



**HAL**  
open science

# Métabolisme des polysaccharides de la matrice extracellulaire chez les algues brunes : histoires évolutives et approches protéomiques

Lisa Mazéas

► **To cite this version:**

Lisa Mazéas. Métabolisme des polysaccharides de la matrice extracellulaire chez les algues brunes : histoires évolutives et approches protéomiques. Biologie cellulaire. Sorbonne Université, 2023. Français. NNT : 2023SORUS597 . tel-04496123

**HAL Id: tel-04496123**

**<https://theses.hal.science/tel-04496123>**

Submitted on 8 Mar 2024

**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

École Doctorale 227 Sciences de la Nature et de l'Homme, Écologie et Évolution

*Laboratoire de Biologie Intégrative des Modèles Marins UMR8227  
Equipe de Glycobiologie Marine*

## **Métabolisme des polysaccharides de la matrice extracellulaire chez les algues brunes : histoires évolutives et approches protéomiques**

Par Lisa Mazéas  
Thèse de doctorat en Biologie Marine  
Dirigée par Cécile Hervé

Présentée et soutenue publiquement le 4 décembre 2023

### **Membres du jury**

Pr Christophe Dunand	Université Paul Sabatier, Toulouse	Rapporteur
Dr Thierry Tonon	University of York, United Kingdom	Rapporteur
Dr Catherine Rayon	Université de Picardie Jules Verne, Amiens	Examinatrice
Pr Nathalie Bourgougnon	Université Bretagne Sud, Vannes	Examinatrice
Dr Cécile HERVE	Station Biologique de Roscoff, SU/CNRS, Roscoff	Directrice de thèse
Pr Christophe Destombe	Station Biologique de Roscoff, SU/CNRS, Roscoff	Président du jury



## **Remerciements**

Premièrement, je tiens à remercier les membres de mon jury d'avoir accepté d'évaluer mon travail, Dr Thierry Tonon, Pr Christophe Dunand, Pr Nathalie Bourgougnon, Dr Catherine Rayon, Pr Christophe Destombe. J'espère que vous apprécierez la lecture de ce manuscrit.

Ensuite, je tiens à remercier Cécile pour son encadrement pendant ces 4 années et plus. Merci pour tes conseils avisés et pour m'avoir donné confiance pour mener cette thèse. Je suis toujours ressorti plus motivés à la suite de nos échanges ce qui m'a permis de tenir bon face aux difficultés.

Ludo, merci d'avoir pris le temps de m'aider, merci d'avoir suivi ce projet depuis le master. Merci pour tes précieux conseils, ta rigueur scientifique, cela a un été un plaisir d'apprendre à tes côtés.

Je tenais ensuite à remercier l'ensemble des membres de l'Equipe de Glycobiologie Marine présents et passés, merci pour votre accueil et votre bienveillance. Mirjam merci pour ton expertise et tes encouragements. Tristan, merci pour ton implication dans ce travail. Murielle, merci pour ta disponibilité, ton implication et tes conseils. Merci à Maéva, Guillaume, Jasna, Antonin, c'était un plaisir de vous croiser au labo, merci pour votre écoute. Merci Ahlem pour ton soutien, je te souhaite une bonne dernière année de thèse ! Merci à Chloé pour le travail qu'elle a fourni pendant son stage. Sabine, merci pour ton aide au labo et tes encouragements. Merci à Bernard aussi, sans qui je n'en serais pas là. Et tous les autres, Lionel, Diane, François, Liz, Gurvan...

Merci à Stéphane Égée de m'avoir accueillie au sein de l'UMR, merci pour ton écoute et tes encouragements.

Je remercie les membres de l'ANR BROWN SUGAR avec lesquels j'ai pu collaborer et sans qui les résultats de cette thèse n'auraient été possibles. Merci à Nicolas et l'équipe CAZy pour leur implication dans l'annotation des CAZymes d'algues brunes. Merci aussi pour leur accueil royal à Marseille. Merci d'avoir pris le temps de me faire découvrir le monde des CAZymes. Ce fut très enrichissant. À l'équipe Protim de Rennes, merci également de m'avoir accueilli quelques jours, merci pour la prise en charge des analyses protéomiques. Emmanuelle, Aurélie, merci pour votre réactivité, vos conseils, votre écoute et vos encouragements.

Aussi, je tiens à remercier le Service de Culture d'algue de la Station, en particulier, merci à Laurence pour ses conseils, Dan sans qui bon nombre d'extractions n'auraient pas été possibles, merci d'avoir été aussi réactif. Merci à Sylvie aussi pour son expertise. Merci aussi à Sophie de la plateforme de microscopie, merci pour ta contribution à ce travail de thèse, et de l'intérêt que tu as porté à mon projet, ce fut un plaisir de travailler avec toi. Merci aussi aux membres de Phaeoexplorer avec lequel j'ai pu travailler, merci Lorraine, Pélagie de m'avoir aidé avec les analyses bioinformatiques.

Je remercie aussi les membres de mon comité de thèse, Catherine Le Blanc, Olivier Lerouxel, Anne Harduin-Lepers, merci pour votre aide et vos encouragements, ça a été un plaisir d'échanger avec vous. Je pense aussi à Anne-Claire Baudoux et Philippe Potin qui ont pris le temps d'échanger sur mon sujet et mes problématiques.

Au membre du bureau 336 présents et passés, merci, Aurélien, Sam merci pour la bonne ambiance, le soutien et la créativité. Pensées aussi au bureau de l'Association des Jeunes Chercheurs de la Station 2020/2021/2022, Jérémy, Yasmine, Auré, Roman, Emma, Erwan, Martin, ce fut une expérience associative riche à vos côtés. Merci à mes amies, amis, sans qui cette expérience n'aurait pas été la même. Merci pour votre soutien et encouragements. Je me sens chanceuse d'avoir pu profiter de Roscoff à vos côtés, Louison, Jérémy, Momo, Doug, Camille, Yas, Mariana, Jana, Dan, Sam, Mathilde, Erwan...

Antho merci pour ton soutien inconditionnel, merci de t'être intéressé à ce travail.

Enfin, je remercie ma famille pour leur soutien, merci Kervoad village pour les week-ends ressourçant...

## Table des matières

Chapitre I : Introduction générale .....	11
1) Les algues brunes : position phylogénétique et organisation subcellulaire .....	12
2) La matrice extracellulaire chez les algues brunes .....	16
2.1) Définitions et rôles.....	16
2.2) Architecture et composition.....	18
3) Biosynthèse des polysaccharides de la MEC chez les algues brunes .....	21
3.1) Localisation subcellulaire de la biosynthèse des polysaccharides de la MEC .....	21
3.2) Enzymes impliquées dans le métabolisme des polysaccharides.....	24
3.3) Voies de biosynthèses des polysaccharides de la MEC chez les algues brunes .....	26
4) Problématique et objectifs de la thèse .....	29
Article de revue.....	32
Chapitre II : Histoire évolutive des polysaccharides de la MEC chez les algues brunes .....	33
1) Introduction.....	34
2) Matériel et Méthode .....	36
3) Résultats et Discussion .....	38
3.1) Le nombre de CAZymes varie peu entre les génomes d'algues brunes .....	38
3.2) Exploration des gènes candidats pour la synthèse des fucanes.....	43
3.3) Origine et évolution de la voie métabolique de l'alginate chez les algues brunes .....	65
3.4) <i>S. ischiensis</i> possède-t-elle une MEC typique des Phaeophyceae ? .....	75
4) Conclusion .....	76
Annexe 1. Arbre phylogénétique ouvert des ST de Straménopiles.....	78
Annexe 2. Arbre phylogénétique ouvert des ManC5-E .....	79
Chapitre III : Mise en place d'un enrichissement en microsomes .....	81
1) Introduction.....	82
1.1) Difficultés pour obtenir un enrichissement en appareil de Golgi .....	82
1.2) Méthode de validation de l'enrichissement.....	83
1.3) Analyse des données de protéomique .....	84
1.4) Modèles d'études.....	84
1.5) Présentation du chapitre.....	85
2) Matériel et méthodes.....	86
3) Résultats et discussion.....	94
3.1) Identification d'une méthodologie générale.....	94

3.2) Tentative de génération d'un marqueur de l'appareil de Golgi chez les algues brunes	108
3.3) Développement d'un protocole d'isolement de microsomes à partir du modèle <i>Saccharina latissima</i> : l'apport de la MET et des analyses protéomiques	113
3.4) Tentative de purification d'appareil de Golgi à partir de fraction de 'microsomes' d'algues brunes	117
4) Conclusions	120
Chapitre IV : Enrichissement en microsomes et identification d'enzymes liées au métabolisme des polysaccharides chez l'algue brune <i>Saccharina latissima</i>	121
1) Introduction	122
2) Matériel et méthodes	124
3) Résultats	128
3.1) Validation expérimentale de l'enrichissement en microsomes	128
3.2) Analyse protéomique qualitative des fractions obtenues	130
3.3) Analyse protéomique quantitative des fractions obtenues	138
3.4) Identification des enzymes associées au métabolisme des carbohydrates	140
4) Discussion	152
Chapitre V : Tests d'expression hétérologues de glycosyltransférases d'algues brunes	155
1) Introduction	156
2) Matériel et méthodes	159
3) Résultats et discussion	164
3.1) Expression hétérologue	164
3.2) Tests d'activités glycosyltransférases	170
4) Conclusion	171
Article en collaboration	172
Chapitre VI : Discussion générale et perspectives	173
1) Sur les traces de l'origine des polysaccharides de la MEC des algues brunes	174
2) Approches combinées pour l'étude du métabolisme de polysaccharides de la MEC chez les algues brunes	175
2.1) Voie de biosynthèse des FCSP	175
2.2) Voie de biosynthèse des alginates	177
3) Perspectives pour l'étude du métabolisme des alginates et des FCSP	179
Bibliographie	181
Résumé	203

## Table des Figures

Figure I. 1 Arbre phylogénétique des eucaryotes. ....	12
Figure I. 2 Arbre phylogénétique des Straménopiles. ....	13
Figure I. 3. Phylogénie des algues brunes (Phaeophyceae) indiquant leurs différents ordres. ....	14
Figure I. 4. Modèles d'endosymbioses plastidiales. ....	15
Figure I. 5. Organisation subcellulaire chez les algues brunes. ....	16
Figure I. 6. Modèles de MEC et fonctions communes chez les animaux, algues brunes et plantes. ....	17
Figure I. 7. Rôles clés de la MEC chez les algues brunes. ....	18
Figure I. 8. Modèle de MEC des algues brunes avec des structures clés de FCSP et des alginates. ....	19
Figure I. 9. Représentation simplifiée de la mise en place des polysaccharides de la MEC chez les plantes. ....	22
Figure I. 10. Immunolocalisation de FCSP et des alginates au niveau subcellulaire chez le zygote de <i>Silvetia babingtoni</i> (Fucales). ....	23
Figure I. 11. Présentation simplifiée d'action de GT et de leur type d'ancrage membranaire. ....	26
Figure I. 12. Schéma des voies métaboliques des alginates et des fucanes sulfatés. ....	29
Figure II. 1. Arbre phylogénétique des algues brunes et de leurs groupes sœurs et illustrations de la diversité de leurs morphologies. ....	34
Figure II. 2. Représentation de la phylogénie des Ochrophyta. ....	35
Figure II. 3. Distribution des CAZymes chez les algues brunes et leurs groupes sœurs. ....	39
Figure II. 4. Distribution des CAZymes chez les Phaeophyceae et leurs groupes sœurs. ....	41
Figure II. 5. Arbres phylogénétiques des enzymes clés des premières étapes de la synthèse des fucanes et de l'alginate. ....	44
Figure II. 6. Arbres phylogénétiques des enzymes clés de la synthèse du GDP-fucose par la voie <i>de novo</i> . ....	45
Figure II. 7. Arbre phylogénétique de la famille GT74. ....	48
Figure II. 8. Arbre phylogénétique de la famille GT41. ....	50
Figure II. 9. Arbre phylogénétique de la famille GT10. ....	52
Figure II. 10. Comparaison de GT10 de l'algue brune avec la protéine bactérienne structurellement caractérisée. ....	54
Figure II. 11. Carte de chaleur des séquences d'algues brunes et d'animaux au sein de la famille GT23. ....	56
Figure II. 12. Arbre phylogénétique des GT23 de Phaeophyceae et de leur groupe sœur des Schizocladiphyceae. ....	57
Figure II. 13. Comparaison d'une GT23 de Phaeophyceae avec la protéine humaine FUT8 caractérisée structurellement. ....	58
Figure II. 14. Arbre phylogénétique non raciné des sulfotransférases d' <i>Ectocarpus</i> sp. 7, <i>Cladosiphon okamuranus</i> , <i>Nemacystus decipiens</i> , <i>Saccharina japonica</i> . ....	60
Figure II. 15. Arbre phylogénétique des ST d'algues brunes et d'autres Straménopiles. ....	61
Figure II. 16. Carte de chaleur entre des séquences de ST d'algues brunes et de métazoaires. ....	62
Figure II. 17. Région synténique de gènes pouvant être liés au métabolisme des fucanes. ....	63
Figure II. 18. Carte de chaleur des protéines de Phaeophyceae au sein de la superfamille des GDP-mannose/UDP-glucose déshydrogénases (GMD/UGD). ....	66
Figure II. 19. Arbre phylogénétique des GMD d'algues brunes. ....	67
Figure II. 20. Mannuronane C5-épimérasés chez les algues brunes. ....	69
Figure II. 21. Arbre phylogénétique des alginates lyases de la famille PL41. ....	71

Figure II. 22. Arbres phylogénétiques des DEHU réductases, connues pour être impliquées dans la dégradation de l'alginate.....	72
Figure II. 23. Arbre phylogénétique des GH88. ....	73
Figure III. 1. Schématisation des différentes formes adoptées par l'appareil de Golgi après extraction. ....	83
Figure III. 2. Schéma résumant les étapes clés et les conditions testées pour l'isolement d'organites d'algues brunes. ....	94
Figure III. 3. Les différents types de matériel de départ testés.....	96
Figure III. 4. Les différentes méthodes de broyage testées. ....	97
Figure III. 5. Principales méthodes de séparation des organites utilisées. ....	100
Figure III. 6. Méthodes classiques de validation d'un enrichissement en organites.....	101
Figure III. 7. Immunohistochimie des chloroplastes, avec les anticorps anti-Rbcl, sur une coupe de <i>S. latissima</i> . ....	104
Figure III. 8. Immunodétection sur gel de la Rbcl d'algue brune lors d'une comparaison entre une extraction au hachoir et au mortier, avec et sans PVPP. ....	105
Figure III. 9. Immunohistochimie d'une coupe de <i>S. latissima</i> en MET. ....	106
Figure III. 10. Suivi de l'enrichissement en chloroplastes chez <i>S. latissima</i> . ....	107
Figure III. 11. Purification de la protéine <i>EsRab6</i> recombinante.....	111
Figure III. 12. Invalidation de l'anticorps anti- <i>EsRab6</i> comme marqueur de l'appareil de Golgi chez l'algue brune <i>S. latissima</i> .....	112
Figure III. 13. Comparaison en MET de l'impact des méthodes de broyage sur l'obtention d'un enrichissement en microsomes.....	114
Figure III. 14. Observations en MET de fraction 'microsomes' obtenues avec un tampon d'extraction contenant un fixateur.....	115
Figure III. 15. Avantage du tampon d'extraction contenant du fixateur sur l'enrichissement en protéines référencées.....	116
Figure III. 16. Impact de la présence du fixateur sur l'enrichissement en termes GO des fractions 'microsomes' de <i>S. latissima</i> . ....	116
Figure III. 17. Comparaison du nombre de GT entre les fractions 'microsomes' de <i>S. latissima</i> réalisées avec et sans PFA. ....	117
Figure III. 18. Etude préliminaire d'une séparation sur gradient de sucrose pour optimiser l'enrichissement en appareil de Golgi. ....	118
Figure III. 19. Analyse d'une séparation sur gradient de sucrose par suivi de termes GO.....	119
Figure III. 20. Comparaison du nombre de GT entre des fractions de gradient issus d'extraction au hachoir électrique et au mortier à partir de <i>F. serratus</i> .....	120
Figure IV. 1. Procédure expérimentale d'enrichissement en microsomes et analyse en protéomique associée. ....	123
Figure IV. 2. Mesure de la qualité de l'enrichissement des différentes fractions obtenues. ....	128
Figure IV. 3. Images en MET des différentes fractions subcellulaires. ....	130
Figure IV. 4. Description qualitative des analyses en protéomique des fractions obtenues. ....	131
Figure IV. 5. Comparaison qualitative du contenu protéique entre les fractions obtenues.....	132
Figure IV. 6. Prédiction de localisation subcellulaire des protéines identifiées dans les fractions, à partir d'un outil de prédiction propre aux Straménopiles. ....	133
Figure IV. 7. Prédiction de localisation subcellulaire des protéines identifiées dans les fractions, par exploitation de bases de données publiques. ....	134
Figure IV. 8. Enrichissements en termes GO dans les fractions obtenues. ....	137



Figure IV. 9. Abondance relative des protéines identifiées entre les différentes fractions.....	139
Figure IV. 10. Abondance différentielle des protéines marqueurs de compartiments subcellulaires entre les fractions obtenues. ....	140
Figure IV. 11. Nombre de glycosyltransférases identifiées dans les fractions obtenues suivant leurs familles et leur localisation putative. ....	142
Figure IV. 12. Enrichissement relatif en GT dans la fraction ‘microsomes’ par rapport aux fractions ‘chloroplastes’ et ‘mitochondries’.....	145
Figure IV. 13. Nombre de GH et enrichissement relatif dans les différentes fractions. ....	149
Figure IV. 14. Nombre de ST identifiées par clades et enrichissement relatif dans les fractions. ....	151
Figure V. 1. Séquences protéiques de <i>EsGT23</i> , <i>SlGT23</i> et <i>EsGT64</i> . ....	159
Figure V. 2. Détection d’activité glycosyltransférase à l’aide du Glo-Kit (Promega).....	163
Figure V. 3. Expression de la <i>EsGT64</i> recombinante dans trois conditions de concentrations d’inducteurs.....	165
Figure V. 4. Immunodot montrant les résultats des tests d’expression hétérologue à moyen débit. 165	
Figure V. 5. Détection des GT23 pour différentes co-expression avec des protéines chaperonnes. .	166
Figure V. 6. Purification de la protéine <i>SlGT23</i> sur colonne d’affinité. ....	168
Figure V. 7. Purification <i>EsGT23</i> sur colonne His-Tag.....	169
Figure V. 8. Test d’activité avec des GT23 recombinantes de Phaeophyceae. ....	170
Figure VI. 1. Scénario proposé pour l’évolution de de la MEC chez les algues brunes et leurs groupes sœurs.....	175
Figure VI. 2. Représentation putative au niveau subcellulaire de la voie de biosynthèse des fucanes sulfatés. ....	177

