red colouration was uniformly distributed over the zygote wall (Fig. 4a,b), and it became polarized when the rhizoid emerged, being located on the cell wall of the future thallus cell (Fig. 4a,b). At the stage of three- to four-celled embryos, the staining was distributed on the cell wall of the thallus pole as well as in the collar zone (Fig. 4c). The β-mannosyl (βManY) Yariv reagent, which is known not to bind AGPs, showed no binding at any stage of development.

**Early *Fucus* development is altered upon treatment with AGP-reactive Yariv reagents** The effects of cross-linking the chimeric AGPs with the Yariv reagents on development patterns of *Fucus* embryos were investigated after 48 h of cultivation of the zygotes in the presence of Yariv reagents (Fig. 5). In the treated samples, 66% (βGalY) and 69% (βGlcY) of zygotes normally completed the first cell divisions and/or rhizoid germination, compared with 69% in untreated samples and 70% in zygotes incubated with βManY ( $n > 220$  for each treatment) (Fig. 5a). The results were



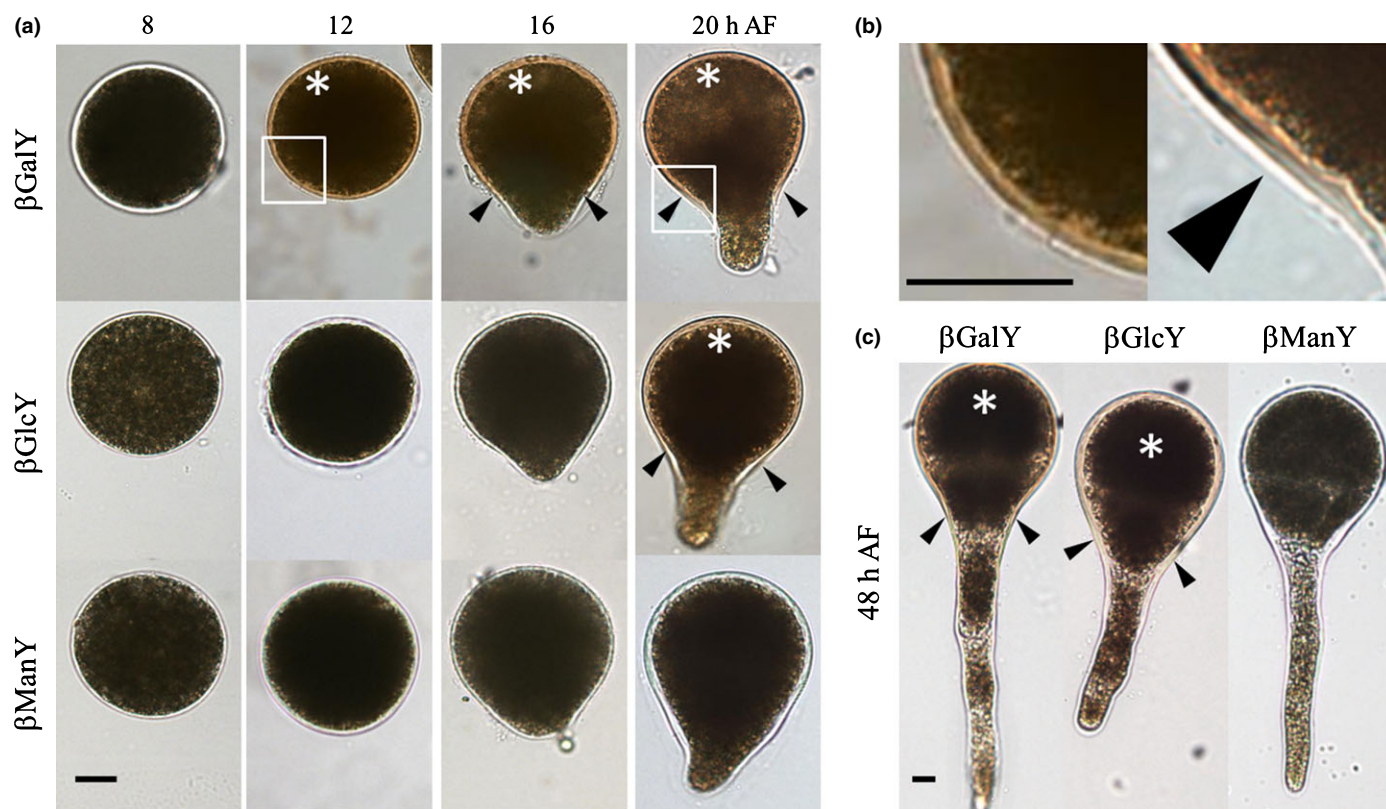
**Fig. 3** Detection of arabinogalactan protein (AGP) epitopes in brown algal extracts by glycan array analyses. Cell walls from six species of the Fucales, seven species of the Laminariales, two species of the Ectocarpaceales (Ec.) and one species of the Dictyoptales (Di.) were sequentially extracted with CaCl<sub>2</sub> and Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> and the solubilized material was probed with a range of monoclonal antibodies directed against AGPs. Several Laminariales were partitioned by organs as indicated. The colour scale in relation to absorbance values is shown. The highest mean signal value in the entire data set was set to 100 and all other signals adjusted accordingly. Values <5 were considered as background and discarded.

not significantly different between the conditions ( $P > 0.3$ ) which indicates that Yariv treatments do not affect the survival rate and the ability of the zygotes to enter a developmental programme. In all cases, the rhizoids emerged in the shaded hemisphere, suggesting that the treated zygotes remained able to perceive the light signal. However, the treated samples had a significantly higher percentage of abnormal embryos compared with the controls: 73% ( $n = 251$ ;  $P < 0.01$ ) for  $\beta$ GalY and 59% ( $n = 226$ ;  $P < 0.01$ ) for  $\beta$ GlcY compared with 15% and 23% for untreated and  $\beta$ ManY-treated samples, respectively (Fig. 5b).

Various developmental anomalies were observed upon treatment (Fig. 6). At 24 h AF, a delay in germination was observed and, in extreme cases, the absence of a rhizoid resulted in the formation of two equal cells (Fig. S5). At 48 h AF, abnormal phenotypes were more pronounced. Four subcategories of altered shapes were defined: a short rhizoid, a fat rhizoid, a branched rhizoid, and an altered cell division pattern. The short rhizoid phenotype was the most prevalent in 45% ( $\beta$ GalY) and 17% ( $\beta$ GlcY) of the treated zygotes ( $n = 251$  and 226, respectively) (Fig. 6). The fat rhizoid was also a frequently observed phenotype, with a frequency of 19% ( $\beta$ GalY) and 23% ( $\beta$ GlcY). Both phenotypes were commonly co-occurring. In extreme cases, extensive bulging led to the development of either multiple or branched rhizoids, in 11% ( $\beta$ GalY) and 13% ( $\beta$ GlcY) of the treated zygotes. In some rare cases, supernumerary cell divisions

and/or incorrect cell plate positions were observed, in 1% ( $\beta$ GalY) and 4% ( $\beta$ GlcY) of the treated zygotes (Fig. 6). The untreated and  $\beta$ ManY-treated samples developed normally.

**AGP-reactive Yariv reagents affect *Fucus* development before the first cell division** To investigate whether the altered developmental patterning observed at the three- to four-cell embryo stage was attributable to the disruption of events taking place at earlier stages and regulated by the chimeric AGPs, distinct series of cultivation of the zygotes were performed in the presence of Yariv reagents (Fig. 7a). For each treatment, the number of embryos showing a normal or abnormal developmental pattern was scored. No obvious impact of the treatment was seen in the late incubation periods (e.g. 14–20 and 26–48 h AF). With the exception of the treatment with  $\beta$ GlcY between 14 and 20 h AF, which showed a significant difference compared with controls ( $n = 271$ ;  $P < 0.05$ ), the proportions of normal embryos recorded for the  $\beta$ GalY- and  $\beta$ GlcY-treated embryos were equivalent to those recorded in either the controls (no Yariv reagent) or the  $\beta$ ManY-treated embryo cultures (Fig. 7b). By contrast, cultures treated at the early stages of development (e.g. 1–8 h AF) had a significantly higher percentage of abnormal embryos compared with controls: 49% ( $n = 212$ ;  $P < 0.01$ ) of abnormal embryos were observed upon incubation with  $\beta$ GalY and 35% ( $n = 215$ ;  $P < 0.01$ ) with  $\beta$ GlcY, compared with 17% in controls and 15%



**Fig. 4** Distribution of arabinogalactan proteins (AGPs) during *Fucus* early embryogenesis. (a) AGP detection by staining with Yariv reagents at different developmental stages up to 20 h after fertilization (AF). (b) High magnification of the insets from (a). (c) AGP detection by staining with Yariv reagents at 48 h AF. Stars indicate zones of positive staining. Arrowheads indicate the collar zone and the limit in the detection of AGPs. Bars, 25  $\mu$ m.

in the zygotes cultured in the presence of  $\beta$ ManY ( $n = 250$  and 187, respectively) (Fig. 7b).

This suggests that the effects observed after a continuous 48-h treatment result from an early inhibition of the chimeric AGP function, which takes place at the same time as the establishment of the polar axis. However, the frequencies of abnormal embryos were not as high when a short incubation period was applied with the Yariv reagents, compared with those observed after a continuous 48-h treatment (Fig. 5). Zygotes were able partially to recover from an early treatment when transferred to a fresh culture medium, indicating that the effects of the Yariv reagents are reversible.

**The ability of the *Fucus* zygote to photopolarize is not inhibited by Yariv reagents** The formation of the initial embryonic pattern in *Fucus* is strictly dependent on the correct establishment of zygotic cell polarity. Photopolarization is the ability of a zygote to select a growth axis in response to a light gradient (Bisgrove & Kropf, 2008). We used the ability of the zygotes to photopolarize to investigate whether the Yariv reagents have any effect on the establishment of the polar axis in *Fucus*. Zygotes were first grown in unidirectional light (L1) in either the absence or the presence of Yariv reagents. At 9 h AF, the zygotes were placed in normal seawater and cultivated with a second unidirectional light (L2) gradient, orientated 180° to the first. At 24 h AF, the zygotes were evaluated for the direction of their rhizoid growth (Fig. 8a).

As expected (Kropf *et al.*, 1988), untreated zygotes were able to reorient their L1-induced growth axis, to form a new growth axis in response to L2 (58%;  $n = 53$ ), and this was also the case with  $\beta$ ManY-treated zygotes (97%;  $n = 31$ ) (Fig. 8b). Treatments with the AGP-reactive Yariv reagents did not significantly change this response: 87% ( $\beta$ GalY) and 100% ( $\beta$ GlcY) of the zygotes were able to form a rhizoid in response to L2 ( $n = 46$  and 31, respectively).

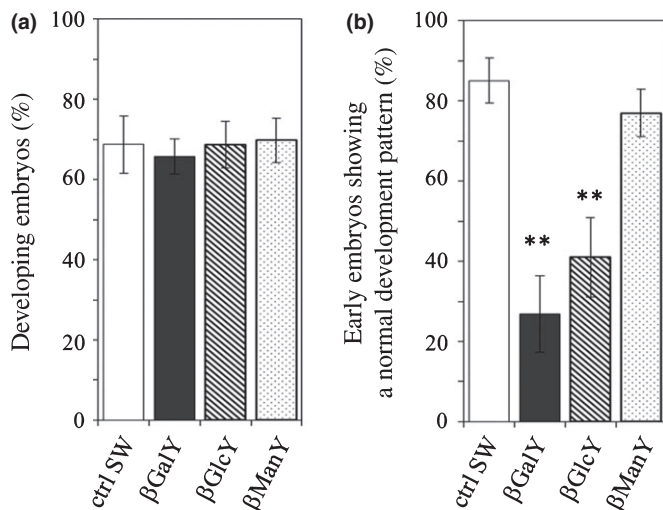
## Discussion

### Chimeric AGPs are present in brown algae

**Brown algae feature AGP glycan epitopes and genes encoding AGP protein backbone motifs** The  $\beta$ GlcY and  $\beta$ GalY reagents positively stained *Fucus* embryos while  $\beta$ ManY did not, indicating the presence of AGPs on these cell surfaces (Fig. 4). In addition, microarrays populated with material extracted from brown algae and probed with anti-AGP monoclonal antibodies indicated that AGP glycan epitopes are expressed in a broad range of brown algal species (Fig. 3).

In the *E. siliculosus* translated proteome, we identified genes encoding AGP protein backbone motifs (Fig. 2). They are all predicted to be secreted, as expected for AGPs. Interestingly, all these regions encoding AGP-like core modules are contained within larger proteins, all with functions putatively related to cell





**Fig. 5** Effect of the Yariv reagents on the initiation of embryogenesis in *Fucus*. (a) Impact of the Yariv reagents on the initiation of development. (b) Impact of the Yariv reagents on the developmental pattern of embryos. Data are based on at least three repeats of the experiment and a total of  $n > 221$  for each treatment. Error bars represent  $\pm$  SD. Independent Student's *t*-tests demonstrated that there was a very significant difference (\*\*,  $P < 0.01$ ) between the  $\beta$ GalY- and  $\beta$ GlcY-treated samples and controls.

wall metabolism, and would therefore be classified as chimeric AGPs (Johnson *et al.*, 2003). *Ectocarpus* AGPs are novel in containing AGP motifs associated with PFAM domains different from those found associated with higher plants and an absence of 'classical' AGPs (Johnson *et al.*, 2003; Showalter *et al.*, 2010; Tan *et al.*, 2012).

**Biological and structural diversity of chimeric AGPs in brown algae** The FCSPs and the alginates are the main cell wall components in brown algae (Deniaud-Bouët *et al.*, 2014). They are preferentially extracted with  $\text{CaCl}_2$  and  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , respectively (Torode *et al.*, 2015). Differences in anti-AGPs antibody binding suggest that, in the Fucales, these epitopes are coextracted primarily with alginates rather than FCSPs, whereas the reverse is found in the Laminariales (Fig. 3). This difference in the extraction abilities between the various algal orders might indicate distinct association of the AGPs with other cell wall components and/or variations in the detailed structures of the glycan chains. Within the Laminariales, additional tissue variations are also apparent: the chimeric AGPs are preferentially localized within tissues known to perform growth and reproduction, suggesting functional recruitment of these molecules in these processes.

Chimeric AGPs are functionally involved in *Fucus* embryogenesis

**Chimeric AGPs are spatiotemporally distributed during embryo development** The AGP-reactive Yariv reagents revealed that chimeric AGPs are uniformly distributed in the spherical zygotes at the earliest time of cell wall assembly (i.e. 12 h AF). At this stage, cellulose and alginates are uniformly present in the

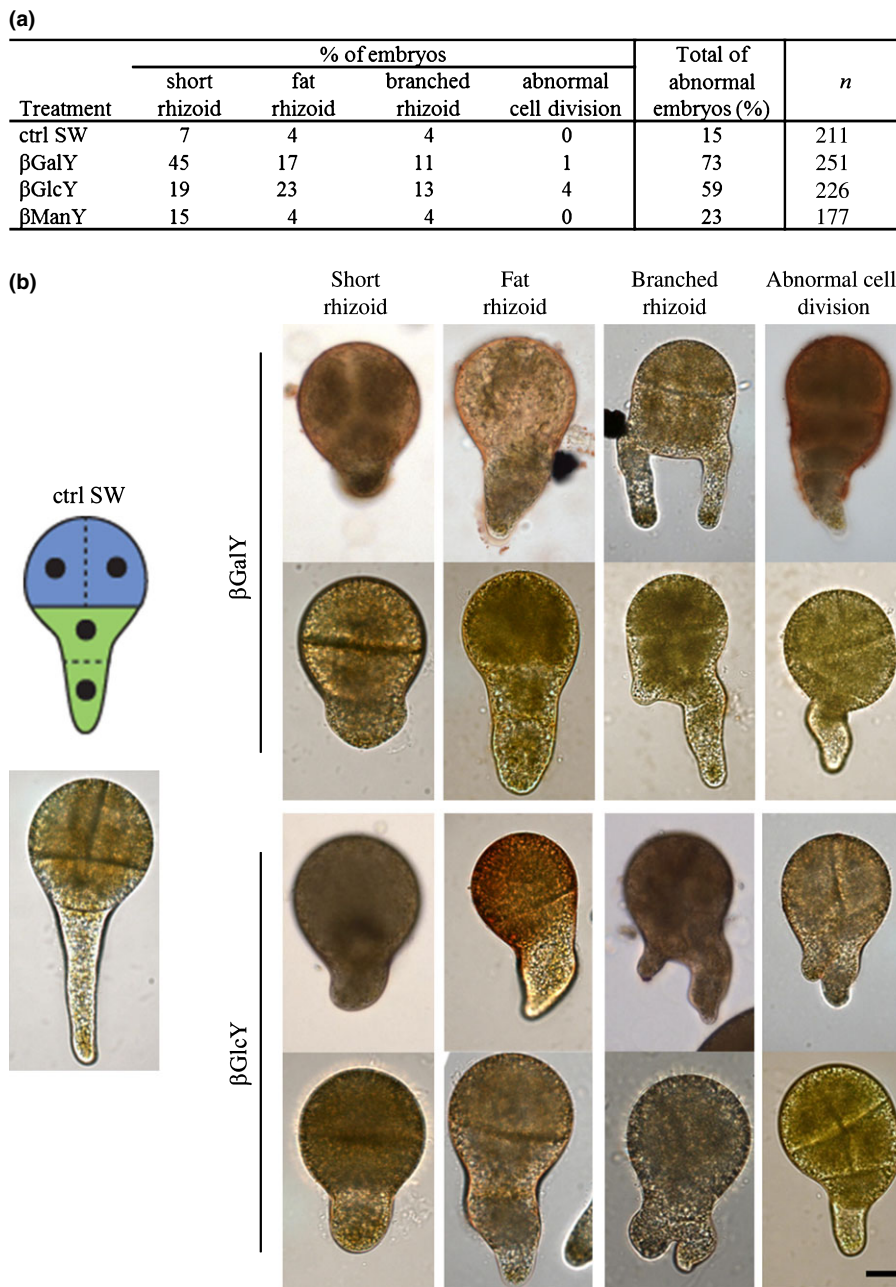
nascent wall (Quatrano & Stevens, 1976). Hence, AGPs must play an important role in the establishment and stability of this early cell wall. In contrast to furoid algae, plant eggs and zygotes are relatively inaccessible at this early stage, buried within the ovule, where their development can be influenced by the surrounding maternal tissue.

An apical–basal distribution of the red Yariv staining was later observed in the *Fucus* zygote, starting during germination, which also coincides with the polar deposition of sulfated fucans at the rhizoid tip (Bisgrove & Kropf, 2001). The red colouration was specifically located at the thallus pole (Fig. 4). These results indicate that the expression of the chimeric AGPs is developmentally regulated in the *Fucus* embryos and that the chimeric AGPs coexist with alginates and cellulose during the first hours of development. They probably contribute to the establishment and stability of this early cell wall. By contrast, AGPs do not colocalize with sulfated fucans.

**Chimeric AGPs are involved in cell elongation in the *Fucus* embryo** When zygotes from *Fucus* were cultivated in the presence of the AGP-reactive Yariv reagents, the cell elongation of the rhizoid was delayed. This effect was not apparent in cultures treated with the AGP-unreactive  $\beta$ ManY, indicating that the action of  $\beta$ GalY and  $\beta$ GlcY is AGP-dependent. Evidence for the involvement of AGPs in cell elongation already exists in plants (Willats & Knox, 1996; Lee *et al.*, 2005; Huang *et al.*, 2013). In *Lilium longiflorum* pollen tubes, the AGP-reactive Yariv reagents reduce tip growth, resulting in abnormal cell wall deposition and assembly (Jauh & Lord, 1996; Mollet *et al.*, 2002). It is interesting to note that the polarity defect in this system can lead to tip branching in pollen tubes (Ischebeck *et al.*, 2010), a phenotype highly similar to the branched rhizoid pattern reported in this study (Fig. 6).

In *Fucus*, the AGP-active Yariv reagents impacted the shape of the embryo only at the earliest time of zygote development, indicating that the early cell wall is functionally critical for normal embryogenesis. In plants, many studies have shown that deposition of a regular cell wall is a prerequisite for cell elongation and that the AGP-reactive Yariv reagents can interfere with the deposition of either cellulose (Vissenberg *et al.*, 2001; Yu & Zhao, 2012), pectin or hemicelluloses (Huang *et al.*, 2013). We suggest that, by precipitating the chimeric AGPs in the walls, the AGP-reactive Yariv reagents impair their correct deposition at the thallus pole. This is likely to disturb the early cell wall assembly and to impair cell elongation and further cause incorrect cell plate positions and abnormal cell divisions in the developing embryos (Fig. 6).

**Chimeric AGPs are not involved in the polar axis establishment in the *Fucus* embryo** In *Fucus*, initiation of the main body axis emerges during embryogenesis several hours before the first asymmetrical cell division. Cell polarity can be determined by light (axis formation). During this period the polar axis is labile and can be overridden by a second light gradient. Several studies have demonstrated that the actin cytoskeleton and the cell wall play critical roles in the establishment of polarity. With the formation



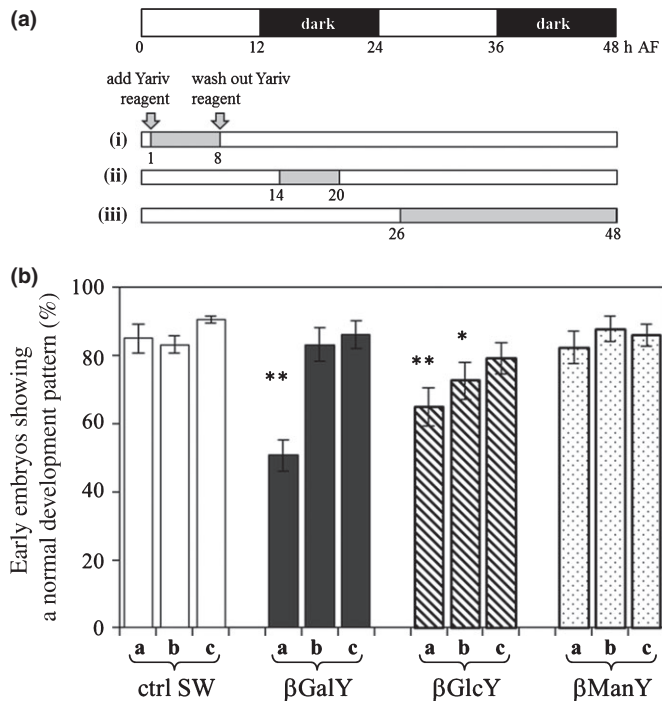
**Fig. 6** Changes induced by a 48 h-treatment with Yariv reagents in the development pattern of the *Fucus* early embryos. (a) Frequency of the abnormal phenotypes. Data are based on at least four repeats of the experiment and the numbers of recorded embryos are indicated. (b) Representative pictures of the changes induced by the treatments in the development pattern of the *Fucus* embryos. A representative picture of a corresponding normal embryo cultivated in seawater (ctrl SW) is indicated at the side for comparison. Bar, 25  $\mu$ m.

of an ASC, the polar axis becomes fixed and it can no longer be reoriented (Quatrano *et al.*, 1991). The ASC is located in the rhizoid apex where it recruits sulfated fucan polysaccharides as an element of the cell wall anchor.

Knowing that in some plant systems AGPs are involved in establishing and maintaining zygotic polarity (McCabe *et al.*, 1997; Tang *et al.*, 2006) and that chimeric AGPs are developmentally regulated in the *Fucus* embryo, one major question is whether the chimeric AGPs are a component of the light-induced signalling pathway that generates polarity in *Fucus*. We showed that, upon treatment with the AGP-reactive Yariv reagents, zygotes were still able to polarize, with their rhizoids germinating from the shaded hemispheres. This indicates that the chimeric AGPs are not involved in the integration of the light signal.

Photopolarization experiments based on two opposite light directions also showed that the zygotes treated with the AGP-reactive Yariv reagents were still able to reorient their growth axis (Fig. 8), indicating that inhibiting the molecular functions of the chimeric AGPs does not affect axis fixation.

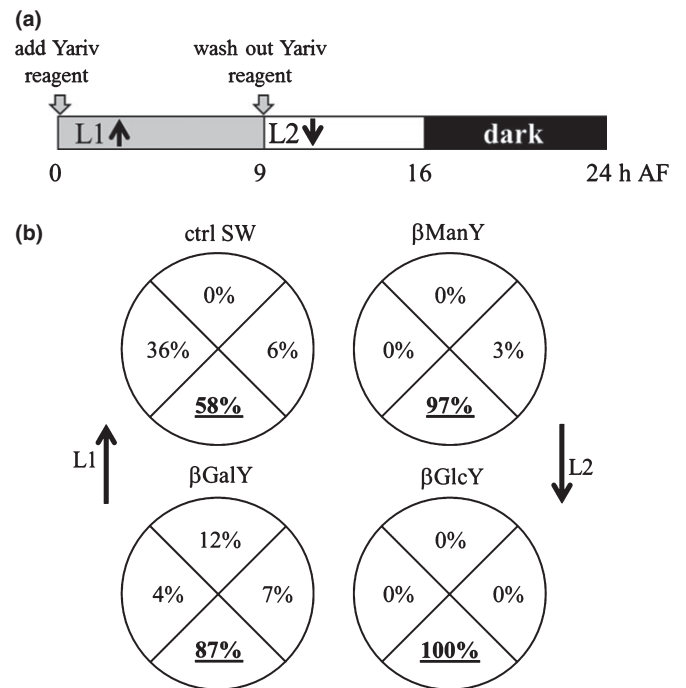
We also provide several lines of evidence indicating that the chimeric AGPs are not associated with sulfated fucans in the wall. They do not co-localize in the zygotes and they do not co-extract in cell wall fractions from the Fucales. Structural genomic evidence points towards interaction of the chimeric AGPs with either alginates or cellulose, with some AGP-core protein motifs being appended to domains involved in either the metabolism or recognition of these polysaccharides (i.e. ManC5-E or CBM1, respectively), whereas there is no indication that this is also the



**Fig. 7** Effect on *Fucus* early embryos of treatment with Yariv reagents at various developmental stages. (a) Zygotes were treated with the Yariv reagents from either: (i) 1–8 h after fertilization (AF; during the establishment of the polar axis), (ii) 14–20 h AF (after the fixation of polar axis), or (iii) 26–48 h AF (after the first cell division). (b) The impact on the developmental pattern of the embryos was recorded for all treatments at 48 h AF ( $n > 111$  for each treatment). Error bars represent  $\pm$  SD. Independent Student's *t*-tests demonstrated that there was either a significant difference (\*,  $P < 0.05$ ) or a very significant difference (\*\*,  $P < 0.01$ ) between the  $\beta$ GalY- and  $\beta$ GlcY-treated samples and controls (ctrl SW).

case for proteins involved in the biogenesis of sulfated fucans. The data presented here refine the proposed model in which sulfated fucans are integral in establishing polarity in the *Fucus* zygote (Quatrano *et al.*, 1991). Our findings indicate that both the chimeric AGPs and sulfated fucans play roles in the early development of *Fucus* but that they are involved in distinct signalling pathways. In particular, we show that the chimeric AGPs are neither components of the ASC nor a part of the polarization pathway.

**The specific location of wall polysaccharides may reflect a prepatterning of tissues** While chimeric AGPs were expressed in the early cell wall, along with alginates and cellulose, they were not part of the second wave of cell wall deposition that occurred in the rhizoid cell of the embryo, and which recruited sulfated fucans. These observations confirm that specific cell wall polysaccharides are not equally distributed in cells and that distinct cell wall architectures occur between the rhizoid and the thallus cells, which may be intimately involved in an early prepatterning of tissues. This is consistent with previous observations made by Berger *et al.* (1994), which showed that distinct cell wall components appeared to direct cell fate in this system.



**Fig. 8** Effect of a treatment with Yariv reagents on photopolarization of *Fucus* embryos. (a) Zygotes were treated with the Yariv reagents and exposed to unidirectional light (L1) while an initial growth axis was established. Reagents were then washed out and the zygotes reoriented 180° from the initial light source (L2), until the time of observation (24 h after fertilization (AF)). (b) Frequencies of zygotes germinating in each quadrant were determined. For example, treatment with  $\beta$ GalY resulted in 87% of zygotes germinating on the shaded quadrant of L2.

## Origin and evolution of AGPs

**Apparent similarities and differences between plants and brown algal AGPs** All AGPs possess hydroxyproline residues, post-translational modifications of proline, which form the primary sites of *O*-glycosylation. In plants, this modification is carried out by a P4H. Several cyanobacteria possess P4H-like proteins (Jackson, 2010), closely related to other bacterial P4H sequences within bacteria which are not known to contain AGPs. This P4H clade includes two sequences from *Ectocarpus* (Esi0187\_0005 and Esi0045\_0057) and forms a sister group to the P4Hs from green plants and algae, as well as from Stramenopiles (Fig. 1). This phylum arose *c.* 1000 million yr ago after a secondary endosymbiotic event by which a unicellular red alga was captured by an ancestral protist (Popper *et al.*, 2011). This observation could suggest that plant and algal AGPs have a cyanobacterial origin, having its roots in the primary endosymbiotic event. However, no P4H genes were identified in red algal genomes, consistent with the fact that red algae are not known to contain hydroxyproline (Gotelli & Cleland, 1968). If we postulate, as earlier, that P4Hs were recruited in brown algae from cyanobacteria and then from rhodoplasts, we also need to speculate that red algae lost the ancestral cyanobacterial P4Hs very early after the secondary endosymbiosis. A more parsimonious scenario is to infer that the P4H and chimeric AGPs of Stramenopiles are derived from a cryptic event which involved an endosymbiosis



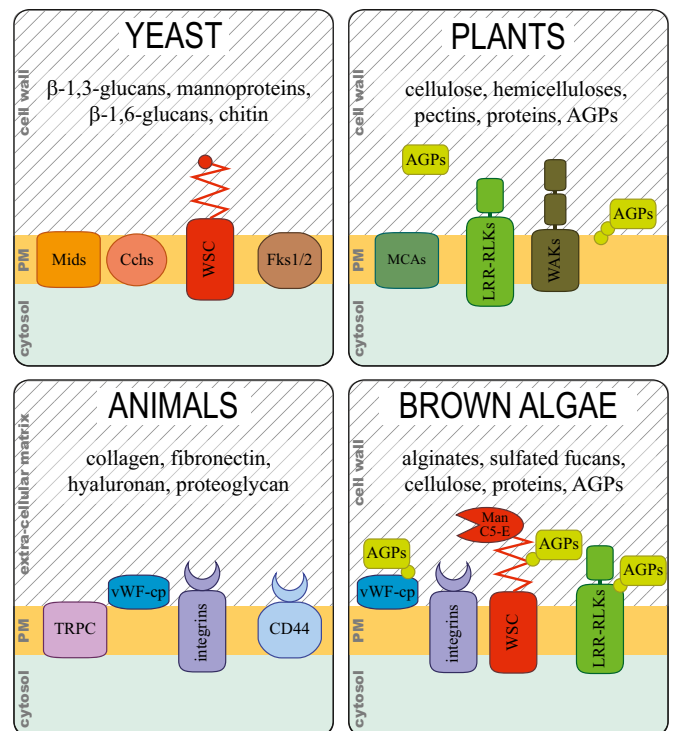
with an ancestral unicellular green alga (Dorrell & Smith, 2011). This supports the hypothesis proposed by Moustafa *et al.* (2009) that the P4H genes from the diatoms *Phaeodactylum* and *Thalassiosira* have a green algal origin.

On the basis of studies in *Arabidopsis*, the glycan structures that decorate AGPs are considered to be synthesized by glycosyl transferases (GTs). While many GTs have now been characterized (Cantarel *et al.*, 2009; Doblin *et al.*, 2010), our understanding of how AGP galactan side chains are synthesized and which classes of GTs are involved is still limited. Recent studies suggest the involvement of a galactosyltransferase from the GT31 family (Qu *et al.*, 2008; Geshi *et al.*, 2013) and of two fucosyltransferases from the family GT37 (Wu *et al.*, 2010), but many other GTs are likely to be involved (Ellis *et al.*, 2010; Tan *et al.*, 2012). An inventory of all the glycosyl hydrolases (GHs) and GTs found in the *Ectocarpus* genome was performed (Cock *et al.*, 2010) and discussed in more detail (Michel *et al.*, 2010a,b). No GT31 or GT37 family members were found within the genome but a variety of GT families were found, including GTs absent in plants but shared with other organisms (Cock *et al.*, 2010).

**Brown algae harbour a variety of wall-sensing elements** Our results show that chimeric AGPs are components of the cell wall in brown algae. Our analyses of the candidate genes also point to a role in cell wall sensing and/or remodelling. Among the genes we studied, two belong to the large multigene family of ManC5-Es, which represent key enzymes in the regulation of the composition of the alginate and thus of their mechanical properties (Nyvall *et al.*, 2003). It is possible that regulation of the ManC5-E activity occurs through the involvement of the appended AGPs, by acting as sensor molecules. This hypothesis is strengthened by the presence of additional WSC domains within the Esi0010\_0210 protein which are also found in two additional AGP motif-containing candidates. The WSC domain family is one of the largest protein domain families in *Ectocarpus* (Cock *et al.*, 2010; Michel *et al.*, 2010a,b). The WSC domains were initially found in yeasts (Verna *et al.*, 1997) where they act as cell surface mechanosensors. They are believed to activate the cell wall integrity signalling cascade, which includes rearrangement of the actin network (Verna *et al.*, 1997; Gualtieri *et al.*, 2004; Dupres *et al.*, 2009). In brown algae, they may also regulate wall rigidity, through the control of the activity of the appended ManC5-E on alginates (Fig. 9).

Additional AGP motifs in *Ectocarpus* are found within protein kinases featuring LRRs. In plants, LRR-RLKs form the largest group within the RLK family (Gish & Clark, 2011) where they are related to a myriad of biological functions, including cell wall sensing. We speculate that, in brown algae, chimeric AGPs act as sensor molecules with a possible impact on the activity of the kinase attached and that they coevolved with LRR-RLKs (Fig. 9).

In another sequence (Esi0027\_0106), the AGP motifs are found flanking a module containing vWFD domains and showing homology to the Sushi domain. vWFD domains are also found in integrin receptors and other proteins involved in cell adhesion in animals (Perkins *et al.*, 1994). This again points to cell surface interactions (O'Keeffe *et al.*, 2005). In the *Ectocarpus* genome, three predicted proteins share significant similarities



**Fig. 9** Putative cell wall sensing model in brown algae compared with those found in other kingdoms (reviewed in Wolf *et al.*, 2012). Only simplified versions of the models are shown, with: stretch-activated calcium channels (Mids, MCAs and TRPC), cell wall sensors (wall sensing component (WSC), leucine-rich repeat receptor-like kinases (LRR-RLKs), wall-associated kinases (WAKs) and integrins), and cell contact modules (von Willebrand factor containing-protein (vWF-cp) glycoprotein CD44). For more comprehensive models in yeast, plants and animals, the readers should refer to dedicated reviews. AGPs, arabinogalactan proteins; Cchs, chitin synthases; ManC5-E, mannuronan C5-epimerase; Fks1/2, Fks subunits of the glucan synthase.

with animal  $\alpha$ -integrins (Cock *et al.*, 2010). *Fucus* embryos were reported featuring molecules similar to those found in focal contact points in animals, for example vinculin, integrin and vitronectin (Quatrano *et al.*, 1991). These data suggest that brown algae have a complex cell wall sensing system (Fig. 9) which evolved independently from those of yeasts, plants or animals, but with the recruitment of similar building blocks, which first emerged within the common eukaryotic ancestor.

While our study indicates the presence of AGPs in brown algae, they do not share all the characteristics of plant AGPs. As a consequence of the phylogenetic distances and physiological differences between brown algae and green plants, direct comparison of these systems and their products is challenging. The isolation and chemical analysis of the corresponding putative AGPs will need to be assessed in the future to conclude whether these molecules are indeed AGPs, and to detail their exact composition.

## Conclusions

In conclusion, we have demonstrated that chimeric AGPs are present in brown algae. This is the first report that this crucial cell wall component is present in multicellular organisms outside the

green lineage. They belong to a cell wall architecture which, in brown algae, markedly differs from that found in green plants, with the exception that cellulose constitutes the fibrillary phase of both groups. These findings have implications for our understanding of the structure–function relationships that are possible between the chimeric AGPs and other cell wall polymers and of their roles in the cell-to-cell signalling cascades that accompany growth and development. We have also shown that AGPs control cell elongation in the *Fucus* embryo, pointing to some convergent functions with plants. In terms of cell wall evolution, whether AGPs have an ancestral origin and were then lost in red algae or were recruited independently in plants and in brown algae is unclear. In any event, they perform developmentally related functions in extant plants and brown algae.

## Acknowledgements

K.L.J., M.S.D. and A.B. acknowledge the support of a grant from the Australia Research Council to the ARC Centre of Excellence in Plant Cell Walls (CE10001007). A.S. received a grant from the Brittany region (ARED\_8979 ECTOPAR).

## Author contributions

C.H. planned and designed the research, performed the research and wrote the paper; A.S., M.J., A.C. and A.A.S. performed the research; K.L.J. analysed data and contributed in the writing of the paper; W.G.T.W., M.S.D., A.B. and B.K. contributed to the writing of the paper.

## References

- Berger F, Taylor A, Brownlee C. 1994. Cell fate determination by the cell wall in early *Fucus* development. *Science* 263: 1421–1423.
- Bisgrove S, Kropf DL. 2008. Asymmetric cell divisions: zygotes of fucoid algae as a model system. In: Verma D, Hong Z, eds. *Plant cell monographs*. Berlin, Heidelberg, Germany: Springer, 323–341.
- Bisgrove SR, Kropf DL. 2001. Cell wall deposition during morphogenesis in fucoid algae. *Planta* 212: 648–658.
- Borderies G, Le Béhec M, Rossignol M, Lafitte C, Le Deunff E, Beckert M, Dumas C, Matthey-Rochon E. 2004. Characterization of proteins secreted during maize microspore culture: arabinogalactan proteins (AGPs) stimulate embryo development. *European Journal of Cell Biology* 83: 205–212.
- Brownlee C, Berger F. 1995. Extracellular matrix and pattern in plant embryos: on the lookout for developmental information. *Trends in Genetics* 11: 344–348.
- Cantarel BL, Coutinho PM, Rancurel C, Bernard T, Lombard V, Henrissat B. 2009. The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for glycogenomics. *Nucleic Acids Research* 37: 233–238.
- Cock JM, Sterck L, Rouze P, Scornet D, Allen AE, Amoutzias G, Anthouard V, Artiguenave F, Aury JM, Badger JH *et al.* 2010. The *Ectocarpus* genome and the independent evolution of multicellularity in brown algae. *Nature* 465: 617–621.
- Deniaud-Bouët E, Kervarec N, Michel G, Tonon T, Kloareg B, Hervé C. 2014. Chemical and enzymatic fractionation of cell walls from Fucales: insights into the structure of the extracellular matrix of brown algae. *Annals of Botany* 114: 1203–1216.
- Doblin MS, Pettolino F, Bacic A. 2010. Plant cell walls: the skeleton of the plant world. *Functional Plant Biology* 37: 357–381.
- Domoych D, Ciancia M, Fangel JU, Mikkelsen MD, Ulvskov P, Willats WGT. 2012. The cell walls of green algae: a journey through evolution and diversity. *Frontiers in Plant Science* 3: 1–7.
- Dorrell RG, Smith AG. 2011. Do red and green make brown?: perspectives on plastid acquisitions within Chromalveolates. *Eukaryotic Cell* 10: 856–868.
- Dupres V, Alsteens D, Wilk S, Hansen B, Heinisch JJ, Dufrene YF. 2009. The yeast Wsc1 cell surface sensor behaves like a nanospring *in vivo*. *Nature Chemical Biology* 5: 857–862.
- Eisenhaber B, Wildpaner M, Schultz CJ, Borner GHH, Dupree P, Eisenhaber F. 2003. Glycosylphosphatidylinositol lipid anchoring of plant proteins. Sensitive prediction from sequence- and genome-wide studies for Arabidopsis and rice. *Plant Physiology* 133: 1691–1701.
- Ellis M, Egelund J, Schultz CJ, Bacic A. 2010. Arabinogalactan-proteins: key regulators at the cell surface? *Plant Physiology* 153: 403–419.
- Estevez JM, Fernandez PV, Kasulin L, Dupree P, Ciancia M. 2009. Chemical and *in situ* characterization of macromolecular components of the cell walls from the green seaweed *Codium fragile*. *Glycobiology* 19: 212–228.
- Geshi N, Johansen JN, Dilokpimol A, Rolland A, Belcram K, Verger S, Kotake T, Tsumuraya Y, Kaneko S, Tryfona T *et al.* 2013. A galactosyltransferase acting on arabinogalactan protein glycans is essential for embryo development in Arabidopsis. *Plant Journal* 76: 128–137.
- Gish LA, Clark SE. 2011. The RLK/Pelle family of kinases. *Plant Journal* 66: 117–127.
- Gorres KL, Raines RT. 2010. Prolyl 4-hydroxylase. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 45: 106–124.
- Gotelli IB, Cleland R. 1968. Differences in the occurrence and distribution of hydroxyproline-proteins among the algae. *American Journal of Botany* 55: 907–914.
- Gualtieri T, Ragni E, Mizzi L, Fascio U, Popolo L. 2004. The cell wall sensor Wsc1p is involved in reorganization of actin cytoskeleton in response to hypo-osmotic shock in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 21: 1107–1120.
- van Hengel AJ, Tadesse Z, Immerzeel P, Schols H, van Kammen A, de Vries SC. 2001. N-acetylglucosamine and glucosamine-containing arabinogalactan proteins control somatic embryogenesis. *Plant Physiology* 125: 1880–1890.
- Huang G-Q, Gong S-Y, Xu W-L, Li W, Li P, Zhang C-J, Li D-D, Zheng Y, Li F-G, Li X-B. 2013. A fasciclin-like arabinogalactan protein, GhFLA1, is involved in fiber initiation and elongation of cotton. *Plant Physiology* 161: 1278–1290.
- Ischebeck T, Seiler S, Heilmann I. 2010. At the poles across kingdoms: phosphoinositides and polar tip growth. *Protoplasma* 240: 13–31.
- Jackson O, Taylor O, Adams DG, Knox JP. 2012. Arabinogalactan proteins occur in the free-living cyanobacterium genus *Nostoc* and in plant–*Nostoc* symbioses. *Molecular Plant–Microbe Interactions* 25: 1338–1349.
- Jackson OD. 2010. *Cyanobacteria in symbiosis and their relationship with components of plant cell walls*. PhD thesis, University of Leeds, Leeds, UK.
- Jauh G, Lord E. 1996. Localization of pectins and arabinogalactan-proteins in lily (*Lilium longiflorum* L.) pollen tube and style, and their possible roles in pollination. *Planta* 199: 251–261.
- Johnson KL, Jones BJ, Bacic A, Schultz CJ. 2003. The fasciclin-like arabinogalactan proteins of Arabidopsis. A multigene family of putative cell adhesion molecules. *Plant Physiology* 133: 1911–1925.
- Kreuger M, van Holst G-J. 1993. Arabinogalactan proteins are essential in somatic embryogenesis of *Daucus carota* L. *Planta* 189: 243–248.
- Kropf DL, Kloareg B, Quatrano RS. 1988. Cell wall is required for fixation of the embryonic axis in *Fucus* zygotes. *Science* 239: 187–190.
- Lee KJD, Sakata Y, Mau S-L, Pettolino F, Bacic A, Quatrano RS, Knight CD, Knox JP. 2005. Arabinogalactan proteins are required for apical cell extension in the moss *Physcomitrella patens*. *Plant Cell* 17: 3051–3065.
- McCabe PF, Valentine TA, Forsberg LS, Pennell RI. 1997. Soluble signals from cells identified at the cell wall establish a developmental pathway in carrot. *Plant Cell* 9: 2225–2241.
- Michel G, Tonon T, Scornet D, Cock JM, Kloareg B. 2010a. The cell wall polysaccharide metabolism of the brown alga *Ectocarpus siliculosus*. Insights into the evolution of extracellular matrix polysaccharides in Eukaryotes. *New Phytologist* 188: 82–97.
- Michel G, Tonon T, Scornet D, Cock JM, Kloareg B. 2010b. Central and storage carbon metabolism of the brown alga *Ectocarpus siliculosus*. Insights into the origin and evolution of storage carbohydrates in Eukaryotes. *New Phytologist* 188: 67–81.
- Moller I, Sorensen I, Bernal AJ, Blaukopf C, Lee K, Obro J, Pettolino F, Roberts A, Mikkelsen JD, Knox JP *et al.* 2007. High-throughput mapping of



- cell-wall polymers within and between plants using novel microarrays. *Plant Journal* 50: 1118–1128.
- Mollet J-C, Kim S, Jauh G-Y, Lord EM. 2002. Arabinogalactan proteins, pollen tube growth, and the reversible effects of Yariv phenylglycoside. *Protoplasma* 219: 89–98.
- Moustafa A, Beszteri B, Maier UG, Bowler C, Valentín K, Bhattacharya D. 2009. Genomic footprints of a cryptic plastid endosymbiosis in diatoms. *Science* 324: 1724–1726.
- Naumoff DG, Stepuschenko OO. 2011. Endo- $\alpha$ -1,4-polygalactosaminidases and their homologs: structure and evolution. *Molecular Biology* 45: 647–657.
- Nguema-Ona E, Coimbra S, Vitré-Gibouin M, Mollet J-C, Driouich A. 2012. Arabinogalactan proteins in root and pollen-tube cells: distribution and functional aspects. *Annals of Botany* 110: 383–404.
- Nyvall P, Corre E, Boisset C, Barbeyron T, Rousvoal S, Scornet D, Kloareg B, Boyen C. 2003. Characterization of mannuronan C-5-epimerase genes from the brown alga *Laminaria digitata*. *Plant Physiology* 133: 726–735.
- O’Keeffe AH, Green JL, Grainger M, Holder AA. 2005. A novel Sushi domain-containing protein of *Plasmodium falciparum*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 140: 61–68.
- Perkins SJ, Smith KF, Williams SC, Haris PI, Chapman D, Sim RB. 1994. The secondary structure of the von Willebrand Factor type A Domain in Factor B of human complement by Fourier transform infrared spectroscopy: its occurrence in collagen types VI, VII, XII and XIV, the Integrins and other proteins by averaged structure predictions. *Journal of Molecular Biology* 238: 104–119.
- Petersen TN, Brunak S, Hejine GV, Nielsen H. 2011. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nature Methods* 8: 785–786.
- Popper ZA, Michel G, Hervé C, Domozych DS, Willats WGT, Tuohy MG, Kloareg B, Stengel DB. 2011. Evolution and diversity of plant cell walls: from algae to flowering plants. *Annual Review of Plant Biology* 62: 567–590.
- Qin Y, Zhao J. 2006. Localization of arabinogalactan proteins in egg cells, zygotes, and two-celled proembryos and effects of  $\beta$ -D-glucosyl Yariv reagent on egg cell fertilization and zygote division in *Nicotiana tabacum* L. *Journal of Experimental Botany* 57: 2061–2074.
- Qu Y, Egelund J, Gilson P, Houghton F, Gleeson P, Schultz C, Bacic A. 2008. Identification of a novel group of putative *Arabidopsis thaliana*  $\beta$ -(1,3)-galactosyltransferases. *Plant Molecular Biology* 68: 43–59.
- Quatrano RS, Brian L, Aldridge J, Schultz T. 1991. Polar axis fixation in *Fucus* zygotes: components of the cytoskeleton and extracellular matrix. *Development* 113(Suppl. 1): 11–16.
- Quatrano RS, Stevens PT. 1976. Cell wall assembly in *Fucus* zygotes. I. Characterization of the polysaccharide components. *Plant Physiology* 58: 224–231.
- Schindler T, Bergfeld R, Schopfer P. 1995. Arabinogalactan proteins in maize coleoptiles: developmental relationship to cell death during xylem differentiation but not to extension growth. *Plant Journal* 7: 25–36.
- Schultz CJ, Rumsewicz MP, Johnson KL, Jones BJ, Gaspar YM, Bacic A. 2002. Using genomic resources to guide research directions. The arabinogalactan protein gene family as a test case. *Plant Physiology* 129: 1448–1463.
- Showalter AM, Keppler B, Lichtenberg J, Gu D, Welch LR. 2010. A bioinformatics approach to the identification, classification, and analysis of hydroxyproline-rich glycoproteins. *Plant Physiology* 153: 485–513.
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24: 1596–1599.
- Tan L, Eberhard S, Pattathil S, Warder C, Glushka J, Yuan C, Hao Z, Zhu X, Avci U, Miller JS *et al.* 2013. An *Arabidopsis* cell wall proteoglycan consists of pectin and arabinoxylan covalently linked to an arabinogalactan protein. *Plant Cell* 25: 270–287.
- Tan L, Showalter AM, Egelund J, Hernandez-Sanchez A, Doblin MS, Bacic A. 2012. Arabinogalactan-proteins and the research challenges for these enigmatic plant cell surface proteoglycans. *Frontiers in Plant Science* 3: 1–10.
- Tang X-C, He Y-Q, Wang Y, Sun M-X. 2006. The role of arabinogalactan proteins binding to Yariv reagents in the initiation, cell developmental fate, and maintenance of microspore embryogenesis in *Brassica napus* L. cv. Topas. *Journal of Experimental Botany* 57: 2639–2650.
- Thompson HJM, Knox JP. 1998. Stage-specific responses of embryogenic carrot cell suspension cultures to arabinogalactan protein-binding  $\beta$ -glucosyl Yariv reagent. *Planta* 205: 32–38.
- Torode TA, Marcus SE, Jam M, Tonon T, Blackburn RS, Hervé C, Knox JP. 2015. Monoclonal antibodies directed to fucoidan preparations from brown algae. *PLoS ONE* 10: e0118366.
- Verna J, Lodder A, Lee K, Vagts A, Ballester R. 1997. A family of genes required for maintenance of cell wall integrity and for the stress response in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 94: 13804–13809.
- Vissenberg K, Feijó JA, Weisenseel MH, Verbelen JP. 2001. Ion fluxes, auxin and the induction of elongation growth in *Nicotiana tabacum* cells. *Journal of Experimental Botany* 52: 2161–2167.
- Wagner VT, Brian L, Quatrano RS. 1992. Role of a vitronectin-like molecule in embryo adhesion of the brown alga *Fucus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 89: 3644–3648.
- Willats WGT, Knox JP. 1996. A role for arabinogalactan-proteins in plant cell expansion: evidence from studies on the interaction of  $\beta$ -glucosyl Yariv reagent with seedlings of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* 9: 919–925.
- Wolf S, Hematy K, Hofte H. 2012. Growth control and cell wall signaling in plants. *Annual Review of Plant Biology* 63: 381–407.
- Wu Y, Williams M, Bernard S, Driouich A, Showalter AM, Faik A. 2010. Functional identification of two nonredundant *Arabidopsis*  $\alpha$  (1,2)fucosyltransferases specific to arabinogalactan proteins. *Journal of Biological Chemistry* 285: 13638–13645.
- Yu M, Zhao J. 2012. The cytological changes of tobacco zygote and proembryo cells induced by beta-glucosyl Yariv reagent suggest the involvement of arabinogalactan proteins in cell division and cell plate formation. *BMC Plant Biology* 12: 126.
- Zhang Y, Brown G, Whetten R, Loopstra C, Neale D, Kieliszewski M, Sederoff R. 2003. An arabinogalactan protein associated with secondary cell wall formation in differentiating xylem of loblolly pine. *Plant Molecular Biology* 52: 91–102.

## Supporting Information

Additional supporting information may be found in the online version of this article.

**Fig. S1** Full alignment used to draw the phylogenetic tree of the P4H proteins.

**Fig. S2** Annotated sequences of the candidate genes encoding putative AGP protein backbones in the *Ectocarpus* genome.

**Fig. S3** Cell division pattern of zygote and early embryo in *Fucus*.

**Fig. S4** Alignment of P4H sequences from Stramenopiles and *Drosophila melanogaster*.

**Fig. S5** Representative pictures of the changes induced by a 24-h treatment with Yariv reagents on the development pattern of the *Fucus* early embryos.

**Table S1** Accession numbers of the P4Hs proteins that were aligned to construct the phylogeny

Please note: Wiley Blackwell are not responsible for the content or functionality of any supporting information supplied by the authors. Any queries (other than missing material) should be directed to the *New Phytologist* Central Office.

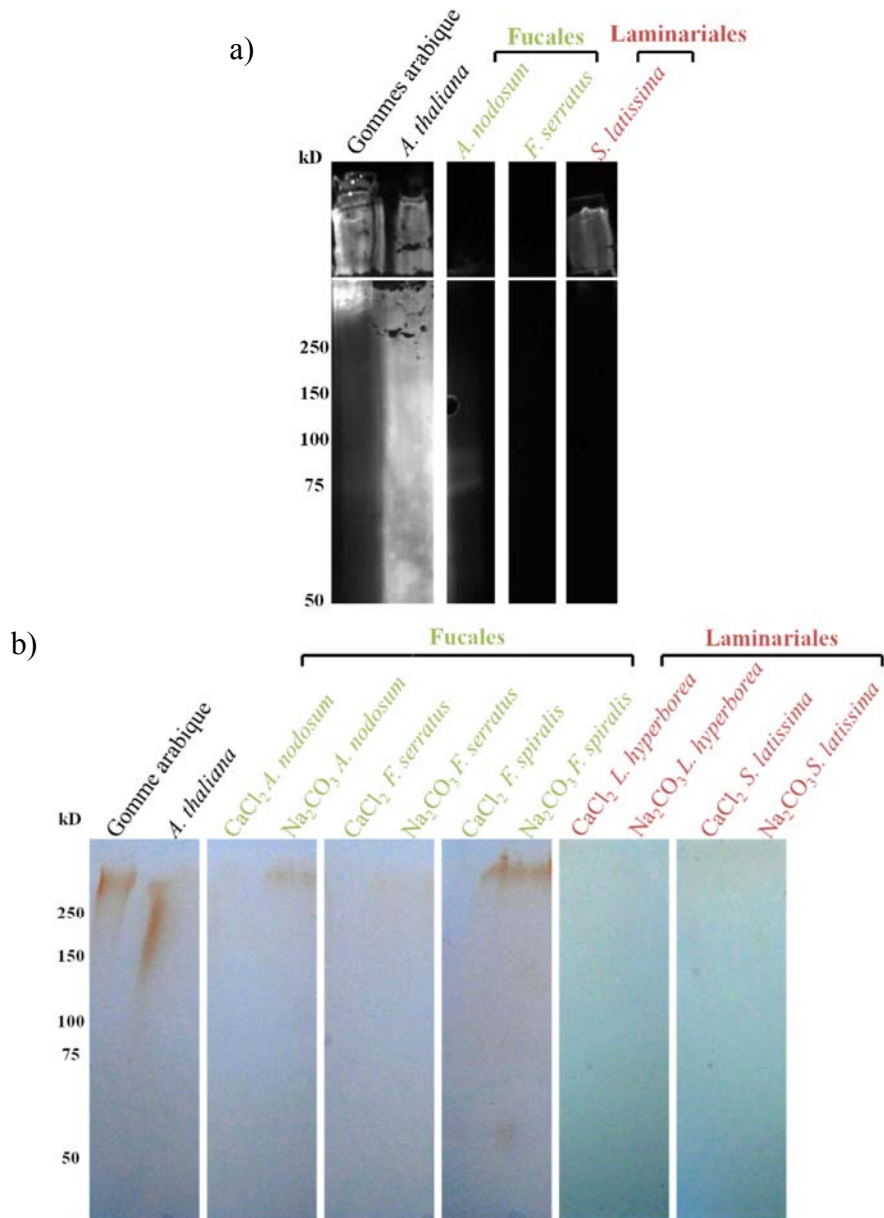
## Compléments à l'étude

### Analyses complémentaires : détection de la présence d'AGPs chez les algues brunes

La mise en évidence des AGPs dans la paroi des algues brunes a fait l'objet de quelques analyses complémentaires. Des extraits séquentiels de paroi utilisées dans [Hervé et al., 2016](#) (*L. hyperborea*, *S. latissima*, *A. nodosum* et *F. serratus*) ou d'AGPs (*E. siliculosus*, *A. nodosum*, *F. serratus*, *S. latissima*) ont été mis à migrer sur gel SDS-PAGE et une révélation par précipitation au réactif de Yariv  $\beta$ Gal et  $\beta$ Glu a été effectuée. Des AGPs extraient à partir de racines d'*A. thaliana* et de la gomme arabique ont été utilisés comme contrôles positifs. Les extraits d'AGPs d'*A. nodosum*, de *F. serratus* et de *S. latissima* étaient très gélatineux tout au long du protocole d'extraction et lors de la migration des extraits, rendant la migration dans le gel difficile. Les échantillons restaient bloqués dans la partie « stacking » du gel. Des colorations étaient toutefois observées (principalement dans le « stacking ») pour les extraits d'*E. siliculosus*, d'*A. nodosum* et de *F. serratus* mais pas de *S. latissima*. Les contrôles positifs gomme arabique et AGPs d'*A. thaliana* avaient une bonne migration dans le gel et étaient fortement marqués. Des dégradations enzymatiques des alginates et des fucanes ont été réalisées mais cela n'a pas amélioré la qualité des échantillons. Un western-blot avec l'anticorps anti-AGPs JIM13 a également été réalisé avec les extraits d'*A. nodosum*, *F. serratus* et *S. latissima* ([Fig. 22a](#)). L'anticorps a été choisi en fonction des résultats obtenus lors des analyses en « glycans arrays » décrit dans [Hervé et al., 2016](#). JIM13 était celui pour lequel les signaux détectés étaient les plus soutenus. Un signal fort était observé pour les deux contrôles positifs et *S. latissima* (dans le « stacking »). Un plus faible signal était détecté pour l'échantillon d'*A. nodosum*, mais aucun n'était observé pour *F. serratus*. Ces résultats sont assez similaires à ce qui a été observé lors des tests en « glycans arrays ». Les résultats obtenus ont été confirmés en réalisant la même expérience avec les extraits séquentiels en  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  et en  $\text{CaCl}_2$ , qui contiennent respectivement des alginates et des fucanes ([Fig. 22b](#)). Une meilleure migration était observée. Lors de la précipitation avec le réactif de Yariv  $\beta$ Gal, seuls les extraits séquentiels en  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  des Fucales étaient colorés. Une coloration rougeâtre dans le puits de dépôt des échantillons en  $\text{CaCl}_2$  d'*A. nodosum* était observée. En revanche, quelle que soit la fraction analysée, aucune précipitation n'a été observée pour les Laminaires.

Ces résultats confirment la présence de structures AGPs dans les extraits d'algues brunes. De plus, ils confortent l'idée que ces derniers sont co-localisés avec les alginates chez les

Fucales (Hervé *et al.*, 2016). En revanche, l'absence de précipités pour les Laminaires est plus surprenante, d'autant plus qu'un signal est observé avec l'anticorps JIM13 qui est beaucoup plus spécifique que les réactifs de Yariv. Il est possible, que la quantité d'extrait déposée dans les puits contienne trop peu de molécules d'AGPs pour visualiser une précipitation rougeâtre avec le réactif de Yariv.



**Figure 22 : Détection des AGPs par Western-blot et coloration aux réactifs de yariv sur gel SDS page.** (a) L'anticorps **JIM13** détecte la présence d'AGPs dans les deux contrôles positifs (gomme arabique et racine d'*A. thaliana*) et dans les extraits d'AGPs d'*A. nodosum* et de *S. latissima* (230µg/puits). (b) Le réactif de Yariv **βGal** colore les deux contrôles positifs et les extraits séquentiels en  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  d'*A. nodosum* et de *F. spiralis*.

**Chapitre 4**

**Dynamique de la paroi au cours du  
développement précoce  
du zygote de *Fucus***

# Chapitre 4 : Dynamique de la paroi au cours du développement précoce du zygote de *Fucus*

## Présentation de l'article

La paroi cellulaire joue de nombreux rôles physiologiques essentiels et intervient notamment dans les mécanismes du développement (Arun *et al.*, 2012; Le Bail *et al.*, 2011; Berger *et al.*, 1994; Kropf *et al.*, 1988). Les diverses fonctions de la paroi reposent sur une composition complexe et dynamique. Comme chez les plantes, la paroi des algues brunes est principalement constituée de polysaccharides organisés en un réseau tridimensionnel (Deniaud-Bouët *et al.*, 2014). La majorité des connaissances sur la paroi des algues brunes reposent sur des études d'extractions chimiques réalisées à l'échelle de la plante entière, ou sur la purification de polymères d'intérêts. Ces techniques ne permettent pas de comprendre la dynamique des polysaccharides au cours du développement, ni d'étudier les relations exactes qui existent entre la paroi et le développement. Aujourd'hui, de nouveaux anticorps monoclonaux (Torode *et al.*, 2015 ; Torode *et al.*, 2016) permettent de localiser des fractions spécifiques d'alginate et de fucane à un niveau tissulaire et cellulaire et d'étudier les relations qui existent entre les polysaccharides de la paroi et ses fonctions physiologiques telles que le développement cellulaire. Chez les algues brunes, le zygote de *Fucus* est un organisme modèle en biologie du développement et de nombreuses études concernant les relations entre la composition pariétale, la polarisation cellulaire et la croissance du rhizoïde y ont été réalisées (Berger *et al.*, 1994 ; Bisgrove & Kropf, 2001 ; Quatrano & Stevens, 1976 ; Quatrano, 1982 ; Kropf *et al.*, 1988).

L'article présenté ci-après a été publié en 2016 dans le journal « *Journal of Experimental Botany* ». Cet article est le fruit d'une collaboration. La première partie de ces travaux a consisté à générer, produire et caractériser un set de 6 anticorps monoclonaux anti-alginate spécifiques. La production et la caractérisation des anticorps monoclonaux ont été réalisées dans l'équipe du professeur Paul Knox de l'université de Leeds. Ce travail fait suite à un précédent article qui validait l'utilisation d'un panel de 4 anti-fucane d'algues brunes (Torode *et al.*, 2015). Ces anticorps ont été nommés BAMs pour « **B**rown **A**lga **M**onoclonal ». Dans cet article, les BAMs produits reconnaissent des fractions distinctes d'alginate allant des alginate riches en M à des

blocs d'alginate GG. Dans cet article, j'ai validé biologiquement l'utilisation de ces nouveaux anticorps sur l'organisme modèle zygote de *Fucus*. Pour cela, une cartographie détaillée de la localisation des différents polysaccharides de la paroi du zygote de *Fucus* a été réalisée avec les différentes sondes. La localisation des polysaccharides a été étudiée sur une cinétique de 24 heures après la fécondation du gamète femelle. Les résultats ont ensuite été validés en les comparant avec les données de la littérature concernant la mise en place de la paroi au cours du développement précoce des embryons de Fucales. D'une part, la validation de ces nouveaux outils m'a permis d'étudier la redistribution de différentes fractions de fucanes et d'alginate dans la paroi au cours du développement et en réponse à une réorientation de l'axe de croissance en fonction d'un vecteur lumineux. Ces résultats ont montré l'implication de fractions spécifiques de fucanes sulfatés dans les processus d'émergence du rhizoïde. D'autre part, j'ai poursuivi les précédents travaux concernant l'étude du rôle des AGPs dans le développement précoce et leurs relations avec les autres composés polysaccharidiques de la paroi. Des zygotes de *Fucus* dont les AGPs étaient inhibés au cours du développement par précipitation avec des réactifs de Yariv ont été immunomarqués avec différents anti-fucanes et anti-alginate. Cette expérience a permis de montrer que l'inhibition de ces AGPs chimériques dans la paroi entraîne une redistribution d'une fraction particulière de fucanes sulfatés et une perte de la détection d'une fraction d'alginate riche en blocs GG.

En résumé, cette étude valide l'utilisation des anticorps monoclonaux anti-alginate et anti-fucanes chez les algues brunes et offre de nouvelles perspectives pour l'étude *in situ* des polysaccharides de la paroi à un niveau tissulaire et cellulaire. De plus, l'intégration de ces outils dans nos études du développement confirme l'implication de fractions particulières d'alginate et de fucanes lors de la polarisation cellulaire et de l'émergence du rhizoïde chez le zygote de *Fucus*.



RESEARCH PAPER

# Dynamics of cell wall assembly during early embryogenesis in the brown alga *Fucus*

Thomas A. Torode<sup>1,\*</sup>, Amandine Siméon<sup>2,3,\*</sup>, Susan E. Marcus<sup>1</sup>, Murielle Jam<sup>2,3</sup>, Marie-Anne Le Moigne<sup>2,3</sup>, Delphine Duffieux<sup>2,3</sup>, J. Paul Knox<sup>1,†</sup> and Cécile Hervé<sup>2,3,†</sup>

<sup>1</sup> Centre for Plant Sciences, Faculty of Biological Sciences, University of Leeds, Leeds, UK

<sup>2</sup> Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, UMR 8227, Integrative Biology of Marine Models, Station Biologique de Roscoff, CS 90074, Roscoff, France

<sup>3</sup> CNRS, UMR 8227, Integrative Biology of Marine Models, Station Biologique de Roscoff, CS 90074, Roscoff, France

\* These authors contributed equally to this work.

† Correspondence: [j.p.knox@leeds.ac.uk](mailto:j.p.knox@leeds.ac.uk) or [cecile.herve@sb-roscoff.fr](mailto:cecile.herve@sb-roscoff.fr)

Received 28 May 2016; Accepted 22 September 2016

Editor: Simon Turner, University of Manchester

## Abstract

**Zygotes from *Fucus* species have been used extensively to study cell polarization and rhizoid outgrowth, and in this model system cell wall deposition aligns with the establishment of polarity. Monoclonal antibodies are essential tools for the *in situ* analysis of cell wall glycans, and here we report the characteristics of six monoclonal antibodies to alginates (BAM6–BAM11). The use of these, in conjunction with monoclonal antibodies to brown algal sulfated fucans, has enabled the study of the developmental dynamics of the *Fucus* zygote cell walls. Young zygotes are spherical and all alginate epitopes are deposited uniformly following cellulose deposition. At germination, sulfated fucans are secreted in the growing rhizoid wall. The redistribution of cell wall epitopes was investigated during treatments that cause reorientation of the growth axis (change in light direction) or disrupt rhizoid development (arabinogalactan-protein-reactive Yariv reagent). Alginate modeling was drastically impaired in the latter, and both treatments cause a redistribution of highly sulfated fucan epitopes. The dynamics of cell wall glycans in this system have been visualized *in situ* for the first time, leading to an enhanced understanding of the early developmental mechanisms of *Fucus* species. These sets of monoclonal antibodies significantly extend the available molecular tools for brown algal cell wall studies.**

**Key words:** Alginate, arabinogalactan-protein, brown algae, cell wall, *Fucus serratus*, monoclonal antibody, sulfated fucan, zygote.

## Introduction

Brown algae are a large and diverse class of marine organisms ubiquitous to coastal environments. These photosynthetic eukaryotes exhibit complex multicellularity and have cells surrounded by a cell wall, two features that they share with land plants and also with green and red algae (Popper *et al.*, 2011). However, their evolutionary origin is not related

to these other groups, and the brown algae have evolved both multicellularity and cell walls independently from the other multicellular photosynthetic lineages. Brown algae belong to the stramenopiles, a phylum which also contains unicellular (e.g. various protists and diatoms) and filamentous (e.g. oomycetes) members. Through the course of evolution,

Abbreviations: AF, after fertilization; AGP, arabinogalactan-protein; ASC, axis-stabilizing complex; BAM, brown alga monoclonal antibody; DP, degree of polymerization; M,  $\beta$ -D-mannuronic acid; MAb, monoclonal antibody; ManC5-E, mannuronan C5-epimerase; G,  $\alpha$ -L-guluronic acid;  $\beta$ GalY,  $\beta$ -galactosyl-Yariv reagent.

© The Author 2016. Published by Oxford University Press on behalf of the Society for Experimental Biology.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>), which permits unrestricted reuse, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.



this lineage gained new biosynthetic capabilities for cell wall components (Michel *et al.*, 2010), allowing the evolution of cell walls/extracellular matrices that were certainly critical for the generation of complex multicellularity (Michel *et al.*, 2010; Deniaud-Bouët *et al.*, 2014).

Brown algal cell walls are composed predominantly of polysaccharides together with lower amounts of phenols, proteins, and halide compounds (Deniaud-Bouët *et al.*, 2014). Sulfated fucans and the alginates are the major sets of matrix polysaccharides, which are by far prevalent over crystalline polymers including cellulose. Sulfated fucans encompass a highly diverse spectrum of sulfated polysaccharides containing  $\alpha$ -L-fucose residues. Heterofucans may also contain galactose, mannose, xylose, and uronic acids. Alginate is a linear co-polymer of 1,4-linked uronic acid epimers differing only at C5:  $\beta$ -D-mannuronic acid (M) and  $\alpha$ -L-guluronic acid (G). These residues are arranged in homopolymeric regions of MM- and GG-blocks, interspaced with random arrangements of both monomers (MG-blocks). While the MM-block regions do not associate in the presence of divalent cations, GG-block regions will form 'egg-box' junctions with calcium (Grant *et al.*, 1973), bridging two antiparallel chains and leading to gel formation. The alginate polysaccharide in brown algae is first produced as a pure mannuronate structure. Subsequently this alginate is modified at the polymer level by the action of mannuronan C5-epimerases (ManC5-Es), which catalyze the conversion of M residues into G residues. This enzymatic activity allows the fine-tuning of the alginate structure, with the generation of variants having distinct chemical and rheological properties.

Additional cell wall components in brown algae are shared with land plants, including cellulose, although it is a minor fraction of brown algal walls (from 0% to 10%). A  $\beta$ -1,3-glucan, known as callose in land plants, is also present in brown algal walls (Raimundo *et al.*, 2015), where it can be transiently expressed upon infection (Tsirigoti *et al.*, 2014). Arabinogalactan-proteins (AGPs) are also cell surface components in brown algae (Hervé *et al.*, 2016). AGPs are a complex family of proteoglycans that have been known for decades to be present at cell surfaces in land plants. Although they are reported to play key roles in a number of cellular and developmental processes in these organisms, the detailed molecular mechanisms involved remain elusive (Siefert and Roberts, 2007).

In the Fucales order of brown algae, zygotes have long served as an important developmental biology model system to study the mechanisms by which cells acquire polarity and regulate asymmetric cell division (Bisgrove and Kropf, 2008). In the case of *Fucus* spp. zygotes, cell wall deposition has been demonstrated to be an absolute requirement for polar axis fixation (Kropf *et al.*, 1988) and cell fate selection (Berger *et al.*, 1994). Past studies, conducted to locate the main classes of polymers tentatively at the cell surface of developing *Fucus* zygotes, have suggested that cellulose and alginates are the first polysaccharides to be deposited uniformly into the wall after fertilization (Quatrano and Stevens, 1976; Quatrano, 1982). Sulfated fucans are proposed to be deposited at a later stage during polar axis establishment, and specifically at the

rhizoid pole featuring apical growth (Quatrano and Stevens, 1976; Bisgrove and Kropf, 2001), where they were suggested to be involved in the formation of an axis-stabilizing complex (ASC) (Quatrano *et al.*, 1991). Recent work has demonstrated that AGPs are expressed in the early wall, along with alginates and cellulose, before being spatially restricted to the wall opposite the rhizoid pole (Hervé *et al.*, 2016). Although cell wall components have been shown to play major roles in early embryogenesis in *Fucus* species, there were few accessible molecular tools at the time to investigate selectively the detailed distribution of polysaccharide motifs. Most attempts to map cell wall polymers at the cell surface of *Fucus* zygotes used labor-intensive chemical extractions and/or colorimetric methods (Quatrano and Stevens, 1976; Quatrano *et al.*, 1985), birefringence assays (Bisgrove and Kropf, 2001), or general stains which are not specific enough to ascertain the exact nature of the targeted polymer (Quatrano and Stevens, 1976; Bisgrove and Kropf, 2001). Such methods do not readily allow the cell-based location of polymers or their interactions during wall assembly and modeling or in response to environmental cues. It could be argued that this drawback has played a part in the arrest of studies in this developmental model system in recent decades.

We recently isolated four monoclonal antibodies (MAbs) named the brown alga monoclonal (BAM) antibodies (BAM1 to BAM4) that bind to sulfated fucans and heterofucan preparations (Torode *et al.*, 2015). Here we report the generation of six MAbs (BAM6–BAM11) directed towards different block structures of alginate. We have now used these two sets of molecular probes to investigate cell wall deposition during the development of *Fucus serratus* zygotes. We have reinvestigated and extended the findings outlined above on the spatial and temporal distribution of cell wall polymers during early embryogenesis in this system. Moreover, we have studied the impact of the loss of AGP function on cell wall assembly. The results provide evidence that implicates AGPs both in alginate modeling and in the distribution of some fucan populations in the *F. serratus* zygote.

## Materials and methods

### *Polysaccharides and oligosaccharides*

Alginate (A7003), medium viscosity alginate (A2033), low viscosity alginate (A2158), fucooidan (F5631), laminaran (L9634), gum Arabic (G9752), oat spelt xylan, and polygalacturonic acid (P3889) were obtained from Sigma-Aldrich. A sodium alginate from *Laminaria hyperborea* stipes was kindly provided by DuPont (Landerneau, France). High viscosity alginate (02154723, MP Biochemicals) and very low viscosity alginate (A18565, Alfa Aesar) were kindly provided by Dr Richard Blackburn (University of Leeds). Tamarind xyloglucan, potato galactan, guar galactomannan, sugar beet arabinan and citrus pectin were obtained from Megazyme International (Bray, Ireland).

The MM- and GG-blocks of alginates were prepared using the DuPont sodium alginate according to Heyraud *et al.* (1996). A 0.5% alginate solution was hydrolyzed for 5 h at 100 °C in 0.3 M HCl. After selective precipitation and centrifugation, the blocks were dialyzed, freeze-dried, and re-suspended in distilled water, and respective M/G compositions monitored by NMR. The MM- and GG-blocks were further fragmented using alginate M-lyase (Lundqvist *et al.*, 2012)

and alginate G-lyase (Thomas *et al.*, 2013), respectively. The enzymatic degradation and the purification of the released oligosaccharides was performed as described previously (Thomas *et al.*, 2013).

#### Generation of alginate-directed monoclonal antibodies

Six rat MAbs were derived subsequent to immunization with neoglycoprotein immunogens, prepared by coupling either GG-blocks (BAM10), MM-blocks (BAM7), or alginate from DuPont (BAM6, 8, 9, 11), to BSA by activation with 1-cyano-4-dimethylaminopyridium tetrafluoroborate (CDAP) (Lees *et al.*, 1996). In each case, two male Wistar rats were each injected with 250 µg of alginate–BSA conjugate in complete Freund's adjuvant administered subcutaneously on day 0, and the same was administered with incomplete Freund's adjuvant ~30, 60, 120, and 160 d after this. A pre-fusion boost of 100 µg of alginate–BSA in 1 ml of PBS was administered prior to spleen removal. Hybridoma production and cloning procedures were performed as described (Willats *et al.*, 1998).

#### Enzyme-linked immunosorbent assays

ELISAs were performed in 96-well microtitre plates (Maxisorb, NUNC) coated with 100 µL per well of antigen (50 µg ml<sup>-1</sup>) in phosphate-buffered saline (PBS; 137 mM NaCl) overnight at 4 °C. Unbound antigen was washed out using tap water, and 200 µl of blocking solution of 5% milk powder in PBS (MP/PBS) were added per well. After 1 h at room temperature, plates were rinsed in tap water and 100 µl of hybridoma supernatant in MP-PBS were added at the desired dilution. Plates were incubated at room temperature for 1.5 h, washed with tap water, and then incubated with secondary antibody [rabbit anti-rat IgG, whole molecule, coupled to horseradish peroxidase (HRP), Sigma-Aldrich] at a dilution of 1:1000 for 1.5 h and at room temperature. Plates were washed in tap water, and antibody binding was detected by the addition of 150 µl per well of HRP substrate [0.1 M sodium acetate buffer, pH 6.0, 1% tetramethyl benzidine, 0.006% (v/v) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>] and allowed to develop for 5 min before the reaction was stopped by the addition of 30 µl of 2.5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. For competitive inhibition ELISAs, antigen-coated and blocked microtiter plates were incubated at the same time with the primary antibody and competitor molecules (i.e. MM- and GG-blocks of alginates and oligoalginates) in MP/PBS. After incubation for 1 h, plates were processed as above.

#### Isolation of *Fucus serratus* zygotes and cultivation of the embryos

Sexually mature fronds of *F. serratus* were collected in Roscoff (France; 48.43-3.59). Receptacles were cut, rinsed, and dry stored at 4 °C in the dark for up to 2 weeks. Gametes were released by placing the receptacles in filtered seawater in daylight. Fertilization occurred within 15 min of mixing sperm with oospheres. After 1 h, the resulting zygotes were washed twice in filtered seawater and filtered through a 100 µm nylon mesh. Zygotes were held on microscope slides and allowed to grow in seawater under unidirectional light at 16 °C. A photoperiod of 12 h light and 12 h darkness was used. For the photo-polarization experiment, zygotes were cultured in filtered seawater on microscope slides and in unidirectional light (L1) beginning at 1 h after fertilization (AF). At 6 h AF, the zygotes were allowed to grow in unidirectional light (L2) oriented 180° from the first light source. At 24 h AF, the zygotes were observed for the direction in which rhizoid development had occurred.

In certain cases, *Fucus* zygotes were cultivated in the presence of the β-galactosyl-Yariv reagent (βGalY; Biosupplies Pty Ltd), diluted in seawater at 40 µM and made using a 2 mg ml<sup>-1</sup> stock in 0.15 M NaCl. A first series of incubations started 1 h AF and continued until the time of observation. A second series of incubations was performed between 1 h and 6 h AF. At the end of the incubation period, the reagent was removed by rinsing the samples three times with filtered seawater and zygotes were returned to cultivation.

#### Immunolabeling and fluorescence microscopy

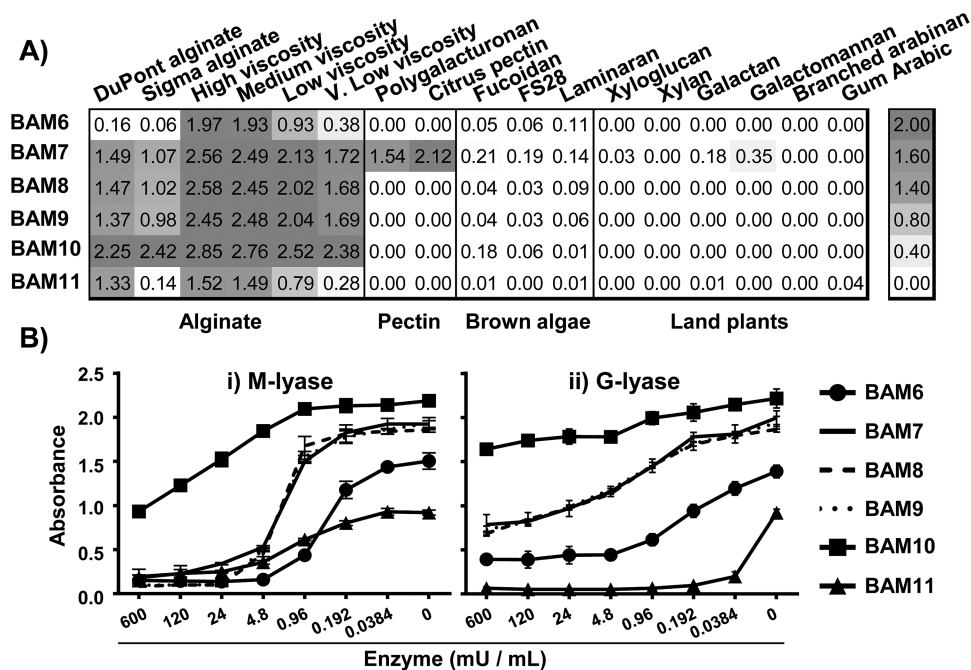
Zygotes were fixed for 1 h in seawater containing 4% paraformaldehyde and 10% glycerol, and washed twice in PBS before immunolabeling. Fluorescence imaging of MAb binding to samples was achieved with indirect immunofluorescence labeling procedures with 10-fold dilutions of hybridoma supernatants followed by 100-fold dilution of anti-rat-IgG-whole molecule–fluorescein isothiocyanate (FITC; Sigma-Aldrich, F1763) as described for other rat MAbs (Marcus *et al.*, 2008). The binding of CBM3a to the zygotes was assessed by a three-stage immunolabeling technique, described previously (Hervé *et al.*, 2009). Prior to analysis, the samples were incubated with the β-linked glucan stain Calcofluor White (Fluorescent Brightner 28; Sigma-Aldrich) for 5 min in darkness, and mounted after washing in a glycerol-based anti-fade solution (Citifluor AF3; Agar Scientific). Immunofluorescence was observed with a microscope equipped with epifluorescence irradiation (BX-60; Olympus). Images were captured with an EXI Aqua camera and Volocity software (Perkin Elmer). The bright field pictures were obtained using a Qimaging camera. Micrographs of zygotes shown are representative of analyses of at least 50 (photo-polarization and βGalY experiments) and 200 (control conditions) zygotes.

## Results

### Generation of monoclonal antibodies directed towards different alginate populations

Alginates are major polysaccharides in the cell walls of brown algae. To understand the role of alginates in the context of algal cell development, a set of molecular probes covering different alginate structures is required. As a first attempt to generate MAbs to alginate structures, isolated fractions of oligomannuronates (MM-blocks; M/G ratio of 7.4) and oligoguluronates (GG-blocks; M/G ratio of 0.06) were prepared, coupled to BSA, and used as immunogens. These immunogens led to very weak immune responses although two hybridoma cell lines were isolated. Subsequent immunization with an alginate polymer (M/G ratio of 0.9) coupled to BSA led to the isolation of several further lines secreting MAbs that bound to alginates. In total six lines were selected for cloning based on initial screening for appropriate specificities and binding characteristics. The corresponding antibodies were designated BAM6–BAM11.

The alginate recognition trend for these MAbs from BAM6 to BAM11 is from a mannuronate-rich epitope for BAM6 to a guluronate-specific epitope for BAM11 as indicated by experiments outlined below. To determine the specificities of the BAM6–BAM11 antibodies toward alginates, and to assess their possible binding to other cell wall polymers, the antibodies were used to probe ELISA-based polysaccharide macroarrays in which sets of plant and brown algal cell wall polysaccharides were present (Fig. 1A). All antibodies displayed a strong binding to a range of commercially available alginate samples, and the BAM7 antibody displayed cross-reactivity with the two galacturonic-acid-rich pectin samples. No cross-reactivity towards other polysaccharides from brown algae including sulfated fucans or polysaccharides from plant cell walls was observed. Epitopes were most abundant in the high and medium viscosity alginate samples and, overall, the BAM10 epitope was the most abundant and the epitopes bound by BAM6 and BAM11 displayed the greatest differential occurrence across the alginate samples (Fig. 1A).



**Fig. 1.** Characterization of six alginate-directed MAbs (BAM6–BAM11). (A) Heat map of epitope occurrence in a range of polysaccharides (coated at 50  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) showing ELISA absorbance obtained from 25-fold dilution of MAbs. Values shown are means of four replicates and in all cases SDs were  $<0.1$  absorbance unit. (B) ELISA analysis of loss of epitope recognition due to enzymatic cleavage of high-viscosity alginate via (i) M-lyase and (ii) G-lyase, with constant 25-fold dilution of MAbs. Note that BAM7, BAM8, and BAM9 are indistinguishable. Results are means of three replicates, and error bars represent the SD.

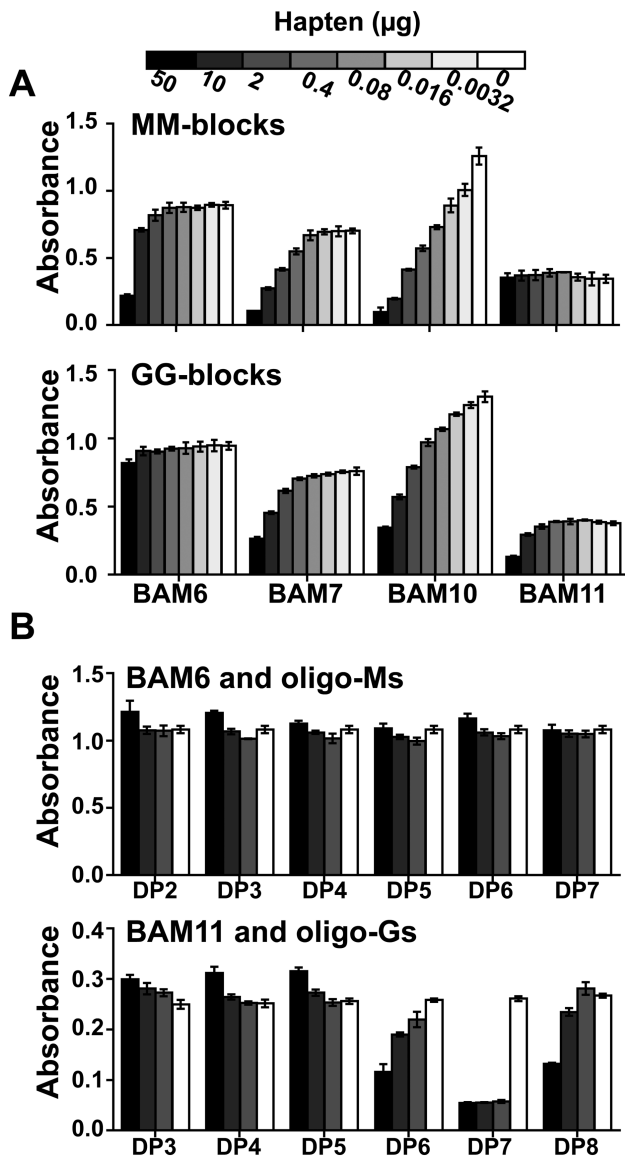
Analysis based on enzymatic digestion of alginate motifs was carried out in order to characterize further the alginate epitopes recognized by BAM6–BAM11. Alginate (high viscosity) was coated onto microtiter plates and treated with two specific alginate lyases prior to ELISA analysis. The alginate lyase from the marine bacterium *Pseudoalteromonas alginovora* X017 cleaves M-MM motifs (Lundqvist et al., 2012) and is hereafter named as M-lyase. The alginate lyase AlyA1 from *Zobellia galactanivorans* (Thomas et al., 2013) cleaves G-G motifs and is hereafter named G-lyase. The binding of BAM6 to high viscosity alginate was most susceptible to M-lyase activity, and formed a midway plateau at  $\sim 0.45$  absorbance units when digested with G-lyase (Fig. 1B). This suggests that the BAM6 epitope is rich in mannuronic acid residues and may contain a restricted amount of guluronic acid residues. The BAM11 epitope is highly susceptible to the G-lyase and only moderately so to M-lyase activity, suggesting a guluronate-rich epitope. In all digestions BAM7, BAM8, and BAM9 were indistinguishable (dotted lines, Fig. 1B), suggesting that their epitopes vary little in structure. The BAM10 epitope had the highest level of detection and the least loss in response to enzymatic digestion. To explore further the relative abundance and potential differences between the alginate epitopes, cell walls from a wide range of brown algae were fractionated by a series of extractants and the solubilized materials screened by ELISA (Supplementary Fig. S1 at JXB online). A scatter-plot analysis for all MAb combinations revealed a high correlation (average  $R^2$  of 0.980) for the occurrence of the BAM7, BAM8, and BAM9 epitopes, further supporting

the observations above and suggesting similar alginate epitopes for these three MAbs—although BAM7 has a clearly different binding capacity in relation to pectic polysaccharides (Fig. 1A).

To determine further the structural features required for recognition, the inhibition of antibody binding to alginates was determined using competitive inhibition (hapten) ELISAs with isolated alginate MM-block and GG-block structures with a degree of polymerization (DP) ranging from 4 to  $\sim 30$ . BAM7, BAM8, and BAM9 displayed similar results, and only results for BAM7 are shown. BAM7 and BAM10 were most effectively inhibited by both sets of the isolated block structures, with BAM10 being most sensitive to inhibition by both MM-blocks or GG-blocks, and this is aligned with it being least susceptible to the alginate lyases. BAM6 binding was only effectively inhibited by MM-blocks, and BAM11 was only effectively inhibited by GG-blocks (Fig. 2A).

Guided by the MM- and GG-block competitive inhibition ELISAs, it was decided to attempt to determine the minimum number of M or G residues required for epitope recognition by the most specific MAbs. Digestion of the MM-blocks and GG-blocks of alginates with the M-lyase and G-lyase, respectively, was used to generate series of oligoalginates which through size exclusion chromatography were separated into individual fractions based on their DP. These procedures led to the isolation of sufficient defined DP oligosaccharides for the analysis of two MAbs. As the epitopes of BAM6 and BAM11 are potentially M and G specific, respectively, the potential of the isolated oligosaccharides to inhibit the binding of these two antibodies was determined. BAM6 was





**Fig. 2.** Alginate hapten inhibition ELISAs with alginate antibodies. (A) Competitive inhibition ELISAs with MM-blocks and GG-blocks of alginates with BAM6, BAM7, BAM10, and BAM11. Results are means of four replicates, and error bars represent the SD. (B) Competitive inhibition ELISAs with defined oligoalginates. BAM6 with DP2–DP7 oligomannuronates and BAM11 with defined DP3–DP8 oligoguluronates. Results are means of four replicates, and error bars represent the SD.

not inhibited by any of the defined oligomannuronates up to DP7 (Fig. 2B). BAM11 was most effectively inhibited by oligoguluronates with DP of 7 (Fig. 2B) which is in agreement with other indications of its binding to a guluronate-specific epitope.

In summary, BAM6 binds to a mannuronate-rich epitope but with a probable requirement for some guluronate for recognition, except GG dyads which would have been fully degraded by the G-lyase. The BAM7 antibody (and closely related BAM8 and BAM9 antibodies) most probably recognize MG regions. BAM10 recognizes a small, ubiquitous epitope of the alginate structure, most probably also MG rich, that is largely resistant to lyase action. BAM11 binds to an epitope of around seven guluronate residues.

### In situ detection of cell wall epitopes during early embryogenesis in *Fucus serratus*

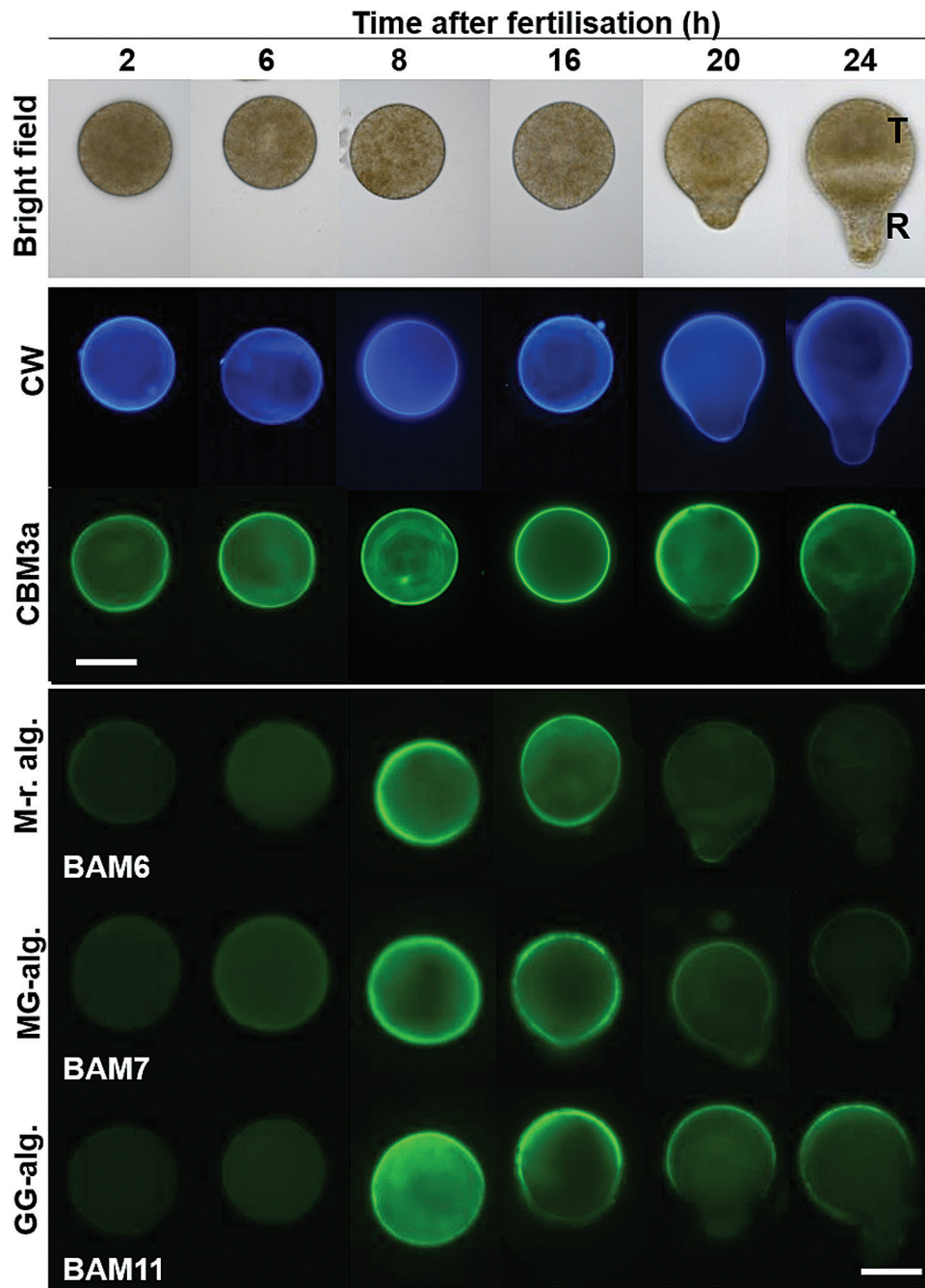
In fucoid zygotes, the first cell division gives rise to a larger thallus cell and a smaller, polarly growing, rhizoid cell (Fig. 3). Past studies have suggested to some extent the localized secretion of cell wall structures during early embryogenesis (Quatrano *et al.*, 1991; Bisgrove and Kropf, 2001). This makes fucoid zygotes an ideal system in which to explore the capabilities of the recently produced cell wall probes while extending the previous observations on cell wall deposition dynamics. To explore the binding of both the alginate and heterofucan BAM MAb to brown algal cell wall polysaccharides, *F. serratus* zygotes were grown in seawater and fixed at different time points AF.

### Alginates are deposited after cellulose in zygote cell walls and are rapidly epimerized

BAM6, BAM7, and BAM11 alginate antibodies strongly bound the zygotes at moderately early stages as determined by immunofluorescence labeling, and the epitopes were strongly and uniformly distributed over the zygote wall at 8 h AF (Fig. 3). BAM8, BAM9, and BAM10 gave the same pattern of detection as BAM7 (Supplementary Fig. S2). The specificity of the developmental dynamics of the alginate epitopes was emphasized by the comparative probing of *F. serratus* zygotes at equivalent time points with both Calcofluor White stain and the carbohydrate-binding module CBM3a (Fig. 3). Both of these probes indicated that cell wall polymers were accessible at the surface of intact *F. serratus* zygotes throughout a 24 h period AF. Binding was uniformly distributed over the zygote wall at the earliest developmental stage analyzed (2 h AF), and both binding patterns became polarized to the future thallus cell when the rhizoid emerged (20 h AF). CBM3a fluorescence was barely detected at the germination zone (20 h AF) or on the rhizoid cell of two-cell embryos (24 h AF). In contrast, immunofluorescence signals for the alginate probes displayed a clear developmental dynamic and were most abundant from 8 h to 16 h AF. Some signal was observed at 6 h, albeit with much reduced intensity, and at 2 h AF alginate epitopes were not detectable. In later stages, 20 h AF onwards, the BAM6 and BAM7 fluorescence signals declined and the BAM11 epitope continued to be detected, although with decreased intensity, in a polarized manner during rhizoid emergence with a focus on the future thallus cell (Fig. 3).