## Table des tableaux

Tableau II. 1. Nombre de gènes de fucosyltransférases putatives chez 4 génomes d’algues brunes. .	46
Tableau II. 2. Nombre de gènes de fucosyltransférases putatives chez les Phaeophyceae et leurs groupes sœurs.....	47
Tableau III. 1. Anticorps commerciaux testés sur les algues brunes <i>S. latissima</i> et <i>F. serratus</i> .....	103
Tableau III. 2. Homologie de <i>EsRab6</i> avec d’autres membres de la famille Rab d’ <i>Ectocarpus</i> .....	110
Tableau IV. 1. Nombre de protéines ayant au moins un terme GO associé dans les fractions obtenues. ....	135
Tableau IV. 2. Activité et localisation de GT eucaryotes appartenant aux familles identifiées par analyse protéomique chez <i>S. latissima</i> . ....	143
Tableau IV. 3. Activité et localisation des familles de GH appartenant aux familles identifiées par analyse protéomique chez <i>S. latissima</i> . ....	150
Tableau V. 1. Stratégie de clonage avec les chaperonnes du kit Takara Bio Plasmid set <sup>®</sup> . ....	160
Tableau V. 1. Stratégie de clonage avec les chaperonnes du kit Takara Bio Plasmid set <sup>®</sup> . ....	160

## Abréviations

AA : activité auxiliaire  
ARF1 : ADP Ribosylation Facteur de type I  
BiP : *binding immunoglobulin*  
BSA : albumine de sérum bovin  
CAZymes : Carbohydrate-Active enZymes  
CBM : *carbohydrate-binding modul*  
CE : carbohydrate estérase  
DEH : 4-deoxy-L-erythro-5-hexoseulose uronique  
DTT : dithiothréitol  
ECL : électrochimiluminescence  
EGGNOG : *evolutionary gene and ortholog group*  
ESI Q-TOF : *electrospray ionization quadrupole time-of-flight*  
FCSP : polysaccharides sulfatés contenant du fucose  
FDR : *False Discovery Rate*  
FFE : électrophorèse à flux libre  
FucT : fucosyltransférase  
GM46D : GDP-mannose 4,6-dehydratase  
GFPP : GDP-fucose pyrophosphorylase  
GH : glycoside hydrolase  
GlcNAc : N-acétylglucosamine  
GlcNAcT :  $\beta$ -N-acétylglucosaminyltransférase  
GMD : GDP-mannose déshydrogénase  
GO : *Gene Ontology*  
GT : glycosyltransférase  
HRP : peroxydase de raifort  
HGT : *Horizontal Gene Transfer*  
IPDase : inosine diphosphatase  
KGD : 2-keto-3-deoxy-gluconate  
L-FK : L-fucokinase  
LPMO : *lytic polysaccharide monoxygenase*  
ManC5-E : mannuronane C5-épimérase  
MEC : matrice extracellulaire  
MET : microscopie électronique à transmission  
MPI : mannose-6-phosphate isomérase  
NDPases : nucléotides disphosphatases  
PBS : tampon phosphate salin  
PFA : paraformaldéhyde  
PL : polysaccharide lyase  
PMM : phosphomannomutase  
PS : peptide synthétique  
PVPP : polyvinylpolypyrrolidone  
RbcL : grande sous unité de la RubisCO  
RE : réticulum endoplasmique  
REC : réticulum endoplasmique lié au chloroplaste  
RubisCO : ribulose-1,5 bisphosphate carboxylase/oxygénase

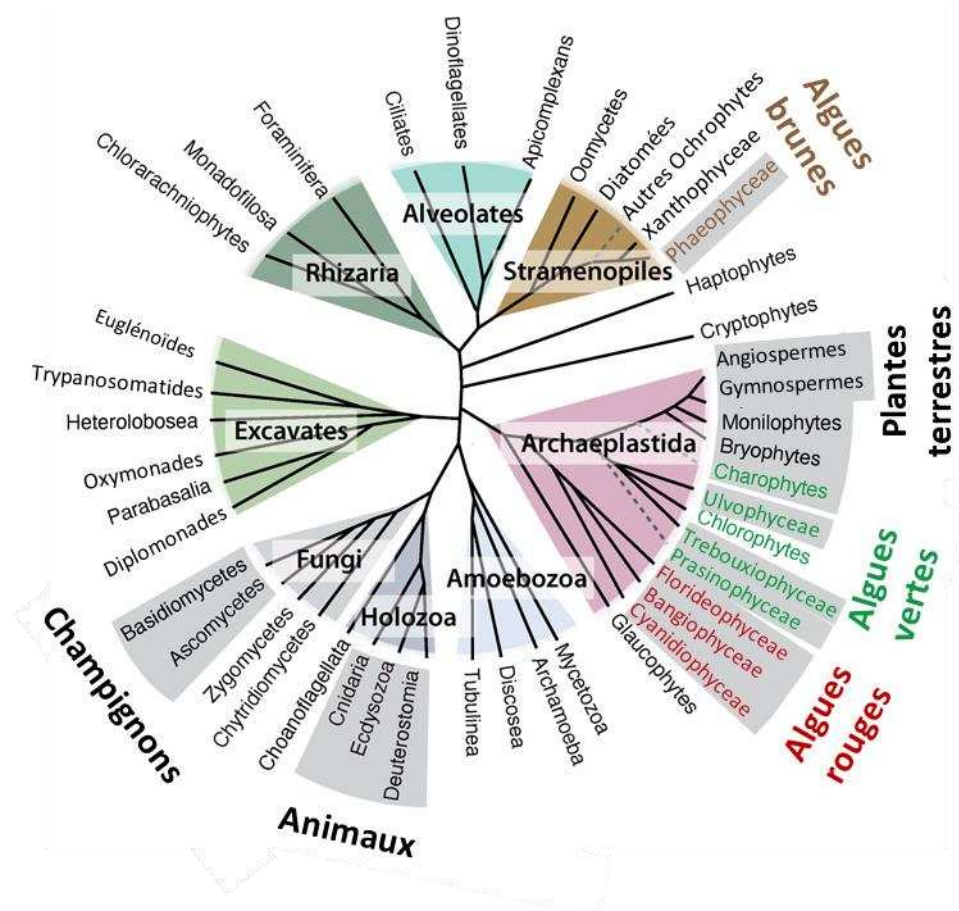
SDS : dodécylsulfate de sodium  
SDS-PAGE : gel de polyacrylamide SDS  
SHMT : sérine hydroxyméthyltransférase  
UDPase : uridine diphosphatase

# **Chapitre I : Introduction générale**

Durant mon travail de thèse, j'ai participé à l'écriture d'une revue sur l'assemblage et la biosynthèse des polysaccharides de la matrice extracellulaire (MEC) chez les algues brunes (Mazéas et al., 2023). Cette revue est incorporée à la fin de ce chapitre. Ce chapitre d'introduction étaye et reprend certains aspects de la revue, importants pour la compréhension de la suite du manuscrit. À noter que certains résultats issus de cette étude seront intégrés dans le chapitre II.

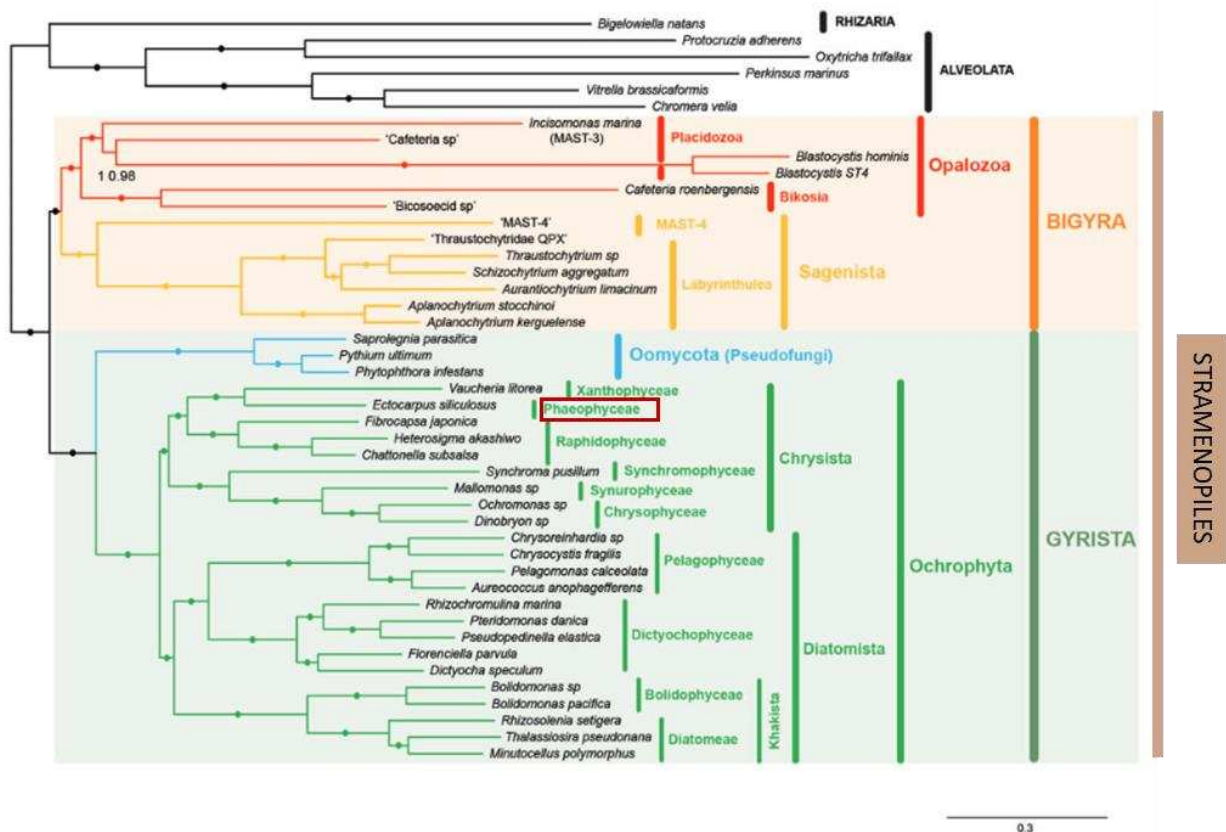
## 1) Les algues brunes : position phylogénétique et organisation subcellulaire

Au cours de l'évolution des eucaryotes, un nombre limité de lignées sont parvenues à élaborer des organismes multicellulaires complexes, ce sont les animaux, les champignons, les plantes terrestres, les algues vertes, les algues rouges et les algues brunes (Figure I.1). Un organisme multicellulaire complexe est un organisme macroscopique qui possède plusieurs types cellulaires associés à des mécanismes de division et de différenciation cellulaire. L'acquisition d'une multicellularité complexe chez les algues brunes ou Phaeophyceae est indépendante des autres lignées (Cock et al., 2010 ; Cock & Collén, 2015).



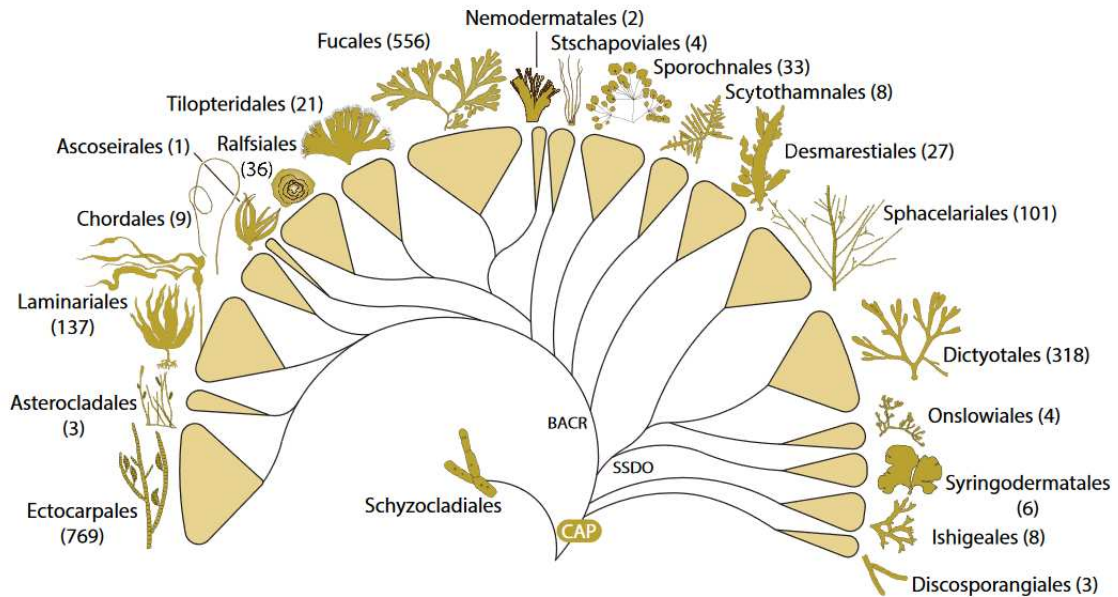
**Figure I. 1. Arbre phylogénétique des eucaryotes.** Les lignées grisées possèdent des organismes à la multicellularité complexe (Kloareg et al., 2021 adapté de Coelho et al., 2020).

Les algues brunes sont classées dans le groupe des Ochrophyta qui est le seul groupe photosynthétique des Straménopiles. Les Straménopiles se divisent en deux groupes majoritaires, les Gyrista auquel appartiennent les ochrophytes et les Pseudofungi (qui comportent les oomycètes) et les Bigyra (Figure I.2). Au sein des ochrophytes, la plupart des lignées sont unicellulaires (par exemple les Bacillariophyta ou diatomées) dont certaines espèces peuvent s'organiser en filaments (par exemple *Vaucheria* et *Botrydium* dans les Xanthophyceae). Chez les ochrophytes on trouve aussi des organismes qui possèdent une multicellularité simple (par exemple les Phaeothamniophyceae) ou une multicellularité complexe (Phaeophyceae ou algues brunes) (Bringloe et al., 2020).



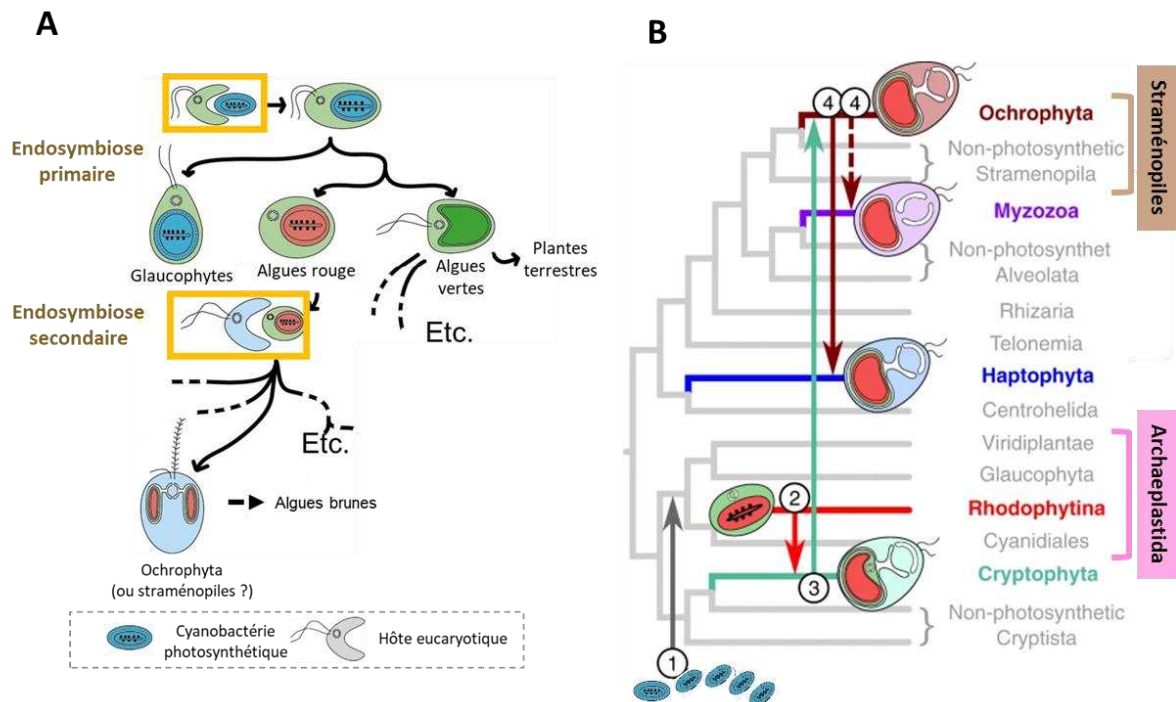
**Figure I. 2. Arbre phylogénétique des Straménopiles.** Le groupe des algues brunes ou Phaeophyceae est encadrée en rouge. Les Alveolata et Rhizaria servent de groupe extérieur. La figure est tirée de Derelle et al., 2016).

Les algues brunes qui sont apparues il y a environ 250 millions d'années (Kawai et al., 2015) se distinguent en étant le seul groupe au sein des Ochrophyta à avoir développé une multicellularité complexe. Elles sont réparties dans 19 ordres et possèdent une grande diversité de morphologies et de schémas de développement (Bringloe et al., 2020) (Figure I.4). Les algues brunes sont des organismes importants des environnements côtiers tempérés (Teagle et al., 2017). Elles remplissent des rôles essentiels en tant que producteurs primaires des zones intertidales, et sont des espèces structurantes des écosystèmes (Jones et al., 1994 ; Mineur et al., 2015 ; Teagle et al., 2017).



**Figure I. 3. Phylogénie des algues brunes (Phaeophyceae) indiquant leurs différents ordres.** Entre parenthèses figurent les nombres d'espèces dans chaque ordre selon AlgaeBase (Guiry & Guiry, 2020). CAP : ancêtre commun des Phaeophyceae ; SSDO : clade des Sphacelariales, Syringodermatales, Dictyotales, Onslowiales ; BACR : radiation de la couronne des algues brunes. Le groupe des Schyzocladiales (ordre) ou Schizocladiphyceae (classe) est le groupe sœur le plus proche des Phaeophyceae. Figure issue de Bringloe et al., (2020).