### BAM3 and BAM4 sulfated fucan epitopes are deposited in a polar manner concomitant with rhizoid emergence

MAbs BAM1–BAM4 display strong and specific binding to preparations of sulfated fucans from cell walls of the brown algae (Torode *et al.*, 2015). BAM1 and BAM4, respectively, bind to a non-sulfated epitope and a sulfated epitope present in fucan preparations. BAM2 and BAM3 recognize additional distinct epitopes which are not yet fully characterized. These probes were used to explore the occurrence of fucan populations in relation to the zygote/embryo development. The BAM2 epitope was not detected

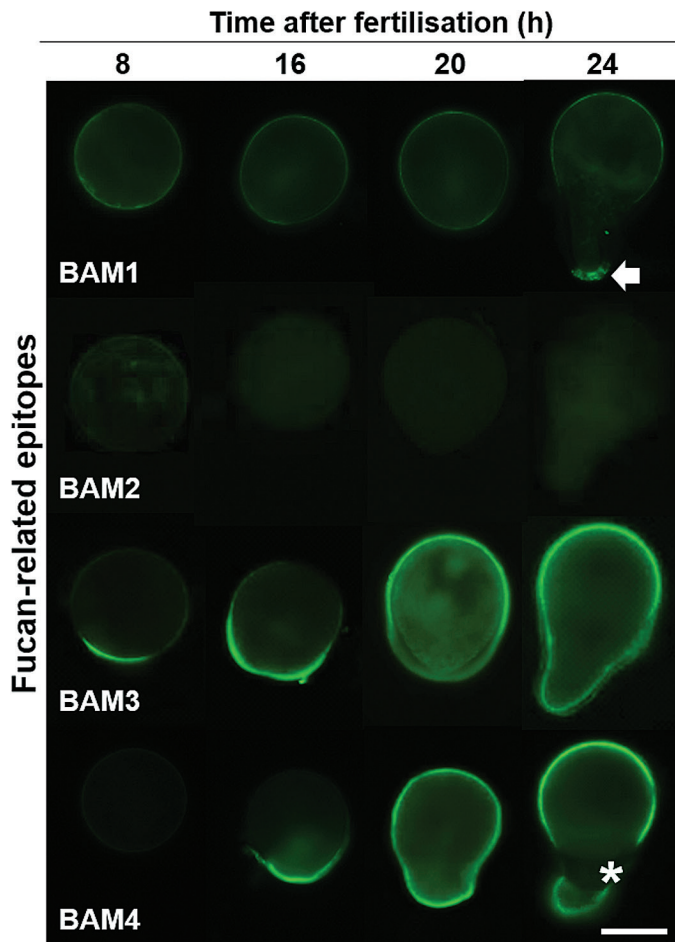


**Fig. 3.** Indirect immunofluorescence labeling of cellulose and alginate populations in developing *Fucus serratus* zygotes. Bright field images on the top panel show the morphology of the zygote and early embryo at time points after fertilization. Beta-linked glucans were detected by use of Calcofluor White stain (blue fluorescence) and the carbohydrate-binding module CBM3a (green fluorescence). Detection of the BAM6, BAM7, and BAM11 alginate epitopes in equivalent individuals. T, thallus cell; R, rhizoid cell. Scale bars=50  $\mu$ m.

at any stage up to 24 h AF. The BAM1 epitope was detected only at the rhizoid tip at 24 h AF (Fig. 4). In contrast, BAM3 and BAM4 bound the zygotes strongly, and the BAM3 epitope was detected at the rhizoid pole at 8 h and at the whole surface of the zygote from 20 h onwards. The BAM4 epitope displayed a similar pattern, being detected from 16 h onwards (Fig. 4). Although both BAM3 and BAM4 recognized polar depositions at early developmental stages, the BAM3 epitope consistently appeared first (8 h AF) compared with the BAM4 epitope (16 h AF). At 24 h AF, the two-cell embryo continued to grow, and there was a

consistent and specific decrease in the BAM4 binding in the rhizoid collar zone (Fig. 4).

In summary, the use of the sets of cell wall probes has shown that the deposition of  $\beta$ -linked glucans that include cellulose occurs ahead of detectable alginate deposition and this is ahead of detected fucan deposition. There are clear contrasting dynamics to the major sets of matrix polysaccharides in that alginate occurrence gradually becomes polarized to the thallus cell and fucan deposition is initiated in a restricted location at the opposite rhizoid pole before becoming more widely distributed. The BAM3 fucan epitope is detected at



**Fig. 4.** Indirect immunofluorescence labeling of fucan deposition in developing *Fucus serratus* zygotes. The zygotes/embryos were labeled at the indicated time points following fertilization. The green fluorescence shows the detection of BAM3 and BAM4 fucan epitopes in equivalent individuals. The arrow shows the presence of BAM1 epitopes at the extreme tip of the elongated rhizoid. The asterisk indicates the collar zone of the embryo. Scale bar=50  $\mu$ m.

the site of future rhizoid emergence at 8 h AF—ahead of visible rhizoid emergence.

#### *Redistribution of fucan populations associated with re-orientation of zygote growth axes*

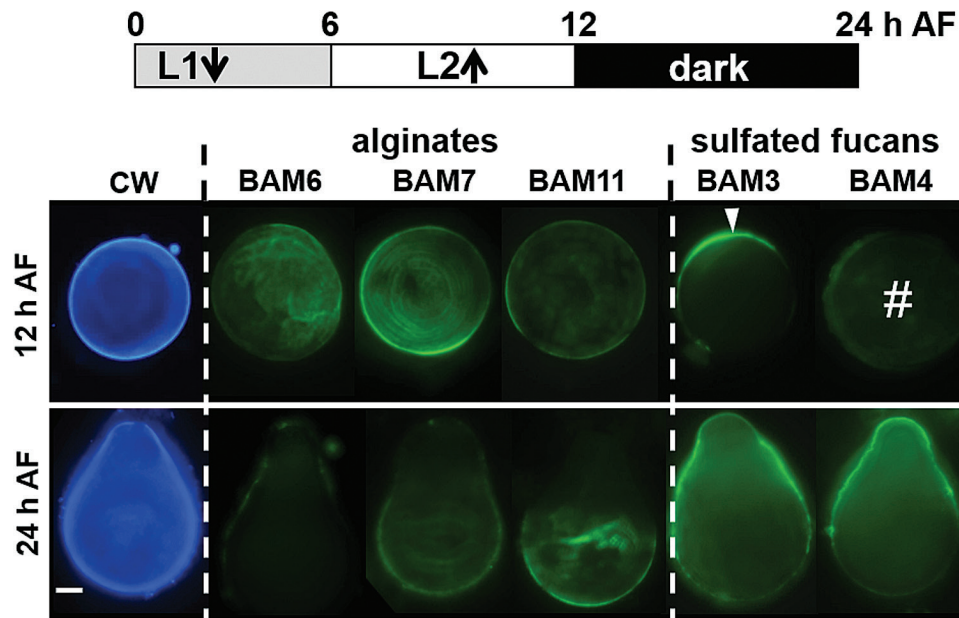
The first detectable epitope asymmetry in the zygote occurs between 8 h and 16 h with BAM3/BAM4 fucan epitopes, and during this time the axis is labile and has the potential for re-orientation by an external vector such as a unilateral gradient (Bisgrove and Kropf, 2008). We used the ability of the zygotes to photopolarize to investigate if the BAM3 and BAM4 fucan epitopes are relocated to a ‘new’ shaded hemisphere when the light gradient is reversed. Zygotes were first grown in unidirectional light (L1) during a first 6 h period AF, before being subject to a second unidirectional light (L2) gradient, orientated 180° to the first. At 24 h, the rhizoids emerge on the dark side of L2, indicating that all zygotes were able to reorient their L1-induced growth axis and formed a new growth axis in response to L2 (Fig. 5). At 24 h AF, when the rhizoid pole is well established, the epitope distribution

patterns were similar in relation to thallus/rhizoid orientation to those observed in zygotes cultivated in a continuous L1 light direction (Figs 3–5). The zygotes were further evaluated for the location of cell wall polymers at the earlier time point of 12 h AF. As anticipated, the alginate-directed BAM6, BAM7, and BAM11 MAb and the Calcofluor White staining showed the same uniform detection at the cell surface as observed with the controls grown in a continuous L1 light gradient (Fig. 5). However, a change in the light direction prior to axis fixation causes a re-distribution of BAM3 and BAM4 fucan epitopes. The BAM3 epitope was at the shaded side of L2 at the new future site of rhizoid germination, indicating that it had responded to change in light direction and correlated with rhizoid development. However, the BAM4 epitope was consistently not detected in a polar manner but in a weak but uniform distribution over the zygote surface (Fig. 5). These observations suggest that the set of the fucan-related polymers carrying the BAM3 epitope are part of the ASC, while those with the BAM4 sulfated epitope are a distinct population of sulfated fucans.

#### *Arabinogalactan-protein-binding $\beta$ Gal-Yariv reagent disrupts cell wall deposition and assembly during *F. serratus* early embryogenesis*

Recent work has demonstrated that *F. serratus* zygotes show an abnormal morphology when cultivated in a medium containing  $\beta$ GalY known to interact with AGPs (Hervé *et al.*, 2016). In the presence of  $\beta$ GalY, the length of the rhizoid was reduced, the collar zone expanded to give a fat rhizoid phenotype, and in extreme cases  $\beta$ GalY treatment results in multiple branching and abnormal cell divisions (Fig. 6A; Hervé *et al.*, 2016). To study how AGP function may be associated with specific elements of cell wall assembly dynamics, patterns of wall polysaccharide epitopes were assessed on 16-hour-old  $\beta$ GalY-treated zygotes, a time point where in untreated zygotes all the main classes of polysaccharides are detectable, including the fucans, which show a polar distribution at this stage. Calcofluor White staining of the  $\beta$ GalY-treated zygotes revealed strong fluorescence at zygote cell walls equivalent to untreated controls (Fig. 6B). At 16 h AF, the BAM6 and BAM7 alginate epitopes were uniformly detected at the surface of the treated zygotes, but to a lesser extent than in the absence of  $\beta$ GalY, and the detection of the guluronate BAM11 epitope was abolished entirely by the treatment (Fig. 6B). This indicates a major reduction in the metabolic development of GG-blocks in the cell walls. At 24 h AF, the BAM6 and BAM7 epitopes were more abundant in treated zygotes than in controls, further suggesting disruption of alginate dynamics, and the BAM11 epitope remained absent. In the case of the fucan-related polymers, the BAM3 epitope was detected in the  $\beta$ GalY-treated zygotes in a polar manner equivalent to the control. The sulfated fucan BAM4 epitope, however, was not detected in a polar manner at any stage and was uniformly distributed over the wall in the  $\beta$ GalY-treated zygotes at 16 h AF, although by 24 h it was detected in a pattern similar to the untreated control (Fig. 6B).





**Fig. 5.** Effect of a reorientation of the growth axis on the deposition of cell wall polysaccharides in developing *F. serratus* zygotes. Zygotes were cultivated and exposed to unidirectional light (L1) while an initial growth axis was established. At 6 h after fertilization (AF), the zygotes were reoriented 180 ° from the initial light source (L2), until the time of observation. Blue fluorescence shows Calcofluor White stain. The green fluorescence shows the detection of the BAM6, BAM7, and BAM11 alginate epitopes, and also the BAM3 and BAM4 fucan epitopes. Scale bar=50  $\mu$ m.

These observations indicate that AGP disruption by  $\beta$ GalY has impacts on subsets of both alginate and fucan polymers. Past studies have shown that the frequencies of abnormal embryos were higher with continued exposure to the Yariv reagent, compared with those observed after a short incubation period (Hervé *et al.*, 2016). This indicates that zygotes are partially able to recover from an early treatment when transferred to a fresh culture medium, suggesting that the effects on developing *F. serratus* zygotes are reversible. In order to survey if the effects of the  $\beta$ GalY reagent on cell wall assembly were reversible, 16-hour-old zygotes were transferred from a medium containing the reagent to fresh seawater, and assessment at 24 h showed that the epitope patterns were identical to those observed for untreated zygotes (Fig. 6B), except for the BAM4 epitope which was still uniformly distributed over the wall.

## Discussion

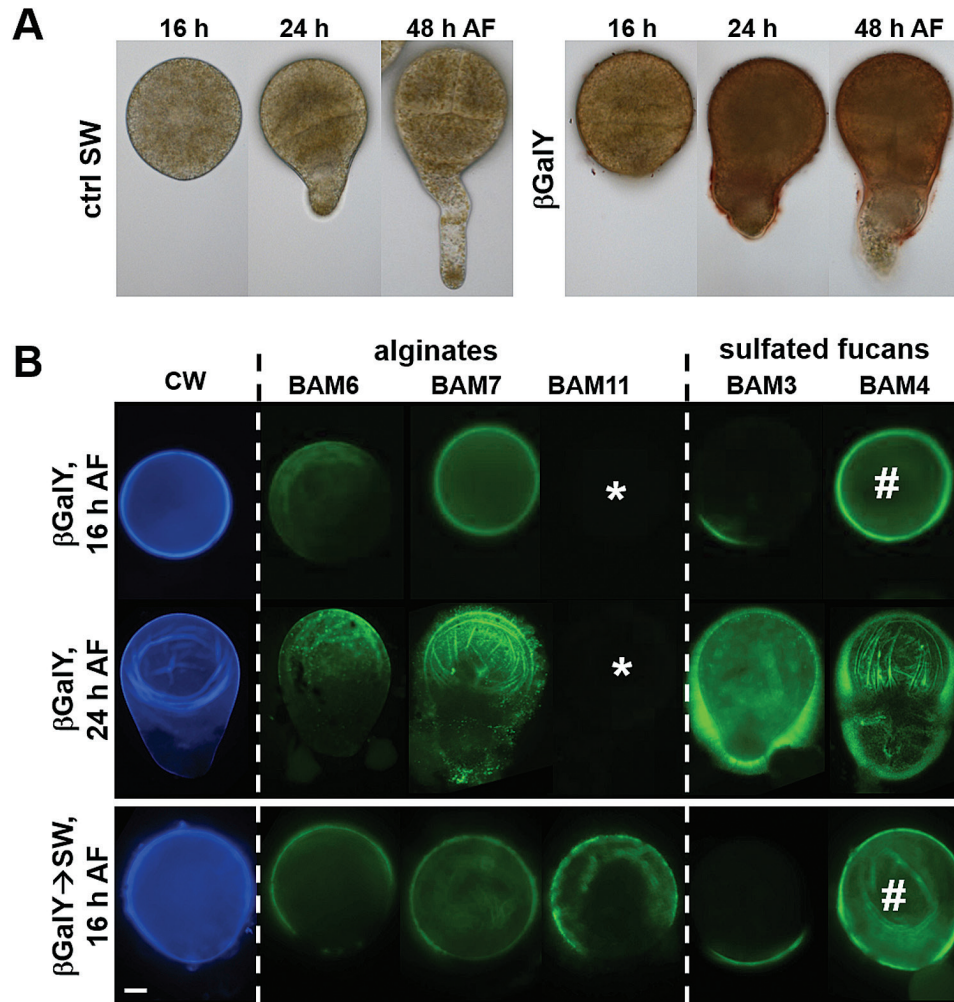
### *New molecular tools extend capacities to study cell wall biology in brown algae*

The availability of >200 MAbs targeting a variety of cell wall polysaccharides continues to be an important resource for the study of the polysaccharide-rich cell walls of terrestrial plants (Patathil *et al.*, 2012; Raimundo *et al.*, 2015). For macroalgal cell walls, the probe reservoir is limited due to less research activity, relative to plant cell walls, as well as the challenges in providing well-defined oligosaccharides for the immunization processes and/or epitope characterization. Vreeland and co-authors were pioneers in developing antibodies targeting specific algal epitopes (Vreeland *et al.*, 1984; Boyen *et al.*, 1988), but the lack of specific polysaccharides at the time limited their comprehensive characterization.

The recently generated probes to fucan-related polymers (Torode *et al.*, 2015) and now BAM6–BAM11 directed to alginates, characterized herein, complement the antibodies previously obtained (Nagasato *et al.*, 2010). Additionally, the genomic information recently released from marine bacteria and brown algae allows for the characterization of recombinant enzymes involved in cell wall degradation [i.e. alginate lyases (Thomas *et al.*, 2013), fucanase (Colin *et al.*, 2006)] and alginate synthesis [i.e. GDP-mannose dehydrogenase (Tenhaken *et al.*, 2011), ManC5-E (Fischl *et al.*, 2016; Inoue *et al.*, 2016)]. Together these new implementations will be important tools for the study of cell wall biology in brown algae.

### *Re-examination of cell wall assembly in the developmental model system, the F. serratus zygote*

Biochemical and *in situ* investigations indicate that the anti-fucan BAM1–BAM4 and anti-alginate BAM6–BAM11 are highly specific to their respective polymer classes and also bind to distinct epitopes within these classes. These probes therefore permit the *in situ* tracking of relevant cell wall epitopes in developing *F. serratus* zygotes. Cellulose was detected within the first 2 h AF, ahead of alginates, which were only faintly detected at 6 h, before being abundantly present in the wall during the polar axis establishment, at 8–16 h AF. These results are in agreement with earlier observations indicating that cellulose and alginates are deposited early into the wall. However, Quatrano and Stevens (1976) were reporting the abundant detection of alginates concomitant to cellulose in zygotes from *F. vesiculosus*. This was not the case in previous studies using antibodies, which were also detecting G-blocks of alginates only at 6 h AF in zygotes from *F. distichus* (Boyen *et al.*, 1988). This discrepancy might



**Fig. 6.** Effect of a  $\beta$ GalY treatment on the deposition of cell wall polysaccharides in developing *F. serratus* zygotes. (A) Bright field images showing the morphology of the treated zygotes as compared with untreated controls. (B) Indirect immunofluorescence labeling of cell wall polysaccharides. Blue fluorescence shows Calcofluor White stain. Green fluorescence shows the detection of the BAM6, BAM7, and BAM11 alginate epitopes, and the BAM3, BAM4 fucan epitopes. Zygotes were cultivated in the presence of  $\beta$ GalY, either from 1 h AF until the time of observation or for 8 h AF when the reagent was removed and the zygotes allowed to develop for a further 8 h in seawater ( $\beta$ GalY $\rightarrow$ SW). Scale bar=50  $\mu$ m.

indicate either a difference between species, or that alginates are initially incorporated into the wall in a configuration which impairs the antibody binding, or that the chemical procedure used by Quatrano and Stevens (1976), which does not differentiate between the different uronic acids, was overestimating the alginate content by incorporating cytosolic contaminants.

The three types of alginate structures, as recognized by BAM6, BAM7, and BAM11, have similar dynamics of distribution during embryo development, albeit with an earlier diminution of the M-rich epitopes relative to the guluronate-specific BAM11 epitope. This aligns with the knowledge that the distinct types of blocks are localized on the same polymer and suggest the rapid epimerization of the polymer by ManC5-Es, concomitant with alginate incorporation into cell walls. At later stages there is a localized change in alginate distribution, with a focus on the thallus cell pole, which has been poorly documented in previous literature. A disappearance of the alginate is unlikely as alginate is known to be abundantly present throughout embryo development, ranging from 40% to 60% of

the total polysaccharide content (Novotny and Forman, 1974; Quatrano and Stevens, 1976). This may indicate a change in alginate structure not covered by the panel of MABs or change in wall structure resulting in a masking of alginates. As fucan-related polymers become abundant at this stage, as indicated by the BAM3 and BAM4 epitopes, it is possible that they contribute to the masking of the alginate epitopes. Attempts to unmask alginate with a fucanase were not successful and additional fucanases would be required to explore this possibility further. Another possibility is that the MABs bind to single alginate chains and that their binding abilities are challenged in complex composites where calcium and GG-block regions mediate self-association of the polymers. Another explanation could be that the cross-linking of alginates by phenols (Bitton *et al.*, 2006; Deniaud-Bouët *et al.*, 2014) would impair MAB accessibility to epitopes. This is consistent with the view that phenols are first incorporated at the rhizoid pole at these later stages (Schoenwaelder and Wiencke, 2000).

Previous studies have reported at least two fucan populations in *F. distichus* zygotes during early embryogenesis.



A first fucan population (F1), with little detectable sulfate, and high levels of xylose relative to fucose, was detected in low amounts in walls and cytoplasm 1–6 h AF. When deposited into the wall, F1 was randomly present at the cell surface (Hogsett and Quatrano, 1975; Quatrano and Stevens, 1976). The present study reports no detection of the unsulfated BAM1 epitope, except at the extreme rhizoid tip of 24 h elongating rhizoid cells. A second population of highly sulfated fucans (F2) was first seen in the cytoplasm of the 6- to 10-hour-old zygotes but not in the cell wall until 12–14 h (Quatrano and Shaw, 1997). In the present study, the BAM3 and BAM4 sulfated epitopes were detected, in a restricted polarized manner, as early as 8–16 h AF, prior to rhizoid germination. At later stages, both these epitopes were detected across all cell walls.

The heterotrophic growth in *Fucus* zygotes is initiated by the production of a protuberance, indicative of the site of rhizoid emergence, and which further elongates through an apical growth process. Such a mechanism is reminiscent of observations made on other eukaryotic organisms having cells featuring apical growth, including land plant pollen tubes. In this system, both initiation and elongation phases of cell growth are concomitant with dynamic cell wall changes (Dardelle *et al.*, 2010; Geitmann, 2010). In the spherical *Fucus* zygote, cellulose deposition helps to organize and strengthen the wall, and the low signal of cellulose detection in the bulge wall during the initiation growth phase is congruent with a local cell wall loosening (Novotny and Forman, 1974; Bisgrove and Kropf, 2001). To date, no cellulases, expansins, or alginase lyases have been reported from genome sequences of brown algae (Cock *et al.*, 2010; Michel *et al.*, 2010; Ye *et al.*, 2015). This suggests the existence of novel mechanisms involved in the disruption of the cellulose and cell wall architecture during the transition to localized cell expansion in brown algae. In *Fucus* zygotes, sulfated components such as F2 and/or polyphenols are believed to support the strengthening of the apical wall during elongation (Schoenwaelder and Wiencke, 2000; Bisgrove and Kropf, 2001). During rhizoid cell elongation, the BAM4 sulfated fucan epitope was observed to be displaced from the collar zone, possibly indicating a region of specific cell wall modification relating to cell wall extension.

#### Multifunctional roles for cell wall fucans in brown algae

Several studies on *Fucus* zygotes have demonstrated the essential role of cell walls as a source of position-dependent information required for cell polarization (Quatrano and Stevens, 1976; Kropf *et al.*, 1988; Berger *et al.*, 1994; Bisgrove and Kropf, 2001). The specific deposition of sulfated fucans (F2) at the rhizoid end during the establishment of the polar axis was indicative of a role for this polymer in the formation of an ASC bridging the cell wall, transmembrane proteins, and the cytoskeleton (Quatrano *et al.*, 1991). Both the BAM3 and BAM4 sulfated fucan epitopes have a localized distribution at the future site of rhizoid growth. However, when the polar axis fixation is challenged by an external cue such as a reversion of a light gradient, or by AGP-binding Yariv reagent, only the earlier deposited BAM3 epitope is clearly linked to

the site of rhizoid initiation. These observations indicate that BAM3 and BAM4 epitopes are representative of two distinct fucan populations, with the BAM3 epitope being a positional marker for the establishment of polarity in *F. serratus* zygotes, and a likely component of the ASC, and the BAM4 epitope not being so tightly associated with axis formation.

In the brown alga *Ectocarpus subulatus*, the BAM4 sulfated epitope was modulated in relation to the external salt concentration (Torode *et al.*, 2015), which is indicative of the BAM4 epitope being involved in the osmotic adjustment at the cell surfaces through cation binding activity. In *Fucus* zygotes, cytosolic gradients of H<sup>+</sup> and Ca<sup>2+</sup> are generated during the establishment of polar growth (Taylor *et al.*, 1996). Increased concentration of Ca<sup>2+</sup> at the rhizoid apex may play a significant role in amplifying the initial cell asymmetry. When the direction of the light vector is changed, ion gradients reposition to the new rhizoid pole (Bisgrove and Kropf, 2001). The localized insertion of sulfated fucans at the rhizoid apex is believed to participate in the regulation of the intracellular electrical field. In this study, while the BAM3 epitope was observed to be invariably initially localized at the future site of rhizoid growth, the distribution of the BAM4 fucan population undergoes a distinct dynamic change and covers the whole cell surface during reversion of the light gradient. It is possible that the population of fucans marked by the BAM4 epitope participates in the buffering of transient and local cation elevations and contributes to the redirection of the cytosolic Ca<sup>2+</sup> gradient through its osmoregulation property of the cell surface.

#### AGPs influence alginate modeling and cell wall assembly in the *Fucus* embryo

In *F. serratus*, AGP-binding βGalY specifically disrupts early embryogenesis, with a pronounced delay in cell elongation (Hervé *et al.*, 2016). It was postulated that βGalY was impairing cell elongation by interfering with the deposition of either cellulose or alginates. Here we show that βGalY leads to loss of detection of the BAM11 guluronate epitope at all stages of zygote development. This indicates a reduction in the *in muro* epimerization of alginates and is congruent with the knowledge that in the brown alga *Ectocarpus siliculosus*, some chimeric AGPs motifs are associated with ManC5-Es (Fischl *et al.*, 2016; Hervé *et al.*, 2016). It is therefore possible that the AGPs present in the *Fucus* embryo are chimerically associated with ManC5-Es that trigger the increase of GG-bock alginate structures. In such a system, AGPs may regulate wall rigidity through the control of the activity of appended ManC5-Es. Impairing such an AGP molecular function would therefore contribute to a softening of the wall, in particular in the collar zone, and lead in turn to the fat rhizoid phenotype, or more extreme abnormalities.

βGalY not only caused a modification in the modeling of alginates, but the BAM4 fucan epitope was also incorrectly distributed over the zygote cell surface. Instead of being polarly localized at the future germination site, the BAM4 epitope displayed a uniform binding equivalent to that observed during the redirection of the growth axis by

light reversion. In land plants, AGPs have been identified as important calcium-binding molecules and proposed to act as calcium flux capacitors that regulate plant growth (Lampport and Várnai, 2013). The fucan population represented by the BAM4 epitope may be responsive to some mechanistic link between disrupted alginate structure and fucan or indicating an additional role for a distinct AGP molecule that is involved in ion fluxes and electrical gradients concomitant with polar growth, as discussed above.

In summary, with new sets of probes for alginates, described here, and fucans (Torode *et al.*, 2015), some insights have been obtained into the role of cell walls in the mechanisms underpinning zygote polarization and development in *F. serratus*. These observations emphasize the complexities of these two brown algae matrix polysaccharide classes and perhaps also the likelihood that a full coverage of polysaccharide structures by molecular probes has not yet been achieved for these polymers. Nevertheless, the isolated MABs are useful additions to the brown algae cell wall tool box.

## Supplementary data

Supplementary data are available at *JXB* online.

**Figure S1.** Scatterplot matrix of BAM6–BAM11 MAB binding to sequential cell wall extracts of a range of diverse Fucales and Laminariales brown algae.

**Figure S2.** Indirect immunofluorescence labeling of the deposition of MG-alginates (BAM7, BAM8, BAM9, and BAM10 epitopes) in the early embryo in *F. serratus*.

## Acknowledgements

TAT was supported by a UK Biotechnology and Biological Research Council studentship, with visits to Station Biologique de Roscoff (France) supported by short-term grants provided by the European Commission through under the FP7 ‘capacities’ specific programme ASSEMBLE. CH acknowledges funding from the Brittany Region (SAD 6630 SONDALG). AS was supported by a grant from the Brittany Region (ARED\_8979 ECTOPAR).

## References

- Berger F, Taylor A, Brownlee C. 1994. Cell fate determination by the cell wall in early *Fucus* development. *Science* **263**, 1421–1423.
- Bisgrove S, Kropf DL. 2008. Asymmetric cell divisions: zygotes of fucooid algae as a model system. In: Verma D, Hong Z, eds. *Cell division control in plants*. Heidelberg: Springer, 323–341.
- Bisgrove SR, Kropf DL. 2001. Cell wall deposition during morphogenesis in fucooid algae. *Planta* **212**, 648–658.
- Bitton R, Ben-Yehuda M, Davidovich M, Balazs Y, Potin P, Delage L, Colin C, Bianco-Peled H. 2006. Structure of algal-born phenolic polymeric adhesives. *Macromolecular Bioscience* **6**, 737–746.
- Boyen C, Kloareg B, Vreeland V. 1988. Comparison of protoplast wall regeneration and native wall deposition in zygotes of *Fucus distichus* by cell wall labelling with monoclonal antibodies. *Plant Physiology and Biochemistry* **26**, 653–659.
- Cock JM, Sterck L, Rouze P, *et al.* 2010. The *Ectocarpus* genome and the independent evolution of multicellularity in brown algae. *Nature* **465**, 617–621.
- Colin S, Deniaud E, Jam M, Descamps V, Chevolut Y, Kervarec N, Yvin JC, Barbeyron T, Michel G, Kloareg B. 2006. Cloning and biochemical characterization of the fucanase FcnA: definition of a novel glycoside hydrolase family specific for sulfated fucans. *Glycobiology* **16**, 1021–1032.
- Dardelle F, Lehner A, Ramdani Y, Bardor M, Lerouge P, Driouich A, Mollet JC. 2010. Biochemical and immunocytological characterizations of Arabidopsis pollen tube cell wall. *Plant Physiology* **153**, 1563–1576.
- Deniaud-Bouët E, Kervarec N, Michel G, Tonon T, Kloareg B, Hervé C. 2014. Chemical and enzymatic fractionation of cell walls from Fucales: insights into the structure of the extracellular matrix of brown algae. *Annals of Botany* **114**, 1203–1216.
- Fischl R, Bertelsen K, Gaillard F, Coelho S, Michel G, Klinger M, Boyen C, Czjzek M, Hervé C. 2016. The cell wall active mannanan C5-epimerases in the model brown alga *Ectocarpus*: from gene context to recombinant protein. *Glycobiology*, (in press).
- Geitmann A. 2010. How to shape a cylinder: pollen tube as a model system for the generation of complex cellular geometry. *Sexual Plant Reproduction* **23**, 63–71.
- Grant GT, Morris ER, Rees DA, Smith PJC, Thom D. 1973. Biological interactions between polysaccharides and divalent cations: the egg-box model. *FEBS Letters* **32**, 195–198.
- Hervé C, Rogowski A, Gilbert HJ, Knox JP. 2009. Enzymatic treatments reveal differential capacities for xylan recognition and degradation in primary and secondary plant cell walls. *The Plant Journal* **58**, 413–422.
- Hervé C, Siméon A, Jam M, Cassin A, Johnson KL, Salmeán AA, Willats WGT, Doblin MS, Bacic A, Kloareg B. 2016. Arabinogalactan proteins have deep roots in eukaryotes: identification of genes and epitopes in brown algae and their role in *Fucus serratus* embryo development. *New Phytologist* **209**, 1428–1441.
- Heyraud A, Gey C, Leonard C, Rochas C, Girond S, Kloareg B. 1996. NMR spectroscopy analysis of oligoguluronates and oligomannuronates prepared by acid or enzymatic hydrolysis of homopolymeric blocks of alginic acid. Application to the determination of the substrate specificity of *Haliotis tuberculata* alginate lyase. *Carbohydrate Research* **289**, 11–23.
- Hogsett WE, Quatrano RS. 1975. Isolation of polysaccharides sulfated during early embryogenesis in *Fucus*. *Plant Physiology* **55**, 25–29.
- Inoue A, Satoh A, Morishita M, Tokunaga Y, Miyakawa T, Tanokura M, Ojima T. 2016. Functional heterologous expression and characterization of mannanan C5-epimerase from the brown alga *Saccharina japonica*. *Algal Research* **16**, 282–291.
- Kropf DL, Kloareg B, Quatrano RS. 1988. Cell wall is required for fixation of the embryonic axis in *Fucus* zygotes. *Science* **239**, 187–190.
- Lampport DTA, Várnai P. 2013. Periplasmic arabinogalactan glycoproteins act as a calcium capacitor that regulates plant growth and development. *New Phytologist* **197**, 58–64.
- Lees A, Nelson BL, Mond JJ. 1996. Activation of soluble polysaccharides with 1-cyano-4-dimethylaminopyridinium tetrafluoroborate for use in protein–polysaccharide conjugate vaccines and immunological reagents. *Vaccine* **14**, 190–198.
- Lundqvist LCE, Jam M, Barbeyron T, Czjzek M, Sandström C. 2012. Substrate specificity of the recombinant alginate lyase from the marine bacteria *Pseudomonas alginovora*. *Carbohydrate Research* **352**, 44–50.
- Marcus SE, Verhertbruggen Y, Herve C, Ordaz-Ortiz JJ, Farkas V, Pedersen HL, Willats WG, Knox JP. 2008. Pectic homogalacturonan masks abundant sets of xyloglucan epitopes in plant cell walls. *BMC Plant Biology* **8**, 60.
- Michel G, Tonon T, Scornet D, Cock JM, Kloareg B. 2010. The cell wall polysaccharide metabolism of the brown alga *Ectocarpus siliculosus*. Insights into the evolution of extracellular matrix polysaccharides in Eukaryotes. *New Phytologist* **188**, 82–97.
- Nagasato C, Inoue A, Mizuno M, Kanazawa K, Ojima T, Okuda K, Motomura T. 2010. Membrane fusion process and assembly of cell wall during cytokinesis in the brown alga, *Silvetia babingtonii* (Fucales, Phaeophyceae). *Planta* **232**, 287–298.
- Novotny AM, Forman M. 1974. The relationship between changes in cell wall composition and the establishment of polarity in *Fucus* embryos. *Developmental Biology* **40**, 162–173.
- Pattathil S, Avci U, Miller JS, Hahn MG. 2012. Immunological approaches to plant cell wall and biomass characterization: glycome profiling. *Methods in Molecular Biology* **908**, 61–72.

- Popper ZA, Michel G, Hervé C, Domozych DS, Willats WGT, Tuohy MG, Kloareg B, Stengel DB.** 2011. Evolution and diversity of plant cell walls: from algae to flowering plants. *Annual Review of Plant Biology* **62**, 567–590.
- Quatrano RS.** 1982. Cell-wall formation in *Fucus* zygotes: a model system to study the assembly and localization of wall polymers. In: Brown RM, ed. *Cellulose and other natural polymer systems: biogenesis, structure, and degradation*. Boston: Springer, 45–59.
- Quatrano RS, Brian L, Aldridge J, Schultz T.** 1991. Polar axis fixation in *Fucus* zygotes: components of the cytoskeleton and extracellular matrix. *Development* **113**, 11–16.
- Quatrano RS, Griffing LR, Huber-Walchli V, Doubet RS.** 1985. Cytological and biochemical requirements for the establishment of a polar cell. *Journal of Cell Science* **1985**, 129–141.
- Quatrano RS, Shaw SL.** 1997. Role of the cell wall in the determination of cell polarity and the plane of cell division in *Fucus* embryos. *Trends in Plant Science* **2**, 15–21.
- Quatrano RS, Stevens PT.** 1976. Cell wall assembly in *Fucus* zygotes: I. Characterization of the polysaccharide components. *Plant Physiology* **58**, 224–231.
- Raimundo SC, Avci U, Hopper C, Pattathil S, Hahn MG, Popper ZA.** 2015. Immunolocalization of cell wall carbohydrate epitopes in seaweeds: presence of land plant epitopes in *Fucus vesiculosus* L. (Phaeophyceae). *Planta* **243**, 337–54.
- Schoenwaelder MEA, Wiencke C.** 2000. Phenolic compounds in the embryo development of several northern hemisphere Fucoids. *Plant Biology* **2**, 24–33.
- Seifert GJ, Roberts K.** 2007. The biology of arabinogalactan proteins. *Annual Review of Plant Biology* **58**, 137–161.
- Taylor AR, Manison NFH, Fernandez C, Wood J, Brownlee C.** 1996. Spatial organization of calcium signaling involved in cell volume control in the *Fucus* rhizoid. *The Plant Cell* **8**, 2015–2031.
- Tenhaken R, Voglas E, Cock JM, Neu V, Huber CG.** 2011. Characterization of GDP-mannose dehydrogenase from the brown alga *Ectocarpus siliculosus* providing the precursor for the alginate polymer. *Journal of Biological Chemistry* **286**, 16707–16715.
- Thomas F, Lundqvist LCE, Jam M, Jeudy A, Barbeyron T, Sandström C, Michel G, Czjzek M.** 2013. Comparative characterization of two marine alginate lyases from *Zobellia galactanivorans* reveals distinct modes of action and exquisite adaptation to their natural substrate. *Journal of Biological Chemistry* **288**, 23021–23037.
- Torode TA, Marcus SE, Jam M, Tonon T, Blackburn RS, Hervé C, Knox JP.** 2015. Monoclonal antibodies directed to fucoidan preparations from brown algae. *PLoS One* **10**, e0118366.
- Tsirigoti A, Beakes G, Hervé C, Gachon CM, Katsaros C.** 2014. Attachment, penetration and early host defense mechanisms during the infection of filamentous brown algae by *Eurychasma dicksonii*. *Protoplasma* **252**, 845–856.
- Vreeland V, Slomich M, Laetsch WM.** 1984. Monoclonal antibodies as molecular probes for cell wall antigens of the brown alga *Fucus*. *Planta* **162**, 506–517.
- Willats WGT, Marcus SE, Knox JP.** 1998. Generation of a monoclonal antibody specific to (1→5)- $\alpha$ -arabinan. *Carbohydrate Research* **308**, 149.
- Ye N, Zhang X, Miao M, et al.** 2015. *Saccharina* genomes provide novel insight into kelp biology. *Nature Communications* **6**, 6986.

**Chapitre 5**

**Premières études ciblées sur les parois  
de deux espèces modèles d'*Ectocarpus***

# Chapitre 5 : Premières études ciblées sur les parois de deux espèces modèles d'*Ectocarpus*

## Introduction

Précédemment, nous avons mis en évidence la présence et la régulation au cours du développement d'AGPs chimériques dans la paroi du zygote de *Fucus*, et nous avons montré que leur inhibition, *via* les réactifs de Yariv, perturbait l'élongation du rhizoïde et la distribution d'épitopes d'alginate et de fucanes sulfatés (Hervé *et al.*, 2016 ; Torode *et al.*, 2016). Comme cela a été présenté dans l'introduction, le zygote de *Fucus* comporte certaines limites techniques telles que sa fertilité hivernale et la difficulté de cultiver ses stades tardifs au laboratoire. Contrairement au zygote de *Fucus*, *Ectocarpus* peut être cultivé toute l'année au laboratoire et la souche marine (souche 32) d'*E. siliculosus* est un modèle génétique et génomique pour la lignée des algues brunes (Peters *et al.*, 2004; Cock *et al.*, 2010). Les travaux présentés dans ce chapitre et dans le suivant ont été effectués sur la souche 32 d'*E. siliculosus* et la souche Bft15b d'*E. subulatus* (présentées dans le chapitre 2).

### I. La paroi de la souche marine d'*E. siliculosus*

Comme mentionné dans le chapitre 2, la souche 32 d'*E. siliculosus* est un écotype marin. Les études sur les AGPs dont les résultats étaient très encourageants chez le zygote de *Fucus* ont été poursuivies chez cet autre organisme modèle et sont présentées ci-après. Comme pour le zygote de *Fucus*, une cartographie de la répartition de ses principaux polysaccharides de paroi au cours du développement précoce a été édifiée. Cette étude a permis d'établir un phénotypage de la paroi en condition contrôle. Ce dernier pouvant servir de base de comparaison pour étudier la structure pariétale précoce entre différentes souches d'*Ectocarpus*, et en réponse à différents traitements et stress environnementaux.

## A. Analyse des AGPs chez *Ectocarpus* : difficultés techniques

La localisation des AGPs dans la paroi de jeunes parthénosporophytes d'*Ectocarpus* (7 à 15 jours de développement) a été réalisée, comme pour le zygote de *Fucus*, par précipitation avec des réactifs de Yariv (Hervé *et al.*, 2016). Aucune coloration du compartiment pariétal n'a été observée. Chez le zygote de *Fucus*, les AGPs sont seulement détectés dans la paroi à partir de 12 heures après la fécondation (Hervé *et al.*, 2016). Il est possible que les AGPs soient présents en trop faibles quantités pour que la précipitation par les réactifs de Yariv révèle leur présence ou que ceux-ci soient synthétisés plus tardivement dans la paroi des parthénosporophytes. De plus, les cellules des jeunes parthénosporophytes d'*Ectocarpus* mesurent entre 8 et 10  $\mu\text{m}$ , c'est-à-dire qu'elles ont une taille environs huit fois inférieure aux cellules du zygote de *Fucus*, dont la taille est approximativement de 80  $\mu\text{m}$ . Cette petite taille cellulaire, la forte pigmentation brune initiale et la finesse de la paroi posent des difficultés techniques pour l'observation d'une coloration rougeâtre dans le compartiment pariétal. La méthode concernant la mise en évidence des AGPs dans la paroi *via* une coloration aux réactifs de Yariv est donc limitée en fonction du modèle d'algue brune sélectionné.

Dans le but d'identifier si les AGPs interviennent au cours du développement précoce des parthénosporophytes d'*Ectocarpus*, des gamètes ont été, comme pour le zygote de *Fucus* (Hervé *et al.*, 2016), incubés en présence de réactif de Yariv. Dans un premier temps, les gamètes étaient cultivés avec une concentration équivalente à ce qui avait été testé chez le zygote de *Fucus*, c'est-à-dire une concentration de 40  $\mu\text{g/ml}$ . Aucun développement n'était observé indiquant que la concentration utilisée était létale. Des concentrations beaucoup plus faibles ont alors été testées. Les parthénosporophytes étaient capables de se développer à partir d'une concentration inférieure ou égale à 1  $\mu\text{g/ml}$ . La morphologie était alors semblable aux individus cultivés en eau de mer contrôle, indiquant une absence d'effet sur le développement d'*Ectocarpus*. Une prolifération importante de champignons était constatée en présence de réactifs de Yariv. Lors des études menées sur le zygote de *Fucus*, aucun développement de champignons n'avait été observé. Il est possible que l'ajout de nutriments Provasoli classiquement utilisés dans le milieu de culture d'*Ectocarpus* favorise le développement de spores initialement présents dans les réactifs.

En résumé, les expériences menées sur les parthénosporophytes d'*Ectocarpus* indiquent qu'il est difficile de conclure quant à la présence d'AGPs au cours de ces stades de



développement précoce et quant-à un effet de leur possible inhibition. L'ensemble des résultats présentés indiquent que la mise en place d'outils et de protocoles spécifiques à la lignée des algues brunes est indispensable pour poursuivre des études détaillées sur leurs AGPs. Actuellement, l'amélioration de protocoles et d'outils relatifs à l'étude des AGPs chez les algues brunes est en cours dans l'équipe de Glycobiologie marine. Ainsi, des extractions d'AGPs et leurs purifications par précipitation avec des réactifs de Yariv sont mises au point sur les modèles de *F. serratus* et d'*E. siliculosus*. La composition chimique de la partie glucanique de ces AGPs sera analysée en spectrométrie de masse. De plus, des anticorps spécifiques des AGPs d'algues brunes vont être générés à partir de ce matériel. Ces travaux permettront une meilleure connaissance de la composition et de la répartition cellulaire et tissulaire des AGPs chimériques présents chez les algues brunes. Comme ces travaux sont à la fois à haut risque en raison des résultats incertains et qu'il nécessite des temps de développement plus long que le calendrier de ma thèse. Comme la mise en place de protocoles adaptés et la génération de nouveaux outils de détection nécessitent des temps de développement plus longs que le calendrier de ma thèse, ces travaux n'ont pas été poursuivis directement dans la suite de mon travail de thèse. Néanmoins, dans la continuité de ces premiers travaux, nous avons eu une approche préalable concernant les alginates.

## **B. La présence de ManC5-E dans le milieu de culture altère le développement des parthénosporophytes d'*E. siliculosus***

Dans les 2 chapitres précédents, nous avons montré que les AGPs chez le zygote de *Fucus* jouaient un rôle important dans l'élongation cellulaire. Par ailleurs, parmi les 10 gènes candidats codant des squelettes AGPs identifiés, deux étaient associés à des domaines de ManC5-Es (Hervé *et al.*, 2016). De plus, les résultats présentés dans le chapitre 4 montrent une perte de blocs d'alginates GG lorsque les AGPs sont inhibés dans la paroi, indiquant que les AGPs pourraient réguler la rigidité de la paroi à travers le contrôle de l'activité de la ManC5-E (Torode *et al.*, 2016).

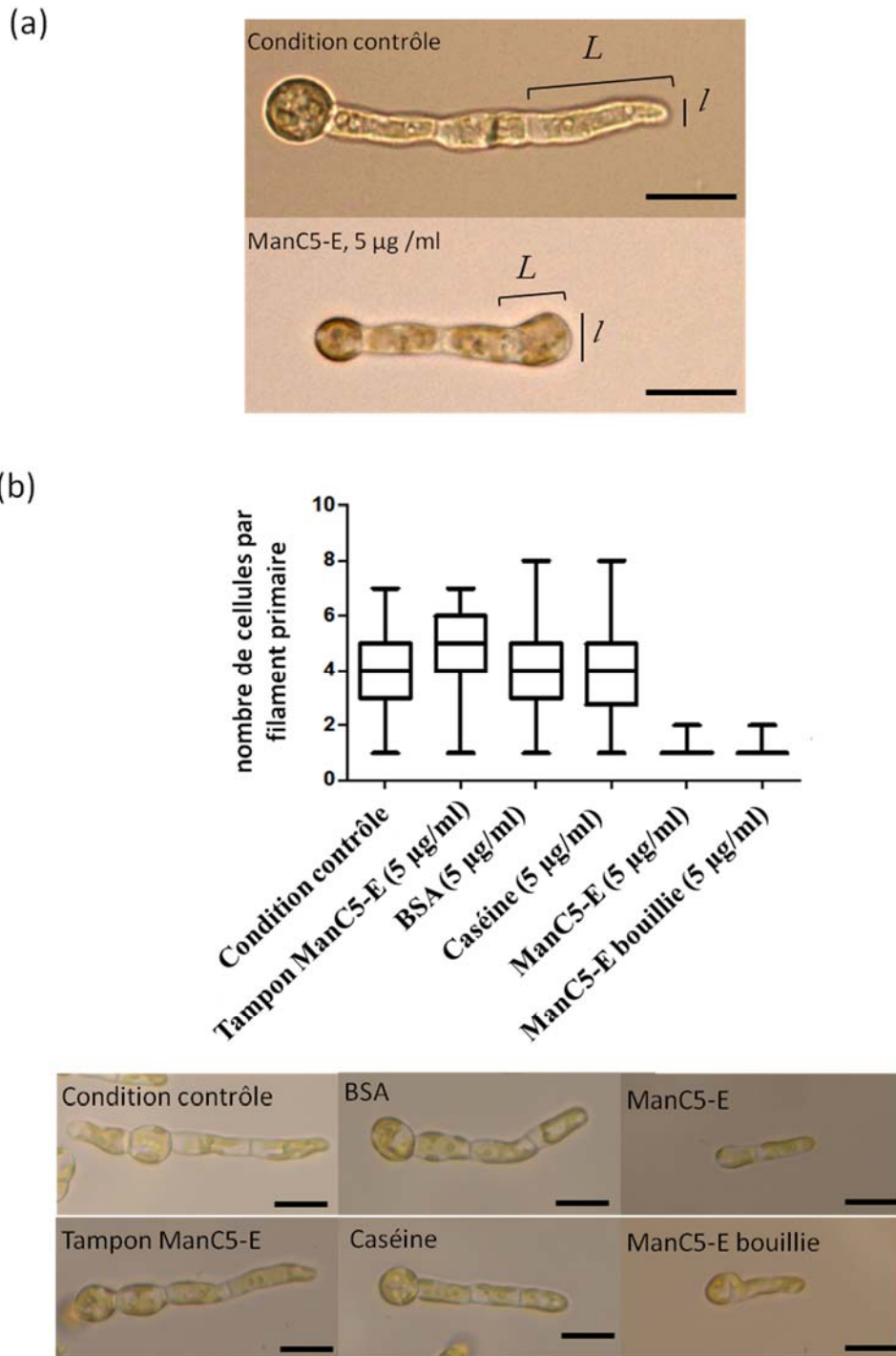
Afin d'étudier dans quelle mesure la régulation de l'épimérisation des alginates intervient dans l'élongation cellulaire et le développement précoce des parthénosporophytes d'*Ectocarpus*, des cultures en présence d'une ManC5-E recombinante (MEP13-C5) (Fischl *et al.*, 2016) ont été effectuées. L'enzyme a été ajoutée dans le milieu de culture à une concentration de 5 µg/ml, et les parthénosporophytes étaient cultivés pendant 7 jours après le

relâchement des gamètes. Un retard de développement, une diminution de la taille du filament primaire et une altération de la morphologie de la cellule apicale (forme globalement sphérique) étaient observés en présence de l'enzyme (Fig. 23a et b). En ajoutant de l'enzyme ManC5-E au milieu de culture, la surproduction de motifs G des alginates conduit probablement à une rigidification de la paroi cellulaire. La morphologie particulière de la cellule apicale et la diminution importante de la croissance semblent indiquer que la paroi de la cellule apicale doit particulièrement être sensible à ce changement de ratio M/G. Les résultats présentés dans le chapitre 3 montrent une absence de détections des blocs GG dans la paroi du rhizoïde chez les zygotes de *Fucus* cultivés en condition contrôle, indiquant qu'une certaine souplesse de la paroi serait nécessaire au processus d'expansion cellulaire.