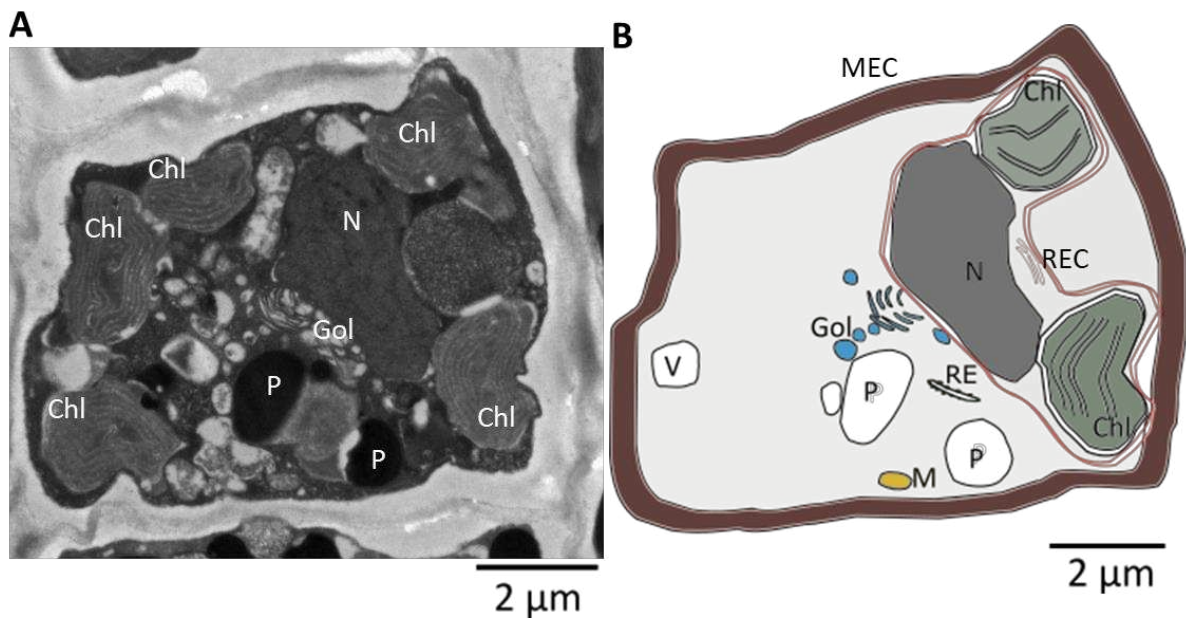
Les algues brunes tout comme les autres ochrophytes possèdent des plastes provenant d'une algue rouge ancestrale. L'organisme de provenance de ce plaste est difficile à mettre en évidence. Dans la littérature, plusieurs scénarios sont discutés quant à l'acquisition de ce plastide et son origine (Keeling, 2013 ; Petersen et al., 2014 ; Strassert et al., 2021). Une des hypothèses est que ce plaste aurait été acquis par un événement d'endosymbiose secondaire ancestrale avec une algue rouge (Figure I.4.A) (Keeling, 2013). Par ailleurs, d'autres hypothèses voient le jour avec l'acquisition de données de génomique et notamment, un scénario d'endosymbiose tertiaire (Petersen et al., 2014 ; Stiller et al., 2014). Dans ce cas, une endosymbiose aurait eu lieu entre un hôte et un eucaryote ayant un plaste lui-même dérivé d'une algue rouge, et qui appartiendrait aux Cryptophytes (Figure I.4.B) (Bodył et al., 2009 ; Stiller et al., 2014). La chronologie précise associée à ces événements est complexe à retracer et reste hypothétique (Burki et al., 2016 ; Strassert et al., 2021). Le plaste des algues rouges est lui issu d'un premier événement d'endosymbiose entre un protiste et une cyanobactérie. C'est de cette endosymbiose primaire que provient également la lignée verte (algues vertes et plantes) ainsi que les glaucophytes (Figure I.4).



**Figure 1. 4. Modèles d'endosymbioses plastidiales. A)** Modèle simplifié de deux évènements d'endosymbiose adapté de Keeling (2004), **B)** Exemple de modèle d'endosymbioses en série proposé par Strassert et al., (2021) et basé sur le travail de Stiller et al., (2014). Les chiffres correspondent aux niveaux des événements d'endosymbioses, le premier étant une endosymbiose avec une cyanobactérie photosynthétique.

L'histoire évolutive associée aux algues brunes a impacté leur organisation subcellulaire. Ainsi leurs chloroplastes sont entourés par 2 doubles membranes appelées enveloppes (Charrier et al., 2008 ; Oliveira & Bisalputra, 1977). L'enveloppe externe est fusionnée avec une partie du réticulum endoplasmique (RE) et forme le RE du chloroplaste (REC) (Figure 1.5). Cette membrane externe entoure aussi le noyau et la membrane nucléaire et sont proches de l'appareil de Golgi (Oliveira & Bisalputra, 1977). Du fait de cette organisation subcellulaire, l'adressage des protéines est adapté entre les différents compartiments. Un outil d'analyse de prédiction d'adressage subcellulaire des protéines a été spécialement conçu pour les Straménopiles et en particulier les Straménopiles photosynthétiques, en prenant en compte les signaux d'adressage entre ces membranes, c'est l'outil HECTAR pour '*H*Eterokont *s*ub*C*ellular *l*ocalisation *T*ARgeting *m*ethod' (Gschloessl et al., 2008).





**Figure 1. 5. Organisation subcellulaire chez les algues brunes.** **A)** Coupe de tissu de *Saccharina latissima* observée en microscopie électronique à transmission (MET). **B)** Schéma représentatif de l'image figurée en A) et montrant les différents compartiments cellulaires, ainsi que l'organisation membranaire.

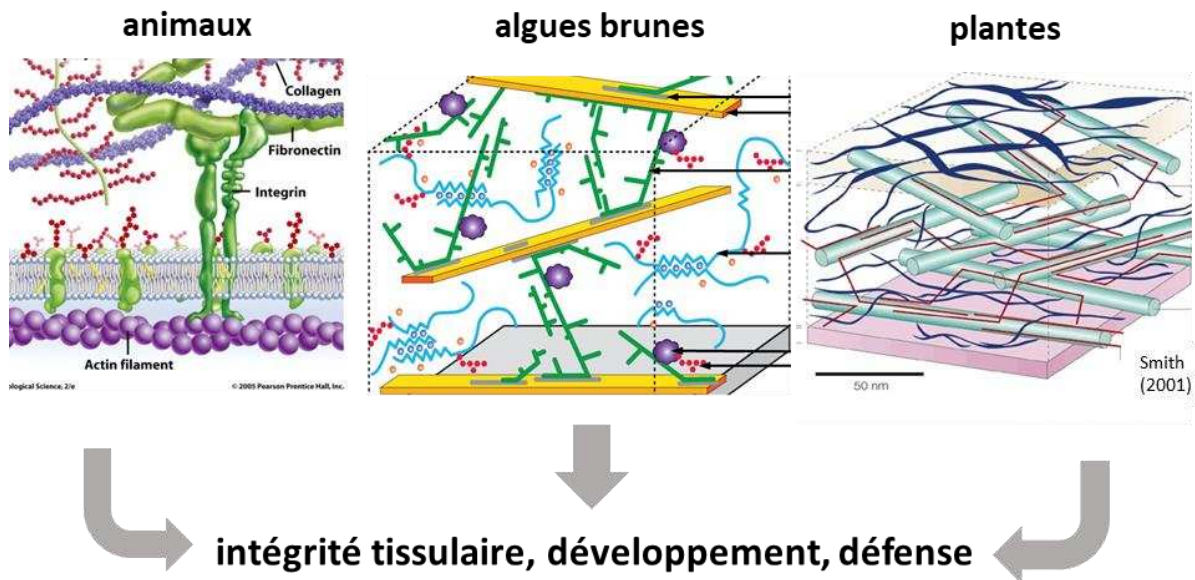
Chl chloroplaste, MEC, matrice extracellulaire, Gol appareil de Golgi, N noyau, V vacuole, M mitochondries, P physode, RE réticulum endoplasmique, REC réticulum endoplasmique associé aux chloroplastes

## 2) La matrice extracellulaire chez les algues brunes

### 2.1) Définitions et rôles

La matrice extracellulaire (MEC) peut se définir comme étant un réseau de 'supramolécules' complexes se trouvant à l'extérieur des cellules et qui s'enchevêtrent pour former un réseau apportant à la fois souplesse et maintien structurel, tout en assurant la protection de la cellule. La MEC constitue une barrière avec l'environnement extérieur. MEC et paroi désignent des structures légèrement distinctes chez les plantes et champignons, la MEC englobant la paroi, la lamelle moyenne et la cuticule chez les plantes (Grandjean, 2022). Ces compartiments sont constitués de composés différents. La présence d'une lamelle moyenne distincte de la paroi est rarement observée chez les cellules d'algues brunes, qui sont aussi dépourvues de cuticule. Aussi, les deux termes MEC et paroi sont considérés synonymes chez ces organismes. En outre, nous considérons le terme MEC plus englobant parce qu'il permet d'éviter des rapprochements avec les parois de plantes/champignons, qui sont erronés d'un point de vue phylogénétique et de composition. Chez les animaux, les plantes terrestres et les champignons, cette MEC est bien caractérisée (par exemple Gow et al., 2017 ; Karamanos et al., 2021

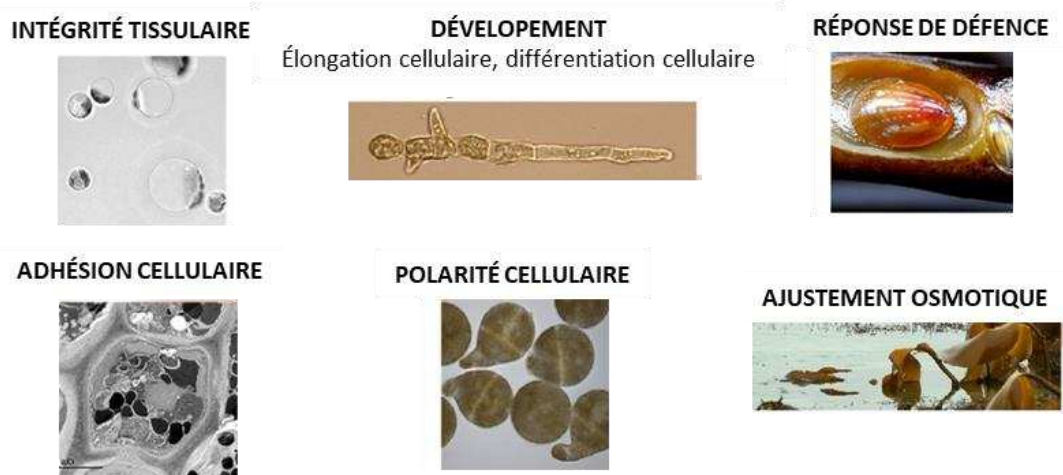
; Zhang et al., 2021) et l'est moins chez les algues brunes. Bien que la composition de ces MEC soit variable d'un point de vue phylogénétique, de nombreuses fonctions convergentes ont été identifiées, les principales étant le maintien de l'intégrité tissulaire, l'implication dans les mécanismes de développement et dans des réponses de défenses (Figure I.6) (Kloareg et al., 2021 ; Popper et al., 2011).



**Figure I. 6. Modèles de MEC et fonctions communes chez les animaux, algues brunes et plantes.** Les trois fonctions communes principales sont indiquées ici. Les MEC animales sont principalement composées de protéines structurales telles que le collagène, de glycoprotéines et de protéoglycanes tels que de glycosaminoglycanes. La paroi chez les plantes de type dicotylédones (paroi de type I) est majoritairement composée de polysaccharides tels que la cellulose, les hémicelluloses et les pectines. Le modèle de MEC d'algues brunes (Deniaud-Bouët et al., 2014) est, lui aussi, riche en polysaccharides et sera discuté dans la partie 2.2.

Chez les algues brunes, plusieurs fonctions de la MEC sont décrites (Figure I.7) (Deniaud-Bouët et al., 2017 ; Kloareg et al., 2021). Si l'on reprend les trois fonctions majoritaires décrites ci-dessus (Figure I.6), le rôle de la MEC des algues brunes dans le maintien de l'intégrité tissulaire a été montré de par ses propriétés mécaniques et biochimiques qui favorisent l'adhésion cellulaire (Salgado et al., 2009). Ces propriétés peuvent varier suivant les tissus (Haug et al., 1974). La MEC des algues brunes participe aussi à la régulation des processus de développement (Kloareg et al., 2021). Par exemple, chez *Fucus* la MEC est essentielle pour la mise en place de l'axe de polarité du zygote et joue un rôle dans la mise en place du destin cellulaire (Berger et al., 1994 ; Bisgrove & Kropf, 2001 ; Torode et al., 2015). La MEC jouer un rôle dans la croissance cellulaire, en effet, l'accumulation de polysaccharides sulfatés a été observé à l'extrémité des cellules apicales chez *E. subulatus* où se produit la croissance

(Hervé et al., 2016 ; Siméon et al., 2020). La MEC participe aussi à la morphogenèse, en effet, un mutant d'*Ectocarpus* présente une morphologie particulière (hyperbranchée) du fait d'un problème de mise en place de la MEC (Le Bail et al., 2011). Enfin, la MEC des algues brunes joue un rôle important en tant qu'interface avec le milieu extérieur, en faisant face à des stress biotiques et abiotiques. En effet, son implication dans l'immunité innée a été décrite, elle intervient dans la protection des cellules face à des pathogènes (Küpper et al., 2001 ; Tsirigoti et al., 2015). Également, elle est impliquée dans l'ajustement osmotique et dans la résistance aux variations de salinité (Kloareg et al., 1987 ; Siméon et al., 2020 ; Torode et al., 2015). Elle participe ainsi à la résistance des algues face à la dessiccation (Kloareg et al., 2021).



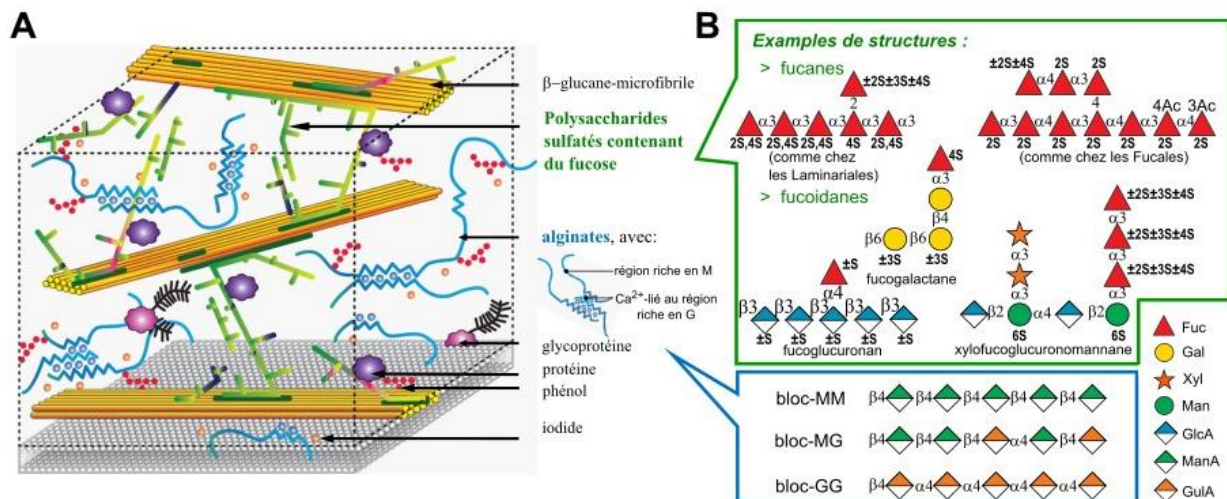
**Figure 1. 7. Rôles clés de la MEC chez les algues brunes.** Les principaux rôles décrits dans la littérature sont indiqués et illustrés : l'intégrité tissulaire (protoplastes *E. siliculosus*) et l'adhérence cellulaire (cellules d'un stipe de *S. latissima*), les processus de développement (filament d'*Ectocarpus* sp. 7), la mise en place de la polarité cellulaire (zygote de *Fucus serratus*), les réponses de défenses (helcions qui se nourrissent en creusant une cavité) et l'ajustement osmotique (des laminaires à marée basse) (adapté de Deniaud-Bouët et al., 2017).

## 2.2) Architecture et composition

Chez les algues brunes, les connaissances sur l'organisation de la MEC et de sa chimie détaillée sont encore limitées. Les polysaccharides sont les principaux constituants, la majorité d'entre eux étant les alginates (~10-45 % du poids sec, Kloareg & Quatrano, 1988 ; Schiener et al., 2015) et les polysaccharides sulfatés contenant du fucose (FCSP) (~ 3-26 % du poids sec, García-Ríos et al., 2012), la cellulose étant plus minoritaire (1-8% du poids sec, Kloareg & Quatrano, 1988). Ces composants ont été intégrés dans un modèle de MEC pour des espèces de Phaeophyceae de l'ordre des Fucales (Deniaud-Bouët et al., 2014). Il s'agit du premier modèle de MEC significatif établi pour les algues brunes. Ce modèle fait état de l'agencement de deux réseaux constitués pour partie par des

polysaccharides : le premier réseau est composé de FCSP reliant des polysaccharides cristallins de  $\beta$ -glucanes (cellulose et/ou glucanes à liaisons mixtes), et le second réseau qui s'enchevêtre dans le premier, est composé d'alginate, parfois liés à des phlorotannins (Birkemeyer et al., 2020 ; Deniaud-Bouët et al., 2014, 2017 ; Salmeán et al., 2017) (Figure. I.8.A). Les protéines (Quatrano & Stevens, 1976), les glycoprotéines (Hervé et al., 2016), les composés halogénés et d'autres ions (Verhaeghe et al., 2008) sont d'autres composants de la MEC des algues brunes (Figure. I.6.A).

La proportion relative des différents composants de la MEC, ainsi que le détail des structures chimiques, peuvent varier d'une espèce à l'autre, d'un type cellulaire à l'autre au sein d'une algue spécifique, en réponse à des facteurs abiotiques ou biotiques (Andrade et al., 2010 ; Bruhn et al., 2017 ; Fletcher et al., 2017 ; Laurens et al., 2020 ; Mak et al., 2013 ; Ponce & Stortz, 2020). La composition de la MEC peut aussi varier au cours du développement (Bisgrove & Kropf, 2001 ; Torode et al., 2015).



**Figure I. 8. Modèle de MEC des algues brunes avec des structures clés de FCSP et des alginates.** Le modèle de MEC est basé sur les algues brunes de l'ordre des Fucales. Inspiré de Deniaud-Bouët et al., (2014, 2017) et Mazéas et al., (2023).

Les FCSP représentent une fraction complexe regroupant des hétéropolysaccharides de composition et structures diverses. Les termes fucanes et fucoïdanes ont longtemps été utilisés de manière confuse dans la littérature, parfois en tant que synonymes, ce qui peut rendre difficile l'interprétation de certaines données. En 2017, le laboratoire a incité la communauté à utiliser des définitions communes plus rigoureuses (Deniaud-Bouët et al., 2017). Le terme FCSP est désormais plus largement utilisé et ces composés constitutifs (fucanes/fucoïdanes), mieux définis. Les fucanes sont des polysaccharides fortement sulfatés dont la structure de la chaîne principale est basée sur des résidus L-fucose, certains de ces résidus peuvent être branchés en C2, C3 ou C4 avec des résidus de

fucose mais aussi du galactose ou de l'acide glucuronique (Deniaud-Bouët et al., 2017) (Figure I.8.B). Les groupements sulfates peuvent être localisés en C2 et/ou C4 et certains auteurs ont décrit des phénomènes d'acétylation (e.g. Prokofjeva et al., 2013 ; Shevchenko et al., 2017). Les caractéristiques du squelette des fucanes peuvent différer suivant leur taxonomie : ceux décrits chez les Fucales ont principalement une structure avec une alternance de liaisons en  $\alpha$ -(1-3) et  $\alpha$ -(1-4), tandis que d'autres ordres, y compris les Laminariales, possèdent principalement des fucanes liés en  $\alpha$ -(1-3), bien qu'il existe des exceptions notamment chez la Fucale *Himanthalia elongata* qui possèdent des fucanes typiques de Laminaires (Deniaud-Bouët et al., 2014) (Figure I.8.B). En dehors des algues brunes, les fucanes sont décrits et caractérisés chez certains échinodermes marins tels que les oursins (Pomin & Mourão, 2008) et les concombres de mer (e.g. Yu et al., 2015). Chez ces organismes, les fucanes ont des structures plus régulières avec des motifs plus linéaires répétés par rapport aux algues brunes (Deniaud-Bouët et al., 2014). Quant aux fucoïdanes, ils constituent un ensemble de polysaccharides hétérogènes, dont le squelette peut être de nature diverse, composés de sucres neutres et/ou d'acides uroniques, mais qui sont également sulfatés (Figure I.8.B). Outre le fucose, les autres monosaccharides identifiés sont principalement le galactose, le mannose, l'acide glucuronique, le xylose et le rhamnose. Les principaux fucoïdanes décrits ont des bases squelettiques de types galactanes, glucuronomannanes et glucuronanes (Figure I.8.B, Deniaud-Bouët et al., 2017). L'étude de la composition des FCSP pour plus de 100 espèces d'algues brunes par Ponce & Stortz, (2020) n'a montré aucune relation évidente entre la composition en fucoïdanes et la classification taxonomique. Si une telle relation existe, elle est difficile à mettre en évidence du fait d'autres facteurs pouvant impacter la composition en FCSP, tels que la situation géographique et la saison de récolte des algues. Aussi, les variations dans les méthodes d'analyses de ces polysaccharides peuvent différer d'un laboratoire à l'autre, ce qui rend les comparaisons difficiles. À ce stade, la description des structures FCSP existantes est encore incomplète.

Les alginates sont des polysaccharides linéaires composés de deux acides uroniques, l'acide  $\beta$ -D-mannuronique (M) et l'acide  $\alpha$ -L-guluronique (G), disposés en blocs MM, GG ou MG (Figure I.8.B). Chaque bloc a des préférences conformationnelles différentes et, par conséquent, des propriétés physico-chimiques différentes (Kloareg & Quatrano, 1988). En particulier, les régions des blocs G forment des jonctions en "boîte à œufs" avec le calcium, ce qui contribue à la rigidité du gel. Alors que la plupart des espèces d'algues brunes présentent un rapport M/G de 1,2 à 1,6 dans l'alginate, des variations du rapport M/G ont été fréquemment signalées entre les tissus (Fischl et al., 2016 ; Kloareg & Quatrano, 1988). Les bactéries non marines des genres *Azotobacter* et *Pseudomonas* sont également connues pour synthétiser des alginates acétylés.

Au-delà de la composition chimique de la MEC, peu de données existent concernant son organisation structurale au niveau cellulaire et tissulaire. De même, les compositions chimiques détaillées au niveau cellulaire n'ont été que très peu étudiées et ne permettent pas d'en dégager une généralité. Ces aspects sont explicités dans la revue présentée à la fin de ce chapitre.

### 3) Biosynthèse des polysaccharides de la MEC chez les algues brunes

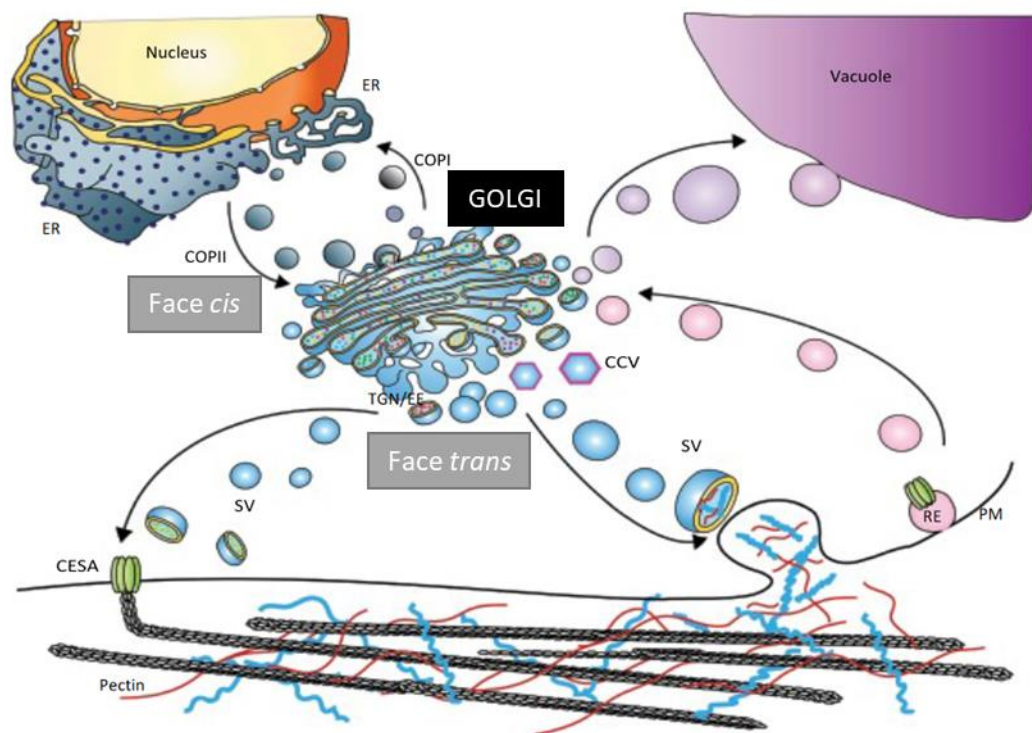
#### 3.1) Localisation subcellulaire de la biosynthèse des polysaccharides de la MEC

##### 3.1.1) Lieu de biosynthèse des composés glycosylés chez les eucaryotes - généralités

L'appareil de Golgi joue un rôle central dans les processus de glycosylation. C'est le lieu majoritaire de la synthèse des polysaccharides. L'appareil de Golgi est également impliqué dans une série d'autres processus, notamment la biosynthèse des glycolipides et des glycoprotéines. De manière générale, c'est un organite dynamique qui occupe un rôle central dans le système sécrétoire des cellules eucaryotes, en participant à la régulation du transport vésiculaire. L'appareil de Golgi était probablement présent chez l'ancêtre commun des eucaryotes et partage des rôles similaires entre les différentes lignées eucaryotes (Klute et al., 2011). Il fait partie des derniers organites à avoir été décrits à la fin du 19<sup>ème</sup> siècle lors de l'analyse de tissus nerveux d'un vertébré au microscope optique (Dröscher, 1998). Avec le développement de la microscopie électronique au milieu du 20<sup>ème</sup> siècle, l'organisation de cet organite complexe et hétérogène a pu être mieux appréhendée dans les cellules eucaryotes (Dalton & Felix, 1954).

L'appareil de Golgi possède une organisation assez conservée au sein des eucaryotes cependant sa localisation subcellulaire peut varier, par exemple dans les cellules de mammifères l'appareil de Golgi est généralement proche du noyau tandis que chez les plantes les structures Golgiennes sont dispersées dans les cellules (Ito et al., 2014). L'appareil de Golgi est constitué d'un empilement de saccules membranaires aussi appelé dictyosomes et de vésicules. Chaque dictyosome peut être divisé en trois régions fonctionnelles différentes : les saccules de la face *cis*, les saccules de la région médiane et les saccules de la face *trans* (Figure I.9). La face *cis* est associée au RE et reçoit des vésicules du RE. En particulier, le RE est un organite impliqué plus spécifiquement dans la glycosylation des protéines. Le 'centre d'envoi' de l'appareil de Golgi vers d'autres compartiments (dont la membrane plasmique) est situé à la face *trans*. Il existe également un système rétrograde impliqué dans le recyclage et la dégradation de macromolécules de la membrane plasmique vers les lysosomes et l'appareil de Golgi.

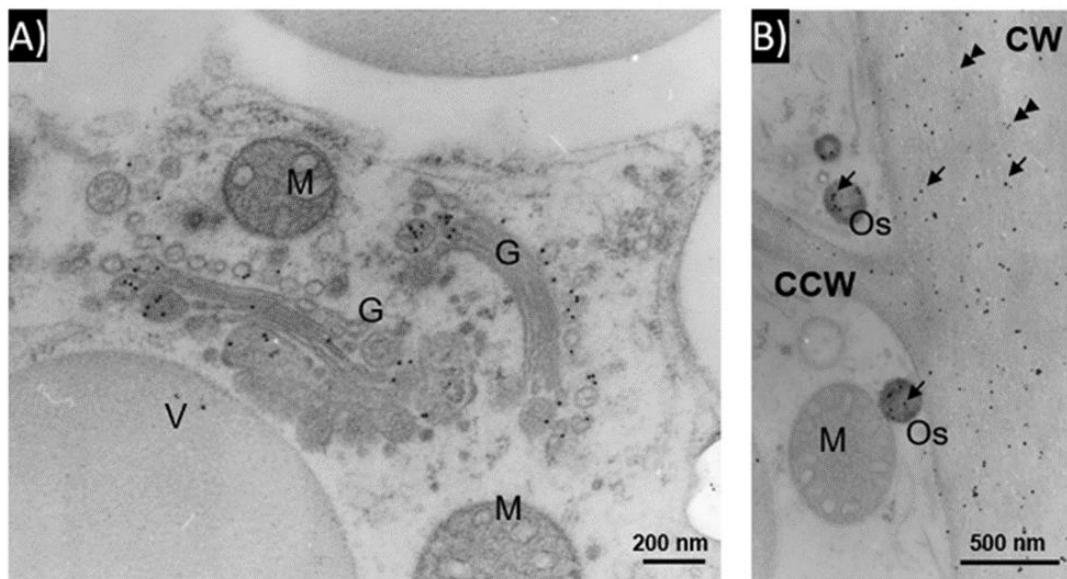
La membrane plasmique abrite aussi la synthèse de glycoconjugués ou de polysaccharides majeurs, tels que l'acide hyaluronique et la chitine chez les animaux et la cellulose chez les plantes (Colley et al., 2022). La figure I.9 montre un schéma de l'organisation subcellulaire simplifiée de la synthèse et du transport des polysaccharides qui sont intégrés à la MEC chez les plantes. L'appareil de Golgi est le lieu de synthèse des polysaccharides de la MEC tel que les pectines et les hémicelluloses (Atmodjo et al., 2013 ; Driouch et al., 2012 ; Young et al., 2008), qui sont ensuite sécrétés à la membrane plasmique pour être intégrés à la MEC. La membrane plasmique est le lieu de synthèse de la cellulose, un polysaccharide majoritaire de la MEC chez les plantes. Cette synthèse est réalisée par des complexes de cellulose-synthases, qui transitent par l'appareil de Golgi avant leur assemblage fonctionnel à la membrane plasmique (Watanabe et al., 2015).



**Figure I. 9. Représentation simplifiée de la mise en place des polysaccharides de la MEC chez les plantes.** Les hémicelluloses et pectines sont synthétisées dans l'appareil de Golgi, puis sécrétés au niveau de l'apoplaste où elles sont incorporées à la MEC. Les complexes de cellulose-synthases (CESA), intégrés dans la membrane plasmique et synthétisant la cellulose sont aussi représentés. CCV, vésicule revêtue de clathrine ; CESA, cellulose-synthases ; PM, membrane plasmique ; RE, endosome de recyclage ; SV, vésicule sécrétoire ; TGN/EE, réseau trans-Golgi/endosome précoce. Tiré de Davis et al., (2016).

### 3.2.2) Lieu de biosynthèse des polysaccharides majoritaires de la MEC chez les algues brunes

Chez les algues brunes, il a été montré par immunomarquage que l'appareil de Golgi renferme des FCSP (Nagasato et al., 2010) (Figure I.10.A). De plus, une activité galactosyltransférase agissant sur du fucose et des fucoïdanes, accepteurs endogènes, a été mise en évidence dans une fraction enrichie en appareil de Golgi à partir de *F. serratus* (Evans & Coughlan, 1978). Aussi, l'incorporation de  $^{35}\text{SO}_4^{2-}$  en radiographie a été détecté au niveau de l'appareil de Golgi (Brawley & Quatrano, 1979 ; Callow et al., 1978 ; Evans et al., 1973 ; Evans & Callow, 1974). Ces études suggèrent que chez les algues brunes, la synthèse et la sulfatation des FCSP se déroulent au niveau de l'appareil de Golgi. En ce qui concerne les alginates, ils ont été détectés par immunohistochimie au niveau de vésicules osmiophiles proches de la paroi (Nagasato et al., 2010) (Figure I.10.B), aucune étude ne montre leur détection au niveau de l'appareil de Golgi. L'implication de ces vésicules n'a pas été montrée dans la biosynthèse de la MEC. L'hypothèse principale est que la synthèse de l'alginate serait localisée au niveau de la membrane plasmique, bien que l'implication de ces vésicules ne soit pas exclue.



**Figure I. 10. Immunolocalisation de FCSP et des alginates au niveau subcellulaire chez le zygote de *Silvetia babingtoni* (Fuciales). A)** Le marquage avec des anticorps anti-FCSP indique une détection des FCSP au niveau de l'appareil de Golgi. **B)** Double marquage avec des anticorps anti-alginate (indiqué par des particules d'or de 15 nm, simple flèche) et anti-FCSP (indiqué par des particules d'or de 10 nm, double flèche). Au niveau intracellulaire, les alginates sont détectés dans des vésicules osmiophiles proches de la membrane. CCW paroi cellulaire transversale, CW paroi cellulaire, G appareil de Golgi, M mitochondrie, Os vésicule osmiophiles, V vacuole (Mazéas et al., 2023).



### 3.2) Enzymes impliquées dans le métabolisme des polysaccharides

Les enzymes impliquées dans le métabolisme des polysaccharides sont nombreuses et peuvent métaboliser d'autres de composés glycosylés tels que des glycoprotéines, glycolipides, etc. Une grande partie d'entre elles sont référencées en tant que *Carbohydrate-Active enZymes* (CAZymes). Les CAZymes regroupent plusieurs classes d'enzymes mais aussi des modules de fixation non catalytiques impliqués dans le métabolisme des carbohydrates. On y trouve : les glycoside hydrolases (GH), les polysaccharide lyases (PL), les glycosyltransférases (GT), les carbohydrate estérases (CE), les enzymes avec des activités auxiliaires (AA) et les *carbohydrate-binding modules* (CBM). Les GH catalysent la réaction d'hydrolyse des liaisons osidiques présentes au sein d'oligosaccharides ou de polysaccharides. Les PL sont impliqués dans la dégradation des polysaccharides en catalysant le clivage de certaines liaisons glycosidiques via une  $\beta$ -élimination qui génère un acide uronique insaturé. Les GT catalysent la formation des liaisons osidiques permettant la biosynthèse d'oligosaccharides, de polysaccharides, de glycoprotéines, de glycolipides et d'autres glycoconjugués. Les CE sont responsables de la modification des monosaccharides par l'ajout ou le retrait de groupements ester. La catégorie AA regroupe diverses enzymes qui participent aux réactions redox, en particulier dans la dégradation de la lignine (e.g. *lytic polysaccharide monoxygenases* ou LPMO), et fonctionnent de concert avec d'autres CAZymes pour la conversion de la biomasse. Les CBM sont des modules de liaison aux glucides, qui sont parfois associés à un module enzymatique mais peuvent exister seuls. Ces différentes CAZymes sont classées en familles dans la base de données CAZy (<http://www.cazy.org/>, Drula et al., 2022). Par exemple, pour les GH et les GT, respectivement 184 et 116 familles étaient répertoriées en Août 2023. La classification en familles au sein de ces différents groupes s'appuie sur des outils bioinformatique de comparaison de séquences primaires : des profils HMM (*Hidden Markov models*) de chacune des familles et des alignements deux à deux contre les membres caractérisés. Cependant, les annotations présentes dans la base CAZy ont été curées/vérifiées manuellement, en particulier lorsque les niveaux de similarité sont faibles.

En dehors des CAZymes, d'autres classes d'enzymes peuvent être impliquées dans le métabolisme des carbohydrates, tel que les épimérasés. Également, il existe des enzymes pouvant être impliquées dans la modification de composés glycosylés, telles que des acétyltransférases, méthyltransférases, sulfotransférases ou encore des sulfatases.