Des immunomarquages anti-alginates MM (anticorps BAM6) et MG (anticorps BAM7) ont été réalisés après un traitement enzymatique de 2 heures avec l'enzyme recombinante, mais aucune modification de la distribution des épitopes n'a été observée par rapport à la condition exempte de traitement enzymatique. Les modifications engendrées par notre ManC5-E recombinante pourraient ne pas être détectées par nos anticorps, ou les changements dans la paroi pourraient ne pas être suffisamment importants pour être mis en évidence par une détection immunohistochimique *in situ*. Quoi qu'il en soit, cette expérience ne permet pas de valider l'activité biologique attendue de cette enzyme sur la paroi des parthénosporophytes d'*Ectocarpus*. Afin de valider l'effet dû à l'activité enzymatique de la ManC5-E, des parthénosporophytes ont été cultivés en présence du tampon seul, de la ManC5-E bouillie, et de protéines dépourvues d'activités enzymatiques (sérum albumine bovine BSA et caséine). L'absence d'effets observés en présence du tampon seul (Fig. 23b), de la BSA et de la caséine indique que les effets observés sur le développement et la morphologie des parthénosporophytes d'*Ectocarpus* sont spécifiques de l'ajout de la protéine ManC5-E dans le milieu de culture. Nonobstant, l'addition dans le milieu de culture de l'enzyme « active » ou bouillie génère un impact similaire (Fig. 23b), indiquant que l'enzyme bouillie est soit toujours active, soit que l'effet observé n'est pas directement liée à son activité enzymatique. Lors de sa production, l'enzyme recombinante est solubilisée à partir de corps d'inclusion (Fischl *et al.*, 2016). Il est possible qu'une fraction de cette enzyme reste active après que l'échantillon ait été bouilli, mais cette hypothèse reste peu probable. Les tests du dosage de l'activité ManC5-E sont très complexes (dosage de l'activité sur des polymères par RMN) et n'ont pas permis de conclure sur l'inactivation par la chaleur de cette enzyme recombinante. Pour l'heure, nous ne pouvons pas certifier de l'action ou non de cette enzyme exogène sur les acides mannuroniques



présents dans la paroi d'*Ectocarpus*. Par ailleurs l'enzyme est difficile à produire en quantité satisfaisante. Pour toutes ces raisons, cette étude n'a pas été poursuivie.



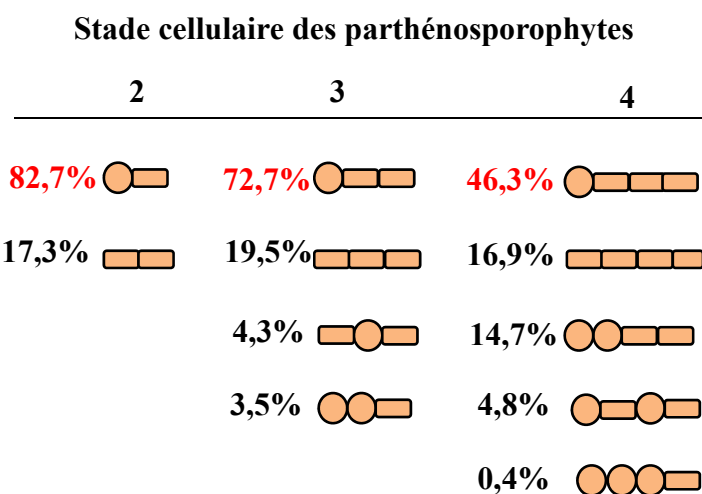
**Figure 23 :** Développement et morphologie des parthénosporophytes d'*E. siliculosus* cultivés 7 jours en présence de différents traitements protéiques et enzymatiques. (a) En présence de 5 µg/ml de ManC5-E, la taille du filament primaire est réduite et la cellule apicale possède une forme arrondie. (b) En présence de l'enzyme bouillie ou non, la croissance est diminuée par rapport aux conditions contrôles (n=30). La présence de BSA, de caséine et du tampon seul n'impactent pas le développement. *L* = longueur; *l* = largeur. Barre d'échelle = 20 µm

## C. Imagerie de la paroi des jeunes parthénosporophytes d'*E. siliculosus*

Les alginates et les fucanes sulfatés sont les principaux polysaccharides de la paroi chez les algues brunes. Les études précédentes réalisées chez le zygotes de *Fucus* ont permis de valider quatre anti-fucanes et huit anti-alginates spécifiques de la paroi des algues brunes (Torode *et al.*, 2015 ; Torode *et al.*, 2016). De plus, les résultats de ces études ont montré que l'utilisation de ces outils permettait d'observer la dynamique des polysaccharides de la paroi lors du développement précoce et de mettre en évidence des altérations de leur dépôt en réponses à différents traitements. Avant d'établir une cartographie détaillée de la répartition des fractions particulières de polysaccharides de la paroi chez *Ectocarpus*, le stade de développement et les outils de détection les plus adaptés ont été sélectionnés.

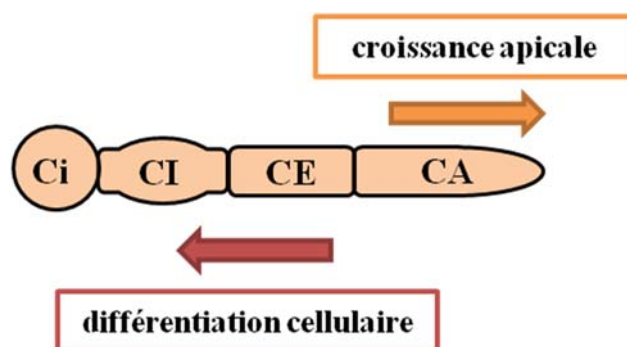
### 1. Choix du stade de développement

Les parthénosporophytes d'*E. siliculosus* sont constitués de cellules allongées qui se différencient progressivement en cellules rondes (Le Bail *et al.*, 2008). La disposition de ces deux types cellulaires est très hétérogène (Fig. 24 adapté de Le Bail *et al.*, 2011). Le nombre de combinaisons possibles augmente avec le nombre de cellules qui constituent le filament, ainsi, au stade 2 cellules, 2 combinaisons sont possibles, alors qu'au stade de 6 cellules, il en existe 11. Afin de pouvoir comparer nos résultats entre eux, nous nous sommes assuré qu'entre deux souches ou différentes conditions de cultures, la paroi d'un même type cellulaire était comparée. Pour cela, seule la combinaison la plus représentée était analysée en détail. Les filaments constitués d'une seule cellule arrondie, localisée à une extrémité forment la combinaison majoritaire (46.3% des filaments) (Le Bail *et al.*, 2011).



**Figure 24 :** Combinaison des patrons de développement possibles des parthénosporophytes de la souche 32 d'*E. siliculosus* (adapté de Le Bail *et al.*, 2011). Pour chaque stade cellulaire, il existe différentes combinaisons en fonction de l'alternance des cellules rondes (représentées par les cercles) et des cellules allongées (représentées par les rectangles). La fréquence respective (%) de chaque combinaison est indiquée. Les valeurs en rouge représentent les combinaisons les plus observées.

Dans le but de faciliter notre analyse et de pouvoir comparer les cellules entre elles, 4 types cellulaires ont été distingués : la cellule apicale (CA) à l'origine de la croissance apicale, la cellule allongée (CE) qui précède la CA, la cellule intermédiaire (CI) qui commence à se différencier et la cellule initiale (Ci) (Fig. 25). La Ci, de forme ronde ou ovale, représente ici la cellule la plus âgée du filament primaire.



**Figure 25 :** Représentation schématique des filaments primaires constitués de 4 cellules. Ci : cellule initiale ; CI : cellule intermédiaire ; CE : cellule allongée (elongated) ; CA : cellule apicale

## 2. Trois anticorps monoclonaux ont été sélectionnés pour étudier la dynamique de la paroi des parthénosporophytes d'*Ectocarpus*.

Les premiers immunomaquages ont été effectués sur la paroi de jeunes parthénosporophytes d'*E. siliculosus* à des stades cellulaires différents. Chaque anticorps testé détecte un épitope particulier. Les anticorps BAM1 à BAM4 sont spécifiques des populations de fucanes dont BAM1 détecte des fucanes non sulfatés et BAM4, des fucanes hautement sulfatés (Torode *et al.*, 2015). Le panel d'anticorps de BAM6 à BAM11 sont spécifiques des alginates (Torode *et al.*, 2016). BAM6 détecte des alginates riches en acides M, les sondes BAM7 à BAM10 sont spécifiques de blocs d'alginates constitués de blocs MG alors que BAM11 reconnaît des hexa-saccharides d'acides G.

Parmi les anti-fucanes, l'épitope de **BAM4** était fortement détecté et le patron de marquage entre les différents individus était reproductible. Les 3 autres anticorps testés n'ont pas été sélectionnés. En effet, aucun signal n'était détecté pour l'une des sondes (BAM3). BAM1 montrait un profil de marquage assez hétérogène avec une proportion importante de cellules non marquées. Le signal était principalement détecté sur les stades les plus précoces et

tendait à être perdu au stade 4 cellules. Quel que soit le stade cellulaire, les fucanes détectés par BAM2 étaient principalement détectés sur la cellule initiale du filament. Parmi les huit anti-alginates, deux ont été sélectionnés. Six reconnaissaient des blocs MG et étaient abondamment détectés dans la paroi avec des profils identiques. Afin d'éviter la redondance, seul l'anticorps **BAM7**, utilisé dans les travaux sur le zygote de *Fucus* (Torode *et al.*, 2016) a été sélectionné. L'anticorps **BAM6**, spécifique des alginates riches en M marquait fortement la paroi avec des résultats reproductibles et a donc été choisi. En revanche l'anticorps BAM11 spécifiques des alginates riches en acides G marquait la paroi de manière très hétérogène de seulement ¼ des individus, il a donc été exclu.

Des  $\beta$ -1-3-glucanes (Raimundo *et al.*, 2016), connu sous le nom de callose chez les plantes terrestres et des mixed-linkage-glucans (MLG) (Salmeán *et al.*, 2017) ont récemment été identifiés comme composants de la paroi cellulaire chez les algues brunes. Ainsi, des anticorps monoclonaux spécifiques des MLG et de la callose ont été testés. Un immunomarquage a été réalisé avec ou sans dégradations enzymatiques préalables des alginates. Aucun marquage n'était observé dans la paroi des parthénosporophytes d'*Ectocarpus*. Seuls quelques épitopes étaient détectés de manière très hétérogène quel que soit le type cellulaire. Au stade cellulaire étudié, il est possible que ces épitopes ne soit pas présents dans la paroi. Néanmoins, nous ne pouvons pas exclure le fait que certains de ces épitopes soit très faiblement présents dans la paroi et qu'ils soient masqués par d'autres composants de la paroi, rendant l'accès des anticorps à leurs épitopes respectifs difficile.

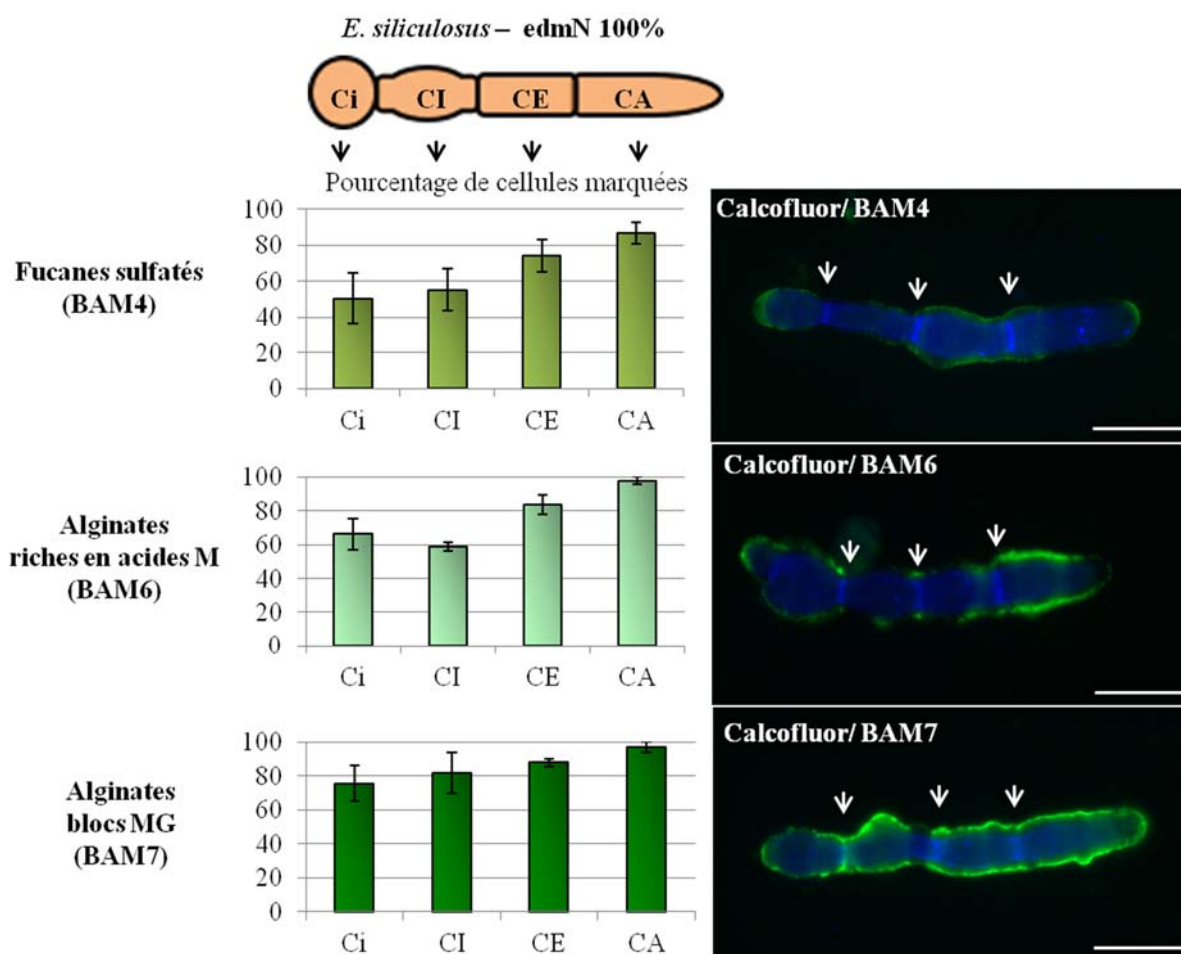
En résumé, les anticorps monoclonaux **BAM4** (spécifique de fucanes sulfatés), **BAM6** (spécifique d'alginates riche en acide M) et **BAM7** (spécifique d'alginates constitués de blocs MG) ont été utilisés. Ils ont permis de réaliser des cartographies détaillées de la localisation des principaux polysaccharides de la paroi lors du développement précoce des parthénosporophytes d'*Ectocarpus* (filament primaire de 4 cellules) et d'observer la composition et les modifications biochimiques de la paroi qui s'opèrent en réponse à des variations de la salinité du milieu.

### 3. La cartographie des parthénosporophytes d'*E. siliculosus* révèle un patron de marquage particulier des parois de la cellule apicale

Pour chaque type cellulaire, le nombre d'individus où l'un des trois épitopes d'intérêts (BAM4, BAM6 et BAM7 décrits précédemment) était détecté, a été comptabilisé pour la

souche de référence d'*E. siliculosus*. Les résultats révèlent un gradient de marquage croissant de la cellule initiale vers la cellule apicale du filament primaire pour les 3 anticorps testés (Fig. 26). De plus, une plus grande variabilité du marquage (absence ou présence du marquage) était observée vers la cellule initiale. Cette variabilité pourrait être expliquée par une diminution de l'accessibilité des anticorps à leurs épitopes respectifs dans la paroi des cellules plus âgées. En effet, il est possible que leur paroi soit plus complexe que celle de cellules apicales plus jeunes, *via* par exemple la formation de complexes alginates-polyphénols (Bitton *et al.*, 2006 ; Deniaud-Bouet *et al.*, 2014 ; Torode *et al.*, 2016). Des immunomarquages similaires ont été réalisées sur des stades plus jeunes, de 2 et de 3 cellules ( $n \geq 50$ ), et révèlent également un gradient de marquage croissant de BAM4, BAM6 et BAM7 vers la cellule apicale, avec une détection de leurs épitopes respectifs dans plus de 80% des cellules apicales. De plus ces résultats sont fiables, avec peu de variabilité. En vue de ces résultats, les marquages observés semblent plutôt être liées au type cellulaire qu'à une absence d'épitope ou une diminution de l'accès des anticorps. Chez les filaments primaires d'*E. siliculosus*, la destinée cellulaire de la cellule initiale varie d'un individu à un autre. En effet, lors de la transition vers le stade cellulaires supérieurs, les cellules initiales peuvent former une nouvelle cellule apicale, rester tel quelles, ou former un filament dressé qui portera les organes reproducteurs (Le Bail *et al.*, 2008). De plus, les cellules en cours de différenciations (CE et CI) peuvent continuer la différenciation cellulaire vers la formation de cellules arrondies ou encore rester tel quel jusqu'au stade suivant (Le Bail *et al.*, 2008). La destinée cellulaire incertaine de ces cellules pourrait-être corrélée avec une variabilité plus importante de la détection des épitopes d'alginates et de fucanes sulfatés dans la paroi, indiquant un lien entre la constitution pariétale et la fonction cellulaire chez les sporophytes d'*E. siliculosus*.

Les résultats d'immunomarquages des parthénosporophytes de la souche 32 d'*E. siliculosus* présentés ci-dessus révèlent un gradient croissant, vers la cellule apicale, de la détection des alginates par BAM6 et BAM7 et des fucanes hautement sulfatés par BAM4 dans la paroi. Le maintien de cette distribution au cours du développement précoce semble indiquer un rôle de ces épitopes dans les mécanismes de la croissance apicale. Le cas de la cellule apicale sera étudié plus en détail dans le chapitre suivant.



**Figure 26 :** Localisation des principaux polysaccharides de paroi des parthénosporophytes d'*E. siliculosus* au stade 4 cellules. Les histogrammes représentent le pourcentage moyen de cellules sur lesquels l'épitope recherché était détecté. Les valeurs et les écarts-types représentées ont été obtenus partir de trois réplicats ( $n \geq 70$  individus). La cellulose est détectée par le Calcofluor White (fluorescence bleue). Ce marquage a permis de mieux visualiser les différents types cellulaires du filament. Les fucanes sulfatés, les alginates riches en M et constitués de blocs MG sont détectés par des anticorps monoclonaux spécifiques, respectivement BAM4, BAM6 et BAM7 (fluorescence verte). Les images résultent d'une combinaison de l'acquisition des images en fluorescence verte et bleue. Les flèches blanches indiquent les parois transversales qui séparent les différents types cellulaires. Ci : cellule initiale ; CI : cellule intermédiaire ; CE : cellule allongée; CA : cellule apicale. Barre d'échelle = 20  $\mu\text{m}$



## II. La souche Bft15b d'*E. subulatus* : morphologie et développement

Des expériences antérieures montrent que l'adaptation d'*E. subulatus* à des variations de salinité du milieu s'accompagne de modification de la composition de la paroi (Dittami *et al.*, 2012 ; Torode *et al.*, 2015). Afin de déterminer la nature de ces variations, le développement et la composition pariétale de la souche Bft15b d'*E. subulatus* ont été étudiés lorsque la souche était cultivée avec différentes concentrations salines. Avant de présenter ces résultats dans le chapitre 6 de ce manuscrit, une courte description de la morphologie générale de la souche d'*Ectocarpus* sélectionnée pour cette étude est proposée.

### A. Morphologie générale des parthénosporophytes d'*E. subulatus*

Lors de l'observation des cultures d'*E. subulatus* (souche Bft15b), la formation de nouveaux branchements ou filaments secondaires (FSs) a été observé à la fois sur des cellules âgées comme les cellules initiales et sur des cellules plus jeunes telles que les cellules apicales (Fig. 27). Ainsi, une ramification dichotomique sur la CA était observée dans environ 30% des parthénosporophytes d'*E. subulatus* alors que cette conformation était très rare (moins de 1%) pour *E. siliculosus*. Pour le parthénosporophyte d'*E. siliculosus*, une étude précédente a montré que les FSs se formaient principalement par bourgeonnement à partir de cellules différenciées (CRs) (Le Bail *et al.*, 2008). En comparant les parthénosporophytes de la souche Bft15b d'*E. subulatus* avec ceux d'*E. siliculosus*, on peut constater que les formes des CRs sont moins marquées (Fig. 27). La cellule la plus âgée était généralement de forme plus arrondie que la cellule apicale (CA) mais ne respectait pas le ratio  $L/l \leq 1,5$  (Le Bail *et al.*, 2008) proposé pour définir les CRs. Ainsi, selon ce ratio, au stade 4 cellules, moins de 4% des filaments d'*E. subulatus* contre plus de 30% des filaments d'*E. siliculosus* possédaient une véritable CR. En résumé, chez *E. subulatus*, il est difficile de discriminer la forme, et donc le type cellulaire, à partir de laquelle les FSs émergent.

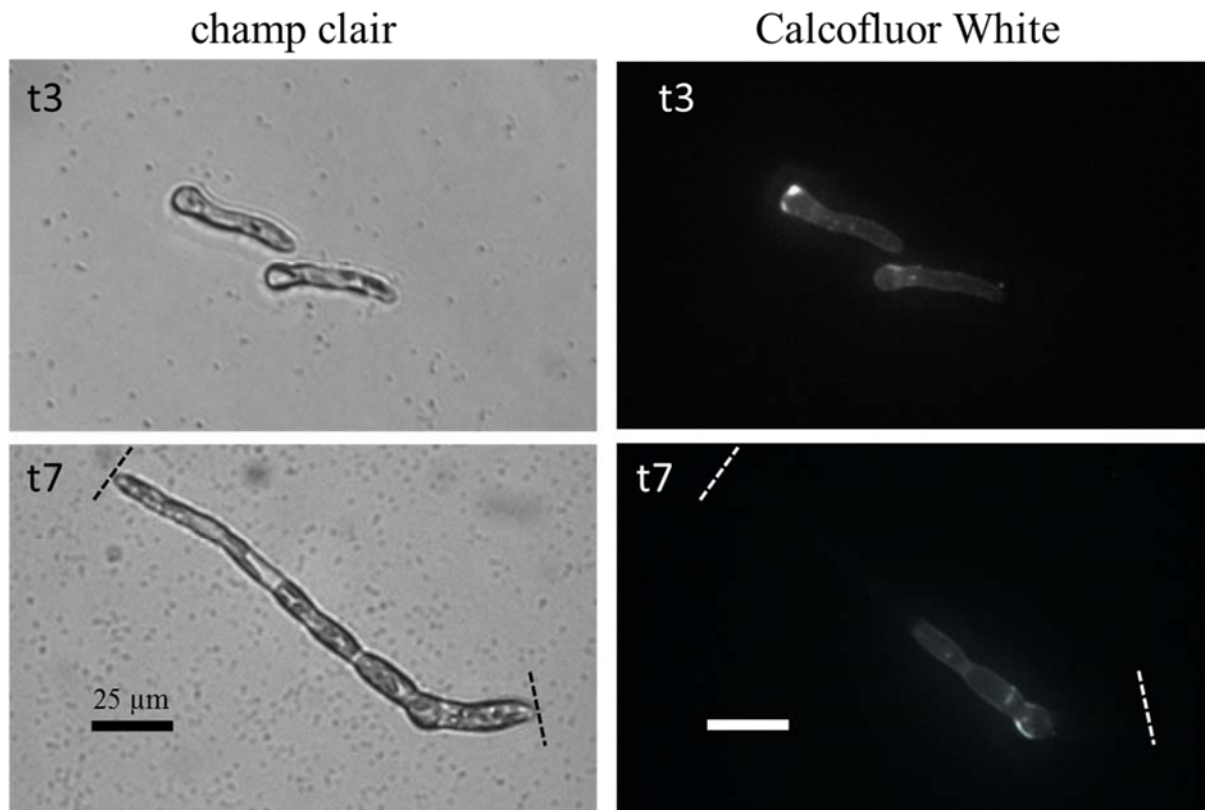


**Figure 27 : Morphologie des jeunes parthénosporophytes d’*E. siliculosus* et d’*E. subulatus* cultivés en eau de mer naturelle.** Les flèches indiquent les divisions dichotomiques qui s’opèrent au niveau de la cellule apicale des filaments de la souche d’*E. subulatus*. FD : filament dressé. Barres d’échelle = 20  $\mu$ m

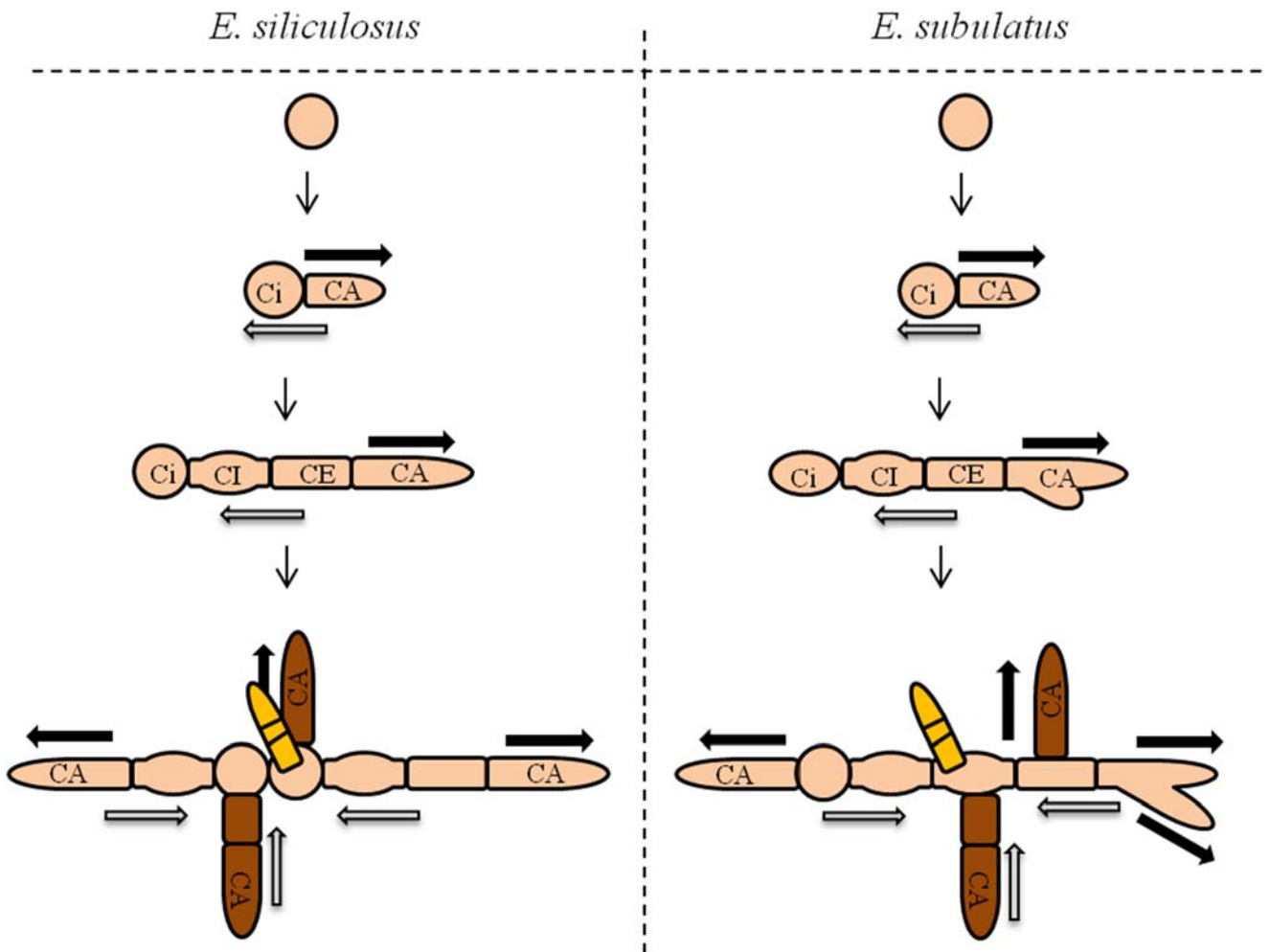
### **B. Le développement des jeunes parthénosporophytes d’*E. subulatus* s’effectuent également par croissance apicale**

Afin d’analyser si comme pour *E. siliculosus* (Le Bail *et al.*, 2008), le développement précoce des parthénosporophytes d’*E. subulatus* repose sur la croissance apicale lors de son développement précoce. La paroi de jeunes filaments d’*E. subulatus* a été marquée avec du Calcofluor White (Fluorescent Brightener 28) à 3 jours ou 7 jours de développement après libération des gamètes. Après plusieurs lavages et remise en culture, la nouvelle paroi formée était révélée par une absence de fluorescence (Le Bail *et al.*, 2008). A 15 jours de cultures, les parthénosporophytes étaient uniquement marqués sur une partie du filament primaire. Aucun phénomène de croissance intercalaire n’a été observé (Fig. 28). Ces résultats nous ont permis de vérifier que les jeunes parthénosporophytes de la souche Bft15b se développaient bien par

croissance apicale. Une représentation schématique du développement précoce des parthénosporophytes d'*E. siliculosus* et d'*E. subulatus* est présentée dans la [figure 29](#).



**Figure 28 :** Croissance apicale des parthénosporophytes d'*E. subulatus*. Les jeunes filaments d'*E. subulatus* âgés de 3 jours ont été incubés dans du calcofluor White (t3) avant d'être remis en culture et observé à 7 jours de développement (t7). Les nouvelles parois cellulaires sont non fluorescentes. Barres d'échelle = 25 µm



**Figure 29 : Développement des jeunes parthénosporophytes d'*Ectocarpus*.** Un gamète non fécondé germe puis effectue une première division symétrique. Le filament primaire (cellules beiges) se développe par croissance apicale (indiquée par les flèches noires) alors qu'une différenciation cellulaire s'effectue en sens inverse (indiquée par les flèches grises). Les cellules les plus âgées du filament sont capables de former de nouvelles ramifications nommées filaments secondaires (cellules brunes). Des filaments dressés se développent de manière perpendiculaire au substrat et portent les parties reproductrices (cellules jaunes). CA : cellule apicale; CE : cellule allongée (elongated) ; CI : cellule intermédiaire ; Ci : cellule initiale ; CR : cellule ronde

**Chapitre 6**

**La sulfatation des fucanes intervient  
dans la croissance apicale  
chez *Ectocarpus***

## Chapitre 6 : la sulfatation des fucanes intervient dans la croissance apicale chez *Ectocarpus*

### Présentation de l'article :

Chez les algues brunes, les polysaccharides anioniques de la paroi jouent un rôle structural crucial et présentent de nombreuses fonctions biologiques. Des études antérieures réalisées chez le zygote de *Fucus* ont, entre autres, identifié différentes populations de fucanes dans la paroi (Hogsett & Quatrano 1975 ; Quatrano & Stevens 1976 ; Torode *et al.*, 2016). Ces différentes fractions auraient des rôles physiologiques distincts dans le développement et/ ou lors des mécanismes d'adaptation aux conditions environnementales (Hogsett & Quatrano 1975 ; Mabeau & Kloareg 1987 ; Quatrano *et al.*, 1991 ; Quatrano & Shaw 1997 ; Quatrano & Stevens 1976 ; Torode *et al.*, 2015 ; Torode *et al.*, 2016). Les résultats chez *Ectocarpus*, qui sont présentés dans le chapitre 5, montrent une composition polysaccharidique différente de la paroi selon le type cellulaire observé. Chez *E. siliculosus*, le gradient de marquage croissant vers la cellule apicale semble indiquer un rôle des épitopes recherchés lors de la croissance apicale.

Le génome de la souche Bft15 d'*E. subulatus* a récemment été séquencé et annoté (Dittami *et al.*, en préparation). Cécile Hervé, Angélique Gobet et moi-même avons participé à l'annotation des gènes impliqués dans le métabolisme des polysaccharides. Afin d'offrir plus de détails aux lecteurs, la partie des résultats concernant l'annotation des gènes est incluse en annexe 2. De manière générale, l'annotation du génome n'a pas montré de différence importante du nombre de gènes impliqués dans le remaniement des polysaccharides de la paroi entre la souche 32 d'*E. siliculosus* et la souche Bft15b d'*E. subulatus*. Le nombre de gènes codant pour les enzymes sulfatases et sulfotransférases, respectivement impliquées dans la désulfatation et l'addition de groupement sulfate sur des substrats carbonés, sont similaires à ceux de la souche marine d'*E. siliculosus* (Dittami *et al.*, en préparation). Ces résultats indiquent que les fonctions de ces enzymes sont probablement toujours essentielles, malgré une capacité d'*E. subulatus* à se développer à faible salinité et donc dans un milieu moins riche en sulfate. Cela suggère une persistance du sulfate dans le métabolisme des polysaccharides chez cette souche.

Le document qui suit est une ébauche de l'article final qui sera soumis au cours de l'année 2018. Il s'intéresse particulièrement à l'importance de la sulfatation des fucanes au cours du développement des parthénosporophytes précoces d'*Ectocarpus*, et plus particulièrement de la souche Bft15b d'*E. subulatus*. Son développement et la composition pariétale associée ont été étudiés. Les immunomarquages réalisées sur la paroi de cellules apicales apportent un niveau de compréhension supplémentaire quant à la distribution des fucanes et à leurs potentielles fonctions dans le développement précoce.

A ce jour, les expériences présentées ci-dessous font l'objet d'analyses supplémentaires. La concentration en sulfate qui a principalement été utilisée lors de ces expériences était de 16 mM qui, bien qu'il s'agisse de l'eau de mer artificielle classiquement utilisée dans la littérature, ne représente pas la concentration réelle de l'eau de mer, qui est de l'ordre de 28 mM. Afin de pouvoir comparer nos résultats avec les observations effectuées dans le milieu naturel, les expériences présentées ci-dessous sont actuellement répétées avec une concentration en sulfate de 28 mM.



# **La sulfatation des fucanes intervient dans la croissance apicale chez *Ectocarpus***

**Amandine Siméon<sup>1,2</sup>, Simon Dittami<sup>1,2</sup>, Sonia Kridi<sup>1</sup>, Bernard Kloareg<sup>1,2</sup>, Cécile Hervé<sup>1,2\*</sup>**

<sup>1</sup>*Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, UMR 8227, Biologie intégrative des modèles marins, Station Biologique de Roscoff, CS 90074, Roscoff, France ;* <sup>2</sup>*CNRS, UMR 8227, Biologie intégrative des modèles marins, Station Biologique de Roscoff, CS 90074, Roscoff, France.*

*\*Correspondance : Cécile Hervé, e-mail: [cecile.herve@sb-roscoff.fr](mailto:cecile.herve@sb-roscoff.fr)*

## Liste des abréviations

**CA : cellule apicale**

**CE : cellule allongée (elongated)**

**CI : cellule intermédiaire**

**Ci : cellule initiale**

**CR : cellule ronde**

**CW : calcofluor white**

**edmA : eau de mer artificielle**

**edmN : eau de mer naturelle**

**FP : filament primaire**

**FS : filament secondaire**

**G : acide guluronique**

**M : acide mannuronique**

**ManC5-E : mannuronane C5-épipimérase**

**mM : millimolaire**

## Introduction

Chez les eucaryotes le soufre est un élément essentiel à la vie, incorporé dans les molécules organiques comme les acides aminés soufrés (méthionine et cystéine), les sulfolipides présents dans les chloroplastes, certains composés sulfatés de faible poids moléculaire (Lee *et al.*, 2014) ou encore certains polysaccharides. Dans l'environnement, la majorité du soufre accessible est présent sous forme de sulfate inorganique. Les organismes photosynthétiques sont dépendant d'un prélèvement continu dans le milieu environnant (Zhang *et al.*, 2014 ; Lee *et al.*, 2017). En milieu marin, le sulfate n'est pas un facteur limitant pour les organismes. En effet, la composition de l'eau de mer repose sur un mélange complexe d'anions, de cations et de molécules, où le sulfate est essentiellement présent sous forme de  $\text{MgSO}_4^{2-}$ , à une concentration de l'ordre de 28 mM, soit 8% de la composition de l'eau de mer (Nguyen *et al.*, 2014). Contrairement au milieu marin, l'eau douce possède une composition chimique très variable, dépendante de l'environnement terrestre qui l'entoure (Dittami *et al.*, 2017). Néanmoins, elle est constituée d'une faible concentration en sulfate, de l'ordre de 0,09 à 1,4 mM (Nguyen *et al.*, 2014).

Les algues brunes sont majoritairement des organismes aquatiques marins, et moins de 1% de leurs espèces ont colonisé l'eau douce (Bold & Wynne, 1985 ; Dittami *et al.*, 2017). Comme les plantes, les algues vertes, les algues rouges, les champignons et les animaux dont elles sont phylogénétiquement distantes, les cellules des algues brunes sont entourées d'une matrice extracellulaire, appelée paroi chez les végétaux. Le compartiment pariétal est une interface importante entre la cellule et l'environnement. De ce fait, la paroi intervient en partie dans les mécanismes d'adaptation à l'environnement, telle que la régulation ionique à forte salinité (Mabeau & Kloareg, 1987 ; Kirst, 1990 ; Torode *et al.*, 2015). Différentes études ont également montré que la paroi intervient dans les mécanismes du développement (Kropf *et al.*, 1988 ; Berger *et al.*, 1994 ; Le Bail *et al.*, 2011 ; Arun *et al.*, 2013 ; Torode *et al.*, 2016). Ses diverses fonctions reposent sur une composition complexe et dynamique. Si la composition de la paroi dépend du groupe phylogénétique de chaque organisme, la présence de polysaccharides sulfatés est commune à tous les végétaux marins et sont absents chez les plantes terrestres (Aquino *et al.*, 2005 ; Deniaud-Bouët *et al.*, 2017 ; Olsen *et al.*, 2016). Cette absence serait le résultat d'une adaptation fonctionnelle lors de la colonisation du milieu terrestre, fournissant des habitats pauvre en sulfate (Michel *et al.*, 2010 ; Olsen *et al.*, 2016).

La paroi des algues brunes est essentiellement composée de polysaccharides. Les alginates et les fucanes sulfatés sont les polysaccharides anioniques majoritaires et forment un gel hygroscopique, alors que des  $\beta$ -glucanes (cellulose, callose, glucanes à liaisons mixtes) insolubles forment une petite fraction cristalline (Deniaud Bouët *et al.*, 2017). Les fucanes sont des polysaccharides très hétérogènes, complexes et sulfatés, contenant des résidus d' $\alpha$ -L-fucose. Ces polymères sont riches en acides uroniques et peuvent être branchés avec des résidus de xylose, de galactose ou de fucose (Deniaud-Bouët *et al.*, 2017). Le compartiment pariétal est également constitué d'une minorité d'arabinogalactanes-protéines (AGPs) et de quelques protéines, phlorotannins et d'iode (Deniaud Bouët *et al.*, 2017). Dans la paroi du zygote de *Fucus*, différentes populations de fucanes, localisées à des sites distincts, ont été identifiées en fonction de leur taux de sulfatation (Hogstt & Quatrano 1975 ; Quatrano & Stevens 1976 ; Torode *et al.*, 2016). Ces différentes fractions auraient des rôles dans la rétention des ions dans la paroi (Mabeau & Kloareg 1987 ; Torode *et al.*, 2015), ou encore l'établissement de l'axe de polarité chez le zygote de *Fucus* (Torode *et al.*, 2016).

Chez les algues brunes, l'algue filamenteuse *Ectocarpus* est un organisme modèle. Le genre *Ectocarpus* est caractérisé par une grande plasticité morphologique (Ravanko, 1970) et transcriptomique (Dittami *et al.*, 2009). Ce genre a la particularité de regrouper différentes souches, ayant notamment différentes capacités de tolérances aux variations physico-chimiques, telle que la salinité. En Australie, la souche 371 d'*E. subulatus* a été isolée en eau douce (West & Kraft 1996), alors qu'une autre, la souche Bft15b, a été récoltée dans un milieu saumâtre aux Etats-Unis (Müller, 1979) (1 à 10 g/L de sel). *E. siliculosus* est une espèce marine (35 g/L de sel), dont le génome est le premier des algues brunes à avoir été séquencé et annoté (Cock *et al.*, 2010). Une de ces souches a notamment été identifiée dans une section fortement concentrée en sels au sein de la rivière Werra en Allemagne (Geißler, 1983). Le terme de salinité ne signifie pas seulement le sel au sens commun, c'est-à-dire le chlorure de sodium, mais un ensemble d'éléments présents sous forme d'ions. Ainsi, les variations de la salinité induisent également une modification de la concentration en sulfates inorganiques. La capacité de cette algue brune à avoir colonisé des milieux aux compositions salines variées en fait un organisme modèle approprié pour étudier les mécanismes d'adaptations aux changements environnementaux et les effets de carences en sulfate sur son développement.

Des études préliminaires réalisées chez la souche 371 d'*E. subulatus* ont révélé une régulation des gènes potentiellement impliqués dans la sulfatation des polysaccharides lors de l'adaptation aux variations de la salinité du milieu (Dittami *et al.*, 2012). Afin d'étudier la dynamique des polysaccharides de la paroi de la souche Bft15b d'*E. subulatus* en réponse à des

variations de la concentration en sel et/ou en sulfate dans le milieu. Les anticorps monoclonaux spécifiques des polysaccharides de la paroi des algues brunes (Torode *et al.*, 2015 ; Torode *et al.*, 2016) ont été utilisés. Ces derniers ont permis d'observer la mise en place des fucanes sulfatés dans la paroi est positivement corrélée avec la croissance apicale.

## Matériels et méthodes

### Modèles d'étude et production des parthénosporophytes

Dans cette étude, deux écotypes d'*Ectocarpus* (Ectocarpales, Phaeophyceae) ont été étudiés. La souche Bft15b de l'espèce *E. subulatus* (accession CCAP 1310/34, Beaufort, North Carolina, USA) est une souche tolérante à l'eau de mer et à de faibles salinités et la souche 32 de l'espèce *E. siliculosus* (accession CCAP 1310/4, origine San Juan de Marcona, Peru) qui est une souche marine de référence. Toutes les expériences ont été réalisées en utilisant les cultures de laboratoire haploïdes (parthénosporophytes) d'*E. siliculosus* ou d'*E. subulatus* produites par la germination de gamètes. Afin d'induire la libération synchronisée des gamètes, des gamétophytes fertiles étaient placés à l'obscurité pendant 4 heures (simulation de marée basse) avec une faible quantité de milieu à 4°C. Les gamétophytes ont ensuite été placés sous une forte luminosité avec de l'eau de mer naturelle à 100% (simulation de marée haute). Les gamètes ont été isolés des gamétophytes parents en pipetant 30 µl de milieu et en les remplaçant dans une goutte de 200 µl de milieu. Pour les analyses morphologiques, les gamètes étaient placés dans des boîtes de Petri stériles de 55 mm de diamètre alors que pour les tests d'immunomarquages, ils étaient cultivés sur des lames polysinées stériles de microscopie placées dans des boîtes de Petri de 140 mm de diamètre. Les gamètes étaient cultivés pendant 24 heures dans une goutte d'eau de mer naturelle (edmN) ou artificielle (edmA) à 100%. Les boîtes étaient placées en chambre de culture à 13°C toute la nuit avant d'être immergées avec le milieu de culture correspondant (naturel ou artificiel / faible ou forte salinité) et d'être replacées en chambre de culture à 13°C avec une intensité lumineuse de 40 µmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> sur une durée de 14 heures par jour. Les effets réversibles d'une carence en sulfate ont été testés par ajout ou retrait du sulfate exogène à 3 ou 7 jours de cultures après le relâchement des gamètes.

## Milieux de cultures

Les deux espèces ont été cultivées en eau de mer autoclavée naturelle ou artificielle. L'edmN a été utilisée telle quelle (edmN 100% = forte salinité) ou diluée à 10% (10% edmN + 90% d'eau distillée = faible salinité). Afin de réaliser des cultures dont les concentrations en sulfate étaient contrôlées, de l'eau de mer artificielle a été produite (edmA 100% : 8,85 mM KCl, 0,55 M NaCl, 10 mM CaCl<sub>2</sub> 2H<sub>2</sub>O, 32 mM MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O, 51,6 mM MgCl<sub>2</sub> 6H<sub>2</sub>O, et 1,77 mM NaHCO<sub>3</sub> pH 7.8 ; Crayton *et al.*, 1974 ; Brawley & Quatrano 1979). L'edmA diluée ou non a été testée avec ou sans sulfate. Afin de préserver le métabolisme protéique des algues cultivées en absence de sulfate, le MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O a été remplacé par 10 mM de méthionine (Crayton *et al.*, 1974 ; Brawley & Quatrano 1979). Une edmA 100% contenant deux fois moins de sulfate (edmA 100% à 16 mM de sulfate) et une edmA 10% contenant également 16 mM de sulfate ont aussi été testées. Des mesures réalisées au laboratoire ont montré que les concentrations osmotiques et en sulfate des milieux à 10% testés ici étaient proches des conditions physiologiques des milieux naturels, où étaient prélevées différentes souches d'*E. subulatus* (Simon Dittami, communication personnelle). Tous les milieux de culture ont été enrichis en nutriments Provasoli (PES ; Starr & Zeikus 1993) exemptés de sulfate. Les cultures ont été réalisées sans contaminants eucaryotes mais dans un milieu non axénique.

## Analyses de la croissance et de la morphologie

La comparaison de la croissance et de la morphologie des parthénosporophytes cultivés dans les différentes conditions a été réalisée à 7, 10 et 15 jours de culture après libération des gamètes. Les observations ont été réalisées avec un microscope inverse Olympus IX 51. Le nombre de cellules par filament primaire (FP) a été compté de manière aléatoire pour 4 réplicats biologiques et techniques (comptage final n= 72). Les taux d'émergence des filaments dressés et des filaments secondaires (FSs) par FP ont été analysés à partir de parthénosporophytes constitués entre 3 et 5 cellules (n ≥ 58 individus par condition).

## Détection des polysaccharides pariétaux et microscopie à fluorescence

Les parthénosporophytes ont été cultivés durant une semaine puis ont été fixés pendant 45 minutes en eau de mer contenant 4% de paraformaldéhyde et 10% de glycérol avant d'être

lavés deux fois en PBS. Les immunomarquages indirects ont été réalisés sur des parthénosporophytes âgés de 7 à 8 jours où seuls les individus dont le FP était constitués de 4 cellules ont fait l'objet d'une étude exhaustive. Les sites aspécifiques étaient bloqués pendant une heure par du lait en poudre dilué à 5% dans du PBS (PBS-lait). Les échantillons étaient ensuite incubés 1 heure avec les anticorps monoclonaux BAM4 dilués au 1/10<sup>ème</sup> dans du PBS-lait. Une seconde incubation d'une heure était réalisée en présence d'anticorps secondaires IgG anti-rat couplés à de l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC, Sigma-Aldrich, F1763) dilués au 1/100<sup>ème</sup> dans du PBS-lait. La cellulose a ensuite été détectée par un colorant fluorescent spécifique des  $\beta$ -glucanes : le Calcofluor White (Fluorescent Brightner 28 ; Sigma-Aldrich). Le colorant Solophenyl Flavine (Diphenyl brilliant flavine 7GFF; Sigma- Aldrich) a été utilisé pour confirmer que le signal observé représentait des  $\beta$ -1,4 glucanes et pouvait donc être utilisé pour identifier la cellulose. Les échantillons ont été incubés avec l'un ou l'autre de ces deux colorants pendant 5 minutes à l'obscurité. Entre chaque incubation, les échantillons étaient abondamment rincés avec une solution de PBS. Enfin, les échantillons ont été montés entre lame et lamelle avec un agent « anti-fading » sans glycérol (Citifluor AF3, Agar Scientific). L'immunofluorescence a été observée avec un microscope à épifluorescence droit (BX-60, Olympus) équipé d'une caméra monochrome (Qimaging EXi Aqua). La prise d'image a été effectuée avec le logiciel Volocity (Perkin Elmer).



## Résultats

### 1. Les parthénosporophytes d'*E. subulatus* réalisent plus de branchements lorsqu'ils sont cultivés à forte salinité

Afin d'observer le développement des parthénosporophytes d'*E. subulatus* en réponse à des variations de la salinité de son environnement, sa croissance et sa morphologie ont été analysées à 7, 10 et 15 jours de croissance après libération des gamètes. Une courbe de croissance globale montrant le nombre de cellules par FP en fonction du temps de culture a été réalisée. Durant les 15 premiers jours de culture, la croissance d'*E. subulatus* était significativement plus rapide (test de Mann-Whitney :  $p < 0,01$ ) lorsque la souche était cultivée en edmN diluée à 10% comparativement à la condition 100% (Fig. 1a). A 15 jours de culture, le nombre de cellules moyen constituant les FPs était quasiment doublé (15 cellules en edmN 10% contre 8 cellules en edmN 100%). Les nombres de FSs et de filaments dressés ont été comptés sur des stades précoces, c'est-à-dire des FPs constitués de 3 à 5 cellules. Le nombre de FSs était significativement diminué (test de Mann-Whitney :  $p < 0,01$ ) lorsque les parthénosporophytes étaient cultivés en edmN diluée à 10% (33% d'individus branchés) comparativement à la condition 100% (93% d'individus branchés) (Fig. 1b). Le nombre de FSs par FP a également été comptabilisé et détaillé pour des FPs constitués jusqu'à 8 cellules (Fig. S1). Ces résultats mettent en évidence une différence de cinétique concernant la formation des FSs entre les deux conditions de salinité, avec un développement plus rapide du nombre de branchement lorsque les filaments sont cultivés en edmN 100% comparé à une culture en edmN 10%. L'émergence des filaments dressés n'était pas impactée par la salinité du milieu (données non présentées). En résumé, les parthénosporophytes d'*E. subulatus* réalisent plus de branchements lorsqu'ils sont cultivés à forte salinité.

Afin de contrôler la composition du milieu, de l'eau de mer artificielle (edmA) a été élaborée et les résultats précédents ont également été observés lorsque les parthénosporophytes d'*E. subulatus* étaient cultivés en edmA. Néanmoins, la croissance étaient diminuée par rapport à celle observée en edmN (Fig. 1a et 2a). La croissance précoce des parthénosporophytes cultivés en edmA diluée à 10% était similaire à celle observée en edmA 100%. En revanche, le nombre de FSs était semblable entre les cultures en edmN et edmA, avec un branchement plus important à forte salinité (Fig. 1b et 2b), confirmant ainsi les résultats observés en edmN. En résumé, une forte salinité accélérât la mise en place des FSs chez les parthénosporophytes d'*E. subulatus*.

## 2. La teneur en sulfate dans le milieu influence la capacité d'*E. subulatus* à produire des branchements

En diluant la salinité de notre milieu naturel, la concentration en sulfate a également été réduite. Le sulfate est un élément essentiel à de nombreux composés qui interviennent à la fois dans la croissance et la régulation osmotique. Afin d'étudier la contribution du sulfate dans les réponses précédentes, la croissance et le développement d'*E. subulatus* ont été étudiés avec différentes concentrations en sulfate inorganique dans des milieux. Pour cela, la composition chimique du milieu a été contrôlée en réalisant des cultures en eau de mer artificielle (edmA). Chez le zygote de *Fucus*, des cultures en présence de <sup>35</sup>S-méthionine ont montré qu'en absence de sulfate dans le milieu, il était possible de préserver le métabolisme protéique tout en inhibant l'incorporation de sulfate dans les fucanes (Crayton *et al.*, 1974).

De manière similaire à l'analyse de l'effet de la salinité sur le développement précoce des parthénosporophytes d'*E. subulatus*, les résultats d'une carence en sulfate ont été étudiés en edmA à faible et forte salinité. En edmA 100%, les concentrations de 32 mM (similaire aux concentrations retrouvées en milieu marin), 16 mM et 0 mM de sulfate ont été testées, alors qu'en edmA 10%, les concentrations de 16 mM, 1,6 mM et 0 mM de sulfate ont été utilisées. Quelle que soit la condition de salinité (10 ou 100%), l'absence de sulfate entraînait une diminution significative du nombre de branchements (test de Mann-Whitney :  $p < 0,01$ ) (Fig. 3b et S2b). La croissance des filaments primaires cultivés à forte salinité sans sulfate était également diminuée (Fig. 3a). En revanche à faible salinité, la croissance des FP's étaient uniquement impacté à 7 et 10 jours de développement, avec une diminution significative en présence de sulfate par rapport à la condition sans sulfate (test de Mann-Whitney :  $p < 0,01$ ) (Fig. S2a). Aucune différence de croissance et du nombre de FSs n'étaient observés entre les deux conditions en edmA à 100% contenant 32 ou 16 mM de sulfate (Fig. S3a et b). Dans toutes les conditions testées, l'émergence des filaments dressés était similaire (données non montrées).

Afin de tester si l'effet d'une carence en sulfate sur la croissance et le développement des parthénosporophytes d'*E. subulatus* était réversible, le milieu carencé en sulfate était changé contre du milieu supplée en sulfate à 3 ou 7 jours de cultures. L'expérience inverse a également été réalisée. Dans les tests précédents, l'effet d'une carence en sulfate était analysé dès le relâchement des gamètes. Les différences de croissance et de développement observées étant les plus importantes lorsque la souche était cultivée en edm à 100%, ces tests ont uniquement été conduits pour cette salinité. L'ajout de sulfate à 3 et 7 jours de culture restaurait la croissance d'*E. subulatus* cultivé au préalable dans un milieu carencé (Fig. S3a). A l'inverse, le retrait du

sulfate dans le milieu ralentissait la croissance. Le nombre de branchements était diminué même lorsque la carence en sulfate était plus tardive alors que ce nombre tendait à être restauré lorsque le sulfate était rajouté à 3 ou 7 jours de culture dans un milieu carencé (Fig. S3b). Les effets d'une carence en sulfate sur la croissance et le développement des parthénosporophytes d'*E. subulatus* sont donc réversibles. De plus, la croissance et le développement étaient impactés indépendamment du stade cellulaire sur lequel la carence en sulfate était appliquée.

Les mêmes analyses ont été effectuées sur la souche marine (32) d'*E. siliculosus* cultivée en edmA 100%. En absence de sulfate, une diminution drastique de la croissance était observée (Fig. S4a). L'ajout de sulfate à 3 ou 7 jours permettait une reprise de la croissance (Fig. S4b). Ces résultats montrent que, quelle que soit l'espèce d'*Ectocarpus*, une carence en sulfate altère la croissance et que les effets observés sont réversibles et indépendants du stade cellulaire sur lequel la carence est appliquée.

### **3. Les fucanes très sulfatés sont préférentiellement localisées dans les zones de croissance apicale**

Des immunomarquages de la paroi réalisés chez la souche d'eau douce d'*E. subulatus* 371 ont montré que la détection d'une fraction de fucanes sulfatés (anticorps monoclonal BAM4) était positivement corrélée avec la concentration saline (Torode *et al.*, 2015). Dans l'intention d'étudier l'impact de la salinité sur le dépôt des fucanes sulfatés dans la paroi de notre souche d'*E. subulatus*, des immunomarquages ont également été réalisés avec l'anticorps monoclonal BAM4, spécifique des fucanes hautement sulfatés. En présence de sulfate, l'épitope BAM4 est détecté dans la paroi des parthénosporophytes d'*E. subulatus*, avec une forte proportion de CA marquées (plus de 90% des individus étaient marqués) (Fig. 4). L'apex était la partie la plus fortement marquée, voire la seule zone de la CA où le signal BAM4 était détecté (Fig. 5 et 6). D'autres immunomarquages BAM4 ont été réalisés sur des stades cellulaires plus tardifs et ont confirmé que BAM4 était fortement détecté sur les apex du FP et des filaments secondaires émergents (Fig. 5). La distribution de la cellulose dans la paroi d'*Ectocarpus* a été mise en évidence *via* le colorant fluorescent Calcofluor White. Quel que soit le stade cellulaire examiné, seul l'apex des CA était exempt de cellulose (Fig. 5 et 6). Des marquages similaires ont été réalisés pour la souche marine d'*E. siliculosus* cultivée en edmN 100%. Le même profil a été constaté pour la détection des  $\beta$ -glucanes. Les fucanes sulfatés BAM4 étaient localisés sur l'ensemble du FP âgé de 4 cellules avec une détection plus

importante de ces épitopes sur l'apex des cellules apicales (Fig. S5). Contrairement à ce qui était observé pour les fucanes hautement sulfatés, les immunomarquages anti-alginates révélèrent une distribution très hétérogène en fonction de la salinité, à la fois sur l'ensemble du filament (Fig. 4) et sur la cellule apicale (Fig. 6). En résumé, quelle que soit l'espèce d'*Ectocarpus* et la salinité du milieu étudiée, un patron particulier de la distribution des fucanes et de la cellulose était observé sur la cellule apicale, avec une absence de cellulose à l'apex alors que des fucanes très sulfatés y étaient abondamment détectés.

#### **4. Le dépôt des fucanes sulfatés BAM4 est altéré par l'absence de sulfate dans le milieu**

Afin d'observer si l'absence de sulfate dans le milieu affecte la distribution des épitopes de fucanes sulfatés BAM4 dans la paroi d'*E. subulatus*, des immunomarquages ont été réalisés sur des parthénosporophytes cultivés en edmA exempt ou non de sulfate. Quel que soit la salinité du milieu 100 ou 10%, la détection de l'épitope BAM4 était drastiquement diminuée lorsque le sulfate était absent du milieu (Fig. 7). Seuls quelques rares individus conservaient un marquage aux apex (environ 14% des filaments cultivés en edmA sans sulfate).

L'effet réversible d'une carence en sulfate sur la sulfatation des fucanes a également été analysé à 7 jours de développement. Lorsque le sulfate était retiré à 3 jours de croissance, BAM4 était toujours fortement détecté dans la paroi des cellules apicales (Fig. 7). Lorsque du sulfate était ajouté dans du milieu carencé à 3 jours de développement, les fucanes sulfatés BAM4 étaient principalement détectés aux apex des cellules apicales d'*E. subulatus* (Fig. 7). Le taux d'individus marqués par l'anticorps était similaire à ce qui était observé pour les filaments cultivés sans interruption en edmA 100% avec du sulfate (Fig. 7). Ces résultats montrent ainsi que la sulfatation des fucanes est dépendante du sulfate exogène et qu'elle est rapidement restaurée après réincorporation du sulfate dans le milieu.

## Discussion

### 1. Les cellules apicales d'*Ectocarpus* présentent des gradients opposés de fucanes hautement sulfatés et de cellulose.

Chez les jeunes parthénosporophytes d'*Ectocarpus*, les nouvelles cellules se forment aux apex, et la croissance des filaments est assurée par l'allongement et la division des cellules apicales. Des ramifications latérales (filaments secondaires) se divisent et initient de nouvelles régions de croissance apicale (Le Bail *et al.*, 2008 ; Charrier *et al.*, 2008). Dans d'autres lignées eucaryotes telles que les champignons et les plantes terrestres (tubes polliniques et poils racinaires), la croissance apicale a fait l'objet d'études approfondies. Les algues brunes filamenteuses telles qu'*Ectocarpus*, fournissent des modèles supplémentaires pour étudier les mécanismes moléculaires qui contrôlent la croissance apicale chez les eucaryotes.

Dans les cellules à croissance apicale de champignons et de plantes, les modifications de l'architecture et de la composition des parois cellulaires jouent un rôle crucial dans le contrôle de la forme cellulaire et de la croissance isotrope. Chez le grain de pollen, un gradient de rigidité croissant de l'apex à la partie distale de la CA est observé (Parre & Geitmann, 2005b). Ce gradient dépend des propriétés biochimiques de la paroi liées aux pectines et à la callose. En tant que tel, le gradient de méthylestérification des homogalacturonanes observé de l'apex aux flancs augmente la rigidité de la paroi cellulaire par des liaisons avec du calcium (Geitmann & Steer, 2006 ; Chebli *et al.*, 2012). Notre étude montre que les cellules apicales de filaments primaires ou secondaires d'*Ectocarpus* partagent toute une architecture pariétale similaire, qui diffère de la composition des autres cellules du filament (Fig. 5 et 6). Chez *E. subulatus* et *E. siliculosus*, la cellulose est détectée le long des filaments, excepté aux dômes, alors qu'un gradient opposé est observé pour les fucanes hautement sulfatés (Fig. 5 et 6). Ces résultats sont analogues aux observations réalisées chez d'autres modèles d'algues brunes à croissance apicale, comme les zygotes de certaines espèces de Fucales (Katsaros, 1995 ; Torode *et al.*, 2016). Alors que de la callose a été identifiée dans certaines parois cellulaires d'algues brunes (Raimundo *et al.*, 2016), notre étude cytochimique n'indique pas sa présence dans les premiers stades d'*Ectocarpus*, et aucun changement considérable des alginates n'a été rapporté. En résumé, les cellules à croissance apicale étudiées jusqu'à présent chez les algues brunes ont une paroi au niveau des apex déficiente en cellulose, mais riche en fucanes hautement sulfatés.

La diminution locale de la cellulose observée au site de croissance apicale diminue probablement la rigidité des parois, facilitant ainsi l'extension locale des cellules de façon

isotrope. Des études antérieures indiquent que les microfibrilles de cellulose ne semblent pas posséder d'orientations spécifiques dans la paroi des cellules d'*E. siliculosus*, ce qui pourrait être crucial pour la ramification des cellules matures (Terauchi *et al.*, 2016 ;Jia *et al.*, 2017), suggérant l'importance de la diminution des contraintes lors de la croissance. Chez le zygote de *Fucus*, l'absence de composés sulfatés dans la paroi affaiblit et désorganise la paroi apicale du rhizoïde, suggérant un rôle des fucanes sulfatés dans le renforcement de la paroi apicale lors de l'élongation du rhizoïde (Bisgrove & Kroft 2001). Chez *E. subulatus*, nos résultats ne montrent aucune modification de la forme cellulaire de la cellule apicale en absence des fucanes très sulfatés détectés par BAM4, indiquant que la sulfatation des fucanes reconnus par BAM4 n'a probablement pas d'effet sur la résistance mécanique.

Le nombre de cellules apicales des jeunes parthénosporophytes d'*Ectocarpus* est corrélé à la disponibilité en sulfate dans le milieu, comme l'indique la détection de fucanes fortement sulfatés dans ces parois (Fig. 3b et 7). Chez les algues rouges, la sulfatation de l'agar diminue la rigidité du gel (Murano, 1995) et la croissance apicale de *Gracilaria conferta* est concomitante à une synthèse importante d'agar sulfaté chez l'algue rouge (Friedlander, 2001), ceci suggère un rôle important des polysaccharides sulfatés dans les processus d'assouplissement de la paroi nécessaire à la croissance. La matrice anionique des polysaccharides sulfatés, tels que les fucanes, offre une surface d'hydratation importante et une certaine flexibilité à la paroi (Ficko-Blean *et al.*, 2015 ; Lee *et al.*, 2017). En augmentant localement l'hydratation, la sulfatation des fucanes pourrait contribuer à assouplir la paroi du dôme, facilitant ainsi la croissance apicale. Chez les plantes, l'hydratation et la relaxation de la paroi sont impliquées dans les mécanismes d'expansion cellulaire (Caeser *et al.*, 2011 ; Wolf *et al.*, 2012). L'hydratation augmenterait l'espace entre les microfibrilles de cellulose, facilitant ainsi leur réarrangement lors de la croissance (Evered *et al.*, 2007 ; Wolf *et al.*, 2012). La diminution des interactions entre les différents composés de la paroi pourrait être particulièrement importante chez les algues brunes. En effet, peu d'enzymes de remodelage de la paroi cellulaire ont été identifiées chez ces organismes. Jusqu'à présent, les génomes séquencés ne présentent aucun homologue de cellulases, d'alginate lyases ou de fucanases connues (Cock *et al.*, 2010; Michel *et al.*, 2010; Ye *et al.*, 2015).

Dans les systèmes modèles à croissance apicale, des facteurs communs comme le transport des vésicules, la réorganisation du cytosquelette, la dynamique des parois cellulaires, les flux ioniques, les flux calciques et les voies de signalisation Rho-GTPase ont été identifiés pour participer à l'expansion de l'apex (Liu *et al.*, 2014). Chez les zygotes de *Fucus*, le gradient de calcium cytosolique joue un rôle important dans la croissance isotrope des rhizoïdes (Berger

& Brownlee, 1993, Taylor *et al.*, 1996). La présence de fucanes sulfatés à l'apex, notamment des populations de fucanes détectées par BAM4, est supposée participer à la régulation du champ électrique intracellulaire (Torode *et al.*, 2016). Les fucanes BAM4 détectés dans les régions apicales des filaments d'*Ectocarpus* pourraient également amplifier les gradients de cations qui sont associés à la croissance apicale (Bisgrove & Kropf 2001). La population de fucanes BAM4 favoriserait ainsi l'initiation de points de croissance apicaux, à la fois par ses propriétés d'écran ionique et d'hydratation.

## 2. La sulfatation des fucanes est un processus de développement dynamique

Après son allongement, la CA d'*Ectocarpus* se divise, donnant lieu à une nouvelle cellule apicale et à une cellule allongée subapicale, qui se différenciera à un stade ultérieur (le Bail *et al.*, 2008). Le dôme correspond à la région où la nouvelle paroi est déposée. Le schéma de distribution des composants de la paroi à la surface des cellules suggère un mécanisme coordonné de modifications de la paroi, concomitant à la croissance et au développement, et incluant probablement la sulfatation et la désulfatation des fucanes. Lors de l'expansion, les fucanes reconnus par BAM4 sont incorporés au fur et à mesure dans les parois apicales et sont progressivement modifier le long des régions latérales. Au cours de la croissance, ces polysaccharides sont modifiés de manière à ce que leur détection dans la paroi soit réduite, voire perdue (Fig. 4 et 6). La capacité de l'anticorps BAM4, à reconnaître ces épitopes, est en effet très sensible à la désulfatation (Torode *et al.*, 2015). Ces observations pourraient indiquer qu'au cours de la croissance apicale, la population détectée par BAM4 serait désulfatée dans les régions latérales. Nous ne pouvons pas exclure que ces épitopes soient ultérieurement masqués par d'autres composants de la paroi cellulaire, tels que des phénols ou des alginates. Néanmoins, cette hypothèse n'est pas privilégiée. En effet, une dégradation enzymatique des alginates, connus pour être étroitement liés aux phénols (Deniaud-Bouët *et al.*, 2014) n'a pas montré de modification du patron de détection des fucanes BAM4 (données non montrées).

Chez le zygotes de *Fucus* cultivés en absence de sulfate inorganique, des extractions chimiques de la paroi ont révélé une perte de la sulfatation des fucanes (Crayton *et al.*, 1974). Dans les parois cellulaires d'*Ectocarpus*, nos résultats montrent que la détection des épitopes BAM4 est directement liée à la disponibilité en sulfate inorganique dans le milieu de culture (Fig. 7), signifiant que la sulfatation des fucanes nécessite un apport continu de ce nutriment dans l'environnement. En carence de sulfate, les épitopes BAM4 ne sont pas mis en place (ou



au moins pas sulfatés) dans les parois cellulaires, cette situation change rapidement lorsque du sulfate est ajouté dans le milieu de culture (Fig. 7). Ces observations pourraient indiquer une régulation continue des activités sulfotransférases et sulfatases, qui sont respectivement responsables de la sulfatation des molécules et de la désulfatation.

La capacité à sulfater les polysaccharides est une caractéristique conservée entre les organismes photosynthétiques marins. Chez les plantes terrestres, la perte de cette capacité est probablement le résultat d'une adaptation fonctionnelle à des habitats pauvres en sulfate (Michel *et al.*, 2010 ; Olsen *et al.*, 2016). La détection de fucanes sulfatés dans la paroi des individus cultivés à faible salinité (1,6 mM de sulfate) (Fig. 4 et 6) indique qu'une très faible quantité de sulfate exogène est suffisante pour induire leur sulfatation chez *E. subulatus*. Contrairement à l'environnement marin d'*E. siliculosus*, où les concentrations en sulfate inorganique sont très importantes (28 mM), des mesures récentes réalisées dans l'environnement naturel de souches d'eau douce d'*E. subulatus* (échantillons de la rivière Hopkins, point de collecte de la souche 371) révèlent de faibles concentrations en sulfate, de l'ordre de 1 à 5 mM (Simon Dittami, communication personnelle). Par rapport à la souche d'*E. siliculosus*, l'analyse du génome de la souche Bft15b révèle une grande conservation génomique des gènes de sulfatases et de sulfotransférases (Dittami *et al.*, en préparation), indiquant que la faible concentration en sulfate dans le milieu n'a pas induit de perte massive de ces gènes. Ces conservations génétiques signalent également un rôle crucial de la dynamique de sulfatation des polysaccharides de paroi au cours du développement. Par ailleurs, aucune perte ou expansion de familles de gènes relatifs à des transporteurs de sulfate ou sulfate perméase n'ont été observées entre les deux génomes (Dittami *et al.*, en préparation), indiquant probablement une régulation au niveau de l'expression de ces gènes. Des analyses transcriptomiques ont été envisagées, mais ces dernières nécessitent une biomasse conséquente qu'il est difficile d'obtenir en milieu carencé en sulfate. Des méthodes d'amplifications de l'ARN peuvent être réalisées, mais génèrent différents biais, notamment à cause d'un grand nombre d'étape nécessaire au protocole (Saint-Macroux *et al.*, 2015).

Malgré l'absence de sulfate exogène, la détection de fucanes sulfatés a été observée sur quelques rares apex de cellules apicales (Fig. 7). Le relâchement des gamètes étant effectué en edmN, une très faible concentration en sulfate pourrait persister dans le milieu en quantité suffisante pour être intégré dans les fucanes de la paroi. Par ailleurs, chez le zygote de *Fucus*, il a été montré que moins de 10% de la méthionine présente de le milieu pouvait être incorporée dans les fucanes sulfatés de la paroi (Crayton *et al.*, 1974).

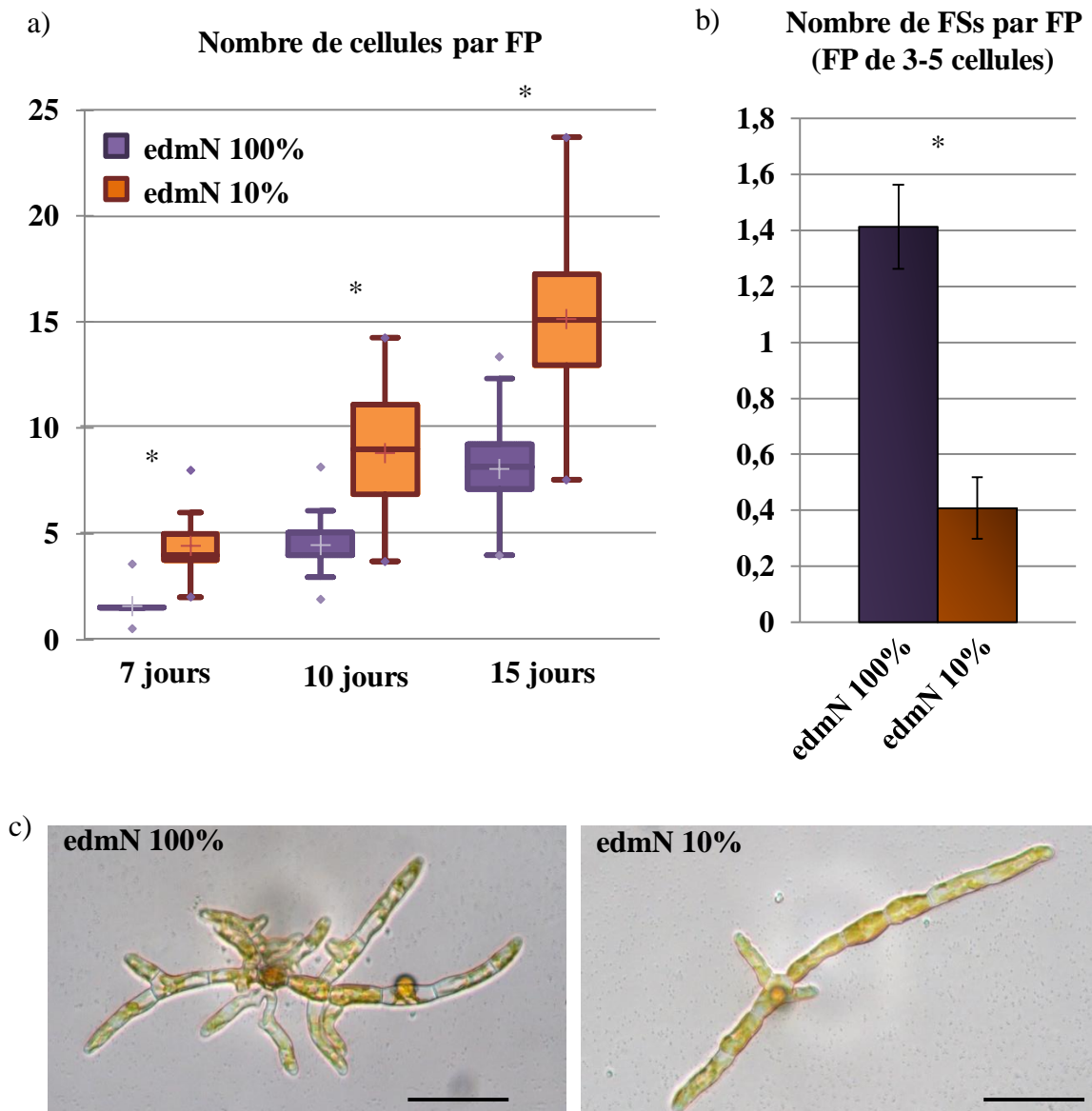
### 3. Le milieu environnant influence la plasticité architecturale d'*Ectocarpus*

Le sulfate inorganique est un composant majeur de l'eau de mer et des habitats aquatiques, dans lesquels il contribue au nombre total de solutés osmotiquement actifs. Il est clair que la modification de la salinité du milieu de culture affecte les activités ioniques au niveau du plasmodesme. La croissance et la cinétique de ramification chez *E. subulatus* (Bft15b) sont influencées par la salinité du milieu environnant (Fig. 1 et 2). La diminution de la salinité du milieu génère une augmentation du potentiel hydrique externe. L'ajustement osmotique fait intervenir la dilution des ions et des solutés organiques intracellulaires, en partie *via* une absorption d'eau qui augmente la pression de turgescence (Teo *et al.*, 2009). La synthèse de nouveau matériel cellulaire et pariétal est requise pour le développement des filaments (primaires et secondaires). Ainsi, la formation plus rapide des FSs observé à forte salinité pourrait compenser l'augmentation de la croissance du FP observée à faible salinité. Des morphotypes différents ont également été observé pour la souche 371 d'*E. subulatus* cultivée dans différentes conditions, suggérant que les changements morphologiques observés pourraient constituer un avantage sélectif lors de l'adaptation à leurs environnements (Dittami *et al.*, 2012).

Bien qu'il faille noter que de nombreux cations / anions sont importants dans de nombreux processus cellulaires qui pourraient affecter le développement, la disponibilité du sulfate joue un rôle clé dans ce processus. Le sulfate inorganique avec la salinité globale, l'auxine (Le Bail *et al.*, 2010), les bactéries (Dittami *et al.*, 2016) et un morphogène diffusible (Arun *et al.*, 2013) est un acteur supplémentaire capable de jouer sur la plasticité architecturale chez *Ectocarpus*. Alors qu'en fonction de la salinité du milieu, des morphotypes distincts sont observés entre les deux souches d'*E. subulatus* (la souche tolérante à de faibles salinités Bft15b et la souche d'eau douce 371), la régulation de la sulfatation de leurs fucanes diffère. Chez la souche 371, aucun épitope BAM4 n'a été observé lorsqu'elle était cultivée avec une salinité globale de 5% (contenant 1,4 mM de sulfate), alors qu'il est largement présent en edmN à 100% (Torode *et al.*, 2015). Chez la souche 371, cette perte à faible salinité coïncide avec la modification de l'expression des gènes de sulfatases et des sulfotransférases (Dittami *et al.*, 2012). La souche Bft15b se développe difficilement à des dilutions inférieures à 5% de salinité (Simon Dittami, communication personnelle) et les épitopes de fucanes sulfatés sont encore détectés par BAM4 en edmN à 10%. Un impact de la concentration en sulfate exogène sur le développement et sur

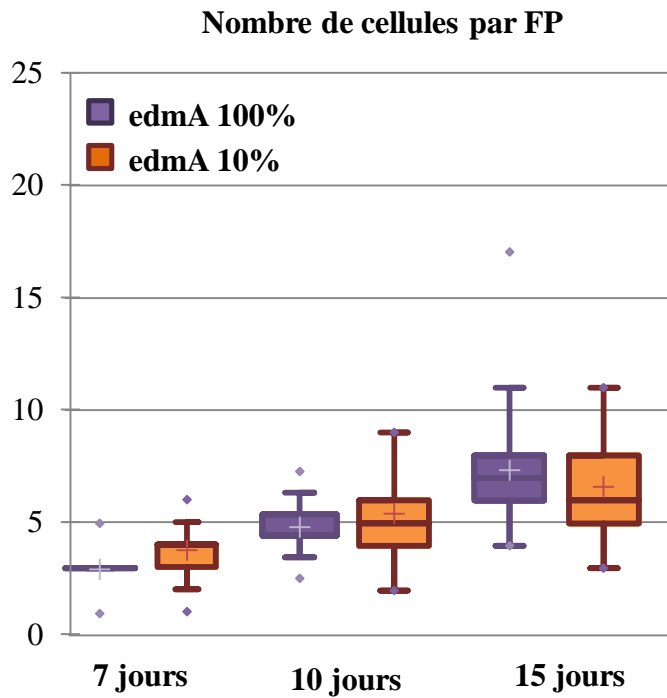
les profils de la paroi, doit encore être étudié dans la souche d'eau douce 371. L'ensemble de ces résultats souligne que ces deux souches sont deux écotypes particuliers, dont les capacités d'adaptation à la salinité ont probablement évolué différemment en fonction des pressions abiotiques de l'environnement.

En conclusion, quel que soit le modèle d'algues brunes étudiés, *Fucus* ou *Ectocarpus*, le soufre présent sous forme de sulfate inorganique dans l'environnement est nécessaire à la sulfatation des fucanes pariétaux. Cette sulfatation ne semble pas être dépendante de la concentration ionique du milieu. Par ailleurs, que ce soit dans un milieu à faible ou à forte salinité, la capacité à mettre en place des fucanes sulfatés au dôme de la cellule apicale apparaît comme essentielle à la croissance des filaments.

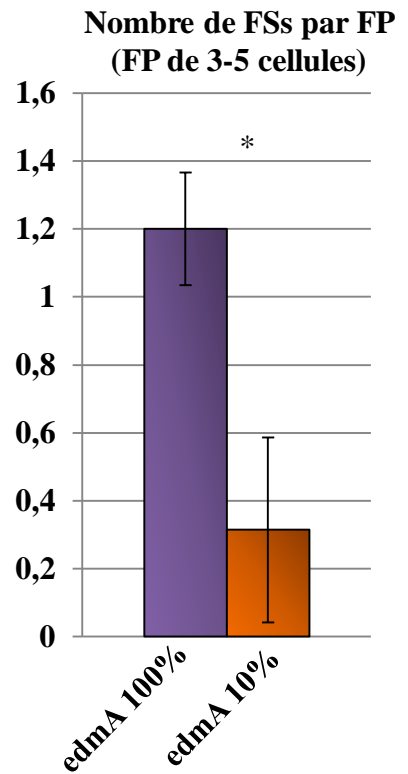


**Figure 1: Croissance d' *E. subulatus* en eau de mer naturelle (edmN) cultivée à différentes salinités.** (a) La croissance du filament primaire (FP) est plus importante lorsque les gamètes sont cultivés en edmN diluée à 10% qu'en eau de mer 100% (n = 72 individus par condition). (b) Le nombre de filaments secondaires (FSs) moyen est plus important lorsque *E. subulatus* est cultivé à forte salinité par rapport à la condition de salinité diluée (n = 58 individus par condition). Pour chaque figure, les résultats représentent les moyennes de quatre réplicats et les barres d'erreurs représentent les écart-types. \* indiquent une différence significative  $p \leq 0,01$  (test de Mann-Whitney). (c) Morphologie des parthénosporophytes d'*E. subulatus* cultivés en edmN 100% ou 10% (respectivement 10 et 15 jours de cultures). Barres d'échelle = 50  $\mu\text{m}$ .

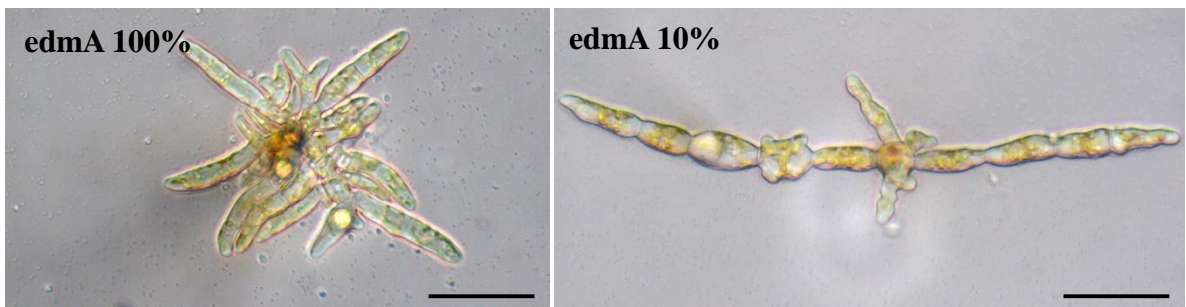
a)



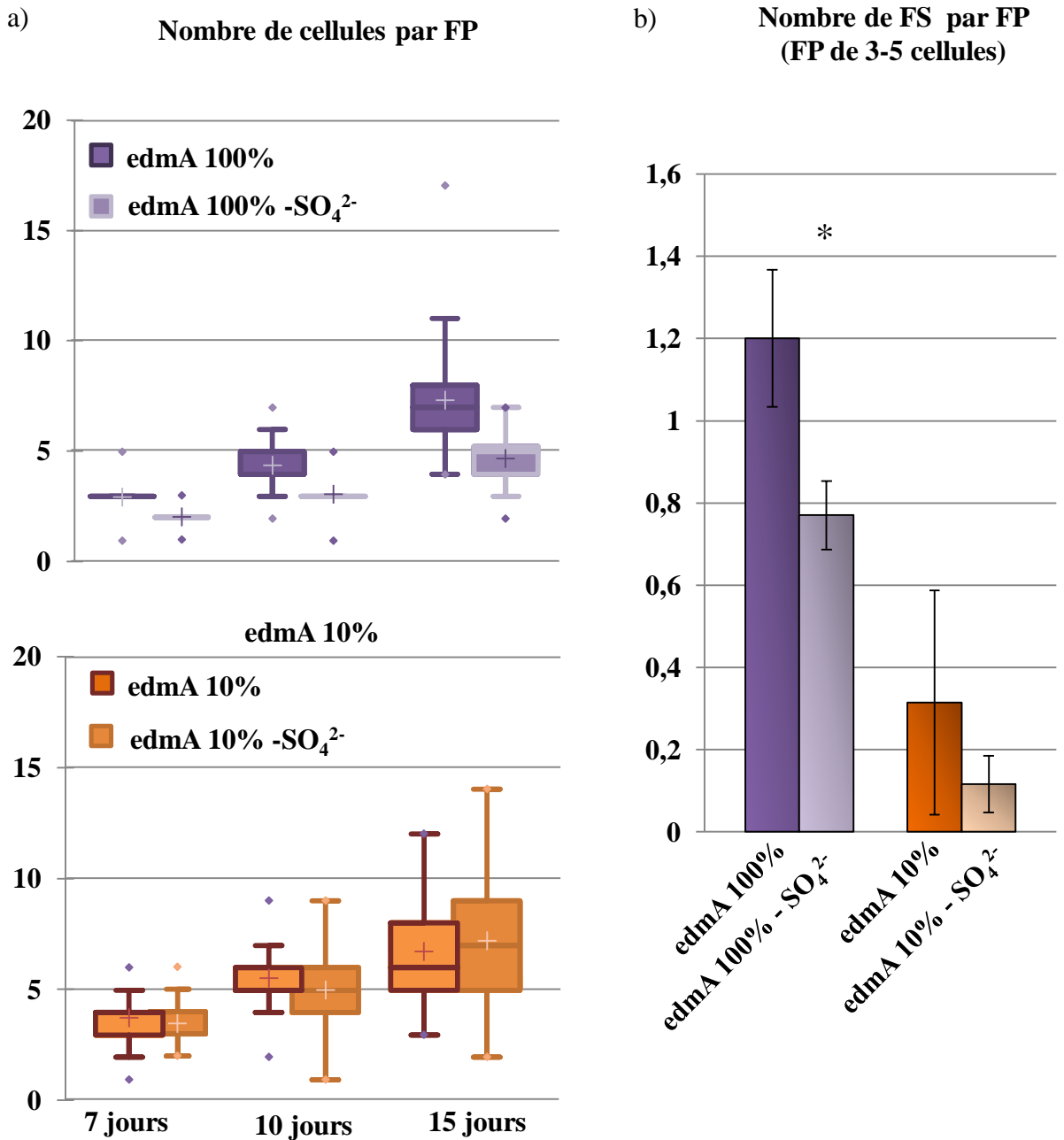
b)



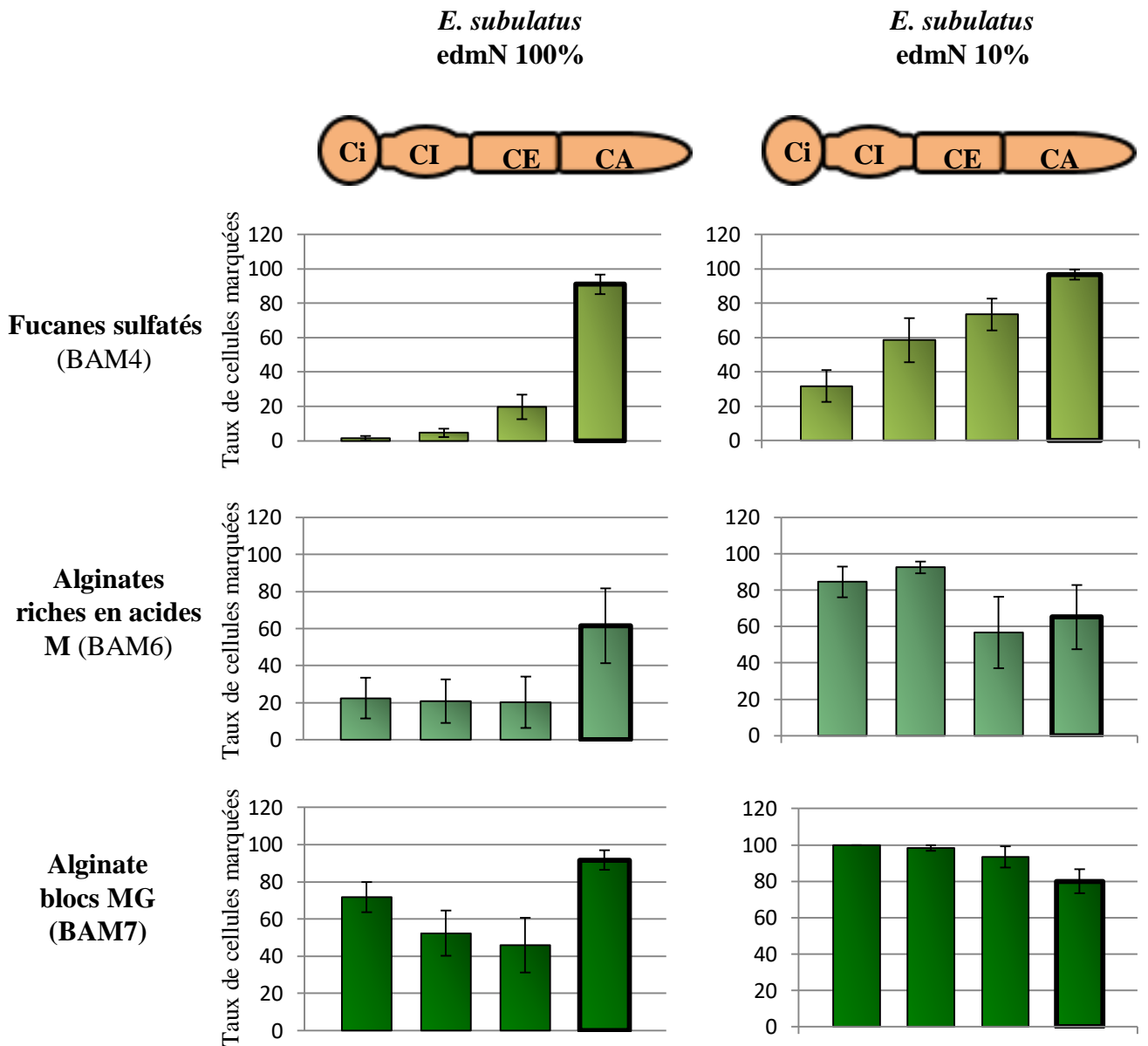
c)



**Figure 2 : Croissance d' *E. subulatus* en eau de mer artificielle (edmA) cultivée à différentes concentrations de salinités.** (a) La croissance du filament primaire (FP) est plus importante lorsque les gamètes sont cultivés en edmA diluée à 10% qu'en eau de mer 100% ( $n = 72$  individus par condition). (b) Le nombre de filaments secondaires (FSs) moyen est plus important lorsque *E. subulatus* est cultivé en eau de mer 100% par rapport à la condition de salinité diluée ( $n = 58$  individus par condition). Pour chaque figure, les résultats représentent les moyennes de quatre réplicats et les barres d'erreurs représentent les écart-types. \* indiquent une différence significative  $p \leq 0,01$  (test de Mann-Withney). (c) Morphologie des parthénosporophytes d'*E. subulatus* cultivés en edmA 100% ou 10% (15 jours de culture). Barres d'échelle = 50  $\mu\text{m}$ .

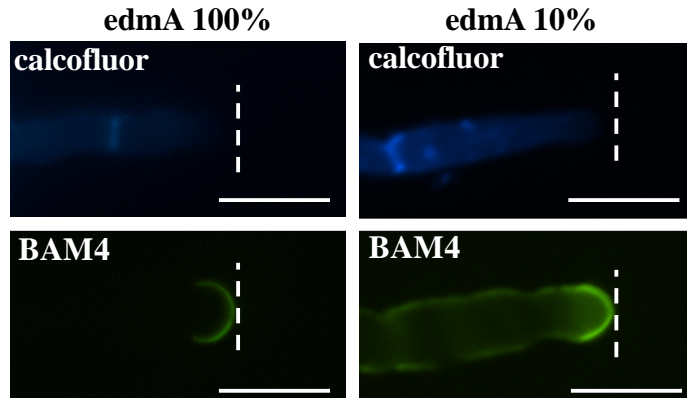
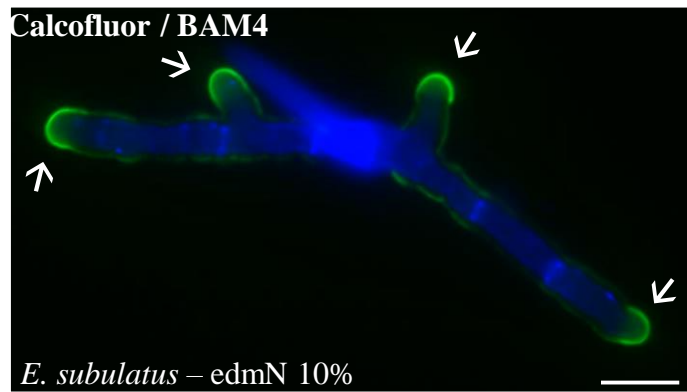


**Figure 3: Croissance d' *E. subulatus* en absence de sulfate dans le milieu.** (a) Quelle que soit la salinité du milieu, la croissance du filament primaire (FP) est diminuée lorsque les gamètes sont cultivés en edmA sans sulfate (n = 72 individus par condition). (b) Le nombre de filaments secondaires (FSs) moyen diminue lorsque *E. subulatus* est cultivé en edmA sans sulfate (n = 58 individus par condition). Pour chaque figure, les résultats représentent les moyennes de quatre réplicats et les barres d'erreurs représentent les écart-types. \* indiquent une différence significative  $p \leq 0,01$  (test de Mann-Withney).