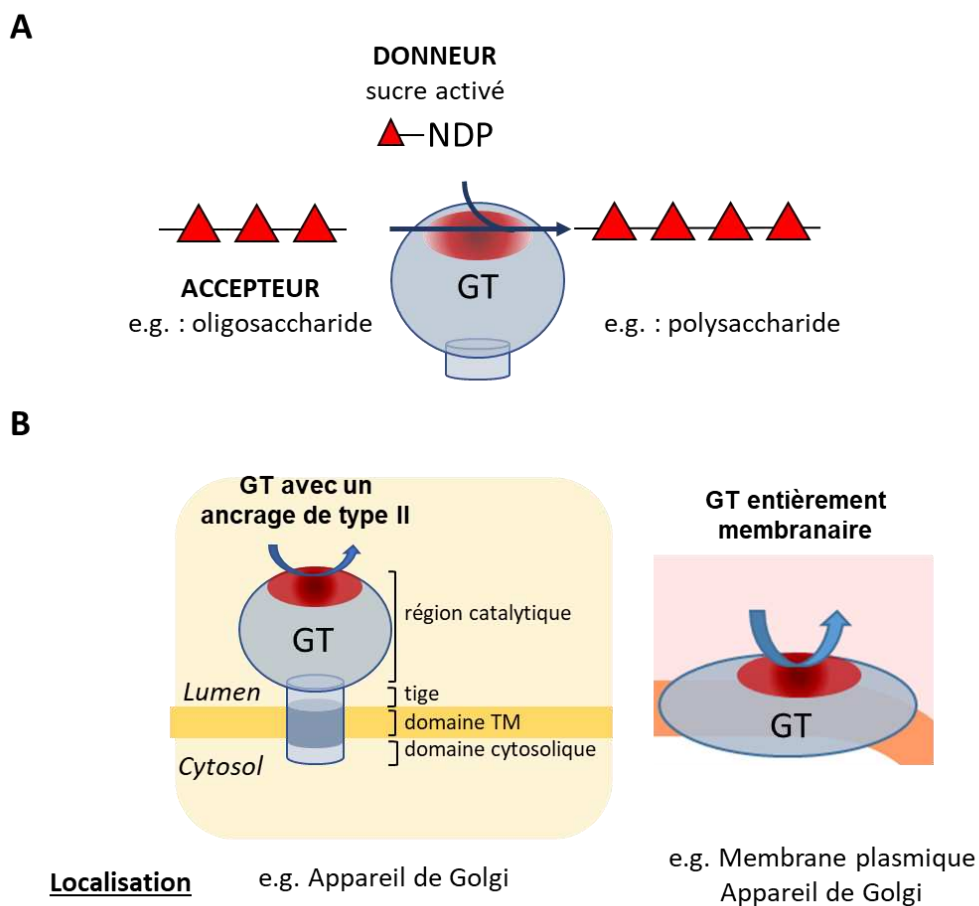
## Rôles des glycosyltransférases dans la biosynthèse des polysaccharides

Les GT jouent un rôle central dans le métabolisme des polysaccharides et glycoconjugués. Elles catalysent la synthèse d'une liaison glycosidique par le transfert d'un sucre (ou monosaccharide) d'un donneur vers un accepteur (Figure I.11.A). Plusieurs types de donneurs peuvent être retrouvés, ce sont principalement des nucléoside diphosphate sucres contenant un groupe phosphate tel que le GDP-fucose, GDP-mannose, UDP-glucose, etc. Les accepteurs peuvent être un autre saccharide, un lipide, une protéine ou une petite molécule tel qu'un métabolite secondaire par exemple. Ces enzymes jouent des rôles cruciaux dans la biologie des eucaryotes, étant donné que les glycoconjugués et polysaccharides sont largement répandus et impliqués dans des mécanismes du développement chez ces organismes (Varki, 2017). Des altérations dans le processus de synthèse des composés glycosylés peuvent entraîner des conséquences néfastes pour l'organisme (Freeze et al., 2014).

La majorité des GT sont des protéines localisées au niveau de l'appareil de Golgi, du RE et plus rarement à la membrane plasmique. Deux topologies membranaires sont majoritairement référencées pour les GT, celles qui comportent plusieurs domaines transmembranaires et qui sont donc largement enchâssées dans la membrane, et celles de type II qui comporte un domaine N-terminal constitué d'une queue cytosolique, d'un domaine transmembranaire et un domaine C-terminal catalytique orienté vers le lumen du Golgi/RE (Figure I.11.B). Les GT avec une topologie de type II sont typiques de l'appareil de Golgi bien que des GT avec plusieurs domaines transmembranaires peuvent être retrouvées dans ce compartiment.

Comme indiqué précédemment, les GT sont classées en famille au sein de la base de données CAZy. Il est à noter que plusieurs activités peuvent être référencées au sein d'une même famille, le cas le plus courant étant la prise en charge d'accepteurs de différentes natures mais cela peut aussi être le cas du donneur, par exemple au sein de la famille GT41 des activités  $\beta$ -N-acétylglucosaminyltransférase (GlcNAcT) et O- $\alpha$ -L-fucosyltransférase (FucT) sont référencées. L'activité d'une GT est donc difficile à prédire sur la seule base de sa séquence. Pour créer une nouvelle famille, une activité doit être démontrée au sein d'enzymes encore non classées.

Chez les plantes, si l'on fait exception des cellulose-synthases qui sont localisées au niveau de la membrane plasmique, la majorité des autres GT impliquées dans la synthèse des polysaccharides de la MEC ont été localisées au niveau de l'appareil de Golgi (Hoffmann et al., 2021). La synthèse de polysaccharides complexes peut nécessiter l'action conjointe ou séquentielle de nombreuses GT, celles-ci peuvent également agir sous forme d'homo ou d'hétérodimères, comme c'est le cas par exemple pour la synthèse du domaine homogalacturonane des pectines chez les plantes (Amos et al., 2018).



**Figure I. 11. Présentation simplifiée d'action de GT et de leur type d'ancrage membranaire. A)** Mécanisme général d'action d'une GT. **B)** Principaux types de GT et exemples de localisation subcellulaire (inspiré d'Oikawa et al., 2013).

### 3.3) Voies de biosynthèses des polysaccharides de la MEC chez les algues brunes

La voie de biosynthèse de l'alginate a été initialement explorée au niveau biochimique chez *Fucus gardneri* par Lin & Hassid (1966). Des activités enzymatiques clés ont été identifiées. La voie de synthèse de l'alginate a également été décrite chez les bactéries, avec des gènes candidats validés d'un point de vue fonctionnel (Remminghorst & Rehm, 2006). Du côté des algues brunes, ce n'est qu'avec

la publication du premier génome séquencé (*Ectocarpus* sp. 7) (Cock et al., 2010), qu'une vue plus complète a été obtenue au niveau moléculaire, à la fois du côté des alginates et des fucanes (Michel et al., 2010b). Depuis, des caractérisations biochimiques ont été obtenues et ont permis en partie d'étayer les prédictions. L'ensemble de ces résultats est décrit dans la revue présentée à la fin de ce chapitre (Mazéas et al., 2023) dont j'offre un résumé ici (Figure I.12).

Le GDP-mannose est le précurseur pour les voies de synthèse de l'alginate et des fucanes (synthèse *de novo*). Les trois étapes enzymatiques menant au GDP-mannose sont communes pour les deux voies de synthèse (Figure I.12). La mannose-6-phosphate isomérase (MPI) catalyse la production de mannose-6-phosphate à partir de fructose-6-phosphate (Chi et al., 2018), puis vient l'action de la phosphomannomutase (PMM) qui convertit le fructose-6-phosphate en fructose-1-phosphate (Chi et al., 2018). Enfin, l'activité mannose-1-phosphate guanylyltransferase (MPG) transforme le fructose-1-phosphate en GDP-mannose. Les gènes des deux premières enzymes avaient été identifiés par Michel et al., 2010, leurs origines seraient eucaryotiques (Michel et al., 2010b). Il s'est avéré que la MPI a également une activité MPG (Chi et al., 2018).

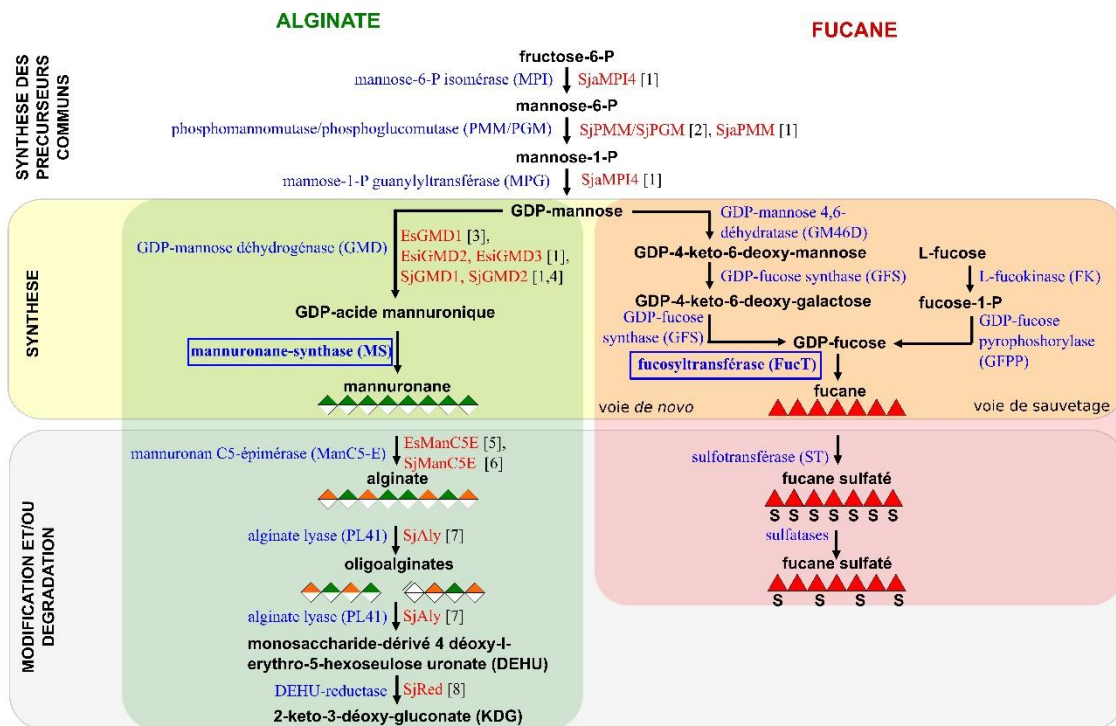
Concernant les fucanes, deux voies de synthèse du précurseur de GDP-fucose seraient présentes chez les algues brunes, avec d'une part la présence des gènes pour la synthèse *de novo* réalisée par la GDP-mannose 4,6-dehydratase (GM46D) puis l'action de la GDP-fucose synthase (GFS) (Figure I.9) (Chi et al., 2018 ; Mazéas et al., 2023 ; Michel et al., 2010b), et d'autre part, la voie de sauvetage, impliquant une L-fucokinase (L-FK) et une GDP-fucose pyrophosphorylase (GFPP) (Figure I.9). Des gènes candidats pour l'étape de synthèse par une fucosyltransférase du squelette de fucanes avaient été initialement proposés parmi les familles GT10, GT23 et GT65 par Michel et al., (2010b), ainsi que des enzymes impliquées dans la sulfatation (sulfotransférases) ou désulfatation (sulfatases) des FCSP. Nous réinvestissons très largement ces analyses de gènes candidats dans ce manuscrit.

Pour les FCSP, qui sont plus hétérogènes, on s'attend à ce que davantage de gènes soient recrutés pour leur synthèse que ceux impliqués dans la synthèse de fucanes. Cela inclurait certaines enzymes pour la synthèse de précurseurs supplémentaires et une diversité de glycosyltransférases au-delà des seules fucosyltransférases.

Concernant la synthèse de l'alginate, des gènes candidats ont aussi été identifiés (Mazéas et al., 2023 ; Michel et al., 2010b) et parfois validés. Une fois que le GDP-mannose a été synthétisé, son oxydation en acide GDP-mannuronique est réalisée par la GDP-mannose déshydrogénase (GMD) (Figure I.12) (Chi et al., 2018 ; Tenhaken et al., 2011 ; Zhang et al., 2016). Michel et al., (2010b) ont

également spéculé sur d'éventuels membres de la famille GT2 impliqués dans la synthèse des squelettes d'alginate en proposant 2 gènes candidats de la famille des GT2. Ces candidats restent en revanche très hypothétiques et cette prédiction ne sera que très brièvement discutée dans ce manuscrit. Une fois que les résidus d'acide mannuronique ont été assemblés, l'étape finale de la synthèse consiste en l'épimérisation de certains résidus M en résidus G par les mannuronane C5-épimérasés (ManC5-E), qui constituent une large famille multigénique chez les algues brunes (Fischl et al., 2016 ; Pengyan et al., 2021 ; Tonon et al., 2008). L'analyse du 1er génome de 2010 indiquait l'acquisition chez l'ancêtre commun des algues brunes, d'enzymes clefs de la voie de biosynthèse de l'alginate, que sont les GMD et ManC5-E, par transfert horizontal de gènes (ou HGT pour *Horizontal Gene Transfer*) avec une actinobactérie.

Enfin, il a été récemment mis en évidence la présence d'enzymes de dégradation de l'alginate chez les algues brunes avec la caractérisation d'alginate lyases qui ont initié la création d'une nouvelle famille de PL, la famille des PL41 (Inoue & Ojima, 2019) (Figure I.12). Les produits des PL41 sont des oligo- et mono-saccharides insaturés, l'acide 4-deoxy-L-erythro-5-hexoseulose uronique (DEH). Ces produits ne peuvent pas être directement métabolisés. Inoue & Ojima (2021) ont aussi identifié et caractérisé une DEHU-réductase chez l'algue brune *Saccharina japonica* qui génère un 2-keto-3-deoxy-gluconate (KGD) à partir de DEH. Dans les organismes dégradant l'alginate tel que des bactéries ou les ormeaux, le KDG est clivé en pyruvate et en glycéraldéhyde-3-phosphate ou glycéraldéhyde comme produits finaux (Inoue et al., 2019 ; Preiss & Ashwell, 1962). De telles enzymes de métabolisation du KDG ne sont pas connues chez les algues brunes mais leur présence est probable.



**Figure I. 12. Schéma des voies métaboliques des alginate et des fucanes sulfatés.** Les différentes activités enzymatiques (en bleu) sont indiquées entre chaque produit (en noir). Les enzymes pour lesquelles une validation biochimique a été obtenue sont indiquées (en rouge) avec leur nom abrégé et les références correspondantes. Les enzymes clés qui sont impliquées dans l'élongation des chaînes sont indiquées dans un cadre bleu. La représentation des voies a été mise à jour à partir de Michel et al., (2010b) avec l'ajout des activités nouvellement caractérisées. [1] Chi et al., (2018), [2] Zhang et al., (2018), [3] Tenhaken et al., (2011), [4] Zhang et al., (2016), [5] Fischl et al., (2016), [6] Inoue et al., (2016), [7] Inoue & Ojima, (2019), [8] Inoue & Ojima, (2021). Figure adaptée de Mazéas et al., (2023).

#### 4) Problématique et objectifs de la thèse

Chez les algues brunes, la MEC qui joue des rôles fondamentaux, possède une biochimie particulière sans équivalent dans les autres lignées eucaryotiques. La vue des enzymes liées aux métabolismes des carbohydrates chez ces organismes est très partielle, avec peu de validations biochimiques, en particulier pour les enzymes clés que sont les glycosyltransférases, impliquées dans l'élongation des chaînes de fucanes et d'alginate.

Plusieurs approches existent pour identifier et caractériser des GT, et plus généralement les enzymes impliquées dans la synthèse de polysaccharides. L'étude des génomes et l'identification *in silico* des enzymes est une première étape dans l'identification de GT. Dans ce contexte, la base de données CAZy est une ressource essentielle, car elle regroupe les différentes GT en familles et est mise à jour régulièrement avec les nouvelles enzymes caractérisées en termes d'activité et de structure

(Drula et al., 2022). L'appartenance à une famille de GT donne des informations sur le type d'enzyme et son activité potentielle mais ne permet pas d'identifier avec certitude le donneur et l'accepteur qui seraient pris en charge.

Par ailleurs, les GT peuvent être isolées des organites dans lesquels elles sont majoritairement attendues et notamment l'appareil de Golgi. Cette approche nécessite la mise en place d'un fractionnement subcellulaire qui, couplé à des dosages d'activités avec des NDP-sucres radiomarqués, permet d'identifier et de localiser des activités de synthèse (Sterling et al., 2001). Le fractionnement subcellulaire peut être couplé à des analyses protéomiques permettant d'identifier des GT mais aussi d'autres protéines impliquées dans le métabolisme des composés glycosylés, qui sont autant d'éléments permettant de suggérer des lieux et enzymes de synthèse de ceux-ci (Parsons et al., 2012).

Les activités catalytiques des GT qui ont été identifiées en bioinformatique ou protéomique peuvent être caractérisées plus finement par des études *in vitro* avec la production de protéines recombinantes. Ce qui implique d'obtenir l'enzyme sous une forme soluble et active, qui dans les cas des GT est connue pour être une étape difficile (Amos & Mohnen, 2019). Différents systèmes d'expression hétérologues peuvent être utilisés, allant du système bactérien (Welner et al., 2017), aux systèmes eucaryotes (levure, cellule d'insecte, cellule de mammifère) (Moremen et al., 2018 ; Münster et al., 2006 ; Petersen et al., 2009 ; Urbanowicz et al., 2017). Plusieurs méthodes de dosages d'activité d'incorporation du donneur sur l'accepteur peuvent être ensuite utilisées tel que des techniques basées sur la détection en radioactivité ou en bioluminescence (Cicéron et al., 2016 ; Sterling et al., 2001), mais également des techniques de spectrométrie de masse afin d'analyser les produits nouvellement synthétisés (Leboeuf et al., 2008).

Dans le cadre de cette thèse, j'aborde plusieurs approches pour étudier **les enzymes impliquées dans le métabolisme des polysaccharides majoritaires qui composent la MEC des algues brunes**, et ainsi participer à la compréhension des voies métaboliques associées :

- Dans le **Chapitre II**, je présente la comparaison des enzymes liées aux métabolismes des composés glycosylés pour un nombre important de génomes d'algues brunes et d'espèces apparentées à celles-ci. Ces génomes ne sont pas encore accessibles publiquement et ont été obtenus dans le cadre du programme Phaeoexplorer (<https://phaeoexplorer.sb-roscoff.fr/home/>) que j'introduis par ailleurs. Nous avons pu bénéficier de l'expertise de l'équipe AFMB (CAZy) de Marseille pour réaliser ces annotations. Cette approche a permis d'affiner les gènes candidats impliqués dans le métabolisme des fucanes et des alginates chez les algues brunes, et de retracer leur histoire évolutive au sein des Straménopiles.

- Le **Chapitre III** retrace la mise en place d'un protocole pour l'isolement de l'appareil de Golgi chez une algue brune. La démarche que j'ai suivie y est exposée ainsi que les problèmes rencontrés.
- Le **Chapitre IV**, expose la validation des fractions enrichies obtenues, notamment une fraction en microsomes, à partir de tests colorimétriques, enzymatiques et d'imagerie. Cette validation est complétée par une analyse en protéomique des fractions, qui m'a permis d'obtenir une vue des protéines exprimées de façon constitutive, notamment des familles de GT.
- Le **Chapitre V**, fait état de tentatives d'expression et de caractérisations de GT recombinantes.
- Dans le **Chapitre VI**, je croise l'ensemble des résultats obtenus précédemment et notamment pour proposer des candidats forts impliqués dans la synthèse des fucanes. Les perspectives qui découlent de ce projet sont aussi discutées.