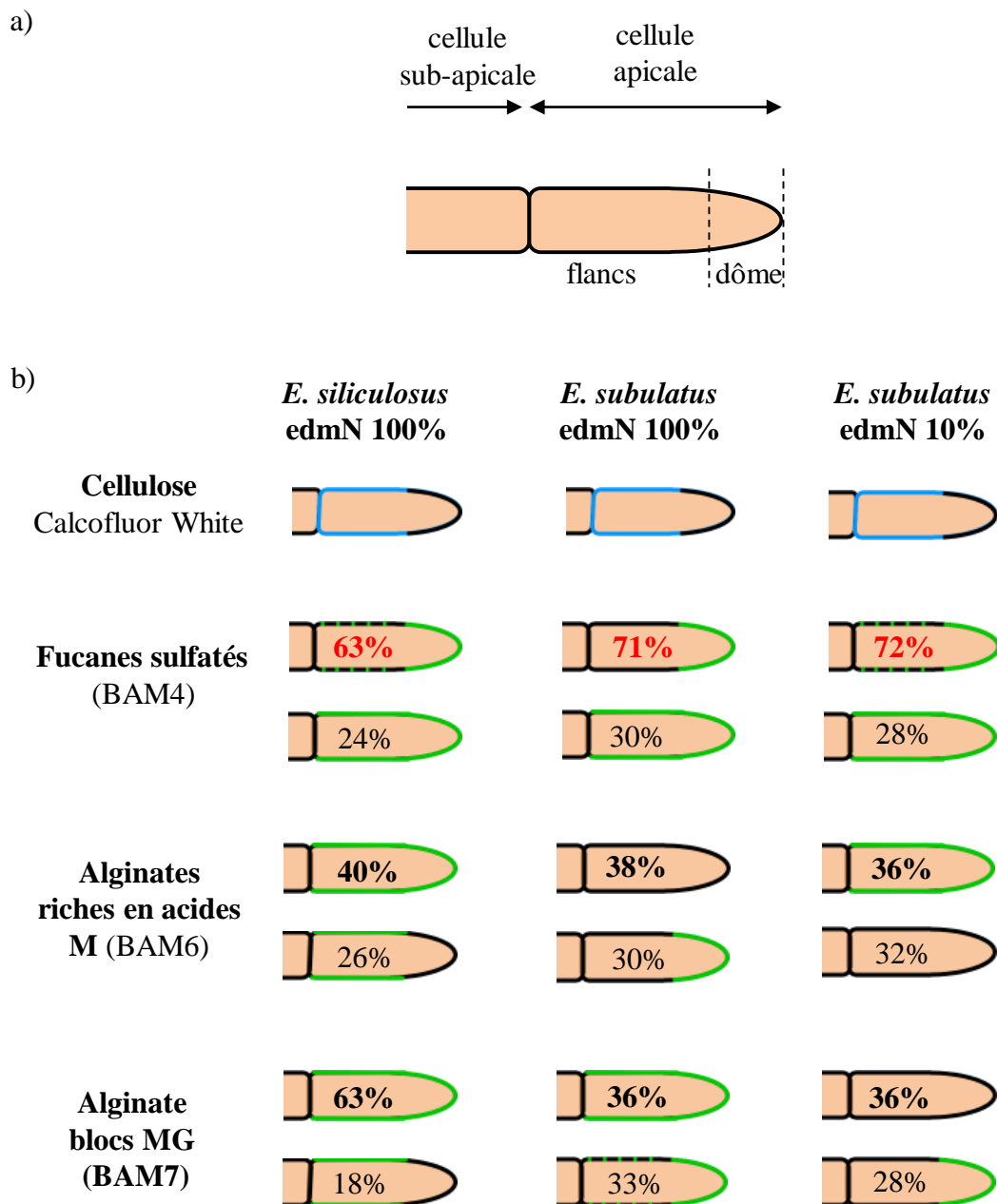


**Figure 4 :** Taux de cellules marquées par les anticorps anti-fucanes sulfatés et anti-alginates dans des filaments d'*E. subulatus* constitués de 4 cellules. Quelle que soit la salinité du milieu de culture, les fucanes sulfatés et les alginates sont détectés de manière similaire dans la paroi de la cellule apicale, ce qui n'est pas le cas pour les autres types cellulaires. CA : cellule apicale ; CE : cellule allongée (« elongated ») ; CI : cellule intermédiaire ; Ci : cellule initiale ; edmN: eau de mer naturelle ; G : acide guluronique ; M : acide mannuronique

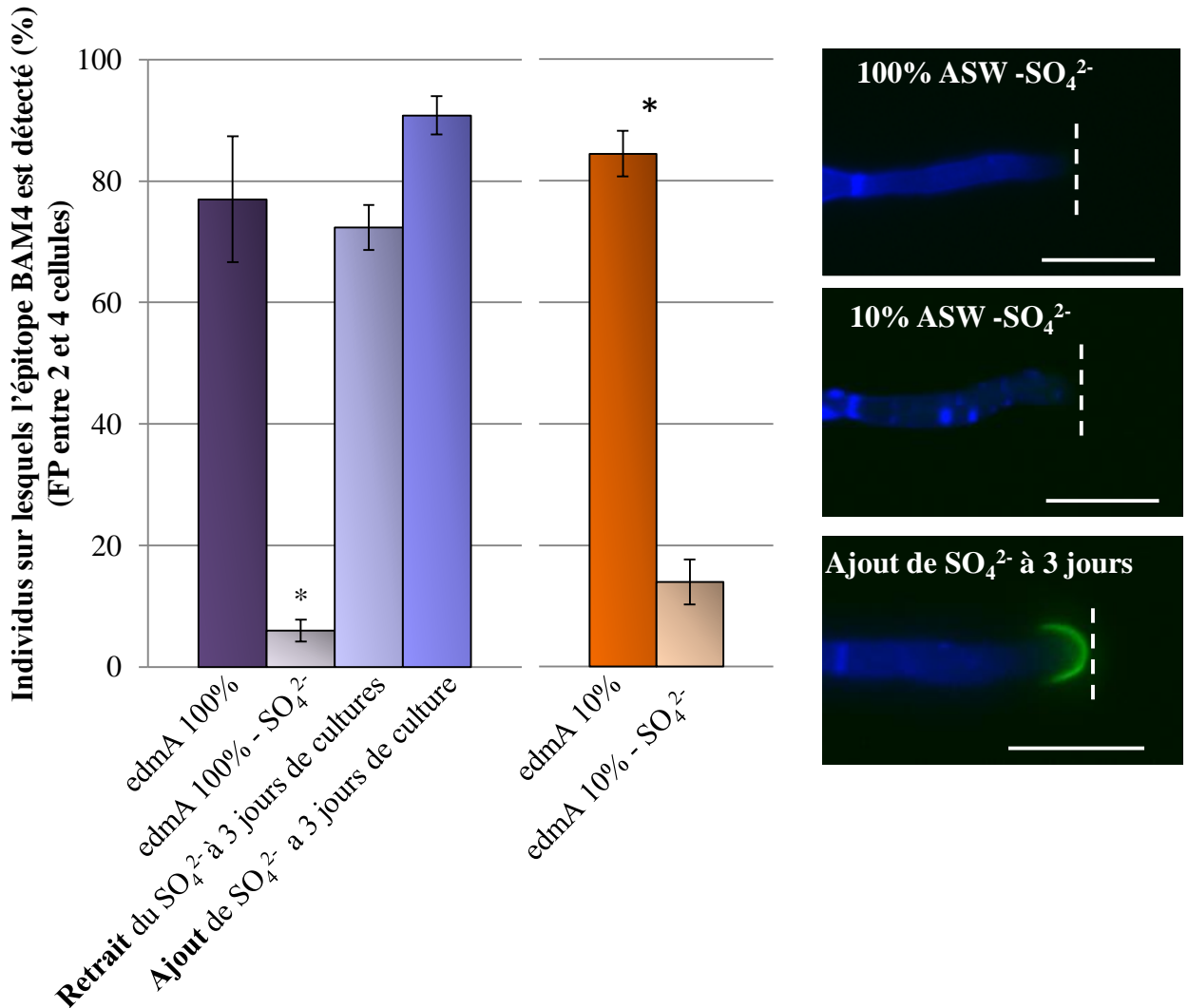




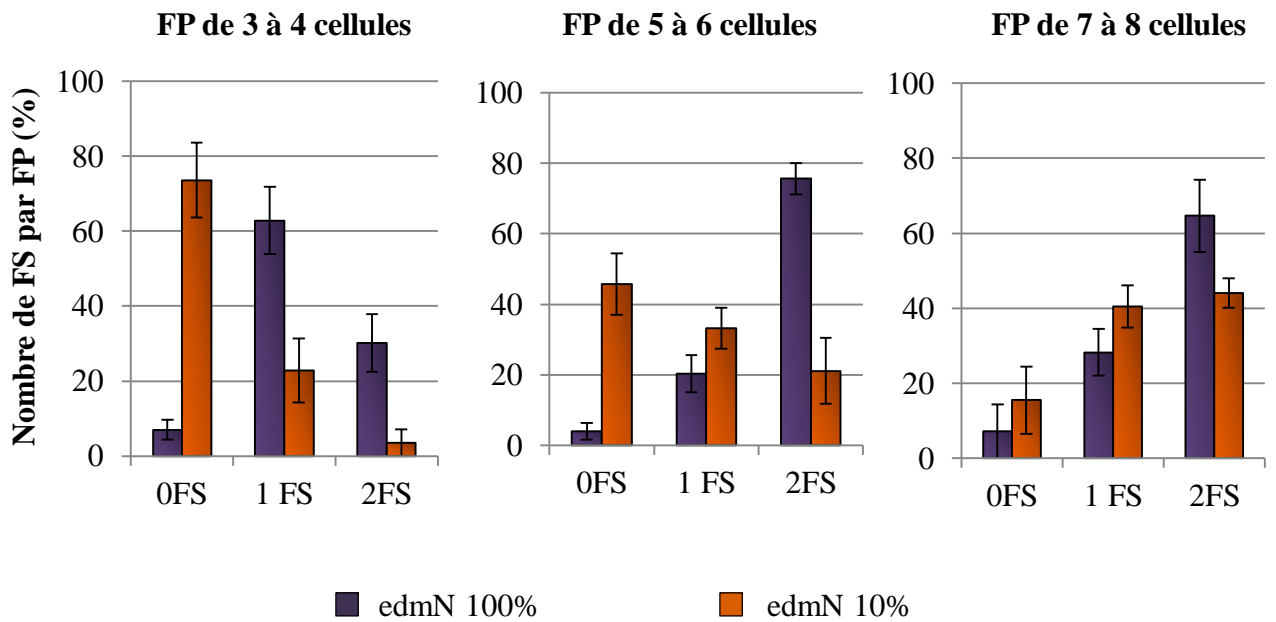
**Figure 5 : Immunofluorescence des polysaccharides de paroi dans les cellules apicales d'*E. subulatus*.** La cellulose est détectée sur tout le filament exceptée aux apex (fluorescence bleue). Les fucanes sulfatés détectés par BAM4 sont principalement localisés aux apex (fluorescence verte). Ces observations sont valables pour toutes les conditions testées (edmN/A-10/100%). edmN: eau de mer naturelle; edmA: eau de mer artificielle. Barres d'échelle = 20  $\mu$ m.



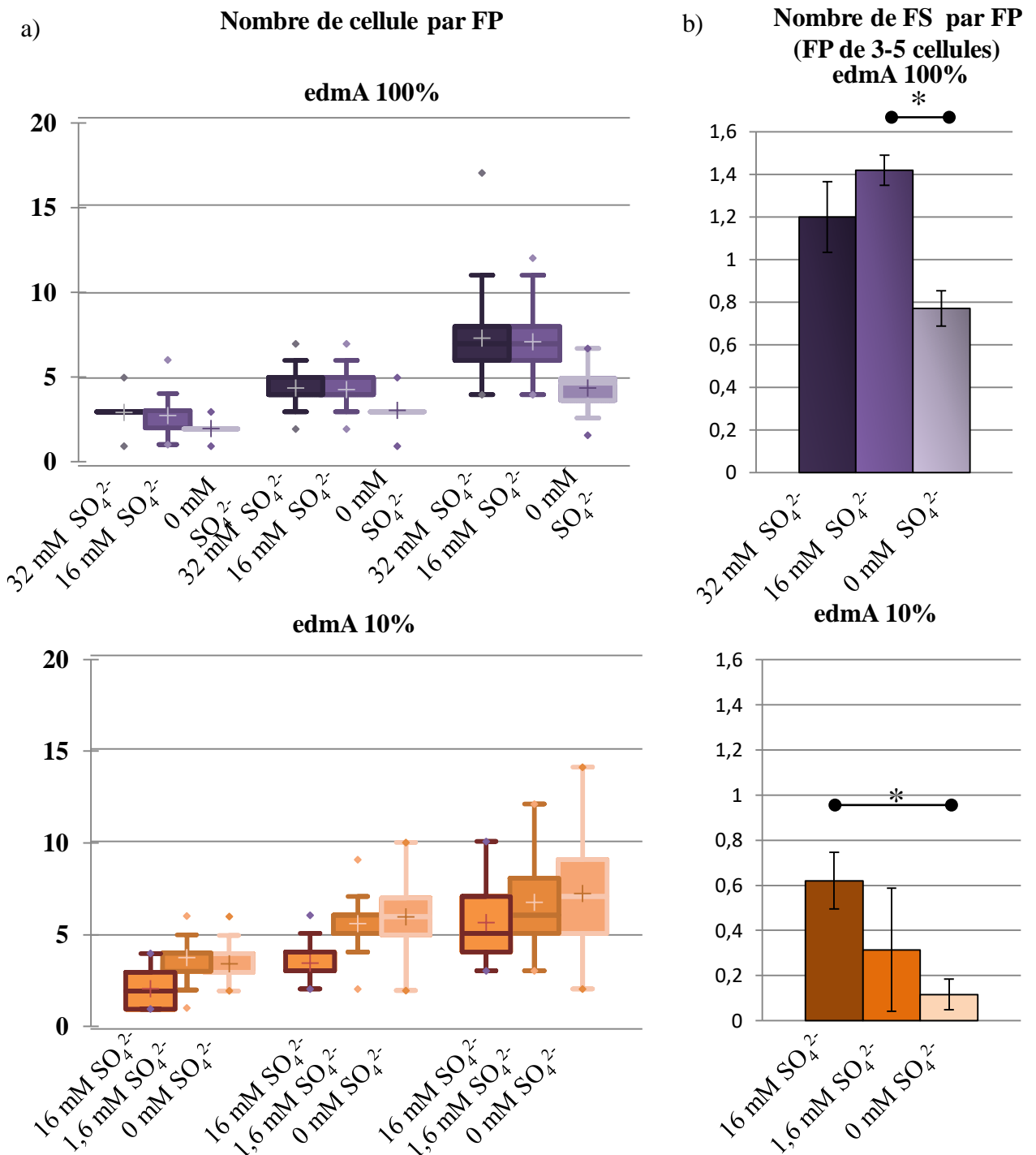
**Figure 6 : Schématisation des patrons de marquages majoritaires observés sur la cellule apicale.** (a) La cellule apicale est constituée d'un dôme (ou apex) et de flancs qui le précède. (b) Pour les deux écotypes et les deux concentrations de salinités testés, la cellulose est détectée sur tout le filament exceptée aux apex (bleu) alors que, les fucanes sulfatés détectés par BAM4 sont principalement localisés aux apex (vert). Les alginates détectés par BAM6 et BAM7 (vert) ont une localisation très hétérogène. Le pourcentage du profil observé est inscrit dans chaque cellule ( $n \geq 33$ ). edmN: eau de mer Naturelle



**Figure 7 : Effet de l'absence de sulfate dans le milieu sur le dépôt des fucanes sulfatés BAM4 dans la paroi des parthénosporophytes d'*E. subulatus*.** La carence en sulfate du milieu entraîne une perte des épitopes de fucanes sulfatés BAM4 (fluorescence verte). Lorsque le sulfate est ajouté à 3 jours de cultures, le dépôt des fucanes sulfatés dans la paroi est restauré. Quelque soit le milieu de culture, le colorant Calcofluor White indique une faible détection de la cellulose aux apex (fluorescence bleue). Les résultats représentent les moyennes de trois réplicats et les barres d'erreurs représentent les écart-types ( $n \geq 87$  individus par condition). \* indiquent une différence très significative ( $p \leq 0,01$ ; test de Mann-Withney). Les images résultent d'une combinaison de l'acquisition des images en fluorescence verte et bleue. Les barres en pointillées indiquent la limite des cellules apicales. Barres d'échelle = 20  $\mu$ m.

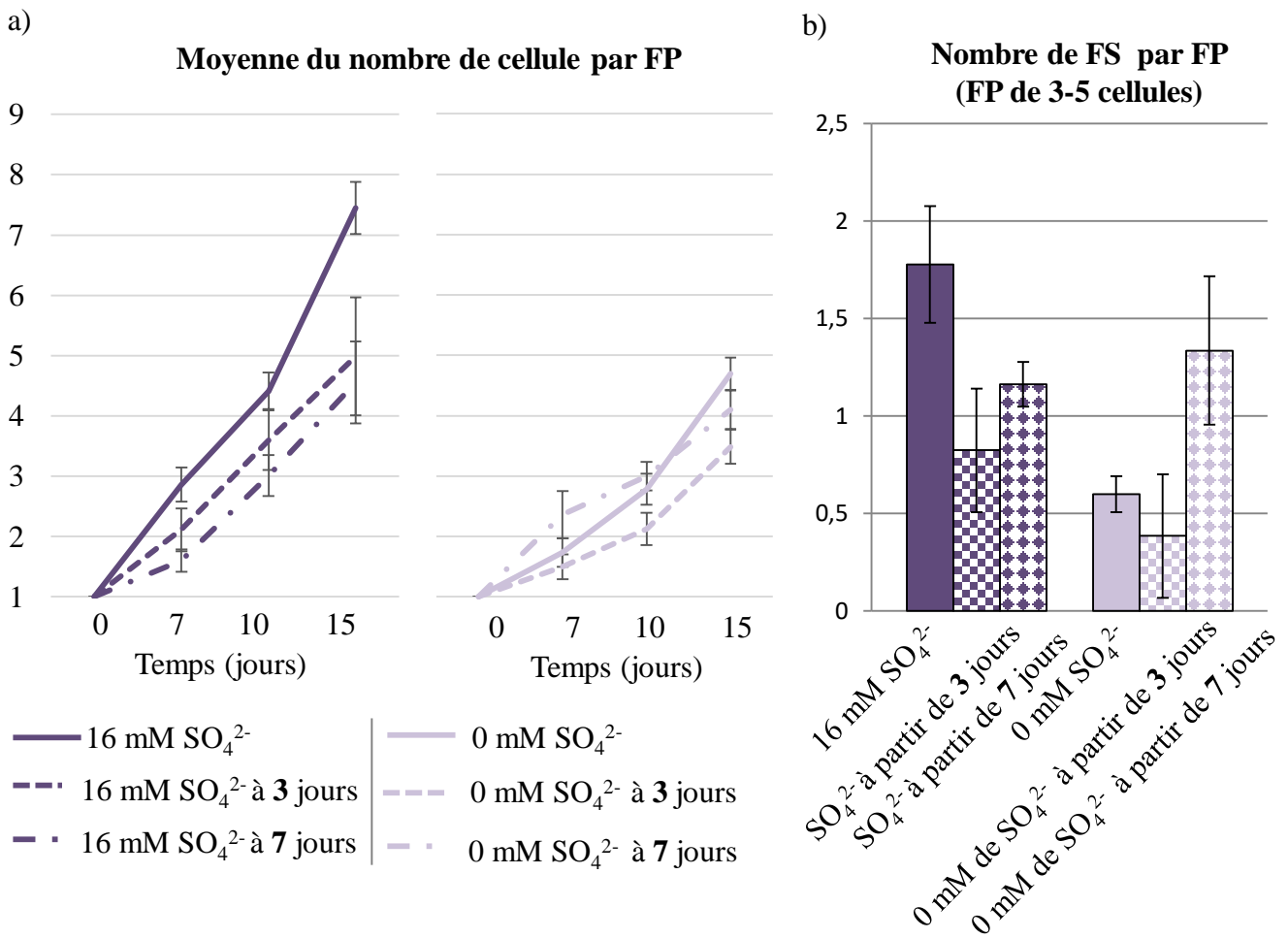


**Figure S1 : Nombre de filaments secondaires (FS) par filament primaire (FP) d'*E. subulatus*.** Les individus aux stades de 3 à 6 cellules ont un nombre de FSs plus important lorsqu'ils sont cultivés en à forte salinité.

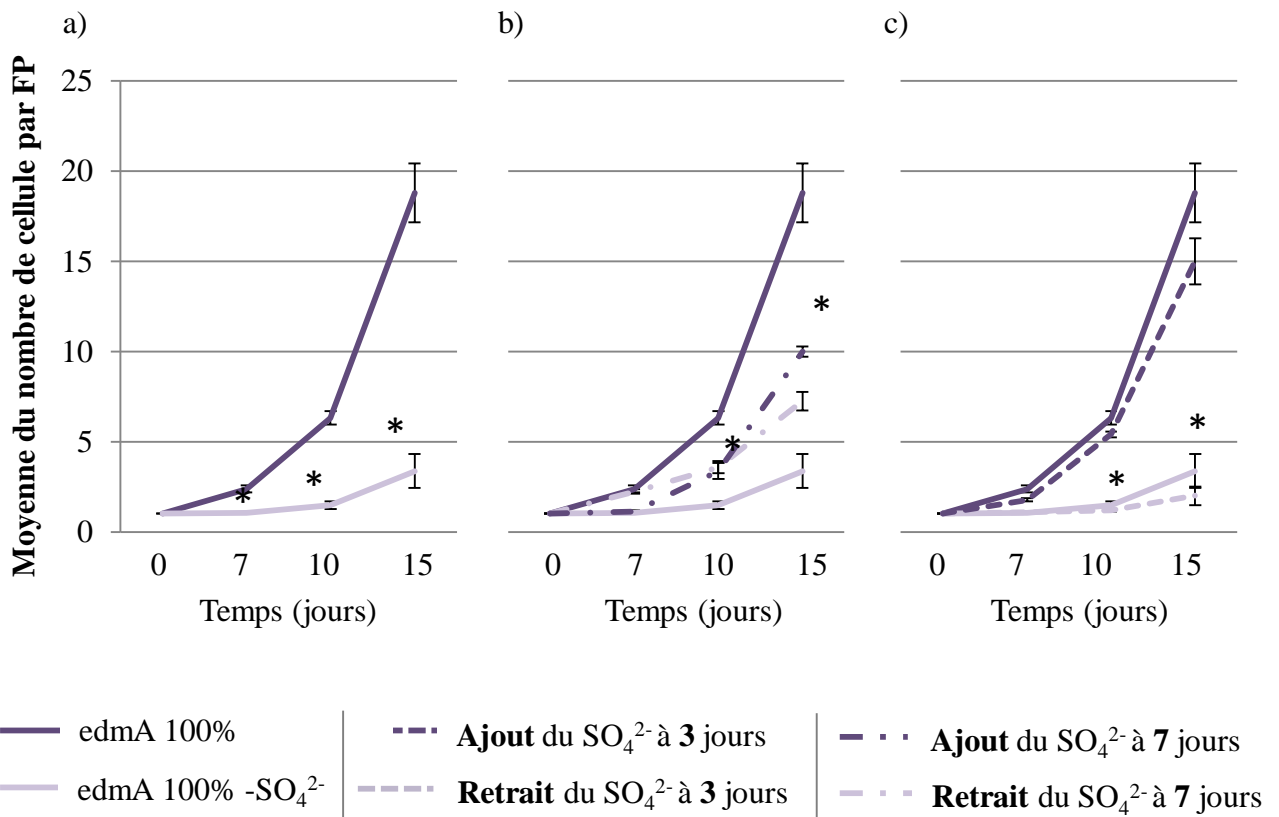


**Figure S2 : Effet d'une variation de la concentration en sulfate dans l'eau de mer artificielle (edmA) sur la croissance et le développement d' *E. subulatus*.** (a) La croissance d' *E. subulatus* n'est pas modifiée par la supplémentation en sulfate (2 x la concentration initiale) dans le milieu edmA 100% (n = 72 individus par condition). En edmA diluée à 10%, la croissance est diminuée par la complémentation (valeur similaire à l'eau de mer 100% non diluée) en sulfate dans le milieu (n = 72 individus par condition).

(b) Quelque soit la dilution du milieu, le nombre de filaments secondaires (FSs) n'est pas modifié par la supplémentation en sulfate. En edmA diluée, le nombre de FSs est augmenté dans la condition supplémentée en sulfate par rapport à la condition sans sulfate (n = 58 individus par condition). Pour chaque figure, les résultats représentent les moyennes de quatre réplicats et les barres d'erreurs représentent les écart-types. \* indiquent une différence significative  $p \leq 0,01$  (t-test de Mann-Whitney).

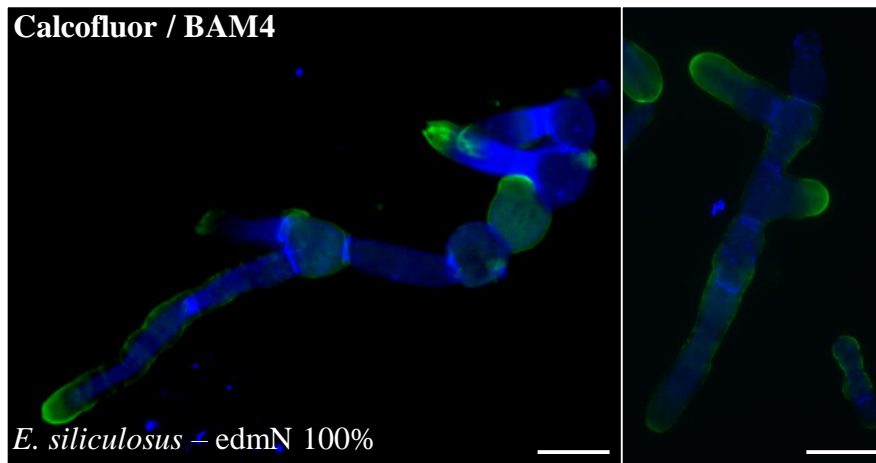


**Figure S3 : Effet réversible d'une carence en sulfate dans le milieu de cultures sur les parthénosporophytes d'*E. subulatus*.** (a) L'ajout de sulfate à 3 ou 7 jours de développement restaure en partie la croissance des alors que son retrait la diminue de manière similaire à ce qui est observé pour la condition contrôle sans sulfate ( $n = 72$  individus par condition). (b) Le nombre de filaments secondaires (FSs) est diminué par le retrait du sulfate à 3 jours de cultures ( $n = 58$  individus par condition). Les résultats représentent les moyennes de quatre réplicats et les barres d'erreurs représentent les écart-types. \* indiquent une différence significative ( $p \leq 0,01$ ; test de Mann-Withney).



**Figure S4 : Effet de la concentration en sulfate de l'eau de mer artificielle (edmA) sur la croissance d' *E. siliculosus*.** (a) La carence en sulfate diminue la croissance des parthénosporophytes d' *E. siliculosus*. (b) L'ajout de sulfate à 3 ou 7 jours de développement restaure en partie la croissance alors que (c) son retrait la diminue de manière similaire à ce qui est observé pour la condition contrôle sans sulfate (n = 72 individus par condition). Comme les filaments secondaires d' *E. siliculosus* sont produits plus tardivement qu' *E. subulatus* et que la croissance en carence de sulfate est très impactée, le nombre de branchements n'a pas été analysé pour cette souche. Les résultats représentent les moyennes de quatre réplicats et les barres d'erreurs représentent les écart-types. \* indiquent une différence significative ( $p \leq 0,01$ ; test de Mann-Whitney).





**Figure S5 :** Immunofluorescence des polysaccharides de la paroi dans les cellules apicales d'*E. siliculosus*. La cellulose est détectée sur tout le filament exceptée aux apex (fluorescence bleue). Les fucanes sulfatés détectés par BAM4 sont principalement localisés aux apex (fluorescence verte). edmN: eau de mer naturelle; Barres d'échelle = 20  $\mu$ m.

## Références

- **Aquino R.S., Grativol C., Mourão P.A.**, 2011 “Rising from the sea: correlations between sulfated polysaccharides and salinity in plants”. *PloS one*, **6**(4), e18862.
- **Aquino R.S., Landeira-Fernandez A.M., Valente A.P., Andrade L.R., Mourão P.A.S.**, 2005. “Occurrence of sulfated galactans in marine angiosperms: Evolutionary implications”. *Glycobiology*. **15**, 11–20.
- **Arun, A., Peters, N. T., Scornet, D., Peters, A., Cock, J. M., Coelho S.**, 2013. “Non-cell autonomous regulation of life cycle transitions in the model brown alga *Ectocarpus*”. *New Phytologist* **192** (2), 503-510
- **Berger, F., & Brownlee, C.**, 1993. “Ratio confocal imaging of free cytoplasmic calcium gradients in polarising and polarised *Fucus* zygotes”. *Zygote*, **1**(1), 9-15.
- **Berger, F., Taylor, A., and Brownlee, C.**, 1994. "Cell Fate Determination by the Cell Wall in Early *Fucus* Development". *Science* **263** (5152), 1421-23
- **Bisgrove S. R. and Kropf D. L.**, 2001. Cell wall deposition during morphogenesis in fucoid algae. *Planta* **212**, 648–658.
- **Bold H.C., Wynne M.J.**, 1985. "Introduction to the Algae: Structure and Reproduction", 2nd ed. Prentice-Hall: Englewood Cliffs, New Jersey, USA.
- **Brawley, S.H., & Quatrano, R.S.**, 1979. "Effects of microtubule inhibitors on pronuclear migration and embryogenesis in *Fucus distichus* (Phaeophyta) ". *Journal of Phycology*, **15**(3), 266-272.
- **Caesar K., Elgass K., Chen Z., Huppenberger P., Witthoft J., Schleifenbaum F., Blatt M.R., Oecking C., Harter K.**, 2011. “A fast brassinolide-regulated response pathway in the plasma membrane of *Arabidopsis thaliana*”. *The Plant Journal*, **66**(3), 528-540.
- **Charrier B., Coelho S.M., Le Bail A., Tonon T., Michel G., Potin P. et al.**, 2008. "Development and physiology of the brown alga *Ectocarpus siliculosus* : two centuries of research". *New Phytologist*, **177** (2), 319-332.
- **Chebli, Y., Kaneda, M., Zerzour, R., & Geitmann, A.**, 2012. “The cell wall of the *Arabidopsis* pollen tube spatial distribution, recycling, and network formation of polysaccharides”. *Plant Physiology*, **160**(4), 1940-1955.

- **Cock M., Sterck L., Rouze P., Scornet D., Allen A.E., Amoutzias G., Anthouard V., Artiguenave F., Aury J.M., Badger J.H., et al., 2010.** “The Ectocarpus genome and the independent evolution of multicellularity in brown algae”. *Nature* **465**, 617–621.
- **Crayton, M.A., Wilson, E., & Quatrano, R.S., 1974.** “Sulfation of fucoidan in *Fucus* embryos: II. Separation from initiation of polar growth”. *Developmental biology*, **39**(1), 164-167.
- **Deniaud-Bouët, E., Hardouin, K., Potin, P., Kloareg, B., & Hervé, C., 2017.** “A review about brown algal cell walls and fucose-containing sulfated polysaccharides: Cell wall context, biomedical properties and key research challenges”. *Carbohydrate polymers*, **175**, 395-408.
- **Deniaud-Bouët, E., Kervarec, N., Michel, G., Tonon, T., Kloareg, B. and Hervé, C., 2014.** "Chemical and enzymatic fractionation of cell walls from Fucales: insights into the structure of the extracellular matrix of brown algae". *Annals of Botany*, **114**, 1203-1216.
- **Dittami S.M., Corre E., Pointoizeau N., Cormier A., Avia K., Collen ., Delage., Doubleau S., Gobet A., Gonzales I., Grosillier A ;, Guéguen L., Hervé C., Kleinjan H., Lipinska A., Liu X., Marie D., Minocje A.E., Monsor M., Perrineau. M.M., Peters A.F., Siméon A., Su Yoon H., Himmelbauer H., Boyen C., and Tonon T., in preparation.** “The genome of *Ectocarpus subulatus*, a highly stress-tolerant brown alga”.
- **Dittami S.M., Scornet D., Petit J.L., Ségurens B., Da Silva C., Corre E et al., 2009.** "Global expression analysis of the brown alga *Ectocarpus siliculosus* (Phaeophyceae) reveals large-scale reprogramming of the transcriptome in response to abiotic stress". *Genome biology*, **10**(6), R66.
- **Dittami, S. M., Gravot, A., Goulitquer, S., Rousvoal, S., Peters, A.F., Bouchereau, A., Boyen, C. & Tonon, T., 2012.** "Towards deciphering dynamic changes and evolutionary mechanisms involved in the adaptation to low salinities in *Ectocarpus* (brown algae)". *The plant journal*, **71**(3), 366-377.
- **Dittami, S.M., Duboscq-Bidot, L., Perennou, M., Gobet, A., Corre, E., Boyen, C., and Tonon, T., 2016.** "Host–microbe interactions as a driver of acclimation to salinity gradients in brown algal cultures". *The ISME journal*, **10**(1), 51.
- **Evered, C., Majevadia, B., & Thompson, D. S., 2007.** “Cell wall water content has a direct effect on extensibility in growing hypocotyls of sunflower (*Helianthus annuus* L.)”. *Journal of experimental botany*, **58**(12), 3361-3371.

- **Ficko-Blean, E., Hervé, C., & Michel, G., 2015.** Sweet and sour sugars from the sea: the biosynthesis and remodeling of sulfated cell wall polysaccharides from marine macroalgae. *Perspect Phycol*, **2**, 51-64.
- **Friedlander, M., 2001.** Inorganic nutrition in pond cultivated *Gracilaria conferta* (Rhodophyta): nitrogen, phosphate and sulfate. *Journal of Applied Phycology*, **13(3)**, 279-286.
- **Geitmann, A., & Steer, M., 2006.** "The architecture and properties of the pollen tube cell wall". *The Pollen Tube*, 177-200.
- **Geissler, U., 1983** "Die salzbelastete Flusstrecke der Werra – ein Binnen-landstandort für *Ectocarpus confervoides* (Roth) Kjellmann". *Nova Hedwigia*, **37(1)**, 193-217.
- **Jia, F., Amar, M.B., Billoud, B., & Charrier, B., 2017.** "Morphoelasticity in the development of brown alga *Ectocarpus siliculosus*: from cell rounding to branching". *Journal of the Royal Society Interface*, **14(127)**, 20160596.
- **Katsaros, C.I., 1995.** "Apical cells of brown algae with particular reference to Sphacelariales, Dictyotales and Fucales". *Phycological Research*, **43(1)**, 43-59.
- **Kirst, G.O., 1990.** "Salinity tolerance of eukaryotic marine algae". *Annual review of plant biology*, **41(1)**, 21-53.
- **Kropf, D. L., Kloareg, B., et Quatrano, R. S., 1988.** "Cell Wall Is Required for Fixation of the Embryonic Axis in *Fucus* Zygotes". *Science* **239** (4836), 187-90.
- **Le Bail, A., Billoud, B., Le Panse, S., Chenivesse, S., and Charrier, B., 2011.** "ETOILE regulates developmental patterning in the filamentous brown alga *Ectocarpus siliculosus*". *The Plant Cell*, **23(4)**, 1666-1678.
- **Le Bail, A., Billoud, B., Maisonneuve, C., Peters, A.F., Mark Cock, J., and Charrier, B., 2008.** "Early development pattern of the brown alga *Ectocarpus siliculosus* (Ectocarpales, Phaeophyceae) sporophyte". *Journal of phycology*, **44(5)**, 1269-1281.
- **Le Bail, A., Billoud, B., Kowalczyk, N., Kowalczyk, M., Gicquel, M., Le Panse, S., et al., 2010.** Auxin metabolism and function in the multicellular brown alga *Ectocarpus siliculosus*. *Plant physiology*, **153(1)**, 128-144.
- **Lee, W. K., Namasivayam, P., Abdullah, J.O., and Ho, C.L., 2017.** "Transcriptome profiling of sulfate deprivation responses in two agarophytes *Gracilaria changii* and *Gracilaria salicornia* (Rhodophyta) ". *Scientific Reports*, **7**.

- **Lee, W. K., Namasivayam, P., & Ho, C. L., 2014.** “Effects of sulfate starvation on agar polysaccharides of *Gracilaria* species (Gracilariaceae, Rhodophyta) from Morib, Malaysia”. *Journal of applied phycology*, **26(4)**, 1791-1799.
- **Liu, J., & Hussey, P. J., 2014.** “Dissecting the regulation of pollen tube growth by modeling the interplay of hydrodynamics, cell wall and ion dynamics”. *Frontiers in plant science*, **5**.
- **Michel G., Tonon T., Scornet D., Cock J.M., Kloareg B., 2010.** "The cell wall polysaccharide metabolism of the brown alga *Ectocarpus siliculosus*. Insights into the evolution of extracellular matrix polysaccharides in Eukaryotes". *New Phytologist*, **188(1)**, 82-97.
- **Müller, D.G., 1979.** "Genetic affinity of *Ectocarpus siliculosus* (Dillw.) Lyngb. from the Mediterranean, North Atlantic and Australia". *Phycologia*, **18(4)**, 312-318.
- **Murano, E., 1995.** “Chemical structure and quality of agars from *Gracilaria*”. *Journal of Applied Phycology*, **7(3)**, 245-254.
- **Nguyen, X.V., Klein, M., Riemenschneider, A., and Papenbrock, J., 2014.** "Distinctive features and role of sulfur-containing compounds in marine plants, seaweeds, seagrasses and halophytes, from an evolutionary point of view". In *Sabkha Ecosystems* (pp. 299-312). Springer Netherlands.
- **Olsen, J.L., Rouzé, P., Verhelst, B., Lin, Y. C., Bayer, T., Collen, J., et al., 2016.** "The genome of the seagrass *Zostera marina* reveals angiosperm adaptation to the sea". *Nature*, **530(7590)**, 331-335.
- **Parre, E., & Geitmann, A., 2005.** “Pectin and the role of the physical properties of the cell wall in pollen tube growth of *Solanum chacoense*”. *Planta*, **220(4)**, 582-592.
- **Raimundo, S., C., Pattathil, S., Eberhard, S., Hahn, M. G., and Popper, Z. A., 2016.** "β-1,3-Glucans Are Components of Brown Seaweed (Phaeophyceae) ". *Cell Walls Protoplasma*, **254(2)**, 997-1016.
- **Ravanko, O., 1970.** "Morphological, developmental and taxonomic studies in the *Ectocarpus* complex (Phaeophyceae) ". *Nova Hedwigia*, **20**, 179–252.
- **Starr, R.C., and Zeikus, J.A., 1993.** "UTEX—the culture collection of algae at the University of Texas at Austin 1993 list of cultures". *Journal of phycology*, **29(s2)**, 1-106.
- **Saint-Marcoux, D., Billoud, B., Langdale, J. A., & Charrier, B., 2015.** “Laser capture microdissection in *Ectocarpus siliculosus*: the pathway to cell-specific transcriptomics in brown algae”. *Frontiers in plant science*, **6**.

- **Taylor, A. R., Manison, N. F., Fernandez, C., Wood, J., & Brownlee, C., 1996.** Spatial organization of calcium signaling involved in cell volume control in the *Fucus* rhizoid. *The Plant Cell*, **8(11)**, 2015-2031.
- **Teo, S., Ho, C., Teoh, S., Rahim, R., Phang, S., 2009.** "Transcriptomic analysis of *Gracilaria changii* (Rhodophyta) in response to hyper- and hypoosmotic stresses". *Journal of phycology*, **45(5)**, 1093-1099.
- **Terauchi, M., Nagasato, C., Inoue, A., Ito, T., and Motomura, T., 2016.** "Distribution of alginate and cellulose and regulatory role of calcium in the cell wall of the brown alga *Ectocarpus siliculosus*". *Planta*, **244(2)**, 361-377.
- **Torode, T.A., Marcus, S.E., Jam, M., Tonon, T., Blackburn, R.S., Hervé, C., and Knox, J.P., 2015.** "Monoclonal Antibodies Directed to Fucoïdan Preparations from Brown Algae". *PloS One* **10** (2): e0118366
- **Torode, T.A., Siméon, A., Marcus, S.E., Jam, M., LeMoigne, A.M., Duffieux, D., Knox J.P., and Hervé, C., 2016.** "Dissection of cell wall assembly dynamics during early embryogenesis in the brown alga *Fucus* using monoclonal antibodies". *Journal of experimental Botany* **67** (21): 6089-6100.
- **West, J. and Kraft, G., 1996.** "*Ectocarpus siliculosus* (Dillwyn) Lyngb. From Hopkins River Falls, Victoria - the first record of a freshwater brown alga in Australia". *Muelleria*, **9**, 29-33.
- **Wolf, S., Hématy, K., & Höfte, H., 2012.** "Growth control and cell wall signaling in plants". *Annual review of plant biology*, **63**, 381-407.
- **Ye, N., Zhang, X., Miao, M., Fan, X., Zheng, Y., Xu, D., et al., 2015.** "Saccharina genomes provide novel insight into kelp biology". *Nature communications*, **6**, 6986.
- **Zhang, Z., Shrager, J., Jain, M., Chang, C. W., Vallon, O., and Grossman, A. R., 2004.** "Insights into the survival of *Chlamydomonas reinhardtii* during sulfur starvation based on microarray analysis of gene expression". *Eukaryotic cell*, **3(5)**, 1331-1348.

# **Chapitre 7**

## **Conclusions et perspectives**



## Chapitre 7 : Conclusions et perspectives

Ce projet de thèse s'est articulé autour de trois principaux objectifs. Le premier objectif consistait à améliorer les connaissances sur la composition de la paroi des algues brunes, notamment en caractérisant davantage des composés minoritaires nouvellement identifiés, les arabinogalactanes protéines (AGPs). Le deuxième objectif était de valider des anticorps monoclonaux nouvellement produits et spécifiques de polysaccharides pariétaux des algues brunes (alginates et fucanes). Grâce à l'utilisation de ces anticorps, nous avons établi des cartographies détaillées de la répartition des polysaccharides de la paroi au cours du développement précoce du zygote de *Fucus* et des sporophytes d'*Ectocarpus*. Cette étape a permis de mieux comprendre l'architecture pariétale de nos modèles en condition contrôle. Enfin, le troisième objectif s'appuyait sur les deux premiers pour étudier les rôles des polysaccharides de la paroi au cours du développement précoce des deux organismes modèles sélectionnés dans cette étude. Les modifications pariétales ont été étudiées entre différentes souches, différentes espèces et en réponse à différents traitements ou à des variations physico-chimiques de l'environnement.

### I. Les anticorps monoclonaux : des outils essentiels à la biologie pariétale

Contrairement aux études antérieures basées sur des analyses de compositions chimiques de la paroi, l'utilisation des anticorps monoclonaux anti-alginates et anti-fucanes a permis de visualiser *in situ* et à un niveau cellulaire la répartition de différentes fractions polysaccharidiques spécifiques. Si de précédents anticorps spécifiques des polysaccharides de la paroi des algues brunes ont déjà été générés par le passé (Vreeland *et al.*, 1984 ; Green *et al.*, 1993 ; Jones *et al.* 1988 ; Eardley *et al.*, 1990), la structure des polysaccharides ciblés n'était pas connue car aucune caractérisation n'a pu être réalisée à l'époque. Ainsi, pour la première fois **la répartition de différentes fractions d'alginates et de fucanes dans la paroi du zygote de *Fucus* et du sporophyte d'*Ectocarpus* a été visualisée *in situ***. Les cartographies réalisées au cours du développement précoce de nos deux organismes modèles ont permis de **confirmer la spécificité de chaque anticorps pour des classes données de polymères (alginates ou fucanes)**.

A travers les résultats qui découlent de cette thèse, nous montrons que ces anticorps monoclonaux sont des outils intéressants pour la biologie de la paroi chez **les algues brunes**. Tout au long de ce manuscrit, ces outils ont été utilisés pour étudier la répartition et suivre la localisation de polymères pariétaux particuliers au cours du développement, en réponse à différents traitements ou conditions de cultures. Nous avons montré que **l'emploi de ces derniers permettait d'établir et d'étudier des liens fonctionnels entre des fractions spécifiques et le développement précoce des algues brunes**. Leur utilisation confirme que **le développement des algues brunes repose sur une régulation fine et complexe du dépôt de différentes fractions polysaccharidiques**. La validation de ces outils offrent de **nombreuses perspectives d'études pour cette lignée**, d'autant plus qu'ils peuvent être utilisés en combinaison à d'autres méthodes que la microscopie optique.

Afin d'améliorer notre compréhension sur les relations qui pourraient exister entre les différents polysaccharides de la paroi, des études d'**immunomarquages en microscopie électronique à transmission** peuvent être réalisées. Outre une **observation de l'ultrastructure de la paroi**, cette technique pourrait, par exemple, permettre de **confirmer une relation entre certains fucanes sulfatés et des protéines pariétales**. La microscopie électronique à balayage pourrait également être utilisée pour **visualiser la surface de la paroi**. La validation des anticorps monoclonaux anti-alginates et anti-fucanes offre également la possibilité de réaliser des **analyses globales ou à haut débit et du profilage de paroi**. En effet, ces sondes peuvent être utilisées en glyco-array. La **CoMPP (Comprehensive Microarray Polymer Profiling) est un outil performant pour détecter des épitopes dans des mélanges polysaccharidiques complexes** (Moller *et al.*, 2007). Ainsi, la composition pariétale de plusieurs échantillons peut être rapidement analysée en fonction des différentes saisons, des conditions environnementales ou encore selon la localisation géographique de différents plants. Enfin, ces sondes pourront être utilisées avec une **méthode de détection des épitopes en chromatographie** (EDC pour 'Epitope detection Chromatographie) qui **permet de disséquer l'hétérogénéité de la structure pariétale et les interconnexions** qui pourraient exister entre les polymères (Cornuault *et al.*, 2014).

Contrairement aux alginates, les fucanes de paroi des algues brunes sont des polysaccharides très complexes et des variations chimiques sont observées entre les fucanes de la paroi des Fucales et des Ectocarpales. Or, les anticorps monoclonaux anti-fucanes, présentés dans cette étude, ont été générés en immunisant des rats avec des fucanes de *Fucus vesiculosus*. Ainsi, **il est possible que des fucanes essentiels dans la paroi d'organismes n'appartenant**

**pas à l'ordre des Fucales ne soient pas détecté** par les quatre anticorps aujourd'hui disponibles, notamment chez *Ectocarpus*. De plus, lors de cette étude, nous avons constaté que la **plasticité morphologique de certaines algues comme *Ectocarpus* rend difficile la comparaison entre différents réplicats**, ce qui nécessite un travail plus exhaustif pour conclure sur les résultats observés. Ainsi, chez *Ectocarpus*, il est plus difficile de mettre en évidence d'éventuelles co-localisations de différents épitopes. Une des solutions seraient de réaliser un double marquage avec des fluorochromes différents portés par des anticorps secondaires distincts. Cependant, les anticorps anti-alginates et anti-fucanes ont tous été produits chez le rat. A l'avenir, si des anticorps monoclonaux dirigés contre d'autres composés de paroi comme les AGPs sont produits, il pourrait être intéressant de les produire chez un autre animal que le rat afin de pouvoir envisager des doubles immunomarquages. Enfin, il n'est pas possible de marquer *in situ* des cellules vivantes, ce qui pourrait faciliter les études concernant la modification des épitopes dans la paroi des algues brunes au cours du temps. En effet, la forte salinité du milieu marin altère la fixation des anticorps à leurs épitopes. Toutefois, l'utilisation de souches d'eau douce ou tolérantes à de faibles salinités pourrait être envisagée. Pour le moment, seul un panel d'anticorps anti-alginates et anti-fucanes est disponible.

## II. La biologie de la paroi dans le développement du zygote de *Fucus* et des sporophytes d'*Ectocarpus*

Les cartographies de la paroi réalisées au cours du développement précoce de nos deux organismes modèles ont permis d'observer une répartition particulière, **dans le temps et dans l'espace, des différentes fractions polysaccharidiques**. Ceci est particulièrement vrai pour les fucanes. Par le passé, plusieurs auteurs avaient déjà observé des populations de fucanes particulières chez les zygotes de *Fucales* et avaient émis l'hypothèse de rôles distincts dans la polarisation des zygotes (Quatrano & Stevens, 1976 ; Kropf *et al.*, 1988; Berger *et al.*, 1994; Bisgrove & Kropf, 2001) ou dans la régulation ionique liée au développement (Taylor *et al.*, 1996). Ici, **nous confirmons que différentes fractions de fucanes sulfatés sont différemment distribuées dans la paroi et que des fonctions distinctes leur sont associées**. Ainsi, les fucanes sulfatés détectés par l'anticorps BAM3 chez le zygote de *Fucus* agissent comme un marqueur de position pour l'émergence du rhizoïde, alors que ceux détectés par BAM4 aurait plutôt des propriétés d'osmorégulation de la surface cellulaire. La plus forte détection de ces

fucanes aux apex, aussi bien chez le zygote de *Fucus* que chez les sporophytes d'*Ectocarpus*, nous a conduit à nous intéresser plus particulièrement à leur rôle dans le développement. Initialement, il avait été suggéré que la présence de polysaccharides sulfatés dans la paroi des végétaux marins, dont les fucanes chez les algues brunes, joueraient un rôle dans la régulation ionique liée à une adaptation à la forte salinité du milieu marin (Mabeau & Kloareg 1987 ; Torode *et al.*, 2015). Les expériences de cultures d'*E. subulatus* à une faible ou forte concentration de salinité n'ont pas montré de modifications de la détection dans la paroi des fucanes sulfatés détectés par BAM4 entre ces deux conditions, indiquant que **la présence de cette fraction n'est pas régulée par la salinité du milieu**. En revanche, nous avons pu constater que l'absence de sulfate dans le milieu altère la sulfatation des fucanes dans la paroi et, que ceci est corrélé à une altération de la croissance des filaments chez *Ectocarpus*. Ainsi, notre étude nous permet de confirmer que **la présence de sulfate inorganique est strictement nécessaire à la sulfatation des fucanes pariétaux**. Pour la première fois, nous montrons que la présence de polysaccharides sulfatés dans la paroi des algues brunes ne serait pas une adaptation liée à une forte concentration en ions dans le milieu marin, mais plutôt dépendante de la présence de sulfates inorganiques. D'autre part, nous mettons en évidence que **la sulfatation des fucanes pariétaux est nécessaires à la croissance apicale** chez les algues brunes.

Les résultats présentés dans ce manuscrit posent de **nombreux questionnements quant aux mécanismes exacts qui permettent aux fucanes sulfatés de réguler l'élongation cellulaire apicale** chez les algues brunes. Dans le but de répondre à ces questionnements, de nouvelles études devront être effectuées. Par exemple, pour observer un possible impact sur la régulation du champ électrique intracellulaire, **des mesures de gradients calciques de la cellule apicale** pourraient être effectuées et comparées entre des filaments avec et sans fucanes sulfatés pariétaux. De plus, l'ultrastructure de la paroi de la cellule apicale et d'éventuels changements engendrés par des variations de la concentration saline et/ou en sulfate pourrons être observés en microscopie électronique.

Dans ce manuscrit, nous montrons principalement l'implication des fucanes dans le développement précoce des algues brunes. Néanmoins, nos résultats indiquent également un rôle important des alginates. Ainsi, les expériences préliminaires réalisées en ajoutant de l'enzyme ManC5-E dans le milieu de culture d'*E. siliculosus* ont indiqué un impact **sur le développement, bien que les mécanismes restent inconnus**. Il serait intéressant de réaliser

des études s'appuyant sur le rôle des différentes fractions d'alginate de paroi lors du développement. Par exemple, d'autres expériences pourraient être réalisées avec d'autres ManC5-E recombinantes qui pourraient-être produites au cours des prochaines années. De plus, le marquage des  $\beta$ -glucanes (cellulose) montrent que quel que soit l'organisme étudié, ces derniers sont uniquement absents au site de croissance apicale, suggérant un rôle dans le renforcement mécanique de la paroi.

Dans cette étude, seul le développement précoce de la phase sporophytique du cycle de vie d'*Ectocarpus* a été étudié. Contrairement au sporophyte, le gamétophyte possède, comme le zygote de *Fucus*, une première division cellulaire asymétrique. Afin de comparer **les différences qui pourraient être liées à la disparité de développement et de morphologie observées entre le sporophyte et le gamétophyte**, il pourrait être intéressant d'observer la **dynamique des polymères de paroi au cours du développement précoce du gamétophyte**. De plus, un parallèle pourrait-être effectué entre la différence de répartition des polymères au cours de la première division asymétrique entre deux organismes d'ordres différents. Toutefois, comme le gamétophyte se détache de son substrat au cours de son développement précoce et flotte dans le milieu, il est nécessaire de pallier à cette difficulté technique pour réaliser cette étude.

### III. Origine et nature des AGPs chez les algues brunes

Initialement uniquement attribués à la lignée des plantes et des algues vertes, nous avons au cours de ce projet, mis pour la première fois en évidence la **présence d'AGPs dans la paroi des algues brunes**. Comme les principaux polysaccharides de paroi, les AGPs sont spatio-temporellement distribués au cours du développement précoce. Comme pour les plantes, nous avons montré que ces glycoprotéines sont impliquées dans les processus d'embryogénèse avec un **rôle dans les processus d'élongation cellulaire chez le zygote de *Fucus***.