Article de revue : Assembly and synthesis of the extracellular matrix in brown algae (Mazéas et al 2023)



Contents lists available at ScienceDirect

## Seminars in Cell and Developmental Biology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/semcdb](http://www.elsevier.com/locate/semcdb)

Review

## Assembly and synthesis of the extracellular matrix in brown algae



Lisa Mazéas<sup>a,b</sup>, Rina Yonamine<sup>c</sup>, Tristan Barbeyron<sup>a,b</sup>, Bernard Henrissat<sup>d,e,f,g</sup>, Elodie Drula<sup>d,e</sup>,  
Nicolas Terrapon<sup>d,e</sup>, Chikako Nagasato<sup>c</sup>, Cécile Hervé<sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup> CNRS, UMR 8227, Integrative Biology of Marine Models, Station Biologique de Roscoff, CS 90074, Roscoff, France<sup>b</sup> Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, UMR 8227, Integrative Biology of Marine Models, Station Biologique de Roscoff, CS 90074, Roscoff, France<sup>c</sup> Muroran Marine Station, Field Science Center for Northern Biosphere, Hokkaido University, Muroran 051-0013, Japan<sup>d</sup> CNRS, Aix Marseille Univ, UMR 7257 AFMB, 13288 Marseille, France<sup>e</sup> INRAE, USC1408 AFMB, 13288 Marseille, France<sup>f</sup> Department of Biological Sciences, King Abdulaziz University, Jeddah, Saudi Arabia<sup>g</sup> Technical University of Denmark, DTU Bioengineering, DK-2800 Kgs., Lyngby, Denmark

## ARTICLE INFO

## Keywords:

Extracellular matrix  
Brown algae  
Alginates  
Fucans  
Glycosyltransferases  
Sulfotransferases

## ABSTRACT

In brown algae, the extracellular matrix (ECM) and its constitutive polymers play crucial roles in specialized functions, including algal growth and development. In this review we offer an integrative view of ECM construction in brown algae. We briefly report the chemical composition of its main constituents, and how these are interlinked in a structural model. We examine the ECM assembly at the tissue and cell level, with consideration on its structure *in vivo* and on the putative subcellular sites for the synthesis of its main constituents. We further discuss the biosynthetic pathways of two major polysaccharides, alginates and sulfated fucans, and the progress made beyond the candidate genes with the biochemical validation of encoded proteins. Key enzymes involved in the elongation of the glycan chains are still unknown and predictions have been made at the gene level. Here, we offer a re-examination of some glycosyltransferases and sulfotransferases from published genomes. Overall, our analysis suggests novel investigations to be performed at both the cellular and biochemical levels. First, to depict the location of polysaccharide structures in tissues. Secondly, to identify putative actors in the ECM synthesis to be functionally studied in the future.

## 1. Introduction

Over the course of eukaryote evolution, a limited number of lineages managed to elaborate complex multicellular organisms [1–3], which are namely the animals, fungi, land plants, green, red and brown algae. In all cases, multicellularity acquisition was associated with the development of an extracellular matrix (ECM) [1,2]. ECMs have been intensely studied in several eukaryotic lineages including animals, fungi and terrestrial plants (see [4–6] for reviews) but are less characterized in macroalgae, including brown seaweeds [2]. While strong compositional variations of these ECMs are evident on a phylogenetic basis, many common functions are found [1,3]. Being at the outer surface of the cell, ECMs are in position to modulate or mediate a variety of events critical to the development and functions of a multicellular organism. In brown algae, the ECM or cell wall, promotes cell adhesion [7,8], regulates cell expansion [9,10] and morphogenesis [11,12], influences polar axis fixation and cell fate [13,14], provides a support to osmotic adjustment

[10,15,16], and protects the cell from pathogens [17,18]. Additionally, the ECM in brown algae is an important resource for hydrocolloids, raw material, feed and food. Some of its components have potential as bioactives of high value [19]. These functions and uses depend on the specific composition of the ECM. The major components of brown algal ECMs are polysaccharides. While knowledge on their chemical diversity expands, the understanding of the *in situ* ECM assembly is still at its infancy. In land plants and animals, much effort has gone into understanding the mechanisms of glycosylation and glycan synthesis at the subcellular level [3]. These investigations have been performed from cell surfaces to within the ER and the Golgi apparatus, sometimes down to distinct Golgi compartments (see [3,5,20,21] for reviews). In brown algae, the topographic locations of the biosynthetic actors within a cell have not been precisely established. Additionally, and in contrast to nucleic acids and proteins, polysaccharides are not template-encoded and their production likely depends on the sequential action of a complex web of metabolic and trafficking steps [22,23], making

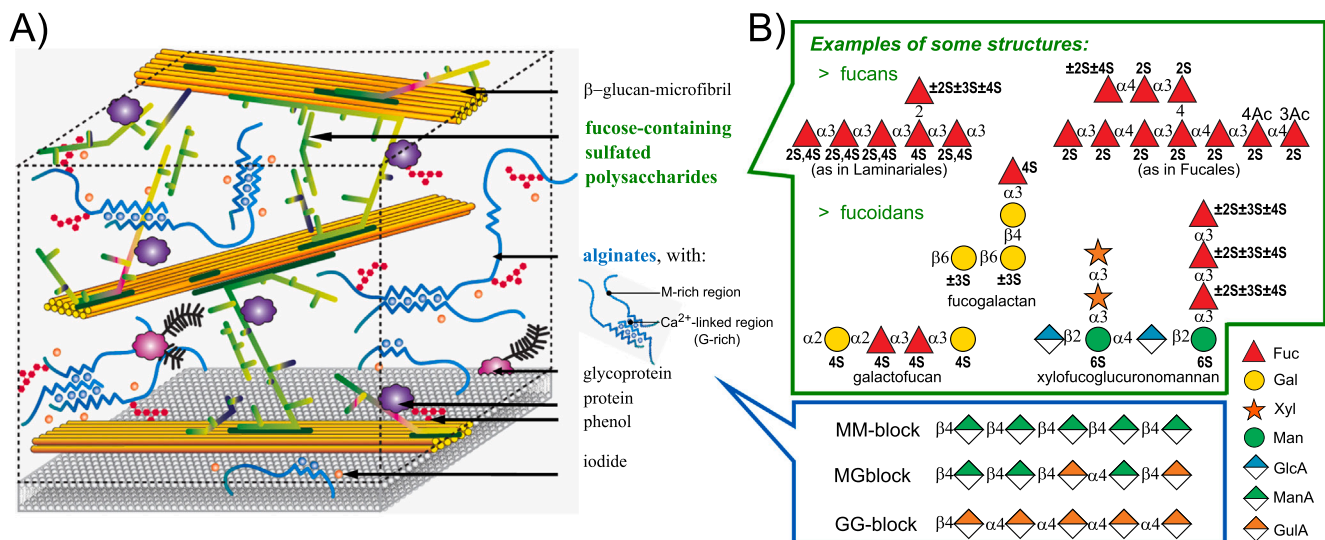
\* Correspondence to: UMR8227, Station Biologique de Roscoff, Roscoff, France.

E-mail address: [cecile.herve@sb-roscoff.fr](mailto:cecile.herve@sb-roscoff.fr) (C. Hervé).<https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2022.03.005>

Received 15 November 2021; Received in revised form 3 February 2022; Accepted 4 March 2022

Available online 17 March 2022

1084-9521/© 2022 The Authors. Published by Elsevier Ltd. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).



**Fig. 1.** Schematic representation of the ECM model in brown algae along with key structures of FCSPs and alginates. A) ECM model for brown algae from the order Fucales. Alginates and FCSPs are the main constituents. FCSPs interlock a  $\beta$ -glucan scaffold that includes cellulose and possible mixed linkage glucans, which have been reported to be insoluble in brown algal ECMs [87]. Most phenols are cross-linked to alginates. Proteins and halide compounds also are present. Glycoproteins related to arabinogalactan-proteins have been reported in brown algae [9], yet they still await a detailed chemical characterisation in these models. B) Examples of typical alginates and FCSP motifs are shown. Updated from Deniaud-Bouët et al. (2014).

carbohydrate structures impossible to predict on the basis of genetic information only. The establishment of the first genomic sequence for brown algae (*Ectocarpus* sp. Ec32 [24], also referred as *Ectocarpus* species 7 [25]), and its in-depth molecular analysis [26], allowed to formalize hypothesis on the activation and incorporation of sugar residues into polysaccharide backbones (i.e. alginates and fucans *sensu stricto*). Yet, the function of only few enzymes has been experimentally validated so far, and none of them deals with the elongation of glycan chains, leaving this area of investigation still unexplored.

In this review we offer an integrative view of results obtained in relation to ECM construction in brown algae, beginning with a summary on its composition and architecture. We provide a comprehensive survey of the literature regarding ECM deposition *in planta* and of the possible subcellular sites for the enzymatic synthesis of polysaccharides. We further address the candidate genes involved in the synthesis of ECM polysaccharides, and discuss the functionally characterized proteins. Finally, we provide a re-examination of some glycosyltransferases and sulfotransferases in published genomes.

## 2. ECM architecture and composition in brown algae

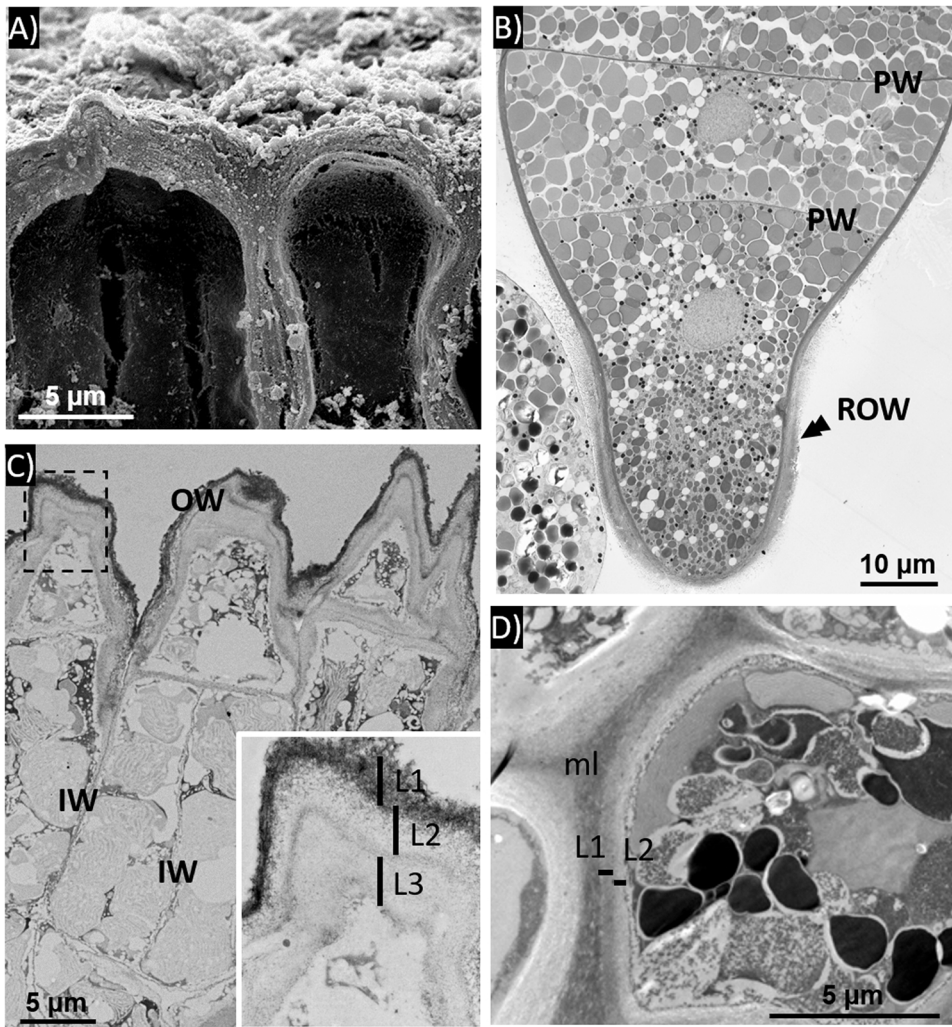
Knowledge about the macromolecular organization of the ECM and its detailed chemistry is still limited in brown algae. However, there is increasing interest in studying brown algal biomass in details, and this might lead to a better understanding of ECM compositions in the near future. Polysaccharides are the main constituents, the majority of which being the alginates and the fucose-containing sulfated polysaccharides (FCSPs). These components have been integrated in an ECM model for Fucales species in which two polysaccharide-based networks are reported, the first being composed of FCSPs interlocking a  $\beta$ -glucan scaffold, embedded in the second made up of alginates and cross-linking phlorotannins [19,27,28] (Fig. 1 A). Proteins [29], glycoproteins [9], halide compounds and other ions [30], are additional components of brown algal ECMs (Fig. 1 A).

The FCSPs designation is used as a collective term to group both fucans and fucoidans. Fucans are highly sulfated polysaccharides with a backbone structure based on sulfated L-fucose residues, to which additional branches of various natures can be observed [19] (Fig. 1B). As a chemotaxonomical trait, it has been postulated that fucans from the Fucales are mostly harboring an alternative structure of  $\alpha$ -(1–3) and

$\alpha$ -(1–4)-linked fucose residues, while other orders, including the Laminariales, tend to have a  $\alpha$ -(1–3)-linked structure [31], albeit exceptions to this statement exist [27]. Fucoidans encompass a set of heterogeneous polymers, harboring diverse backbones, which are based on neutral sugars and/or uronic acid residues (Fig. 1B). In addition to fucose, other monosaccharides are reported such as galactose, mannose, xylose, rhamnose and glucuronic acid [19,31]. Recently, Ponce et al. (2020) have performed an extensive examination of the literature regarding the compositional analyses of FCSPs. More than 100 species were examined [31]. As a matter of fact, it is very difficult to find a common trait in the structures so far analyzed. Across the Phaeophyceae, no obvious relationship between the fucoidan composition and the taxonomic classification can be drawn. If present, this relationship is likely overridden by other factors which are known to dramatically change the biomass and its polysaccharide composition, such as the geographic location and the season of harvest of the seaweed [31]. Additionally, the structures reported are characterized after extraction, pre-treatment and biochemical analyses that differ from one lab to another, making comparisons even harder. At this point, it can be assumed that the description of existing FCSP structures is still incomplete.

Alginates are linear polymers made solely of two 1,4-linked epimers:  $\beta$ -D-mannuronic acid (M) and  $\alpha$ -L-guluronic acid (G). No regular repeating structure can be found throughout the entire polysaccharide chain. However, monomers can be arranged in blocks of G, M and MG of varying length and distribution (Fig. 1B). Each block has different conformational preferences and, hence, different physico-chemical properties [32]. In particular, the G-blocks regions form “egg-box” junctions with calcium, which contribute to gel stiffening. While most seaweed species have an M/G ratio of 1.2–1.6 in alginate [33], variations of the M/G ratio have been frequently reported between tissues [32,33]. This statement is of biological significance as a low or a high M/G ratio will impart the alga with mechanical strength or flexibility, respectively. Bacteria of the *Azotobacter* and *Pseudomonas* genera are also known to synthesize alginates, albeit in an acetylated form. Additionally, and in contrast to bacteria, alginates from brown algae all contain a broad distribution of G-blocks [34].

The ECM composition varies among species, across cell types within a specific alga, in response to abiotic or biotic factors [31,35–39], and during responses of many aspects of cell development and properties. A schematic model of the ECM architecture has been proposed [27]



**Fig. 2.** The ECM frequently follows a layered-ultrastructure in brown algae, A) SEM micrograph of thick-walled meristoderm cells of *A. nodosum*, fouled with epibionts. Up to six ECM layers have been reported prior to epidermal shedding [49]. B) TEM micrograph of a *S. babingtonii* embryo at 24 h after fertilization. The layered structure of the rhizoid outer wall (ROW) is shown and contrasts with the thin and monolayered periclinal wall (PW). C) TEM micrograph of *D. dichotoma* indicating epidermal tissues. Cells in the epidermis are highly polarized with thick outer walls (OW) and thin inner walls (IW). The inset shows a higher magnification of the OW in which distinct layers numbered L1 to L3 are visible. D) TEM micrograph of *S. latissima* showing a medullar cell with ECMs of equal thickness. Distinct layers numbered L1 and L2 are visible. ml, middle lamellae. Figure developed from micrographs provided by Halat et al. (2020), Yonamine et al. (2021) and personal collections.

(Fig. 1 A). However, such a model is generic, applied to some analyzed Fucales only. While it helps to raise our understanding of ‘the brown algal ECM’, it cannot document the entire ECM diversity in brown algae. Similarly, the current model does not address the specificity of a multilayered wall, which is the most reported case in brown algal tissues (see below).