Les analyses génomiques ont mis en évidence une association des gènes candidats codants des AGPs avec des domaines protéiques liés à **des fonctions de détection et de remodelage du compartiment pariétal**. En utilisant les anticorps monoclonaux anti-alginate et anti-fucanes, nous avons confirmé l'implication des AGPs **dans la régulation de la dynamique des polysaccharides pariétaux, dont les fucanes sulfatés détectés par BAM4**. Or, les derniers travaux présentés dans ce manuscrit indiquent que cette fraction particulière de fucanes est impliquée dans la croissance apicale chez les algues brunes. Des études devront être

réalisés pour comprendre, plus en détail, les **mécanismes de régulation directe ou indirecte des AGPs sur la distribution de ces fucanes sulfatés dans la paroi.**

Nos résultats posent de nouvelles **questions quant à l'origine de ces glycoprotéines dans les différentes lignées végétales.** Aujourd'hui, deux scénarios évolutifs sont proposés. Le premier scénario propose la perte des AGPs chez les Rhodophytes alors que le deuxième, plus parcimonieux, propose un **événement cryptique** impliquant une **endosymbiose d'une algue verte unicellulaire ancestrale.**

Au cours de notre étude, nous avons mis en évidence **certaines homologies fonctionnelles** entre les AGPs issus des lignées vertes et des algues brunes. Cependant, comme une conséquence de la **distance phylogénétique** qui les séparent et de leurs **différences physiologiques et morphologiques**, les AGPs des algues brunes et des plantes ne partagent pas toutes les mêmes caractéristiques. Même si aucune analyse de la structure glycanique qui décorent les AGPs n'a pour le moment été réalisée chez les algues brunes, l'identification des gènes impliqués dans cette tâche, les glycosyls hydrolases (GHs), apportent quelques informations quant à de possibles disparités de la composition chimique des AGPs. En effet, chez les plantes deux familles de GH, et beaucoup d'autres probablement, sont impliquées dans la synthèse de la partie glycanique : les familles GT31 et GT37. Si des GT31 ont été identifiées dans le génome d'*E. siliculosus*, ce n'est pas le cas des GT37. Il est possible que certaines enzymes impliquées dans cette tâche diffèrent quelque peu entre les deux lignées, d'autant plus qu'une **variété de familles de GTs absent des plantes a été identifiée dans le génome des algues brunes.** Au vue de ces résultats, la comparaison directe de leur système et de leur production entre ces deux lignées est un challenge. Des travaux d'extraction et de purification des AGPs d'algues brunes sont actuellement en cours au laboratoire. Des analyses structurales seront réalisées sur ces extraits : composition en monosaccharides, digestions enzymatiques et profilage en spectrométrie de masse. Ces dernières pourront nous indiquer le degré de similitude ou de divergence entre les AGPs d'algues brunes et de plantes. Afin d'étudier leur répartition cellulaire et tissulaire dans la paroi, ces résultats seront utilisés pour générer des anticorps spécifiques des AGPs d'algues brunes.

Les sporophytes d'*Ectocarpus* émettent un **facteur diffusible** capable d'induire une reprogrammation de protoplastes ou méiospores issus de gamétophytes en un sporophyte fonctionnel (Arun *et al.*, 2013). Actuellement, des travaux de thèse concernant la détermination de la nature de ce facteur diffusible sont réalisés à la station de Roscoff par Yao Haiqin. Les premiers résultats de ces travaux montrent, entre autres, un poids moléculaire important et une

coloration des extraits par les réactifs de Yariv, ce qui semblerait indiquer que le facteur diffusible pourrait-être une AGP (Yao Haiqin, communication personnelle). D'autre part, aucune conversion en sporophyte n'a été observé lorsque le facteur diffusible était appliqué sur des protoplastes issus du **mutant oro d' *E. siliculosus*** dont la génération du sporophyte manifeste une conversion en gamétophyte fonctionnel (Coelho *et al.*, 2011), indiquant que **le mutant est insensible à l'effet du facteur diffusible** (Yao Haiqin, communication personnelle). Ces nouvelles informations pourraient apporter des connaissances supplémentaires à la fois sur la composition des AGPs et de leurs rôles, mais aussi, en comparant des individus sensibles et d'autres résistants, des informations concernant les voies de signalisation impliqués dans la régulation de ces processus.

Pour le moment, les études fonctionnelles des AGPs ont uniquement étaient réalisées chez le zygote de *Fucus*. Les expériences préliminaires que nous avons effectuées chez *E. siliculosus* ont montré qu'il était nécessaire d'adapter les protocoles et les outils pour l'étude des AGPs issus des algues brunes. De plus, les extractions d'AGPs réalisées chez plusieurs espèces ont indiqué des associations différentes entre les AGPs et les autres composants de paroi (alginate et fucanes), sous entendant des variations de la structure des chaînes glycanes selon l'ordre auquel appartient l'organisme. Ces résultats indiquent que, en partie à causes des grandes variations physiologiques et morphologiques qui existent chez les algues brunes, les outils et les protocoles doivent également être adaptés en fonction du modèle d'algue brune étudié.



# **Annexes**

## Annexes

### Annexe 1 :

#### Avantages et limites des deux organismes modèles utilisés dans cette étude : le zygote de *Fucus* et *Ectocarpus*

	<i>Zygote de Fucus</i>	<i>Ectocarpus</i>
<b>Avantage</b>	<p>Littérature abondante :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• La paroi joue un rôle majeur dans l'embryogenèse</li> <li>• La distribution des principaux polysaccharides pariétaux au cours du développement est connue.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Données morphométriques détaillées du sporophyte</li> <li>• Etudes sur le programme de développement</li> <li>• De nombreuses souches et écotypes différents sont disponibles</li> </ul>
<b>Avantages en laboratoire</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Il est facile à manipuler.</li> <li>• La fécondation <i>in vitro</i> produit une grande quantité de zygotes.</li> <li>• Le développement est synchrone.</li> <li>• Les approches pharmacologiques sont facilement applicables</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Le cycle de vie est entièrement reproductible en laboratoire.</li> <li>• Le taux de fécondation est important et la croissance rapide.</li> <li>• Plusieurs outils sont disponibles : données en 'omics', mutants, morphogène naturel</li> </ul>
<b>Limites</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• La fécondation est hivernale (saisonnalité).</li> <li>• Seuls les stades précoces peuvent être cultivés en laboratoire.</li> <li>• Il n'y a pas d'outils génomiques et génétiques disponibles</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sa petite taille le rend plus difficile à manipuler et à observer.</li> <li>• Les connaissances sur la paroi sont limitées.</li> </ul>

## Annexe 2 :

### **Le génome d'*E. subulatus* : une algue brune très tolérante au stress**

#### **Présentation de l'article :**

Au cours de ma thèse, j'ai participé à l'annotation du génome d'*E. subulatus*. Le but de ces travaux était d'établir une base génomique pour l'utilisation de cette espèce, comme modèle comparatif dans l'étude des mécanismes de tolérance au stress, et en particulier à la salinité chez *Ectocarpus*.

Le papier concernant ces travaux est actuellement en cours de rédaction. La partie ci-après, portant sur les gènes de paroi, est relativement plus détaillée que celle qui sera incluse dans le papier final. Dans ce document, la comparaison entre la souche marine d'*E. siliculosus* et la souche tolérante à de grandes variations de salinité *E. subulatus* montre que malgré la différence d'habitats, seules des différences mineures du nombre de gènes de familles connues ont été observées. Les fortes similitudes du nombre de CAZymes observés entre les deux souches suggèrent que les fonctions propres à ces derniers sont probablement toujours essentielles malgré le changement d'habitat. Il est ainsi fortement probable que la différence d'adaptabilité aux variations de la salinité de l'environnement de ces deux souches concerne plutôt la régulation de l'expression des gènes, qu'une perte ou une expansion des familles de gènes. Cependant, une expansion du génome de 23% est observée pour *E. subulatus* par rapport à *E. siliculosus*. De nombreux gènes ont une fonction encore inconnue et dans le cas des voies de biosynthèse des polysaccharides de paroi, seules l'étape terminale de la voie de biosynthèse des alginates (ManC5-E) est connue et validée. Il est possible que des gènes dont les fonctions sont pour l'heure inconnues diffèrent entre les deux souches.

# The genome of *Ectocarpus subulatus*, a highly stress-tolerant brown alga

---

Simon M. Dittami<sup>1</sup>, Erwan Corre<sup>2</sup>, Noé Pontoizeau<sup>1,2</sup>, Alexandre Cormier<sup>1</sup>, Komlan Avia<sup>1</sup>, Jonas Collen<sup>1</sup>, Ludovic Delage<sup>1</sup>, Sylvie Doubleau<sup>3</sup>, Angélique Gobet<sup>1</sup>, Irène Gonzales<sup>4</sup>, Agnes Groisillier<sup>1</sup>, Loraine Guéguen<sup>2</sup>, Cecile Hervé<sup>1</sup>, Hetty Kleinjan<sup>1</sup>, Aga Lipinska<sup>1</sup>, Xi Liu<sup>2</sup>, Dominique Marie<sup>5</sup>, Andre E. Minoche<sup>4</sup>, Misharl Monsor<sup>2</sup>, Marie-Mathilde Perrineau<sup>1</sup>, Akira F. Peters<sup>6</sup>, Amandine Siméon<sup>1</sup>, Hwan Su Yoon<sup>7</sup>, Heinz Himmelbauer<sup>4</sup>, Catherine Boyen<sup>1</sup>, Thierry Tonon<sup>1,8</sup>

<sup>1</sup> Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, CNRS, UMR8227, Integrative Biology of Marine Models, Station Biologique, CS 90074, 29688 Roscoff cedex, France.

<sup>2</sup> ABiMS platform, FR 2424 CNRS UPMC, Station Biologique, CS 90074, 29688 Roscoff cedex, France.

3

4

5

6

7

8

## Introduction

Brown algae (Phaeophyceae) are multicellular photosynthetic organisms that have colonized rocky coast of the world's temperate regions. In many places, they constitute the dominant vegetation in the intertidal zone and forming large kelp forests that harbor highly diverse communities the subtidal. Economically, brown algae are harvested as food, or for industrial purposes, such as the extraction of Alginates (McHugh 2003). According to the FAO the worldwide annual harvest of brown algae has reached 10 million tons by 2014 and is constantly growing (Food and Agriculture Organization of the United Nations 2016). Although brown algae share the basic photosynthetic machinery with other algae and with land plants as their plastids are most likely derived from a secondary endosymbiosis event with a red alga, they belong to an independent lineage of Eukaryotes, the stramenopiles. This unique phylogenetic background, together with their distinct habitat, contributes to the fact that brown algae have evolved numerous unique metabolic pathways, life cycle features, and stress tolerance mechanisms.

To enable functional studies of brown algae, strain Ec32 of the small filamentous alga *Ectocarpus* sp. has been established as a genetic and genomic model organism (Peters *et al.* 2004; Heesch *et al.* 2010; Cock, Sterck, *et al.* 2010). More recently two further brown algal genomes, that of the kelp species *Saccharina japonica* (Ye *et al.* 2015) and that of *Cladosiphon okamuranus* (Mozuku), a seaweed cultivated for human consumption (Nishitsuji *et al.* 2016) have followed. Comparisons between these three genomes have allowed researchers to obtain a first overview of the unique genomic features of brown algae, as well as glimpse of the genetic diversity within this group, but given the evolutionary distance between these algae it is very difficult to link specific genomic differences between strains to physiological differences and possible adaptations to their lifestyle. To be able to generate more specific hypothesis on the role of specific genes and genomic features for specific adaptive traits a common strategy is to compare closely related strains and species that differ on in a few genomic features. The genus *Ectocarpus* is particularly well-suited for such comparative studies, because it comprises a wide range of genetically distinct strains and species that have adapted to different environments (Stache-Crain *et al.* 1997). One species within this group, *Ectocarpus subulatus* (Peters *et al.* 2015), comprises isolates that have been shown to be highly resistant to high temperature (Bolton 1983) and low salinity. A strain of this species was even isolated from freshwater (West and Kraft 1996), constituting one of

only a hand full of known marine-freshwater transitions in brown algae (Dittami *et al.* 2017). *Ectocarpus subulatus* has separated from the genome-sequenced strain approximately 16 Mya (Dittami *et al.* 2012).

Here we present the draft genome sequence of a haploid male strain of the species *E. subulatus* establishing the genomic basis for the use of this species as a comparative model for the study stress tolerance mechanisms and in particular low salinity tolerance in *Ectocarpus*. Similar strategies have previously been successfully employed with terrestrial plants, where “extremophile” relatives of model- or economically relevant species have been sequenced to explore new stress tolerance mechanisms in the green lineage (Amtmann, 2009; Dassanayake *et al.* 2011; Oh *et al.* 2012; Dittami and Tonon 2012; Ma *et al.* 2013; Zeng *et al.* 2015). These data provide insights into the dynamics of *Ectocarpus* genome evolution and divergence, highlight important adaptive processes, such as a potentially retrotransposon driven expansion of the family of Chlorophyll-binding proteins with subsequent diversification. Most importantly, they underline once more that most of the observed differences overserved between strains correspond to proteins with yet unknown functions.

## **Results/Discussion**

*Only the paragraph in which I have been actively involved in terms of analyses and writing is shown.*

### **Carbon storage and cell wall metabolism**

*Overview of the carbohydrate active enzymes in E. subulatus*

Carbohydrate active enzymes (CAZymes) are key enzymes for the synthesis and the degradation of oligo- and polysaccharides. They include the glycoside hydrolases (GHs) and the polysaccharide lyases (PLs), both involved in the cleavage of glycosidic linkages, the glycosyltransferases (GTs) which create glycosidic linkages, and additional enzymes such as the carbohydrate esterases (CEs) which remove methyl or acetyl groups from substituted polysaccharides. Based on sequence similarities these CAZymes are classified into protein families (<http://www.cazy.org/>; Cantarel *et al.*, 2009). Marine algae have cells surrounded by a carbohydrate-rich cell-wall which is known to include sulfated polysaccharides. Genome sequences from marine algae are thus expected to additionally contain sulfatases and sulfotransferases to remove and add sulfate groups to sugar moieties, respectively. The

genome of the brown alga *E. subulatus* encodes 37 GHs (belonging to 17 GH families), 94 GTs (belonging to 28 GT families), 9 sulfatases (family S1-2), 13 sulfotransferases and lacks genes homologous to known PLs and CEs (**Table X**). In term of CAZY family number, these results are within the same range than the number of families found in the *E. siliculosus* and *S. japonica* genomes (Cock *et al.*, 2010; Ye *et al.*, 2015). In term of the total CAZY gene number, the results are slightly lower in *E. subulatus* as compared to the other two genomes, and the difference is particularly pronounced with *S. japonica*, which features an expansion of certain CAZY families (i.e. 82 GHs belonging to 17 GH families, 131 GTs belonging to 31 GT families), likely to relate to the establishment of more complex tissues in the giant kelp alga as compared to the two Ectocarpales.

As in the *E. siliculosus* and *S. japonica* genomes, the *E. subulatus* genome contains some CAZY families that are absent from plant genomes but present in other phyla such as bacteria (GH88), animals (GT23 and GT49) and *Amoebozoa* (GT60). Some variations in the GT families are observed between the three genomes with some families being present in one of the genome while absent in the two others, and the reverse is also true (e.g. GH30, GT15, GT18, GT25, GT28, GT50, GT54, GT65, GT66, GT74, GT77). In such cases the targeted gene number is very low (i.e. the GT24 family has 1 member in *E. siliculosus*, 2 in *E. subulatus* and none in *S. japonica*) and the encoded proteins frequently belong to GT families only poorly defined. Such assignments are therefore to be taken cautiously, and the specific metabolisms or activities in which such genes are involved are even more difficult to predict.

#### *Central and storage carbohydrate metabolism*

Earlier studies on brown algal genomes have shown that regarding their storage carbohydrate metabolism, brown algae not only differ from land plants but also from other marine algae (Cock *et al.*, 2010; Ye *et al.*, 2015). While cells from most phyla store carbohydrates as glycogen or starch, brown algae store carbohydrates as laminarin (Read *et al.*, 1996). Brown algae also show the particularity to use the photoassimilate D-fructose 6-phosphate to produce the alcohol sugar D-mannitol instead of sucrose like in land plants. The *E. subulatus* genome contains similar sets of genes for carbon storage as compared to *E. siliculosus*: namely all the genes encoding enzymes involved in sucrose metabolism and starch biosynthesis are completely absent while all the genes necessary for the trehalose synthesis (trehalose-6-phosphate synthase, trehalose phosphatase, trehalase) and laminarin synthesis and recycling (UDP-glucose pyrophosphorylase,  $\beta$ -1,3-glucan synthases (GT48),  $\beta$ -1,6-glucanases (GH16),



endo-1,3-beta-glucanases (GH16, GH17 and GH81), exo-1,3-beta-glucanases (GH5),  $\beta$ -glucosidases (GH1)) are found.

### *Cell wall metabolism*

Brown algal cell walls are composed predominantly of the polyanionic polysaccharides alginates and fucose-containing sulfated polysaccharides (Popper *et al.*, 2011; Ficko-Blean *et al.*, 2015). These polymers are prevalent over neutral and crystalline components, which include cellulose. Little is known about the molecular basis of cell wall metabolism in brown algae. Exception made of two characterized enzymes involved in the terminal steps of alginate synthesis (i.e. GDP-mannose dehydrogenase (Tenhaken *et al.*, 2011), mannuronan C5-epimerase, ManC5-E (Fischl *et al.*, 2016; Inoue *et al.*, 2016), only candidate genes are suggested for the biosynthetic pathways. The cell wall biosynthesis may follow the same pathways in the three brown algae and putative genes have been previously reported for *E. siliculosus* (Michel *et al.*, 2010). Overall the numbers of genes putatively involved in the alginate, fucan and cellulose synthesis are within the same range between the two Ectocarpales and *S. japonica*, expect an expansion of the GT2 and ManC5-E families in the latter (i.e. 28, 24 and 105 ManC5-E in *E. siliculosus*, *E. subulatus* and *S. japonica*, respectively).

As in land plants, cellulose in brown algae is likely to be synthesized by genes of the GT2 family. Among the 9 GT2 enzymes identified in the *E. subulatus* genome, 8 are homologous to the cellulose synthases and cellulose synthase-like proteins. They are highly similar to the 9 *E. siliculosus* homologues, indicating a limited divergence of the genes between the two Ectocarpales. Only one gene in *E. subulatus* (EsuBft84\_3) has been duplicated in *E. siliculosus* (Esi0097\_0024, Esi0097\_0016). This gene family is expanded in *S. japonica* with 24 GT2. In the three genome sequences, known families of cellulases and expansins are absent, suggesting the existence of novel mechanisms ~~and~~ proteins for cell wall expansion in brown algae as compared to land plants.

More specifically for the biosynthesis of alginate, no homologous genes have been identified yet in *E. subulatus* for the phosphomannomutase, which is supposedly recruited within the first steps of alginate synthesis (Michel *et al.*, 2010) (Table X). Even though alginate is likely enduring active remodeling during algal growth and development, the presence of known alginate lyases is still not reported in the three genome sequences. Genes homologous to the D-4,5 unsaturated  $\beta$ -glucuronyl hydrolase (GH88 family) are reported in the three brown algal genome sequences, with one gene in *E. subulatus* (EsuBft2077\_2) being

appended to a ManC5-E. In other eukaryotes the GH88 is acting specifically on unsaturated oligosaccharides released by polysaccharide lyases. It could indicate that brown algae may possess alginate lyases belonging to novel PL families, albeit only one GH88 gene is reported in *S. japonica*.

Regarding fucan metabolism, several GT families (GT10, GT23, GT65) were previously discussed to be a source of putative candidates for the polymerization of GDP-fucose into the elongating fucan chain (Michel *et al.*, 2010). However no GT65 genes are identified either in the *S. japonica* and *E. subulatus* genomes (Table X). The GT10 family has a very restricted gene number in all the three genomes (one or two genes) while the GT23 family shows an expansion in *S. japonica* (2 genes in the two Ectocarpales and 17 genes in *S. japonica*), making these GT23 genes ideal targets for a functional assessment. The sulfation of polysaccharides, and notably fucans in *E. subulatus*, has previously been shown to be actively regulated according to the surrounding salinity levels (Torode *et al.*, 2015) and these cellular observations correlate the transcriptomic data (Dittami *et al.*, 2012). Considering the environmental contexts, one would expect *E. subulatus* to have a lower rate of polysaccharide sulfation as compare to *E. siliculosus*. The number of genes encoding sulfatases and sulfotransferases in *E. subulatus* is slightly lower as compared to *E. siliculosus*, but the significance of this is probably limited as the gene numbers are within the same range level (8 sulfatases and 6 sulfotransferases in *E. subulatus* as compared to 10 and 7, respectively, in *E. siliculosus*).

#### *Cell wall sensing: the WSC family*

Previous analysis of the *E. siliculosus* genome led to the identification of wall sensing components (WSCs) which form one of the largest protein domain families in *E. siliculosus* (Cock *et al.*, 2010; Michel *et al.*, 2010). The WSC domains were initially found in yeasts (Verna *et al.*, 1997) where they act as cell surface mechanosensors, behaving as a nanospring capable of sensing mechanical forces acting either on the cell wall or on the plasma membrane. In response to an hypo-osmotic shock they have been shown to activate the intracellular cell wall integrity signaling cascade in yeast, which includes the regulation of the actin network rearrangements (Dupres *et al.*, 2009; Gualtieri *et al.*, 2004; Verna *et al.*, 1997). In brown algae, these WSC domains may also regulate wall rigidity, through the control of the activity of appended enzymes, such as ManC5-E which act on alginates (Hervé *et al.*, 2016). Surprisingly this family is reduced in *E. subulatus* as compared to *E. siliculosus* with the identification of around 70 versus 115 WSC domains, respectively.

GENES:	<i>E. si</i>	<i>E. su</i>	<i>S. ja</i>		GENES:	<i>E. si</i>	<i>E. su</i>	<i>S. ja</i>		GENES:	<i>E. si</i>	<i>E. su</i>	<i>S. ja</i>
<b>Glycoside hydrolases</b>					<b>Glycosyltransferases</b>					GT57	2	2	2
GH1	3	2	1		GT1	1	1	3		GT58	1	1	1
GH2	2	3	3		GT2	11	9	24		GT59	1	1	0
GH3	1	1	1		GT4	13	14	13		GT60	3	4	1
GH5	2	2	2		GT7	1	1	1		GT64	2	2	3
GH10	1	1	1		GT8	3	4	5		GT65	1	0	0
GH13	0	0	1		GT10	1	1	2		GT66	1	0	0
GH16	6	7	3		GT13	2	2	1		GT68	0	0	2
GH17	1	1	2		GT14	5	5	1		GT74	1	0	1
GH18	0	0	1		GT15	1	0	0		GT76	1	1	1
GH30	1	0	1		GT18	0	1	0		GT77	1	0	11
GH31	1	1	0		GT20	6	8	4		GT90	0	0	1
GH36	2	2	0		GT22	3	3	2		GT92	0	0	2
GH37	1	1	1		GT23	2	2	17		GTnc	0	6	0
GH38	1	1	0		GT24	1	2	0					
GH47	5	5	2		GT25	3	0	1		<b>alginate metabolism</b>			
GH63	1	1	0		GT27	0	0	1		MPI	4	4	5
GH81	5	4	53		GT28	0	3	4		PMM	1	0	1
GH85	1	1	1		GT31	3*	5	4		MPG	0	0	?
GH88	6	3	1		GT33	1	1	0		GMD	3	2	3
GH95	1	1	0		GT34	1	1	1		MS	2	?	1
GH114	0	0	7		GT41	3	3	4		ManC5-E	28	24	105
GH128	0	0	1		GT47	8	5	14		<b>fucan metabolism</b>			
					GT48	3	4	2		FK	2	1	1
<b>sulfatases &amp; sulfotransferases (ST)</b>					GT49	3	2	1		GFPP	2	1	1
sulfatases	9	9	?		GT50	1	0	1		GM46D	2	2	1
ST	15	13	24		GT54	1	0	0		GFS	1	1	1

**Figure X :** Census of genes involved in cell wall polysaccharides metabolisms in *Ectocarpus siliculosus* (*E. si*), *Ectocarpus siubulatus* (*E. su*), and *Saccharina japonica* (*S. ja*). GH, glycosyle hydrolase; GT, glycosyl transferase; MPI, mannose-6-phosphate isomerase; PMM, phosphomannomutase; MPG, mannose-1-phosphate guanyltransferase; GMD, GDP-mannose 6-dehydrogenase; MS, mannuronan synthase; ManC5-E, mannuronan C5-epimerase; FK, L-fucokinase; GFPP, GDP-fucose pyrophosphorylase; GM46D, GDP-mannose 4,6-dehydratase; GFS, GDP-L-fucose synthetase.

\*for the GT31, 3 encoding genes have been identified in *Ecotcarpus* sp. Ec32 in the genome paper (Cock, Sterck, *et al.* 2010) and companion paper (Michel *et al.* 2010).

## Bibliographies

Amtmann A. 2009. Learning from Evolution: *Thellungiella* Generates New Knowledge on Essential and Critical Components of Abiotic Stress Tolerance in Plants. *Molecular plant* 2: 3–12.

Bolton JJ. 1983. Ecoclinal variation in *Ectocarpus siliculosus* (Phaeophyceae) with respect to temperature growth optima and survival limits. *Marine Biology* 73: 131–138.

Cantarel BL, Coutinho PM, Rancurel C, Bernard T, Lombard V, Henrissat B. 2009. The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics. *Nucleic Acids Research* 37: D233–D238.

Cock JM, Coelho SM, Brownlee C, Taylor AR. 2010. The *Ectocarpus* genome sequence: insights into brown algal biology and the evolutionary diversity of the eukaryotes. *New Phytologist* 188: 1–4.

Cock JM, Sterck L, Rouzé P, et al. 2010. The *Ectocarpus* genome and the independent evolution of multicellularity in brown algae. *Nature* 465: 617–21.

Dassanayake M, Oh D-H, Haas JS, et al. 2011. The genome of the extremophile crucifer *Thellungiella parvula*. *Nature Genetics* 43: 913–918.

Dittami SM, Gravot A, Goulitquer S, et al. 2012. Towards deciphering dynamic changes and evolutionary mechanisms involved in the adaptation to low salinities in *Ectocarpus* (brown algae). *Plant Journal* 71: 366–377.

Dittami SM, Heesch S, Olsen JL, Collén J. 2017. Transitions between marine and freshwater environments provide new clues about the origins of multicellular plants and algae. *Journal of Phycology*.

Dittami SM, Tonon T. 2012. Genomes of extremophile crucifers: new platforms for comparative genomics and beyond. *Genome biology* 13: 166.

Dupres, V, Alsteens, D, Wilk, S, Hansen, B, Heinisch, JJ, & Dufrêne, YF. 2009. The yeast Wsc1 cell surface sensor behaves like a nanospring in vivo. *Nature chemical biology*, 5(11), 857-862.

Ficko-Blean, E, Hervé, C, Michel, G. 2015. Sweet and sour sugars from the sea: the biosynthesis and remodeling of sulfated cell wall polysaccharides from marine macroalgae. *Perspect Phycol*, 2, 51-64.

Fischl, R, Bertelsen, K, Gaillard, F, Coelho, S, Michel, G, Klinger, M., et al., (2016). The cell-wall active mannuronan C5-epimerases in the model brown alga *Ectocarpus*: From gene context to recombinant protein. *Glycobiology*, 26(9), 973-983.

Food and Agriculture Organization of the United Nations F. 2016. Global Production Statistics 1950-2014. <http://www.fao.org/fishery/statistics/global-production/en>. 16 Sep. 2016.

Gualtieri T, Ragni E, Mizzi L, Fascio U, Popolo L. 2004. The cell wall sensor Wsc1p is involved in reorganization of actin cytoskeleton in response to hypo-osmotic shock in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 21: 1107–1120.

Hervé C, Siméon A, Jam M, et al. 2016. Arabinogalactan proteins have deep roots in eukaryotes: identification of genes and epitopes in brown algae and their role in *Fucus serratus* embryo development. *New Phytologist* 209: 1428–1441.

Inoue, A, Satoh, A, Morishita, M, Tokunaga, Y, Miyakawa, T, Tanokura, M, & Ojima, T. 2016. Functional heterologous expression and characterization of mannuronan C5-epimerase from the brown alga *Saccharina japonica*. *Algal Research*, 16, 282-291.

Ma T, Wang J, Zhou G, et al. 2013. Genomic insights into salt adaptation in a desert poplar. *Nature communications* 4: 2797.

McHugh DJ. 2003. A guide to the seaweed industry. FAO Fisheries Technical Paper (FAO, Rome, Italy).

Michel G, Tonon T, Scornet D, Cock JM, Kloareg B. 2010. The cell wall polysaccharide metabolism of the brown alga *Ectocarpus siliculosus*. Insights into the evolution of extracellular matrix polysaccharides in eukaryotes. *The New phytologist* 188: 82–97.

Nishitsuji K, Arimoto A, Iwai K, et al. 2016. A draft genome of the brown alga, *Cladosiphon okamuranus*, S-strain: a platform for future studies of “mozuku” biology. *DNA Research*: dsw039.

Oh D-H, Dassanayake M, Bohnert HJ, Cheeseman JM. 2012. Life at the extreme: lessons from the genome. *Genome biology* 13: 241.

Peters AF, Coucerio L, Tsiamis K, Küpper FC, Valero M. 2015. Barcoding of cryptic stages of marine brown algae isolated from incubated substratum reveals high diversity. *Cryptogamie, Algologie* 36: 3–29.

Popper, ZA, Michel, G., Hervé, C., Domozych, DS, Willats, WG, Tuohy, M.G *et al.*, 2011. Evolution and diversity of plant cell walls: from algae to flowering plants. *Annual review of plant biology*, 62, 567-590.

Read SM, Currie G, Bacic A. 1996. Analysis of the structural heterogeneity of laminarin by electrospray-ionisation-mass spectrometry. *Carbohydrate Research* 281: 187–201.

Stache-Crain B, Müller DG, Goff LJ. 1997. Molecular systematics of *Ectocarpus* and *Kuckuckia* (Ectocarpales, Phaeophyceae) inferred from phylogenetic analysis of nuclear- and plastid-encoded DNA sequences. *Journal of Phycology* 33: 152–168.

Tenhaken, R, Voglas, E, Cock, JM, Neu, V, & Huber, CG. 2011. Characterization of GDP-mannose dehydrogenase from the brown alga *Ectocarpus siliculosus* providing the precursor for the alginate polymer. *Journal of Biological Chemistry*, 286(19), 16707-16715.

Torode TA, Marcus SE, Jam M, et al. 2015. Monoclonal antibodies directed to fucoidan preparations from brown algae. *PloS One* 10: e0118366.

Verna J, Lodder A, Lee K, Vagts A, Ballester R. 1997. A family of genes required for maintenance of cell wall integrity and for the stress response in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94: 13804.

West J, Kraft G. 1996. *Ectocarpus siliculosus* (Dillwyn) Lyngb. from Hopkins River Falls, Victoria - the first record of a freshwater brown alga in Australia. *Muelleria* 9: 29–33.

Ye N, Zhang X, Miao M, et al. 2015. Saccharina genomes provide novel insight into kelp biology. *Nature communications* 6: 6986.

Zeng X, Long H, Wang Z, et al. 2015. The draft genome of Tibetan hulless barley reveals adaptive patterns to the high stressful Tibetan Plateau. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112: 1095–100.

### **Annexe 3 :**

#### **Commentaire sur l'origine des AGPs chez les végétaux (“Delving in the deep for the origin of plant cell surface proteoglycans”)**

##### **Présentation de l'article :**

Le commentaire présenté ci-après a été publié en 2016 dans la revue *New Phytologist* par le professeur Paul Knox de l'université de Leeds. Il fait suite à la publication présentée dans le chapitre 3, concernant la mise en évidence des AGPs chez les algues brunes (Hervé *et al.*, 2016). Ce dernier propose une discussion quant à l'origine de ces protéoglycanes dans les différentes lignées eucaryotes.



## Commentary

### Delving in the deep for the origin of plant cell surface proteoglycans

All major groups of photosynthetic organisms (cyanobacteria, algae and land plants) have cell walls. The evolutionary origin of eukaryotes capable of oxygenic photosynthesis, through a primary endosymbiosis event, is proposed to have been *c.* 1.5 billion years ago, and well before plants established themselves on land with subsequent radiation leading to present day abundance and diversity. Multicellularity, as seen in organisms such as land plants and macroalgae, has evolved several times leading to distinctive mechanisms for cell attachments, cell expansions and cytokinesis. A biochemical feature of land plant cell surfaces is the occurrence of sets of large proteoglycans called arabinogalactan-proteins (AGPs) that have been implicated in signalling events and developmental processes in a diversity of land plant phyla. Now Hervé *et al.*, in this issue of *New Phytologist* (pp. 1428–1441) with a compelling series of experimental approaches, have demonstrated that AGPs are not land plant-specific but are present in the brown algae – a lineage of photosynthetic organisms phylogenetically well-separated from land plants and with ancestral evolutionary origins of multicellularity, and probably cell walls, which are independent of those of land plants.

---

*'Intriguingly, these observations along with the evidence for AGPs in cyanobacteria lead to questions and speculation concerning the evolutionary origin and occurrence of AGPs amongst photosynthetic organisms.'*

---

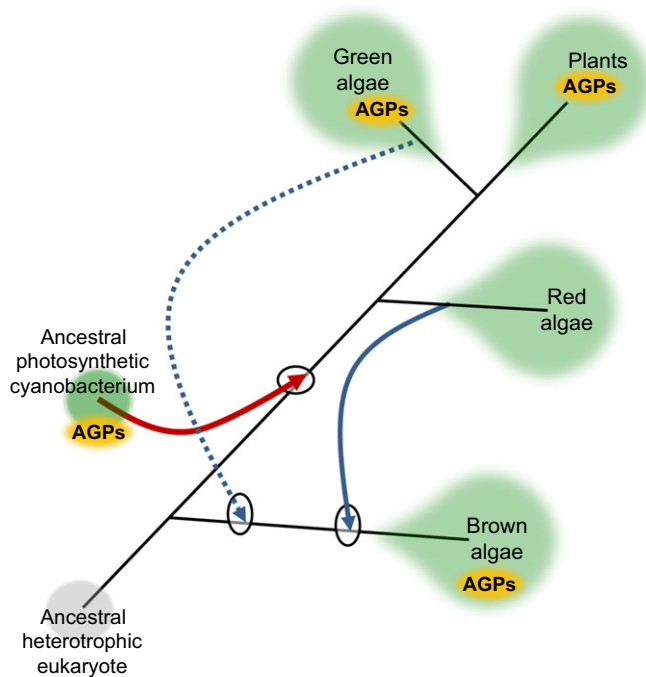
AGPs, occurring at cell surfaces including plasma membranes, cell walls and cell secretions, are one of the most complex families of macromolecules found in plants. They are classed as proteoglycans as their glycan components (based on a framework of  $\beta$ -1,3-galactan with  $\beta$ -1,6-galactan substitutions decorated with arabinosyl, glucuronosyl and other sugars) can account for up to 90% of an AGP molecule (Ellis *et al.*, 2010). AGPs, positioned within a larger group of hydroxyproline-rich glycoproteins found at cell surfaces (Showalter, 2001; Tan *et al.*, 2012), have protein sequences rich in hydroxyproline/proline, alanine and serine/threonine and these appear to direct both proline hydroxylation and O-glycosylation of the arabinogalactan type (Tan *et al.*, 2012). AGPs can be characterized as classical or nonclassical – the former

having a large AGP protein domain and a glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor allowing membrane attachment. An additional feature of AGPs, characteristic of some nonclassical forms, is that they are often components of chimeric structures in which AGP domains (with attached glycans) occur in fusions with other proteins, for example fasciclin domains. This has led to the idea that an AGP component in the context of a larger modular protein may impart, or indeed encode, a particular function such as a signalling or cell wall-modifying property.

Since their discovery over 50 years ago AGPs have become implicated in a wide array of cellular and developmental events. These events and processes, often directly involving cell walls, include cell expansion, cell wall deposition, embryogenesis, tissue patterning, plant defence and organism interactions (Seifert & Roberts, 2007). However, in spite of compelling evidence for AGP involvement in such processes our understanding of the mechanistic basis of (almost certainly multifunctional) AGP action in these processes has remained elusive. Alongside the revelations of the diversity of glycan and protein structures, several molecular tools have been assembled that have contributed insights into AGP biology and generated sets of observations that are highly persuasive of fundamental roles for AGPs in plants. Yariv reagents are synthetic phenyl glycosides that were originally designed to elicit carbohydrate antibodies and subsequently found to selectively bind to and precipitate AGPs from plant materials (Yariv *et al.*, 1967). Yariv reagents are often capable of disrupting biological systems including cell proliferation and pollen tube growth and this bioactivity is an important tool in the uncovering of AGP functions. Additionally, sets of monoclonal antibodies have been assembled and these indicate that AGP glycan microheterogeneity often reflects very early cell patterning and developmental events in embryos and meristems (Showalter, 2001).

#### A nonclassical AGP twist in the brown algae

Recent genome analyses have elucidated to some extent the complex, convoluted and remarkable origins and relationships of the macroalgal groups (Tirichine & Bowler, 2011; Archibald, 2015). A lineage of photosynthetic organisms, the Archaeplastida, encompassing red and green algae and land plants, is proposed to have resulted from a primary endosymbiotic event in which a photosynthetic cyanobacterium was engulfed into an ancestral heterotrophic unicellular eukaryote – see Fig. 1. The highly morphologically and biochemically divergent stramenopiles lineage, that includes brown algae, diatoms and dinoflagellates, is proposed to have resulted from a secondary endosymbiotic event between two eukaryotic cells – a photosynthetic organism from the red algal lineage engulfed by and incorporated into an ancestral unicellular heterotrophic eukaryote (Fig. 1). Such endosymbiosis events are likely to have been phagocytic in nature with cell wall



**Fig. 1** Highly schematic overview of the proposed phylogenetic relationships of the major groups of photosynthetic organisms. Land plants, green algae and red algae are thought to have evolved from a primary symbiosis event (red arrow) involving a cyanobacterium with oxygenic photosynthesis and an ancestral heterotrophic eukaryote. Brown algae of the stramenopiles lineage are proposed to have originated from a secondary endosymbiosis event (blue arrow) involving a red alga and an ancestral heterotrophic eukaryote although some genome evidence suggests the lineage may have originated from serial secondary endosymbiosis events possibly involving a green alga (dashed blue arrow) before the red alga symbiosis event. Arabinogalactan-protein (AGP) cell surface proteoglycans are present in plants along with some evidence for their presence in green algae and cyanobacteria and are now shown to be present in brown algae (Hervé *et al.*, this issue of *New Phytologist*, pp. 1428–1441).

elaborations evolving subsequently. How deep in time these events occurred is unknown.

Much work has demonstrated that AGPs are very widely distributed across land plant phyla. There is some evidence for the occurrence of AGPs outside of land plants with the demonstration of the occurrence of AGP glycan structures and epitopes in members of green algae (Domozych *et al.*, 2012; Fernández *et al.*, 2015) although there is little apparent genomic evidence supporting AGP occurrence in this algal group (Ulsvkov *et al.*, 2013). Evidence for AGPs outside the Viridiplantae grouping encompassing land plants and green algae is, intriguingly, from cyanobacteria and in particular *Nostoc* spp. that form symbiotic associations with land plants (Jackson *et al.*, 2012). The work from Hervé *et al.* comprehensively demonstrates the presence of AGPs in brown algae with the identification of AGP-like protein core sequences, the presence of sequences encoding prolyl-4-hydroxylase enzymes required for the formation of hydroxyproline and O-glycosylation, and the occurrence of AGP glycan epitopes (Hervé *et al.*). Sequence analysis indicates that in the *Ectocarpus siliculosus* genome all AGPs are nonclassical and their protein domains are part of chimeric proteins in conjunction with novel

domains that contribute to cell wall metabolism and sensing. Moreover,  $\beta$ -glucosyl-Yariv reagent can specifically disrupt the early stages of *Fucus serratus* zygote/embryo development (when cellulose/alginate cell walls are being established) and has less impact on later stages (Hervé *et al.*).

Intriguingly, these observations along with the evidence for AGPs in cyanobacteria lead to questions and speculation concerning the evolutionary origin and occurrence of AGPs amongst photosynthetic organisms (Fig. 1). There is no known genetic evidence for the occurrence of AGPs or prolyl-4-hydroxylases in sequenced red algae genomes (Ulsvkov *et al.*, 2013; Hervé *et al.*). This suggests it is not a simple matter of a genetic origin of AGPs in an early photosynthetic eukaryote, or even the cyanobacterial ancestor, that has been carried to extant groups of eukaryotic photosynthetic organisms through endosymbiotic gene transfer. Possibilities include a loss of AGPs from the red algae lineage. It is also thought that serial secondary or tertiary endosymbiotic events may have contributed to the stramenopiles lineage with some possible genetic remnants of an earlier incorporation of a green alga before the well documented red alga endosymbiosis event (Facchinelli *et al.*, 2013; Archibald, 2015). Effective endosymbiotic cell fusions and subsequent establishment of important lineages are likely to have been highly complex events possibly involving many lateral gene transfer events and/or recruitment of genetic capabilities that led by convergent evolution to similar functional outcomes (Facchinelli *et al.*, 2013).

Whatever the genetic contributions from descent, convergence and/or lateral transfer the demonstration of the occurrence of AGPs at the surface of brown algal cells extends the field in two ways. It has the potential to invigorate the *Fucus* spp. zygote developmental system and the genetic model *Ectocarpus* spp. as tractable cell biological systems for the study of AGP functions. Second, the identification of AGPs in brown algae provides multicellular systems with a different origin to that of land plants and in which AGPs are present in different macromolecular contexts in terms of cell wall matrix polysaccharides albeit with cellulose as a common component. In differing growth environments with widely varied mechanical and ionic conditions land plant and brown algal cell wall matrix molecules presumably accommodate and mediate respective requirements in relation to cell wall and physiological functions. Across the land plants cell wall matrix glycans are largely acidic pectins and polysaccharides such as xyloglucans and heteroxylans. In brown algae the major cell wall matrix components are alginates and sulphated fucans. The occurrence of AGPs at cell surfaces alongside the calcium ion binding polysaccharides pectic homogalacturonan and alginates is intriguing. This is particularly the case in light of the identification of AGPs as important calcium ion binding molecules and their proposed role as calcium flux capacitors with a central regulatory role linked to auxin (Lampert *et al.*, 2014). The new knowledge of the occurrence of AGPs in brown algae adds significantly to the resources available to understand these intriguing molecules. It also, of course, can provoke further thought and study on aspects of cellular and molecular exchanges in deep time that led to the evolutionary origins of cell walls and the phyla of extant multicellular photosynthetic organisms that are so important to the planet.

## Acknowledgements

The author wishes to thank Steven Ball for a timely and stimulating discussion.

**Paul Knox**

Centre for Plant Sciences, Faculty of Biological Sciences,  
University of Leeds, Leeds, LS2 9JT, UK  
(tel +44 0113 3433169; email j.p.knox@leeds.ac.uk)

## References

- Archibald JM. 2015. Genomic perspectives on the birth and spread of plastids. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 112: 10147–10153.
- Domozych DS, Ciancia M, Fangel JU, Mikkelsen JD, Ulvskov P, Willats WGT. 2012. The cell walls of green algae: a journey through evolution. *Frontiers in Plant Science* 3: 82.
- Ellis M, Egelund J, Schultz CJ, Bacic A. 2010. Arabinogalactan-proteins: key regulators at the cell surface. *Plant Physiology* 153: 403–419.
- Facchinelli F, Colleoni C, Ball SG, Weber APM. 2013. Chlamydia, cyanobiont, or host: who was on top in the ménage à trois? *Trends in Plant Science* 18: 673–679.
- Fernández PV, Raffo MP, Alberghina J, Ciancia M. 2015. Polysaccharides from the green seaweed *Codium decortatum*. Structure and cell wall distribution. *Carbohydrate Polymers* 117: 836–844.
- Hervé C, Siméon A, Jam M, Cassin A, Johnson KL, Salmeán AA, Willats WGT, Doblin MS, Bacic A, Kloareg B. 2016. Arabinogalactan proteins have deep roots in eukaryotes: identification of genes and epitopes in brown algae and their role in *Fucus serratus* embryo development. *New Phytologist* 209: 1428–1441.
- Jackson O, Taylor O, Adams DG, Knox JP. 2012. Arabinogalactan proteins occur in the free-living cyanobacterium genus *Nostoc* and in plant–*Nostoc* symbioses. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 25: 1338–1349.
- Lampert DTA, Varnai P, Seal CE. 2014. Back to the future with the AGP-Ca<sup>2+</sup> flux capacitor. *Annals of Botany* 114: 1069–1085.
- Seifert G, Roberts K. 2007. The biology of arabinogalactan proteins. *Annual Review of Plant Biology* 58: 137–161.
- Showalter AM. 2001. Arabinogalactan-proteins: structure, expression and function. *Cellular Molecular Life Sciences* 58: 1399–1417.
- Tan L, Showalter AM, Egelund J, Hernandez-Sanchez A, Doblin MS, Bacic A. 2012. Arabinogalactan-proteins and the research challenges for these enigmatic plant cell surface proteoglycans. *Frontiers in Plant Science* 3: 140.
- Tirichine L, Bowler C. 2011. Decoding algal genomes: tracing back the history of photosynthetic life on Earth. *Plant Journal* 66: 45–57.
- Ulvskov P, Paiva DS, Domozych D, Harholt J. 2013. Classification, naming and evolutionary history of glycosyltransferases from sequenced green and red algal genomes. *PLoS ONE* 8: e76511.
- Yariv J, Lis H, Katchalski E. 1967. Precipitation of arabic acid and some seed polysaccharides by glycosylphenylazo dyes. *Biochemical Journal* 105: 1C–2C.

**Key words:** arabinogalactan-proteins (AGPs), brown algae, cell walls, *Ectocarpus* spp., endosymbiosis events, *Fucus* spp., plant cell surface proteoglycans.



## About New Phytologist

- *New Phytologist* is an electronic (online-only) journal owned by the New Phytologist Trust, a **not-for-profit organization** dedicated to the promotion of plant science, facilitating projects from symposia to free access for our Tansley reviews.
- Regular papers, Letters, Research reviews, Rapid reports and both Modelling/Theory and Methods papers are encouraged. We are committed to rapid processing, from online submission through to publication 'as ready' via *Early View* – our average time to decision is <27 days. There are **no page or colour charges** and a PDF version will be provided for each article.
- The journal is available online at Wiley Online Library. Visit **www.newphytologist.com** to search the articles and register for table of contents email alerts.
- If you have any questions, do get in touch with Central Office (np-centraloffice@lancaster.ac.uk) or, if it is more convenient, our USA Office (np-usaoffice@lancaster.ac.uk)
- For submission instructions, subscription and all the latest information visit **www.newphytologist.com**

## **Références bibliographiques**

## References bibliographiques

- **Ale, M. T., & Meyer, A. S., 2013.** “Fucoidans from brown seaweeds: an update on structures, extraction techniques and use of enzymes as tools for structural elucidation”. *RSC Advances*, **3(22)**, 8131-8141.
- **Ale, M. T., Mikkelsen, J. D., & Meyer, A. S., 2011.** “Important determinants for fucoidan bioactivity: A critical review of structure-function relations and extraction methods for fucose-containing sulfated polysaccharides from brown seaweeds”. *Marine drugs*, **9(10)**, 2106-2130.
- **Alessa, L., & Kropf, D. L., 1999.** “F-actin marks the rhizoid pole in living *Pelvetia compressa* zygotes”. *Development*, **126(1)**, 201-209.
- **Anastyuk, S. D., Shevchenko, N. M., Ermakova, S. P., Vishchuk, O. S., Nazarenko, E. L., Dmitrenok, P. S., & Zvyagintseva, T. N., 2012.** “Anticancer activity in vitro of a fucoidan from the brown alga *Fucus evanescens* and its low-molecular fragments, structurally characterized by tandem mass-spectrometry”. *Carbohydrate Polymers*, **87(1)**, 186-194.
- **Anastyuk, S. D., Shevchenko, N. M., Usoltseva, R. V., Silchenko, A. S., Zadorozhny, P. A., Dmitrenok, P. S., & Ermakova, S. P., 2017.** “Structural features and anticancer activity in vitro of fucoidan derivatives from brown alga *Saccharina cichorioides*.” *Carbohydrate polymers*, **157**, 1503-1510.
- **Anderson, R. L., Clarke, A. E., Jermyn, M. A., Knox, R. B., & Stone, B. A., 1977.** “A carbohydrate-binding arabinogalactan-protein from liquid suspension cultures of endosperm from *Lolium multiflorum*”. *Functional Plant Biology*, **4(1)**, 143-158.
- **Andrade, L. R., Leal, R. N., Nosedá, M., Duarte, M. E. R., Pereira, M. S., Mourão, P. A., ... & Amado Filho, G. M., 2010.** “Brown algae overproduce cell wall polysaccharides as a protection mechanism against the heavy metal toxicity”. *Marine Pollution Bulletin*, **60(9)**, 1482-1488.
- **Aquino R.S., Landeira-Fernandez A.M., Valente A.P., Andrade L.R., Mourão P.A.S., 2005.** “Occurrence of sulfated galactans in marine angiosperms: Evolutionary implications”. *Glycobiology*. **15**, 11–20.
- **Aquino, R. S., Grativol, C., & Mourão, P. A., 2011.** “Rising from the sea: correlations between sulfated polysaccharides and salinity in plants”. *PloS one*, **6(4)**, e18862.