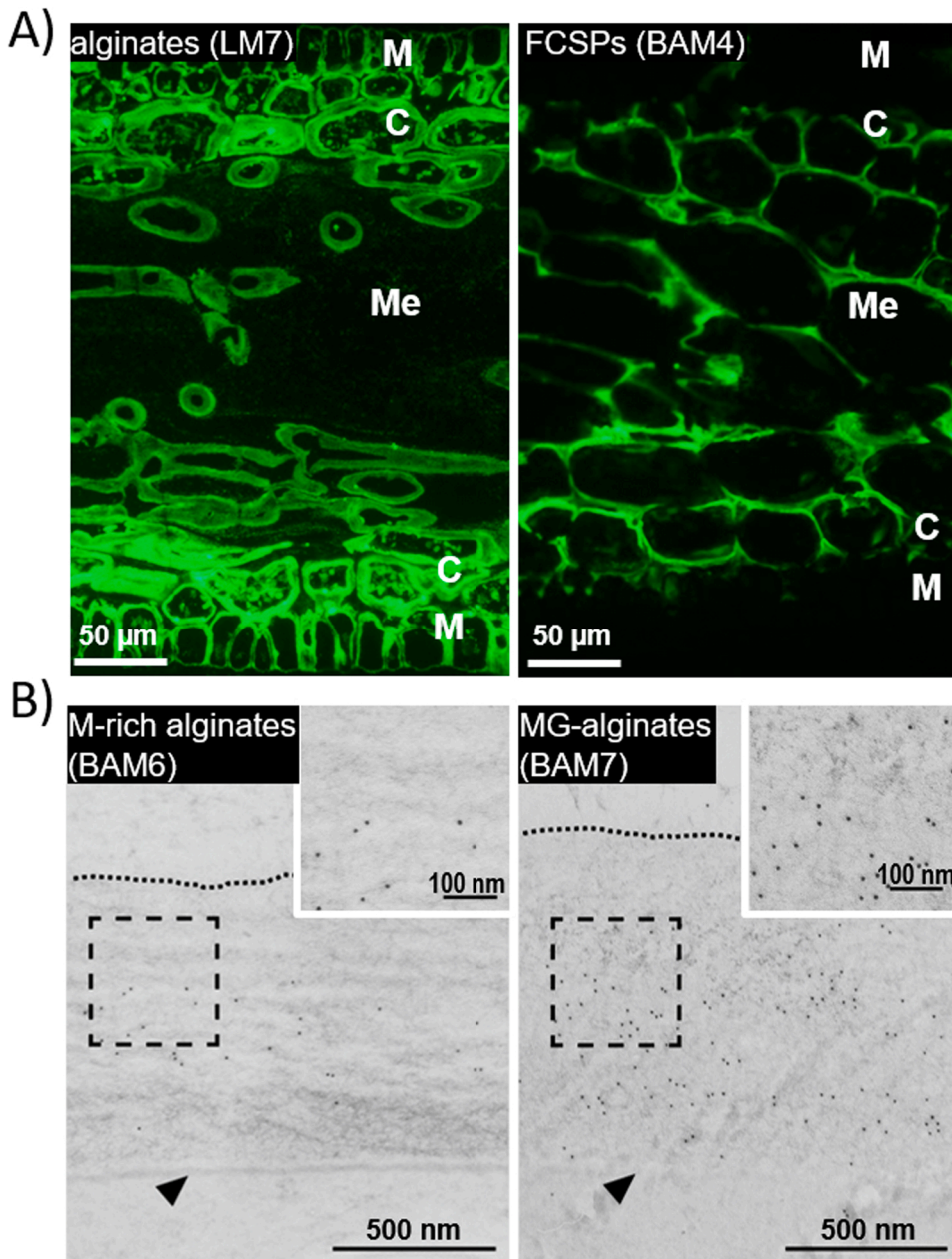
### 3. ECM generation and deposition in plants

#### 3.1. ECMs are frequently multilayered in brown algae

In land plants, when they have ceased growth, some cells elaborate a multilayered secondary wall within the primary wall. This formation is associated with cell differentiation and the layers harbor different polysaccharide compositions. A thick secondary wall as defined in plants, e.g. associated with a specific cell type and in non-expanding cells, has not been reported in brown algae. The relationship between the cell type, the cell wall architecture and its composition is still poorly understood in these organisms. Yet, many ultrastructural observations indicate the occurrence of two, three and up to six ECM layers (Fig. 2A). Some ultrastructural differences can be evident regarding the ECM thickness. In *Dictyota dichotoma* [40], *Pelvetia canaliculata* [41], and *Fucus viruosides* [42], and supposedly in all brown algae with complex tissues, epidermal cells are highly polarized with thick outer walls and thin inner walls (Fig. 2B, C). In contrast medullary cells have ECMs of more or less equal thickness. In complex tissues, amorphous materials

are found between the ECMs of neighboring cells. No clear definition exists in the literature for this region, referred to as ‘middle lamellae’ in this review (Fig. 2D). The middle lamellae is extensive in the medulla but rather scarce in cortical or epidermal regions.

The multilayered ECM organization was only investigated in a handful of early studies, focusing on zygotes [14,43] and thallus cells [42,44] in the Fucales, meristematic cells of *D. dichotoma* [40], the meristoderm of *Ascophyllum nodosum* [45] and apical cells of *Sphaecelaria rigidula* [46]. The distinction of the layers was made by observation of a shift in the distribution of fibers and amorphous material, yet these studies failed to give a consensus view about architectural patterns of the multilayered ECM in brown algae. Initial observations were made using conventional chemical fixation of the tissues. These methods possess inherent limitations as compared to rapid freezing/freeze substitution and electron tomography techniques, which instead offer excellent preservation of morphological details. The extension of these methods in brown algae allowed for a better understanding of the spatial arrangement of the ECM layers, but only rare species have been analyzed so far. This includes *Ectocarpus* sp. Ec32 sporophytes, in which the lateral ECM of thallus cells contains two to three layers [47]. Electron-dense fibrils in the innermost layer run parallel to the plasma membrane, while the outermost layer consists of non-fibrillar amorphous material, and the central layer is made of randomly arranged fibrils. This situation of the denser fibers being located in the innermost layer and the amorphous materials at the outermost layer is reminiscent in *Silvetia babingtonii* zygotes [48] (Fig. 3). Rapid freezing/freezing



**Fig. 3.** Examples of immunolabelling of alginates and FCSPs at the tissue and cell levels, A) Immunofluorescence analysis of ECMs in transverse sections of developing apices of *Fucus vesiculosus*. Moving in from the surface there are a meridosterm cell layer (M), cortical cell layers (C), and the medulla cells (Me) in the center. Probes used are the anti-pectin monoclonal antibody LM7, cross-reacting and detecting alginates in this case [16], and the FCSP/sulfated fucans monoclonal antibody BAM4. The two probes show contrasting labelling. LM7 binds to all of the ECMs although with different intensities, while the BAM4-labelling is observed in all ECMs except within the cell layers present at the tissue surface. At the cell level, distinct ECM layers seem to be differently labelled by the two probes, although this would deserve investigations at higher resolutions. Figure developed from micrographs provided by Torode et al. (2015). B) Immunogold localization of anti-alginate epitopes in the ECM of the thallus cell of a *S. babingtonii* embryo at 24 h after fertilization. Probes used are targeting M-rich alginates (BAM6) and MG-alginates (BAM7). BAM6 epitopes have a more restricted occurrence as compared to BAM7 epitopes. Figure developed from micrographs provided by Yonamine et al. (2021).

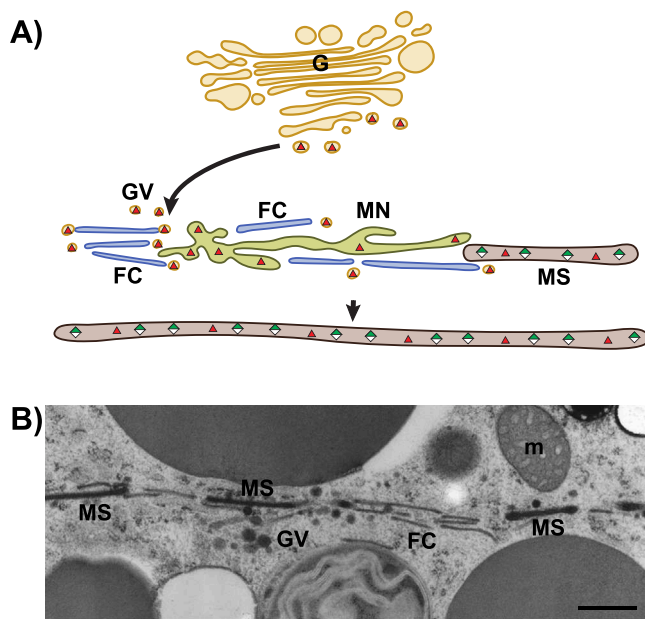
substitution has also been applied in *A. nodosum* during surface shedding. The amorphous materials are sandwiched between two layers of fibrillary structures, where they mark the site of the future rupture zone [49]. More generally, previous reports often indicated dense fibers in the innermost layers of ECMs.

### 3.2. ECM composition at the cell and tissue levels

Surprisingly the literature reports only a few attempts to specifically localize ECM polysaccharides in brown algae. At the tissue level, the use of metachromatic stains has suggested that FCSPs are the main components of the surface walls and in the medulla, notably within the middle lamellae [32,42]. However these techniques are not sensitive and specific enough to offer a conclusive view of polysaccharide distribution. Immunohistochemical approaches, based on the use of specific antibodies, are more appropriate for this purpose. In 1993, Green et al. indicated that the FCSP composition in the aforementioned locations is more complex and that the occurrence of FCSP structures varies

between thallus parts [50] (Fig. 3 A). This statement was further validated in *Fucus* species, where distinct FCSPs epitopes show contrasting distribution patterns between tissues [16]. By contrast, alginates seem to be present in all tissues (Fig. 3A), although their abundance differs with the cell type and the organ. In vegetative tissues of *Fucus distichus*, alginates were detected in abundance in the medulla, with lower occurrences in cortical and epidermal ECMs [51].

At the cell level, studies attempting to relate the multilayered architecture of the ECM to different polysaccharide compositions are also scarce. Immunolabelling procedures in cells of *S. rigidula*, *Scytosiphon lomentaria* [52], *Ectocarpus* sp. Ec32 [47] and in *S. babingtonii* zygotes [53] indicate that alginates tend to be distributed more evenly toward the inner layers of the ECM. It was further concluded that the fibrils observed by TEM in the layers in the vicinity of the plasma membrane are composed of alginate chains. Those alginate fibers, with an average width of 4 nm, are likely shaped by the assembly of multiple alginate chains [47]. The use of the anti-alginate BAM antibodies in *S. babingtonii* zygotes showed that the M-rich epitopes have a more restricted



**Fig. 4.** Centrifugal outgrowth of a partition membrane during cytokinesis in brown algae, A) Diagram showing the formation of a continuous cell partition membrane during cytokinesis. The Golgi vesicles (GVs) derived from the Golgi body and deliver FCSPs in the vicinity of flat cisternae (FC). These structures combine to shape a membranous network (MN). Disappearance of the gaps between MNs occurs when several MNs fuse to grow into membranous sacs (MS). Alginates are accumulating at this stage. The red triangles and the white/green diamonds show FCSPs and alginates, respectively. Updated from Nagasato et al. (2010). B) TEM micrograph of the formation of the cell partition membrane during the second division in a *S. babingtonii* zygote. GVs and FCs have accumulated to shape MSs. The MSs appear in patches at the future cytokinetic plane and will fuse to complete the partition membrane. m, mitochondria. Figure developed from micrographs provided by Yonamine et al. (2021).

distribution pattern as compared to MG-motifs (Fig. 3B). This indicates a rapid conversion of some M residues into G residues after alginate incorporation; a conclusion also reached in *Fucus serratus* zygotes by light microscopy [48,53]. Cellulose fibers were also observed in the *Ectocarpus* cells, albeit with a clear anisotropy and in a very small quantity [47]. So far, immunolabelling of distinct FSCSP epitopes has not been thoroughly investigated at the ECM level.

### 3.3. ECM assembly and expansion

Depending on the species observed, two patterns of cytokinesis have been reported in brown algae, with a completion either through the furrowing of the plasma membrane, or centrifugally by outgrowth of a partition membrane from within the cytoplasm [54]. In both cases flat cisternae are necessary for the completion of the new septum and Golgi vesicles play an important role in this process [55]. Flat cisternae are structures observed in the vicinity of the endoplasmic reticulum from which they likely derived [54,55] (Fig. 4A). During the partition process, both flat cisternae and Golgi vesicles accumulate in several places around the future cytokinetic plane and shape elongated membranous sacs which further fuse to achieve the division (Fig. 4B). During cytokinesis, immunolabelling studies have indicated that the Golgi vesicles deliver FCSPs to the future site of division. Polyclonal anti-alginates antibodies, likely targeting MG-alginates, indicate that the polysaccharide only starts to be detected at a later stage on the newly formed membrane [55]. So far cellulose has not been detected within this new cross wall and its content is therefore estimated to be low.

Once the new cell has been shaped, in the vast majority of algal cells, growth and the deposition of new ECM material supposedly occur

uniformly along the entire expanding wall. Yet, this statement still needs to be fully explored. The situation has been better described in some cells featuring tip growth, notably in the zygote of various *Fucus* species. This model system will not be detailed here as it has been largely described in dedicated reviews [56]. One can just briefly notice the essential role of the ECM as a source of position-dependent information required for cell polarization in those zygotes. Cellulose and alginates are the first polysaccharides to be deposited uniformly into the ECM after fertilization. FCSPs are deposited at a later stage, during the establishment of polarity axis and starting specifically at the emerging, rhizoid tip [14,53]. In *E. subulatus* fluorescent imaging also indicates the incorporation of highly sulfated FCSPs at the dome of apical cells [10].

### 3.4. Subcellular compartmentalization of ECM synthesis

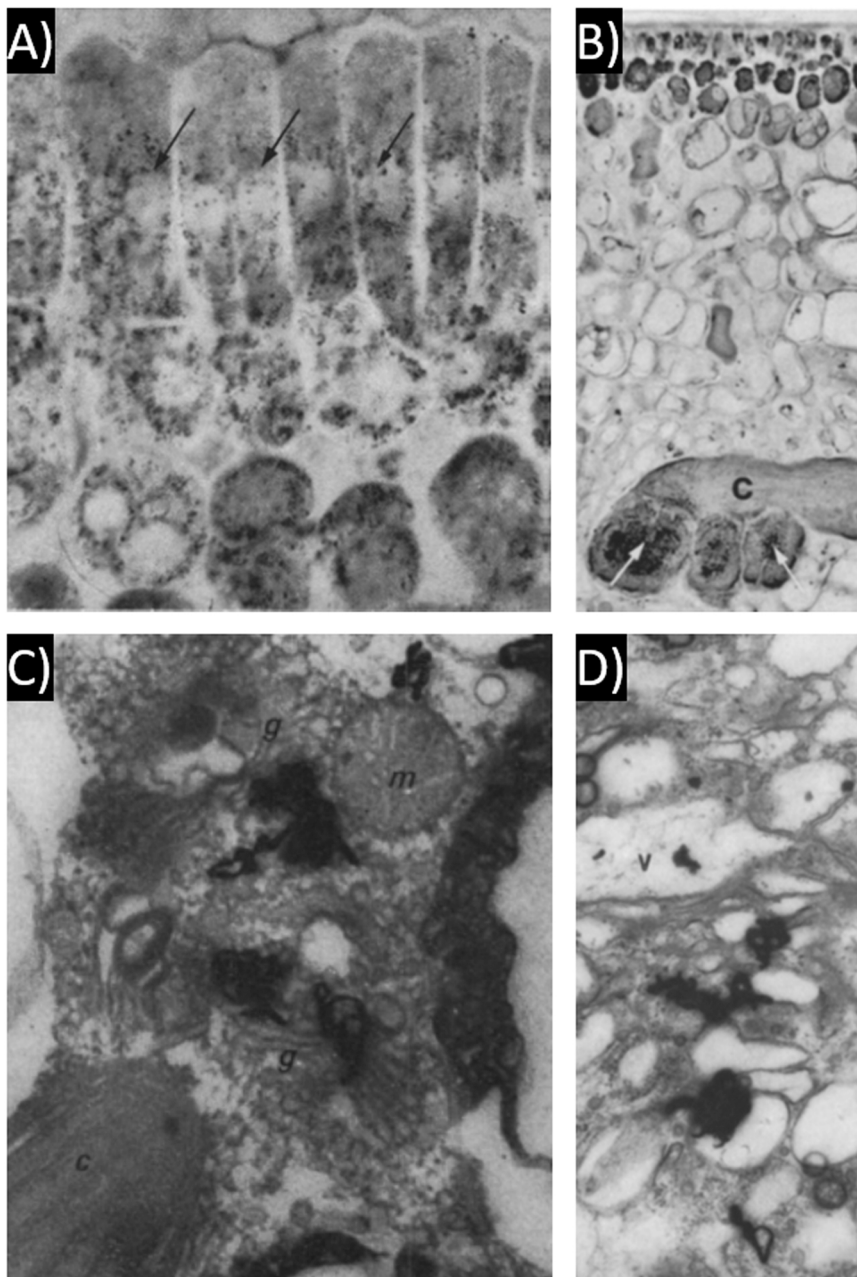
In *Pelvetia canaliculata*, autoradiography using  $^{35}\text{SO}_4^{2-}$  has shown that sulfated materials, which probably include FCSPs, are synthesized by all cell types [41] (Fig. 5A). In *D. dichotoma*, Evans et al. (1973) reported that some of the vegetative cells are specialized for secretion. In distinct species from the Laminariales order (*Laminaria digitata*, *Laminaria hyperborea*, *Saccharina latissima*), this activity was shown to be confined to highly specialized secretory cells, which discharge the sulfated materials into mucilage canals [41,57] (Fig. 5B). There was no evidence of involvement of any other cell type in the production of these sulfated materials. This highly specific location for the sulfation is puzzling, as the deposition of FSCPs would be expected to be rather uniform at least between some cell layers. Work on these substances at the cellular level is very limited and would therefore deserve further investigation.

In all instances the process of sulfation appears to occur in the Golgi-rich perinuclear region. Ultrastructural MET studies based on the use of  $^{35}\text{SO}_4^{2-}$  indicated the location of silver grains within the Golgi bodies in zygotes of *F. serratus* [43]. Similar observations were made in zygotes of *F. distichus* [8], *P. canaliculata* [41] and in the secretory cells of Laminariales [58] (Fig. 5C, 5D). It is believed that FCSPs are first polymerized into neutral polysaccharides prior to their sulfation by sulfotransferases. This point, together with the aforementioned observations, suggest that the carbohydrate sulfotransferases are located in the Golgi complex. Consequently, these observations indicate that the synthesis of the FCSPs is localized within the Golgi apparatus. This suggestion was validated using specific antibodies in *S. babingtonii* zygotes and which locate FCSP antigens in the Golgi [55] (Fig. 6A). This result is in agreement with the reported characterization of a galactosyltransferase activity from an isolated Golgi fraction from *F. serratus*, and which transfers UDP-galactose to endogenous acceptors, fucose and fucoidans [59]. Early ultrastructural TEM studies also indicate the common occurrence of granular vesicles in close vicinity of the membrane, and that the material delivered by those vesicles was seen as continuous to identical materials forming the inner ECM [40], supposedly alginates. Latter on Nagasato et al. (2010) reported by immunolabelling observations that alginates are not detected in Golgi bodies, but in specific osmiophilic vesicles closely associated to the plasma membrane (Fig 6 B).