- **Archibald J. M., Keeling P.J., 2002.** “Recycled plastids: a “green movement” in eukaryotic evolution”. *Trends Genet* **18**:577–584.
- **Archibald, J. M., 2015.** “Endosymbiosis and eukaryotic cell evolution”. *Current Biology*, “, R911-R921.
- **Arun, A., Peters, N. T., Scornet, D., Peters, A., Cock, J. M., Coelho S., 2013.** “Non-cell autonomous regulation of life cycle transitions in the model brown alga *Ectocarpus*”. *New Phytologist* **192** (2), 503-510
- **Bacic, A., Currie, G., Gilson, P., Mau, S. L., Oxley, D., Schultz, C., ... & Clarke, A. E., 2000.** “Structural classes of arabinogalactan-proteins”. In *Cell and Developmental Biology of Arabinogalactan-Proteins* (pp. 11-23). Springer, Boston, MA.
- **Baldauf, S. L., 2008.** “An overview of the phylogeny and diversity of eukaryotes”. *J Syst Evol*, **46**(3), 263-273.
- **Basta, G., Osticioli, L., Rossodivita, M. E., Sarchielli, P., Tortoioli, C., Brunetti, P., & Calafiore, R., 1995.** Method for fabrication of coherent microcapsules: A new, potential immunoisulatory barrier for pancreatic islet transplantation. *Diabetes, nutrition & metabolism*, **8**(2), 105-112.
- **Bentrup, F. W., & Jaffe, L. F., 1968.** “Analyzing the “Group effect”: Rheotropic responses of developing *Fucus* eggs”. *Protoplasma*, **65**(1-2), 25-35.
- **Berger, F., & Brownlee, C., 1994.** “Photopolarization of the *Fucus* sp. zygote by blue light involves a plasma membrane redox chain”. *Plant physiology*, **105**(2), 519-527.
- **Berger, F., Taylor, A., and Brownlee, C., 1994.** "Cell Fate Determination by the Cell Wall in Early *Fucus* Development". *Science* **263** (5152), 1421-23
- **Berteau, O., & Mulloy, B., 2003.** “Sulfated fucans, fresh perspectives: structures, functions, and biological properties of sulfated fucans and an overview of enzymes active toward this class of polysaccharide”. *Glycobiology*, **13**(6), 29R-40R.
- **Bilan, M. I., Grachev, A. A., Shashkov, A. S., Nifantiev, N. E., & Usov, A. I., 2006.** “Structure of a fucoidan from the brown seaweed *Fucus serratus* L”. *Carbohydrate research*, **341**(2), 238-245.
- **Bisgrove S. R. and Kropf D. L., 2001.** Cell wall deposition during morphogenesis in fucoid algae. *Planta* **212**, 648–658.
- **Bitton R., Ben-Yehuda M., Davidovich M., Balazs Y., Potin P., Delage L., Colin C., Bianco-Peled H., 2006.** "Structure of algal-born phenolic polymeric adhesives". *Macromolecular Bioscience* **6**, 737-746.

- **Blake, A. W., McCartney, L., Flint, J. E., Bolam, D. N., Boraston, A. B., Gilbert, H. J., & Knox, J. P., 2006.** “Understanding the biological rationale for the diversity of cellulose-directed carbohydrate-binding modules in prokaryotic enzymes”. *Journal of Biological Chemistry*, **281(39)**, 29321-29329.
- **Borderies, G., Le Béhec, M., Rossignol, M., Lafitte, C., Le Deunff, E., Beckert, M., ... & Matthys-Rochon, E., 2004.** “Characterization of proteins secreted during maize microspore culture: arabinogalactan proteins (AGPs) stimulate embryo development”. *European journal of cell biology*, **83(5)**, 205-212.
- **Brawley, S. H., 1991.** “The fast block against polyspermy in fucoid algae is an electrical block”. *Developmental biology*, **144(1)**, 94-106.
- **Brawley, S. H., Quatrano, R. S., & Wetherbee, R., 1977.** “Fine-structural studies of the gametes and embryo of *Fucus vesiculosus* L.(Phaeophyta). III. Cytokinesis and the multicellular embryo”. *Journal of cell science*, **24(1)**, 275-294.
- **Brawley, S., & Robinson, K. R., 1985.** “Cytochalasin treatment disrupts the endogenous currents associated with cell polarization in fucoid zygotes: studies of the role of F-actin in embryogenesis”. *The Journal of Cell Biology*, **100(4)**, 1173-1184.
- **Brawley, S.H., & Quatrano, R.S., 1979.** "Effects of microtubule inhibitors on pronuclear migration and embryogenesis in *Fucus distichus* (Phaeophyta) ". *Journal of Phycology*, **15(3)**, 266-272.
- **Brownlee, C., & Berger, F., 1995.** “Extracellular matrix and pattern in plant embryos: on the lookout for developmental information”. *Trends in Genetics*, **11(9)**, 344-348.
- **Brownlee, C., & Wood, J. W., 1986.** “A gradient of cytoplasmic free calcium in a growing rhizoid cells of *Fucus serratus*. *Nature*”, **320(6063)**, 624-626.
- **Cannesan, M. A., Durand, C., Burel, C., Gangneux, C., Lerouge, P., Ishii, T., ... & Vicré-Gibouin, M., 2012.** “Effect of arabinogalactan proteins from the root caps of pea and *Brassica napus* on *Aphanomyces euteiches* zoospore chemotaxis and germination”. *Plant physiology*, **159(4)**, 1658-1670.
- **Charrier, B., Coelho, S. M., Le Bail, A., Tonon, T., Michel, G., Potin, P., ... & Cock, J. M., 2008.** “Development and physiology of the brown alga *Ectocarpus siliculosus*: two centuries of research”. *New Phytologist*, **177(2)**, 319-332.
- **Chevolot, L., Mulloy, B., Ratiskol, J., Foucault, A., & Collicec-Jouault, S., 2001.** “A disaccharide repeat unit is the major structure in fucoidans from two species of brown algae.” *Carbohydrate Research*, **330(4)**, 529-535.



- **Chi, S., Liu, T., Wang, X., Wang, R., Wang, S., Wang, G., ... & Liu, C., 2017.** “Functional genomics analysis reveals the biosynthesis pathways of important cellular components (alginate and fucoidan) of *Saccharina*”. *Current genetics*, 1-15.
- **Chizhov, A. O., Dell, A., Morris, H. R., Haslam, S. M., McDowell, R. A., Shashkov, A. S., ... & Usov, A. I., 1999.** “A study of fucoidan from the brown seaweed *Chorda filum*”. *Carbohydrate Research*, **320(1-2)**, 108-119.
- **Cid, V. J., Durán, A., del Rey, F. R. A. N. C. I. S. C. O., Snyder, M. P., Nombela, C., & Sánchez, M., 1995.** “Molecular basis of cell integrity and morphogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*”. *Microbiological reviews*, **59(3)**, 345-386.
- **Cock M., Sterck L., Rouze P., Scornet D., Allen A.E., Amoutzias G., Anthouard V., Artiguenave F., Aury J.M., Badger J.H., et al., 2010.** “The *Ectocarpus* genome and the independent evolution of multicellularity in brown algae”. *Nature* **465**, 617–621.
- **Cock, J. M., & Coelho, S. M., 2011.** “Algal models in plant biology”. *Journal of experimental botany*, **62(8)**, 2425-2430.
- **Coelho, S. M., Godfroy, O., Arun, A., Le Corguillé, G., Peters, A. F., & Cock, J. M., 2011.** “OUROBOROS is a master regulator of the gametophyte to sporophyte life cycle transition in the brown alga *Ectocarpus*”. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **108(28)**, 11518-11523.
- **Colin, S., Deniaud, E., Jam, M., Descamps, V., Chevolut, Y., Kervarec, N., et al., 2006.** “Cloning and biochemical characterization of the fucanase FcnA: definition of a novel glycoside hydrolase family specific for sulfated fucans”. *Glycobiology*, **16(11)**, 1021-1032.
- **Colliec, S., Fischer, A. M., Tapon-Brethaudiere, J., Boisson, C., Durand, P., & Jozefonvicz, J., 1991.** “Anticoagulant properties of a fucoidan fraction”. *Thrombosis research*, **64(2)**, 143-154.
- **Corellou, F., 2000.** « Cycle cellulaire et polarisation du zygote *Fucus* régulations et interactions » (*Doctoral dissertation*, Rennes 1).
- **Craig, S. W. et Johnson, R. P., 1996.** “Assembly of focal adhesions: progress, paradigms, and portents.” *Curr. Opin. Cell Biol.* 74-75.
- **Crayton, M.A., Wilson, E., & Quatrano, R.S., 1974.** “Sulfation of fucoidan in *Fucus* embryos: II. Separation from initiation of polar growth”. *Developmental biology*, **39(1)**, 164-167.
- **Cronshaw, J., Myers, A., & Preston, R. D., 1958.** “A chemical and physical investigation of the cell walls of some marine algae”. *Biochimica et biophysica acta*, **27**, 89-103.

- **Cumashi, A., Ushakova, N. A., Preobrazhenskaya, M. E., D'incecco, A., Piccoli, A., Totani, L., ... & Usov, A. I., 2007.** “A comparative study of the anti-inflammatory, anticoagulant, antiangiogenic, and antiadhesive activities of nine different fucoidans from brown seaweeds.” *Glycobiology*, **17(5)**, 541-552.
- **Dantas-Santos, N., Gomes, D. L., Costa, L. S., Cordeiro, S. L., Costa, M. S. S. P., Trindade, E. S., ... & Rocha, H. A. O., 2012.** “Freshwater plants synthesize sulfated polysaccharides: heterogalactans from water hyacinth (*Eicchornia crassipes*)”. *International journal of molecular sciences*, **13(1)**, 961-976.
- **Davison, I. R., & Pearson, G. A., 1996.** “Stress tolerance in intertidal seaweeds.” *Journal of Phycology*, **32(2)**, 197-211.
- **Deniaud-Bouët, E., Hardouin, K., Potin, P., Kloareg, B., & Hervé, C., 2017.** “A review about brown algal cell walls and fucose-containing sulfated polysaccharides: Cell wall context, biomedical properties and key research challenges”. *Carbohydrate polymers*, **175**, 395-408.
- **Deniaud-Bouët, E., Kervarec, N., Michel, G., Tonon, T., Kloareg, B. and Hervé, C., 2014.** "Chemical and enzymatic fractionation of cell walls from Fucales: insights into the structure of the extracellular matrix of brown algae". *Annals of Botany*, **114**, 1203-1216.
- **Dittami S.M., Corre E., Pointoizeau N., Cormier A., Avia K., Collen ., Delage., Doubleau S., Gobet A., Gonzales I., Grosillier A ;, Guéguen L., Hervé C., Kleinjan H., Lipinska A., Liu X., Marie D., Minocje A.E., Monsor M., Perrineau. M.M., Peters A.F., Siméon A., Su Yoon H., Himmelbauer H., Boyen C., and Tonon T., in preparation.** “The genome of *Ectocarpus subulatus*, a highly stress-tolerant brown alga”.
- **Dittami, S. M., Gravot, A., Goulitquer, S., Rousvoal, S., Peters, A.F., Bouchereau, A., Boyen, C. & Tonon, T., 2012.** "Towards deciphering dynamic changes and evolutionary mechanisms involved in the adaptation to low salinities in *Ectocarpus* (brown algae)". *The plant journal*, **71(3)**, 366-377.
- **Dittami, S. M., Scornet, D., Petit, J. L., Ségurens, B., Da Silva, C., Corre, E., ... & Rouzé, P., 2009.** “Global expression analysis of the brown alga *Ectocarpus siliculosus* (Phaeophyceae) reveals large-scale reprogramming of the transcriptome in response to abiotic stress”. *Genome biology*, **10(6)**, R66.
- **Draget, K. I., Smidsrød, O., & Skjåk-Bræk, G., 2005.** Alginates from algae. *Biopolymers Online*.

- **Dring, M. J., & Brown, F. A., 1982.** “Photosynthesis of intertidal brown algae during and after periods of emersion: a renewed search for physiological causes of zonation”. *Marine Ecology Progress Series*, 301-308.
- **Eardley, D. D., Sutton, C. W., Hempel, W. M., Reed, D. C., & Ebeling, A. W., 1990.** “Monoclonal antibodies specific for sulfated polysaccharides on the surface of *Macrocystis pyrifera* (Phaeophyceae)”. *Journal of Phycology*, **26(1)**, 54-62.
- **Facchinelli, F., Colleoni, C., Ball, S. G., & Weber, A. P., 2013.** “Chlamydia, cyanobiont, or host: who was on top in the ménage à trois?”. *Trends in plant science*, **18(12)**, 673-679.
- **Farnham, G., Strittmatter, M., Coelho, S., Cock, J. M., & Brownlee, C., 2013.** “Gene silencing in *Fucus* embryos: developmental consequences of RNAi-mediated cytoskeletal disruption”. *Journal of phycology*, **49(5)**, 819-829.
- **Ficko-Blean, E., Hervé, C., & Michel, G., 2015.** “Sweet and sour sugars from the sea: the biosynthesis and remodeling of sulfated cell wall polysaccharides from marine macroalgae”. *Perspect Phycol*, **2**, 51-64.
- **Fischl, R., Bertelsen, K., Gaillard, F., Coelho, S., Michel, G., Klinger, M., Boyen, C., Czjzek, M., and Hervé, C., 2016.** "The Cell Wall Active Mannuronan C5-Epimerases in the Model Brown Alga *Ectocarpus*: From Gene Context to Recombinant Protein". *Glycobiology*, mars, cww040. doi:10.1093/glycob/cww040.
- **Gao, M., & Showalter, A. M., 1999.** “Yariv reagent treatment induces programmed cell death in *Arabidopsis* cell cultures and implicates arabinogalactan protein involvement”. *The Plant Journal*, **19(3)**, 321-331.
- **Geißler, U., 1983.** “Salzbelastete Flussstrecke der Werra, ein Binnenlandstandort für *Ectocarpus confervoides* (Roth) Kjellman”. *Nova Hedwigia: Zeitschrift für Kryptogamenkunde*.
- **Goodner, B., & Quatrano, R. S., 1993.** *Fucus* embryogenesis: A model to study the establishment of polarity. *The Plant Cell*, **5(10)**, 1471.
- **Grant, G. T., Morris, E. R., Rees, D. A., Smith, P. J., & Thom, D., 1973.** “Biological interactions between polysaccharides and divalent cations: the egg-box model”. *FEBS letters*, **32(1)**, 195-198.
- **Green, J. R., Stafford, C. J., Jones, J. L., Wright, P. J., & Callow, J. A., 1993.** “Binding of monoclonal antibodies to vegetative tissue and fucose-containing polysaccharides of *Fucus serratus* L”. *New phytologist*, **124(3)**, 397-408.

- **Guiry, M. D., & Guiry, G. M., 2016.** AlgaeBase. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. 2015. URL: <http://www.algaebase.org>.
- **Hable, W. E., & Kropf, D. L., 1998.** “Roles of Secretion and the Cytoskeleton in Cell Adhesion and Polarity Establishment in *Pelvetia compressa* Zygotes”. *Developmental biology*, **198(1)**, 45-56.
- **Hable, W. E., & Kropf, D. L., 2000.** “Sperm entry induces polarity in fucoid zygotes”. *Development*, **127(3)**, 493-501.
- **Hahn, T., Lang, S., Ulber, R., & Muffler, K., 2012.** “Novel procedures for the extraction of fucoidan from brown algae”. *Process biochemistry*, **47(12)**, 1691-1698.
- **Hanelt, D., Tüg, H., Bischof, K., Groß, C., Lippert, H., Sawall, T., & Wiencke, C., 2001.** “Light regime in an Arctic fjord: a study related to stratospheric ozone depletion as a basis for determination of UV effects on algal growth”. *Marine Biology*, **138(3)**, 649-658.
- **Hao, S., Su, L., Guo, X., Moyana, T., & Xiang, J., 2005.** A novel approach to tumor suppression using microencapsulated engineered J558/TNF-alpha cells. *Experimental oncology*, **27(1)**, 56-60.
- **Hervé, C., Rogowski, A., Gilbert, H. J., & Paul Knox, J., 2009.** “Enzymatic treatments reveal differential capacities for xylan recognition and degradation in primary and secondary plant cell walls”. *The Plant Journal*, **58(3)**, 413-422.
- **Hervé, C., Siméon, A., Jam, M., Cassin, A., Johnson, K.L., Salmeán, A.A., Willats, W.G.T., Doblin, M.S., Bacic, A. and Kloareg, B., 2016.** "Arabinogalactan proteins have deep roots in eukaryotes: identification of genes and epitopes in brown algae and their role in *Fucus serratus* embryo development". *New Phytologist*, **209**, 1428-1441.
- **Hogsett, W. E., & Quatrano, R. S. 1978.** “Sulfation of fucoidin in focus embryos: III. Required for localization in the rhizoid wall”. *The Journal of cell biology*, **78(3)**, 866-873.
- **Hurd, A. M., 1920.** “Effect of unilateral monochromatic light and group orientation on the polarity of germinating *Fucus* spores”. *Botanical Gazette*, **70(1)**, 25-50.
- **Inoue, A., Satoh, A., Morishita, M., Tokunaga, Y., Miyakawa, T., Tanokura, M., & Ojima, T., 2016.** “Functional heterologous expression and characterization of mannuronan C5-epimerase from the brown alga *Saccharina japonica*”. *Algal Research*, **16**, 282-291.
- **Jaffe, L. F. & Nuccitelli, R., 1974.** “An ultrasensitive vibrating probe for measuring steady extracellular currents”. *J. Cell Biol.* **63** 614-628.

- **Jaffe, L. F., 1968.** Localization in the developing *Fucus* egg and the general role of localizing currents. *Adv Morphog*, **7**, 295-328.
- **Jones, J. L., Callow, J. A., & Green, J. R., 1988.** “Monoclonal antibodies to sperm surface antigens of the brown alga *Fucus serratus* exhibit region-, gamete-, species-and genus-preferential binding”. *Planta*, **176(3)**, 298-306.
- **Karsten, U., Dummermuth, A., Hoyer, K., & Wiencke, C., 2003.** “Interactive effects of ultraviolet radiation and salinity on the ecophysiology of two Arctic red algae from shallow waters”. *Polar Biology*, **26(4)**, 249-258.
- **Kirst, G.O., 1990.** "Salinity tolerance of eukaryotic marine algae". *Annual review of plant biology*, **41(1)**, 21-53.
- **Knox, P. 2016.** “Delving in the deep for the origin of plant cell surface proteoglycans”. *New Phytologist*, **209(4)**, 1341-1343.
- **Koehler, L. D., & Linskens, H. F., 1967.** “Incorporation of protein and RNA precursors into fertilized *Fucus* eggs”. *Protoplasma*, **64(2)**, 209-212.
- **Kropf, D. L., 1992.** “Establishment and expression of cellular polarity in fucoid zygotes”. *Microbiol. Rev.* **56** 316-339.
- **Kropf, D. L., 1997.** “Induction of polarity in fucoid zygotes”. *Plant Cell* **9** 1011-1020.
- **Kropf, D. L., Bisgrove, S. R., & Hable, W. E., 1999.** “Establishing a growth axis in fucoid algae ». *Trends in plant science*, **4(12)**, 490-494.
- **Kropf, D. L., Kloareg, B. et Quatrano, R. S., 1988.** “Cell wall is required for fixation of the embryonic axis in *Fucus* zygotes”. *Science* **239** 187-190.
- **Kropf, D. L., Kloareg, B., et Quatrano, R. S., 1988.** "Cell Wall Is Required for Fixation of the Embryonic Axis in *Fucus* Zygotes". *Science* **239** (4836, 187-90.
- **Küpper, F. C., Kloareg, B., Guern, J., & Potin, P., 2001.** “Oligoguluronates elicit an oxidative burst in the brown algal kelp *Laminaria digitata*”. *Plant physiology*, **125(1)**, 278-291.
- **Lamport, D. T., Kieliszewski, M. J., & Showalter, A. M., 2006.** “Salt stress upregulates periplasmic arabinogalactan proteins: using salt stress to analyse AGP function”. *New Phytologist*, **169(3)**, 479-492.
- **Le Bail, A., Billoud, B., Le Panse, S., Chenivresse, S., & Charrier, B., 2011.** “ETOILE regulates developmental patterning in the filamentous brown alga *Ectocarpus siliculosus*”. *The Plant Cell*, **23(4)**, 1666-1678.

- **Le Bail, A., Billoud, B., Le Panse, S., Chenivesse, S., and Charrier, B., 2011.** "ETOILE regulates developmental patterning in the filamentous brown alga *Ectocarpus siliculosus*". *The Plant Cell*, **23**(4), 1666-1678.
- **Le Bail, A., Billoud, B., Maisonneuve, C., Peters, A.F., Mark Cock, J., and Charrier, B., 2008.** "Early development pattern of the brown alga *Ectocarpus siliculosus* (Ectocarpales, Phaeophyceae) sporophyte". *Journal of phycology*, **44**(5), 1269-1281.
- **Le Bail, A., Dittami, S. M., de Franco, P. O., Rousvoal, S., Cock, M. J., Tonon, T., & Charrier, B., 2008.** "Normalisation genes for expression analyses in the brown alga model *Ectocarpus siliculosus*". *BMC Molecular Biology*, **9**(1), 75.
- **Lee, K. J., Sakata, Y., Mau, S. L., Pettolino, F., Bacic, A., Quatrano, R. S., et al., 2005.** "Arabinogalactan proteins are required for apical cell extension in the moss *Physcomitrella patens*". *The Plant Cell*, **17**(11), 3051-3065.
- **Levring, T., 1952.** "Remarks on the submicroscopical structure of eggs and spermatozoids of *Fucus* and related genera". *Physiologia Plantarum*, **5**(4), 528-539.
- **Li, S. X., & Showalter, A. M., 1996.** "Cloning and developmental/stress-regulated expression of a gene encoding a tomato arabinogalactan protein". *Plant molecular biology*, **32**(4), 641-652.
- **Likens, G. E. (Ed.), 2010.** "River ecosystem ecology: a global perspective". Academic Press.
- **Lundqvist, L. C., Jam, M., Barbeyron, T., Czjzek, M., & Sandström, C., 2012.** "Substrate specificity of the recombinant alginate lyase from the marine bacteria *Pseudomonas alginovora*". *Carbohydrate research*, **352**, 44-50.
- **Mabeau S. and Kloareg B., 1987.** "Isolation and analysis of the cell walls of brown algae: *Fucus spiralis*, *F. ceranoides*, *F. vesiculosus*, *F. serratus*, *Bifurcaria bifurcata* and *Laminaria digitata*". *Journal of Experimental Botany* **38**: 1573–1580.
- **Macaisne, N., Liu, F., Scornet, D., Peters, A. F., Lipinska, A., Perrineau, M. M., ... & Cock, J. M., 2017.** "The *Ectocarpus* IMMEDIATE UPRIGHT gene encodes a member of a novel family of cysteine-rich proteins with an unusual distribution across the eukaryotes". *Development*, **144**(3), 409-418.
- **Marcus, S. E., Verhertbruggen, Y., Hervé, C., Ordaz-Ortiz, J. J., Farkas, V., Pedersen, H. L., ... & Knox, J. P., 2008.** "Pectic homogalacturonan masks abundant sets of xyloglucan epitopes in plant cell walls". *BMC plant biology*, **8**(1), 60.

- **Matricardi, P., Meo, C. D., Coviello, T., & Alhaique, F., 2008.** “Recent advances and perspectives on coated alginate microspheres for modified drug delivery.” *Expert Opinion on Drug Delivery*, **5(4)**, 417-425.
- **McCartney, L., Blake, A. W., Flint, J., Bolam, D. N., Boraston, A. B., Gilbert, H. J., & Knox, J. P., 2006.** “Differential recognition of plant cell walls by microbial xylan-specific carbohydrate-binding modules”. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **103(12)**, 4765-4770.
- **Meslet-Cladière, L., Delage, L., Leroux, C. J. J., Goulitquer, S., Leblanc, C., Creis, E., ... & Potin, P., 2013.** “Structure/function analysis of a type III polyketide synthase in the brown alga *Ectocarpus siliculosus* reveals a biochemical pathway in phlorotannin monomer biosynthesis”. *The Plant Cell*, **25(8)**, 3089-3103.
- **Michel, G., Tonon, T., Scornet, D., Cock, J. M., & Kloareg, B., 2010.** “The cell wall polysaccharide metabolism of the brown alga *Ectocarpus siliculosus*. Insights into the evolution of extracellular matrix polysaccharides in Eukaryotes”. *New Phytologist*, **188(1)**, 82-97.
- **Moller, I., Sørensen, I., Bernal, A. J., Blaukopf, C., Lee, K., Øbro, J., ... & Bacic, A., 2007.** “High-throughput mapping of cell-wall polymers within and between plants using novel microarrays”. *The Plant Journal*, **50(6)**, 1118-1128.
- **Mollet, J. C., Kim, S., Jauh, G. Y., & Lord, E. M., 2002.** “Arabinogalactan proteins, pollen tube growth, and the reversible effects of Yariv phenylglycoside”. *Protoplasma*, **219(1-2)**, 89-98.
- **Müller, D. G., & Jaenicke, L., 1973.** “Fucoserraten, the female sex attractant of *Fucus serratus* L.(Phaeophyta)”. *FEBS letters*, **30(1)**, 137-139.
- **Nelson, D. R., & Jaffe, L. F., 1973.** “Cells without cytoplasmic movements respond to cytochalasin”. *Developmental biology*, **30(1)**, 206-208.
- **Nguema-Ona, E., Coimbra, S., Vicré-Gibouin, M., Mollet, J. C., & Driouich, A. 2012.** “Arabinogalactan proteins in root and pollen-tube cells: distribution and functional aspects”. *Annals of Botany*, **110(2)**, 383-404.
- **Nguyen, X.V., Klein, M., Riemenschneider, A., and Papenbrock, J., 2014.** "Distinctive features and role of sulfur-containing compounds in marine plants, seaweeds, seagrasses and halophytes, from an evolutionary point of view". In *Sabkha Ecosystems* (pp. 299-312). Springer Netherlands.



- **Nishino, T., Nagumo, T., Kiyohara, H., & Yamada, H., 1991.** “Structural characterization of a new anticoagulant fucan sulfate from the brown seaweed *Ecklonia kurome*.” *Carbohydrate research*, *211*(1), 77-90.
- **Nishitsuji, K., Arimoto, A., Iwai, K., Sudo, Y., Hisata, K., Fujie, M., ... & Satoh, N., 2016.** “A draft genome of the brown alga, *Cladosiphon okamuranus*, S-strain: a platform for future studies of ‘mozuku’biology”. *Dna Research*, *23*(6), 561-570.
- **Olsen, J.L., Rouzé, P., Verhelst, B., Lin, Y. C., Bayer, T., Collen, J., et al., 2016.** "The genome of the seagrass *Zostera marina* reveals angiosperm adaptation to the sea". *Nature*, *530*(7590), 331-335.
- **Osman, M. E., Menzies, A. R., Martin, B. A., Williams, P. A., Phillips, G. O., & Baldwin, T. C., 1995.** “Characterization of gum arabic fractions obtained by anion-exchange chromatography”. *Phytochemistry*, *38*(2), 409-417.
- **Pannier, A. K., & Shea, L. D., 2004.** Controlled release systems for DNA delivery. *Molecular Therapy*, *10*(1), 19-26.
- **Park, M. H., Suzuki, Y., Chono, M., Knox, J. P., & Yamaguchi, I., 2003.** “CsAGP1, a gibberellin-responsive gene from cucumber hypocotyls, encodes a classical arabinogalactan protein and is involved in stem elongation.” *Plant physiology*, *131*(3), 1450-1459.
- **Percival, E. L., & McDowell, R. H., 1967.** “*Chemistry and enzymology of marine algal polysaccharides*”. London.
- **Peters, A. F., Marie, D., Scornet, D., Kloareg, B. & Cock, J. M., 2004a.** "Proposal of *Ectocarpus siliculosus* (Ectocarpales, Phaeophyceae) as a model organism for brown algal genetics and genomics". *Journal of Phycology*, *40*(6), 1079-1088.
- **Peters, A. F., Scornet, D., Ratin, M., Charrier, B., Monnier, A., Merrien, Y., ... & Cock, J. M., 2008.** “Life-cycle-generation-specific developmental processes are modified in the immediate upright mutant of the brown alga *Ectocarpus siliculosus*”. *Development*, *135*(8), 1503-1512.
- **Pomin, V. H., & Mourão, P. A., 2008.** “Structure, biology, evolution, and medical importance of sulfated fucans and galactans”. *Glycobiology*, *18*(12), 1016-1027.
- **Pomin, V. H., & Mourão, P. A., 2008.** “Structure, biology, evolution, and medical importance of sulfated fucans and galactans”. *Glycobiology*, *18*(12), 1016-1027.

- **Poon, S., Heath, R. L., & Clarke, A. E., 2012.** “A chimeric arabinogalactan protein promotes somatic embryogenesis in cotton cell culture”. *Plant physiology*, **160(2)**, 684-695.
- **Popper, Z. A. (Ed.), 2011b.** “The plant cell wall: methods and protocols ». Humana Press.
- **Popper, Z. A., Michel, G., Hervé, C., Domozych, D. S., Willats, W. G., Tuohy, M. G. et al., 2011.** « Evolution and diversity of plant cell walls: from algae to flowering plants”. *Annual review of plant biology*, **62**, 567-590.
- **Potin, P., Bouarab, K., Küpper, F., & Kloareg, B., 1999.** “Oligosaccharide recognition signals and defence reactions in marine plant-microbe interactions”. *Current opinion in microbiology*, **2(3)**, 276-283.
- **Quatrano R.S. and Stevens P.T., 1976.** Cell wall assembly in *Fucus* zygotes: I. Characterization of the polysaccharide components. *Plant Physiology* **58**, 224–231.
- **Quatrano R.S., 1982.** "Cell-wall formation in *Fucus* zygotes: a model system to study the assembly and localization of wall polymers". In *Cellulose and Other Natural Polymer Systems* (pp. 45-59). Springer US.
- **Quatrano, R. S. (1973).** “Separation of processes associated with differentiation of two-celled *Fucus* embryos”. *Dev. Biol.* **30** 209-213.
- **Quatrano, R. S., & Stevens, P. T., 1976.** “Cell wall assembly in *Fucus* zygotes: I. Characterization of the polysaccharide components”. *Plant Physiology*, **58(2)**, 224-231.
- **Quatrano, R. S., 1972.** “An ultrastructural study of the determined site of rhizoid formation in *Fucus* zygotes”. *Exp. Cell Res.* **70** 1-12.
- **Quatrano, R. S., and Shaw, S. L. 1997.** “Role of the cell wall in the determination of cell polarity and the plane of cell division in *Fucus* embryos”. *Trends in Plant Science*, **2(1)**, 15-21.
- **Quatrano, R. S., Brian, L., Aldridge, J., & Schultz, T. 1991.** “Polar axis fixation in *Fucus* zygotes: components of the cytoskeleton and extracellular matrix”. *Development*, **113**, 11-16.
- **Raimundo, S., C., Pattathil, S., Eberhard, S., Hahn, M. G., and Popper, Z. A., 2016.** "β-1,3-Glucans Are Components of Brown Seaweed (Phaeophyceae) ". *Cell Walls Protoplasma*, **254(2)**, 997-1016.
- **Ravanko, O., 1970.** “Morphological, developmental, and taxonomic studies in the *Ectocarpus* complex (Phaeophyceae)”. *Nova Hedwigia*.

- **Rioux, L. E., Turgeon, S. L., & Beaulieu, M., 2007.** “Characterization of polysaccharides extracted from brown seaweeds”. *Carbohydrate polymers*, **69(3)**, 530-537.
- **Roberts, S. K., Berger, F. and Brownlee, C., 1993.** “The role of Ca<sup>2+</sup> in signal transduction following fertilization in *Fucus serratus*”. *J. Exp. Biol.* **184** 197-212.
- **Roberts, S., & Brownlee, C., 1995.** “Calcium influx, fertilisation potential and egg activation in *Fucus serratus*”. *Zygote*, **3(3)**, 191-197.
- **Robinson, K. R. & Jaffe, L. F., 1974.** “Polarizing furoid eggs drive a calcium current through themselves”. *Science* **187** 70-72.
- **Rumyantseva, N. I., 2005.** “Arabinogalactan proteins: involvement in plant growth and morphogenesis”. *Biochemistry (Moscow)*, **70(10)**, 1073.
- **Salmeán, A.A., Duffieux, D., Harholt, J., Qin, F., Michel, G., Czjzek, M., et al., 2017.** “Insoluble (1→ 3),(1→ 4)-β-D-glucan is a component of cell walls in brown algae (Phaeophyceae) and is masked by alginates in tissues”. *Scientific Reports*, **7**.
- **Schindler, T., Bergfeld, R., & Schopfer, P. 1995.** “Arabinogalactan proteins in maize coleoptiles: developmental relationship to cell death during xylem differentiation but not to extension growth”. *The Plant Journal*, **7(1)**, 25-36.
- **Schoenwaelder, M. E., & Wiencke, A. C., 2000.** “Phenolic compounds in the embryo development of several northern hemisphere furoids”. *Plant Biology*, **2(01)**, 24-33.
- **Schultz, C. J., Johnson, K. L., Currie, G., & Bacic, A., 2000.** “The classical arabinogalactan protein gene family of Arabidopsis.” *The Plant Cell*, **12(9)**, 1751-1767.
- **Seifert, G. J., & Roberts, K., 2007.** The biology of arabinogalactan proteins. *Annu. Rev. Plant Biol.*, **58**, 137-161.
- **Senthilkumar, K., Manivasagan, P., Venkatesan, J., & Kim, S. K., 2013.** “Brown seaweed fuoidan: biological activity and apoptosis, growth signaling mechanism in cancer.” *International journal of biological macromolecules*, **60**, 366-374.
- **Shaw, S. L. & Quatrano, R. S., 1996.** “Polar localization of a dihydropyridine receptor on living *Fucus* zygotes”. *J. Cell. Sci.* **109** 335-342.
- **Showalter, A. M., 2001.** “Arabinogalactan-proteins: structure, expression and function”. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, **58(10)**, 1399-1417.
- **Silberfeld, T., Rousseau, F., & Reviere, B. D., 2014.** “An updated classification of brown algae (Ochrophyta, Phaeophyceae)”. *Cryptogamie, Algologie*, **35(2)**, 117-156.

- **Skriptsova, A., Khomenko, V., & Isakov, V., 2004.** “Seasonal changes in growth rate, morphology and alginate content in *Undaria pinnatifida* at the northern limit in the Sea of Japan (Russia)”. *Journal of Applied Phycology*, **16(1)**, 17.
- **Speksnijder, J. E., Miller, A. L., Weisenseel, M. H., Chen, T. H. and Jaffe, L. F., 1989.** “Calcium buffer injections block fucoid egg development by facilitating calcium diffusion”. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 86 6607-6611.
- **Stanford, E. C. C., 1881.** “Improvements in the manufacture of useful products from seaweeds”. *British Patent*, **142**.
- **Starr, R.C., and Zeikus, J.A., 1993.** "UTEX—the culture collection of algae at the University of Texas at Austin 1993 list of cultures". *Journal of phycology*, **29(s2)**, 1-106.
- **Suzuki, Y., Kitagawa, M., Knox, J. P., & Yamaguchi, I., 2002.** “A role for arabinogalactan proteins in gibberellin-induced  $\alpha$ -amylase production in barley aleurone cells”. *The Plant Journal*, **29(6)**, 733-741.
- **Taylor, A., & Brownlee, C., 1993.** “Calcium and potassium currents in the *Fucus* egg”. *Planta*, **189(1)**, 109-119.
- **Tenhaken, R., Voglas, E., Cock, J. M., Neu, V., & Huber, C. G., 2011.** “Characterization of GDP-mannose dehydrogenase from the brown alga *Ectocarpus siliculosus* providing the precursor for the alginate polymer”. *Journal of Biological Chemistry*, **286(19)**, 16707-16715.
- **Thomas, F., Barbeyron, T., Tonon, T., Génicot, S., Czjzek, M., & Michel, G., 2012.** “Characterization of the first alginolytic operons in a marine bacterium: from their emergence in marine Flavobacteria to their independent transfers to marine Proteobacteria and human gut Bacteroides”. *Environmental microbiology*, **14(9)**, 2379-2394.
- **Torode, T.A., Marcus, S.E., Jam, M., Tonon, T., Blackburn, R.S., Hervé, C., and Knox, J.P., 2015.** “Monoclonal Antibodies Directed to Fucoidan Preparations from Brown Algae”. *PloS One* **10** (2): e0118366
- **Torode, T.A., Siméon, A., Marcus, S.E., Jam, M., LeMoigne, A.M., Duffieux, D., Knox J.P., and Hervé, C., 2016.** “Dissection of cell wall assembly dynamics during early embryogenesis in the brown alga *Fucus* using monoclonal antibodies”. *Journal of experimental Botany* **67** (21): 6089-6100.
- **Tsirigoti, A., Beakes, G. W., Hervé, C., Gachon, C. M., & Katsaros, C., 2015.** “Attachment, penetration and early host defense mechanisms during the infection of filamentous brown algae by *Eurychasma dicksonii*”. *Protoplasma*, **252(3)**, 845-856.

- **Underwood D., 2012.** “The plant cell wall: a dynamic barrier against pathogen invasion”. *Front Plant Sci* **3**:1 – 6
- **van Hengel, A. J., Tadesse, Z., Immerzeel, P., Schols, H., Van Kammen, A. B., & de Vries, S. C., 2001.** “N-acetylglucosamine and glucosamine-containing arabinogalactan proteins control somatic embryogenesis”. *Plant Physiology*, **125(4)**, 1880-1890.
- **Verhaeghe, E. F., Fraysse, A., Guerquin-Kern, J. L., Wu, T. D., Devès, G., Mioskowski, C., ... & Potin, P., 2008.** “Microchemical imaging of iodine distribution in the brown alga *Laminaria digitata* suggests a new mechanism for its accumulation”. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*, **13(2)**, 257-269.
- **Vreeland, V., Slomich, M., & Laetsch, W. M., 1984.** “Monoclonal antibodies as molecular probes for cell wall antigens of the brown alga, *Fucus*”. *Planta*, **162(6)**, 506-517.
- **Vreeland, V., Waite, J. H., & Epstein, L., 1998.** “Minireview polyphenols and oxidases in substratum adhesion by marine algae and mussels”. *Journal of Phycology*, **34(1)**, 1-8.
- **Wagner V.T, Brian L, Quatrano R.S., 1992.** “Role of a vitronectin-like molecule in embryo adhesion of the brown alga *Fucus*”. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, USA **89**: 3644–3648.
- **West, J., & Kraft, G., 1996.** “*Ectocarpus siliculosus* (Dillwyn) Lyngb. from Hopkins River Falls, Victoria-the first record of a freshwater brown alga in Australia”. *Muelleria*, **9**, 29-33.
- **Wetzel, R. G., 2001.** *Limnology: lake and river ecosystems*. Elsevier, San Diego, 1006 pp.
- **Whitaker D. M., 1931.** “On the rate of oxygen consumption by fertilized and unfertilized *Fucus* eggs”. *J. Gen. Physiol.* **15** 167-182.
- **Willats, W. G., & Knox, J. P. 1996.** “A role for arabinogalactan-proteins in plant cell expansion: evidence from studies on the interaction of  $\beta$ -glucosyl Yariv reagent with seedlings of *Arabidopsis thaliana*”. *The Plant Journal*, **9(6)**, 919-925.
- **Wu, H. M., Wong, E., Ogdahl, J., & Cheung, A. Y., 2000.** “A pollen tube growth promoting arabinogalactan protein from *Nicotiana glauca* is similar to the tobacco TTS protein.” *The Plant Journal*, **22(2)**, 165-176.
- **Yariv, J., Lis, E. and Katchalski, E., 1967.** “Precipitation of Arabic acid and some seed polysaccharides by glycosylphenylazo dyes”. *Biochem J.* **105**, 1C-2C

- **Yariv, J., Rapport, M.M. and Graf, L., 1962.** “The interaction of glycosides and saccharides with antibody to the corresponding phenylazo glycoside”. *Biochem. J.* **85**, 383-388
- **Yates, E. A., Valdor, J. F., Haslam, S. M., Morris, H. R., Dell, A., Mackie, W., & Knox, J. P., 1996.** “Characterization of carbohydrate structural features recognized by anti-arabinogalactan-protein monoclonal antibodies”. *Glycobiology*, **6(2)**, 131-139.
- **Ye, N., Zhang, X., Miao, M., Fan, X., Zheng, Y., Xu, D., et al., 2016.** “Saccharina genomes provide novel insight into kelp biology”. *Nature communications*, **6**, 6986.
- **Yoon, H. S., Hackett, J. D., Ciniglia, C., Pinto, G., & Bhattacharya, D., 2004.** “A molecular timeline for the origin of photosynthetic eukaryotes”. *Molecular biology and evolution*, **21(5)**, 809-818.
- **Zhang, Z., Shrager, J., Jain, M., Chang, C. W., Vallon, O., and Grossman, A. R., 2004.** “Insights into the survival of *Chlamydomonas reinhardtii* during sulfur starvation based on microarray analysis of gene expression”. *Eukaryotic cell*, **3(5)**, 1331-1348.

## Table des illustrations

Figure 1 : Arbre phylogénétique des Eucaryotes.....	8
Figure 2 : Origine et évolution des plastes acquis par endosymbiose primaire puis secondaire.....	9
Figure 3 : Arbre phylogénétique des algues brunes.....	11
Figure 4 : Diversité morphologiques des algues brunes.....	12
Figure 5 : Présence des polysaccharides sulfatés et leur composition en monosaccharides dans les différents types de végétaux.....	15
Figure 6 : Représentation schématique de la paroi des Fucales.....	16
Figure 7 : Structure chimique de l'alginate.....	18
Figure 8 : Représentation schématique de l'effet des enzymes ManC5-Es sur la structure des alginates.....	19
Figure 9 : Structures chimiques des fucanes sulfatés constituant la paroi des Fucales et des Ectocarpales.....	21
Figure 10 : Structures des arabinogalactanes protéines.....	24
Figure 11 : Origine et évolution des principaux polysaccharides de la matrice extracellulaire des Straménopiles.....	27
Figure 12 : Voies prédites de biosynthèse des alginates et des fucanes sulfatés chez les algues brunes.....	30
Figure 13 : Représentation schématique des rôles clés joués par la paroi des algues brunes.....	32
Figure 14 : Comparaison de l'embryogénèse de <i>Fucus</i> et d' <i>Arabidopsis</i> .....	38
Figure 15 : Cycle de vie de <i>Fucus serratus</i> .....	40



Figure 16 : Changements physiologiques et structuraux au cours de la polarisation du zygote de <i>Fucus</i> .....	44
Figure 17 : Rôle de la paroi dans la régulation de la destinée cellulaire.....	46
Figure 18 : Cycle de vie d' <i>Ectocarpus</i> .....	49
Figure 19 : Rôle de la paroi dans le maintien du programme de développement chez <i>Ectocarpus</i> .....	51
Figure 20 : Production d'anticorps monoclonaux.....	54
Figure 21: Production de parthénosporophytes d' <i>Ectocarpus</i> .....	62
Figure 22 : Détection des AGPs par Western-blot et coloration aux réactifs de yariv sur gel SDS page.....	74
Figure 23 : Développement et morphologie des parthénosporophytes d' <i>E. siliculosus</i> cultivés 7 jours en présence de différents traitements protéiques et enzymatiques.....	83
Figure 24 : Combinaison des patrons de développement possibles des parthénosporophytes de la souche 32 d' <i>E. siliculosus</i> .....	85
Figure 25 : Représentation schématique des filaments primaires constitués de 4 cellules.....	86
Figure 26 : Localisation des principaux polysaccharides de paroi des parthénosporophytes d' <i>E. siliculosus</i> au stade 4 cellules.....	89
Figure 27 : Morphologie des jeunes parthénosporophytes d' <i>E. siliculosus</i> et d' <i>E. subulatus</i> cultivés en eau de mer naturelle.....	91
Figure 28 : Croissance apicale des parthénosporophytes d' <i>E. subulatus</i> .....	92
Figure 29 : Développement des jeunes parthénosporophytes d' <i>Ectocarpus</i> .....	93

## Table des tableaux

Tableau 1 : Répartition des différents polysaccharides de la paroi en fonction des différentes lignées de végétaux.....	14
Tableau 2 : Composition de l'eau de mer et de l'eau douce.....	34
Tableau 3 : Milieux de cultures utilisées pour les parthénosporophytes d' <i>E. siliculosus</i> et d' <i>E. subulatus</i> .....	66
Tableau 4 : Composition de l'eau de mer artificielle avec addition de nutriments Provasoli.....	67

Résumé :

La paroi des algues brunes constitue un compartiment cellulaire majeur impliqué dans de nombreuses réponses physiologiques dont la croissance cellulaire, le développement, ou encore dans l'adaptation aux variations physico-chimiques de l'environnement. Tout comme d'autres organismes photosynthétiques (plantes, algues rouges et vertes), les algues brunes ont une paroi essentiellement composée de polysaccharides, mais compte-tenu des distances phylogénétiques, les composés sont distincts, avec notamment des alginates et des fucanes sulfatés. La majorité des connaissances sur ces compositions dérive d'extractions chimiques effectuées sur des algues entières, au cours desquelles l'information cellulaire est perdue. Aujourd'hui, des anticorps monoclonaux spécifiques d'alginates et de fucanes d'algues brunes ont été développés et caractérisés. Ces outils peuvent être utilisés pour localiser précisément à un niveau cellulaire et tissulaire des fractions polysaccharidiques particulières. Outre des informations sur la structure et la composition de la paroi, ces anticorps permettent d'étudier les rôles de ces polysaccharides dans de nombreuses réponses physiologiques, dont le développement. Afin d'étudier ces aspects, deux organismes modèles d'algues brunes, le zygote de *Fucus* et les sporophytes d'*Ectocarpus* ont été utilisés. Lors de cette thèse, des glycoprotéines minoritaires, des AGPs (arabino-galactanes protéines) ont été mises en évidence dans la paroi des algues brunes avec des fonctions majeures dans l'embryogénèse chez *Fucus*. L'utilisation de nos anticorps monoclonaux spécifiques a permis de montrer la dynamique de la mise en place des alginates et des fucanes au cours du développement de nos modèles. J'ai ainsi pu montrer l'implication des fucanes dans la croissance apicale et le rôle crucial du sulfate présent dans l'environnement, dans ce processus.

Mots clés : [Paroi, Alginate, Fucanes, AGPs, zygote de *Fucus*, *Ectocarpus*]

**Locations and roles of cell wall polysaccharides during the development of two models of brown algae**

Abstract :

The cell wall of brown algae is a major cell compartment involved in many physiological responses including cell growth, development, or in adaptation to the physico-chemical changes of the environment. Like other photosynthetic organisms (plants, red and green algae), brown algae have a cell wall mainly composed of polysaccharides, but taking into account phylogenetic distances, the compounds are distinct, with notably alginates and sulfated fucans. Most knowledge on cell wall compositions comes from chemical extractions carried out on whole algal plants, with the induced loss of most cellular information. Today, monoclonal antibodies specifically directed against alginates and sulfated fucans have been developed and characterized. These tools can be used to precisely localize at a cellular and tissue level their particular polysaccharide fractions. In addition to the information on the structure and composition of the cell wall, these antibodies allow to study the biological roles of the cell wall in many functional responses, including during early development. In this study, two model organisms of brown algae, the zygote of *Fucus* and the sporophytes of *Ectocarpus*, were used. In terms of cell wall composition, glycoproteins known as arabinogalactan proteins (AGPs) have been identified as minor components in the cell walls of brown algae. They were shown to have a functional role in the *Fucus* embryogenesis. The use of our specific monoclonal antibodies allowed to locate alginates and fucans in cell walls during the development of our models. Notably, I have shown the involvement of sulfated fucans in normal apical growth and the crucial role of sulfate in this process.

Keywords : [Cell wall, Alginates, Fucans, AGPs, *Fucus* zygote, *Ectocarpus*]