## 4. The synthesis of ECM polysaccharides in brown algae

### 4.1. Predicted metabolic pathways

The alginate pathway was first explored at the biochemical level in *Fucus gardneri* by Lin et al. (1966), with the identification of key enzymatic activities [60]. It was only with the first release of a brown algal genome, 44 years later, that a more comprehensive view was obtained at the molecular level [26]. Since then, additional functional annotations were made, as for instance enzymes involved in the degradation of alginates (see below). Fig. 7 includes those predictions along with the characterized proteins. Michel et al. (2010) were also the first to provide



**Fig. 5.** Autoradiograph detection of  $^{35}\text{SO}_4^{2-}$  in brown algal cells. The detection is shown at the tissue level (A, B) and at the cell level (C, D) for Fucales species (A, C) and Laminariales species (B, D). A) Light-microscope autoradiograph in an apex of *P. canaliculata* incubated 2 h in  $^{35}\text{S}$  followed by 4 h chase. Silver grains are seen around the nuclei (arrowed) and basal regions of epidermal cells and in outer cortical cells. B) Light-microscope autoradiograph in the thallus of *L. hyperborea* incubated 3 h in  $^{35}\text{S}$  followed by 26 h chase. The subsidiary secretory canal (white arrows) is more heavily labelled than the secretory cells surrounding it. The main canal (C) is not labelled. C) Electron-microscope autoradiograph of a 22 h-old zygote pulsed 15 min with  $^{35}\text{S}$ . The silver grains are associated with the Golgi bodies (g). A mitochondrion (m) and part of a chloroplast (c) also are visible. D) Electron-microscope autoradiograph of a secretory cell showing the association of silver grains with one Golgi body and its associated secretory vesicles (v).

(A) Reproduced with permission from Evans et al. (1973).

(B) Reproduced with permission from Evans et al. (1973).

(C) Reproduced with permission from Callow et al. (1978).

(D) Reproduced with permission from Evans and Callow (1974).

a comprehensive view of the main steps leading to the synthesis of sulfated fucans (Fig. 7). The FCSP populations being highly heterogeneous, it is anticipated that more genes are recruited for their synthesis than just those involved in the synthesis of fucan *sensu stricto*. This would include some epimerases for the synthesis of additional GDP-precursors (e.g. GDP-galactose) and a variety of glycosyltransferases beyond the proper fucosyltransferases. Yet, those predictions are still the best available so far and are described in more details below.

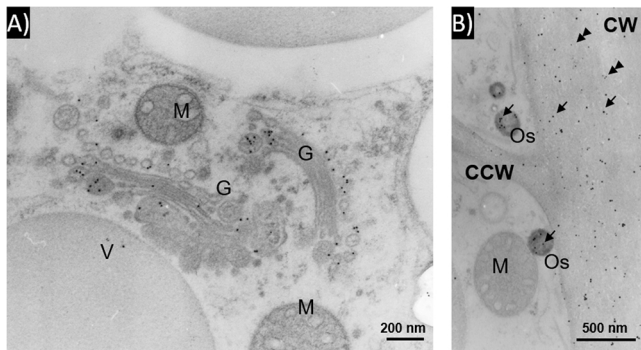
#### 4.2. A recent boost in functionally validated genes

All enzymes biochemically characterized so far are involved either in the synthesis of sugar precursors or in the remodeling of alginates. They are essentially coming from *Saccharina japonica* as a source, with some exceptions made from *Ectocarpus* sp. Ec32.

##### a. Characterized enzymes involved in the synthesis of sugar-precursors

GDP-mannose is an essential activated sugar used in the biosynthetic pathway of alginates, but also in the production of fucans through its conversion to GDP-fucose [26]. The three enzymatic steps which leads to the production of GDP-mannose from fructose-6 phosphate, are essential actors in building up major cell wall polysaccharides in brown algae (Fig. 7). The mannose-6-phosphate isomerase (MPI) catalyzes the production of mannose-6-phosphate from fructose-6-phosphate. In *S. japonica*, three full-length MPI genes have been isolated and the function of one SjaMPI4 protein was validated [61]. This enzyme has an additional mannose-1-phosphate guanylyltransferase (MPG) activity (Fig. 7). This situation is reminiscent to bacterial MPI homologues which possess a dual MPI/MPG activity and would explain why genuine MPG genes were not identified in brown algal genomic and transcriptomic data [26,61].

The bifunctional phosphomannomutase (PMM)/

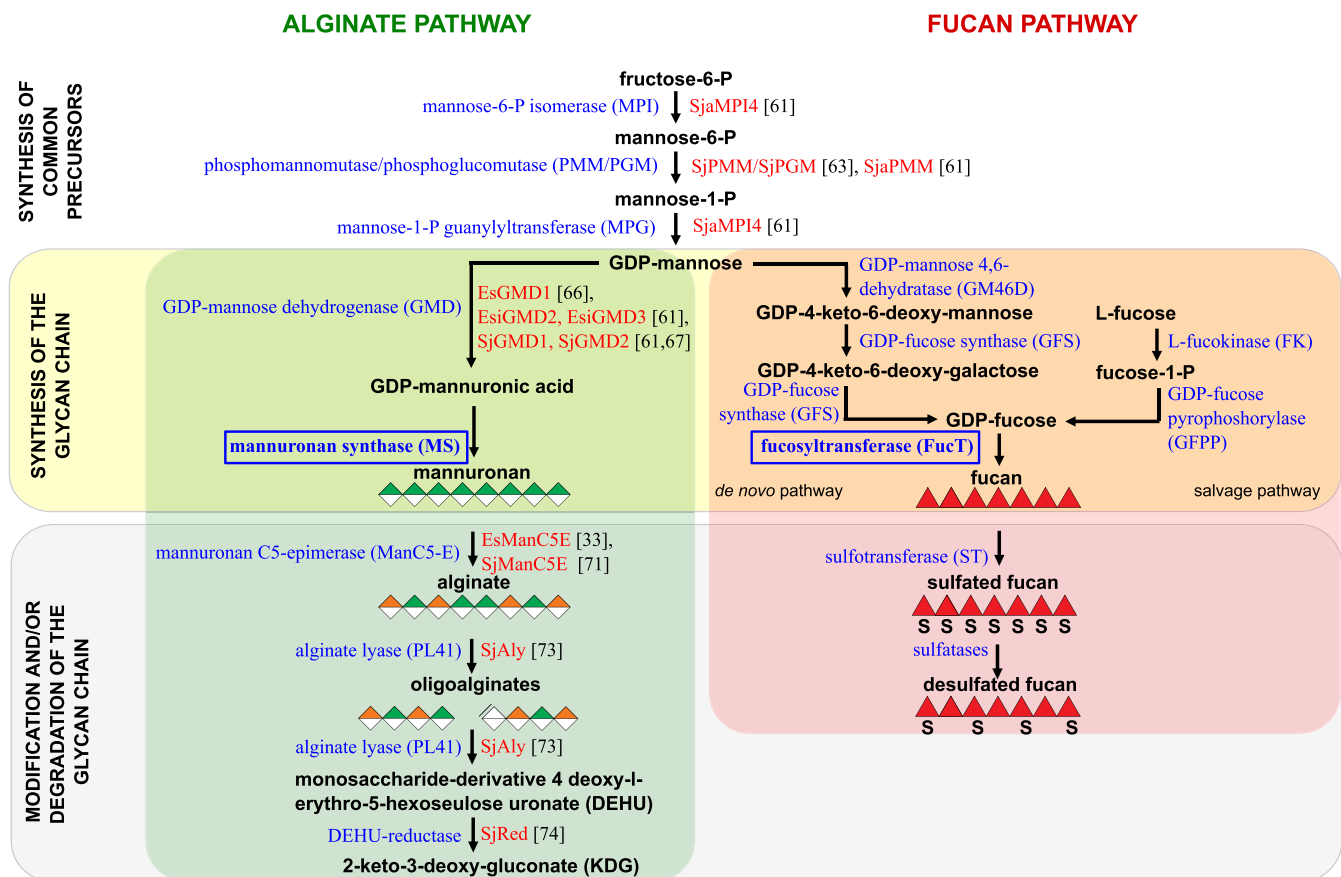


**Fig. 6.** Immunogold localization of FSCPs and alginates at the subcellular level in *S. babingtonii* zygotes. A) FSCPs localize in the Golgi vesicles. B) Double labeling using 10 nm-gold particles for the anti-FSCP antibody (double arrowheads) and 15 nm-gold particles for the anti-alginate antibody (arrows). Alginates, but not FSCPs, localize in osmiophilic vesicles. CCW cross cell wall, CW cell wall, G Golgi body, M mitochondrion, Os osmiophilic vesicle, V vacuole. Figure developed from micrographs provided by Yonamine et al. (2021).

phosphoglucomutase (PGM) enzymes are fundamental to primary metabolism across all the kingdoms of life [62]. In brown algae, besides providing precursors for the synthesis of alginates and fucans (*de novo* pathway) (Fig. 7), they are possibly involved in the generation of other glycosylated components. Two distinct studies report the

characterization of PMM activity in *S. japonica*. The corresponding enzyme was named SjPMM/SjPGM by Zang et al. (2018) [63]. While there is not an obvious transparency on the sequence used by Chi et al. (2018), it likely derives from the same gene and the protein was named SjaPMM [61]. In both cases biochemical characterizations were made on the recombinant and purified forms of the protein. Similar to most PMM/PGMs from other species, this enzyme catalyzes the reversible interconversion of glucose-6-phosphate and mannose-6-phosphate, with the corresponding biphosphorylated sugar as an intermediate and cofactor. This SjPMM/SjPGM enzyme harbors a preference to the glucose phosphosugar as a substrate [61,63] and as such might represent a key branch point in carbohydrate metabolism in *S. japonica*. As reported by Zhang et al. (2018), the corresponding gene was 95% similar to a previously unannotated gene sequence of *Ectocarpus* sp. Ec32, yet differing from another PMM/PGM candidate gene predicted by Michel et al. (2010). Therefore, additional PMM/PGM enzymes with better affinities toward mannose phosphosugars may lay uncharacterized in brown algae.

Once GDP-mannose has been synthesized, its oxidation to GDP-mannuronic acid will serve the elongation of an alginate polymer as a form of polymannuronate. The oxidation of GDP-mannose is catalyzed by GDP-mannose dehydrogenase (GMD), generally seen as a rate-limiting enzyme in the alginate biosynthetic pathway [64]. Such enzyme belongs to the superfamily of GDP-mannose/UDP-glucose dehydrogenases (GMD/UGDs) which are ubiquitously present in all



**Fig. 7.** Schematic representation of the metabolic pathways for alginates and sulfated fucans *sensu stricto*. The different enzymatic activities (in blue) are indicated between each product (in black). The enzymes for which a biochemical validation has been obtained are indicated (in red) with their short names and corresponding references. Key enzymes (e.g. glycosyltransferases) involved in the elongation of the glycan chains are still uncharacterized and are indicated in a blue frame. Note that the catalytic steps involved in the synthesis or early precursors are common to both pathways (upper part). Some reactions are related to the synthesis of the polymeric chains (middle part), whereas others refer to the remodeling and/or degradation of the elongated chains (lower part). The schematic representation of the pathways has been updated from Michel et al. (2010) with the addition of the newly characterized activities, notably the alginate lyase [73] and DEHU reductase [74].



organisms [65]. In bacteria this superfamily includes enzymes that oxidize different sugars such as UDP-glucose, GDP-mannose, UDP-N-acetylglucosamine, UDP-N-acetyl-D-mannosaminuronic acid, and UDP-galactose [66]. Outside brown algae, all known eukaryotic members of this superfamily convert only UDP-glucose (e.g. UGDs) [66]. GMD/UGDs are found in small multi-copy genes in brown algae, with a total of 3 and 4 identified genes in *S. japonica* and *Ectocarpus* sp. Ec32, respectively [61]. Initial studies were reporting the isolation of one GMD gene from *Ectocarpus* sp. Ec32 (EsGMD1) [66] and two GMD genes from *S. japonica* (SjGMD1, SjGMD2) [67] and the corresponding recombinant proteins were produced, purified and biochemically validated. Chi et al. (2018) reported the characterization of all the 3 predicted GMD/UGDs from *S. japonica*, in addition to 3 others from *Ectocarpus* sp. Ec32. While a comparison with the previous work from Zhang et al. (2016) was not made, the characterized SjaGMD1 and SjaGMD2 likely correspond to the previously published enzymes from *S. japonica*. The catalytic activity of two other GMD proteins from *Ectocarpus* was confirmed (EsiGMD2, EsiGMD3). Two additional enzymes were characterized and referred as UGDs (SjaUGD, EsiUGD) [61], however the substrate preference by these enzymes was deduced from their clustering in a UGD clade in phylogenetic studies [61] and their use of UDP-glucose as a substrate has not been biochemically established. Overall these brown algal enzymes have the ability to produce the alginate precursor, GDP-mannuronic acid and are the first eukaryotic GMDs characterized so far.

By contrast to the alginate pathway, all the candidate genes involved in the synthesis of fucan precursors after the GDP-mannose generation still await functional validations. GDP-fucose was predicted to be synthesized through either a *de novo* pathway or a salvage pathway (Fig. 7). Some candidate genes were found in a gene cluster in *Cladosiphon okamuranus* [68], along with a sulfotransferase and a hydrolase, which shared a synteny in *Ectocarpus* sp. Ec32 and *Nemacystus decipiens* [69]. These enzymes offer ideal targets for future work dealing with the biochemical characterization of activities within the fucan pathway.

#### b. Characterized enzymes involved in the remodeling of alginates

Once the mannuronic acid residues have been assembled in an alginate chain, the final step of synthesis or remodeling is the epimerization of some M residues into G residues by mannuronan C5-epimerases (ManC5-E) (Fig. 7). Most of the biochemical knowledge about ManC5-Es originates from the characterization of bacterial enzymes [70]. Two ManC5-Es from brown algae have been expressed in their recombinant forms, purified and characterized [33,71]. However heterologous expression of these algal enzymes, a challenging task, is still a bottleneck which impairs the thorough characterization of the epimerization patterns generated. The brown algal ManC5-Es are putatively located into the walls [72] were they are believed to modify their substrate *in muro*. There is a large number of ManC5-E genes in brown algae, which expression presumably yields polymers with a variety of either random or blockwise distribution of G residues, and thus alginates of distinct rheological properties. These modifications would be regulated in response to physiological requirements. However this is a one-way process, and there is no evidence of modification of the G residues once in ECMs. This suggests the existence of other mechanisms to modulate the alginate and ECM properties further. While the interactions of additional actors may be one option to modify the hydrogel network (i.e. regulation of apoplastic  $Ca^{2+}$  concentration, phlorotannins cross-linking, etc.), Inoue et al. (2019, 2021) have demonstrated the occurrence of an alginate-degrading pathway in brown algae, with the biochemical characterization of key enzymes described below [73,74].

Alginate lyases are common in alginate-assimilating organisms and several of those enzymes have been thoroughly characterized in alga-associated bacteria such as *Zobellia galactanivoran* [75] and other Flavobacteria. Like glycoside hydrolases, glycosyltransferases and others carbohydrate-acting enzymes, polysaccharide lyases (PL) have been classified based on amino-acid sequence similarities in the CAZy

database (www.cazy.org) [76]. Most bacterial alginate lyases described so far belong to families PL5, PL6, PL7, PL15, PL17 and PL18. Additionally, alginate lyase activities were demonstrated in families PL8 and PL14 in eukaryotes [77,78]. Several new PL families with alginate lyase activities were discovered during the last two years, namely PL31, PL32, PL36 and PL39 in bacteria [79,80], and PL41 in brown algae [73]. Indeed, in 2019, Inoue et al. characterized the first PL41-alginate lyase from *S. japonica*, thereof bringing the first evidence of such a lyase in an alginate-producing eukaryotic organism. This SjAly enzyme preferentially uses alginates enriched in M-blocks and can cleave the polymer endolytically into unsaturated tetra-, tri-, disaccharides, and down to the monosaccharide-derivative 4-deoxy-1-erythro-5-hexoseulose uronate (DEHU) (Fig. 7). Homologous genes have been subsequently reported in *E. subulatus* [81] and are likely to be present in other brown algae. The authors later characterized an active DEHU-reductase from the same alga, which reduces DEHU into 2-keto-3-deoxy gluconate (KDG) [74]. DEHU cannot be directly used as a unit structure for alginate synthesis, therefore its further degradation allows its usage as an energy source. In alginate-degrading organisms KDG is further cleaved into pyruvate and either glyceraldehyde-3-phosphate or glyceraldehyde as the final products. Such an enzymatic activity needs to be assessed in brown algae, yet its presence is very likely.

#### 4.3. The core proteins involved in glycan elongation and modification are still unknown

##### a. Candidate genes for the biosynthesis of glucan chains

As stated above, some functional assessment has been made on ECM enzymes in brown algae, however none of them is catalyzing the elongation or grafting of glucan chains, which is a mandatory step in generating the wall. The synthesis of glycans as stand-alone polysaccharides or glycoconjugates, is catalyzed by glycosyltransferases (GT). Among the available genomes of brown algae, only 3 had their CAZy contents analyzed, namely *Ectocarpus* sp. Ec32 [26], *E. subulatus* [81] and *S. japonica* [42,82,83]. The first census of this CAZyme content was detailed for *Ectocarpus* sp. Ec32 and indicated a content of 41 GH and 88 GT members, representing 18 GH and 32 GT families respectively [84]. Those analyses showed that brown algae have a peculiar distribution in GTs among eukaryotes, with for instance some families absent in land plants but shared with other taxonomic groups such as chlorophyte green algae and amoeba (GT60), sac fungi (GT49) and animals (GT23). As compared to other eukaryotes such as land plants, *Ectocarpus* sp. Ec32 harbors less functional redundancy with fewer genes in each of its CAZy families.

Ye et al. (2015) report a total number of GTs within the same range between *Ectocarpus* sp. Ec32 and *S. japonica*, except the slight expansion of some GT families in *S. japonica* (GT2, GT23, GT47, GT77) [83]. However, Liu et al. (2019) indicated that in *S. japonica* the gene number of GTs and GHs is twice more than the gene number in *Ectocarpus* sp. Ec32 [82]. While they speculate that this may relate to more complex tissues in kelps as compared to other species, more in-depth annotation of brown algal genomes from different taxonomic origins would be needed to assess this statement. Notably there is a discrepancy in the total number of GH and GT genes referenced by those authors, with for instance 82 GHs/131 GTs identified by Ye et al. (2015) versus 107 GHs/94 GTs identified by Liu et al. (2019) for *S. japonica*. This situation might lead to false statements regarding specific gene loss or expansion. While this is likely the consequence of different annotation tools applied to such 'exotic' genomes as compared to reference/model species, the accounting of domain duplicates within proteins and/or fragments might also have important impacts on the conclusions. Hence, to clarify this, we have undertaken an expert analysis of the CAZyme content of 4 published genomes of brown algae, namely *S. japonica*, *Ectocarpus* sp. Ec32, *N. decipiens* and *C. okamuranus*. This investigation was motivated by our expertise in maintaining the worldwide reference CAZy

**Table 1**Gene number of GT families known to contain FucT activities in *Ectocarpus* sp. Ec32, *N. decipiens*, *C. okamuranus* and *S. japonica*.

CAZy database		Number of candidate genes in brown algae			
GT families	Known FucT activities in CAZy	<i>Ectocarpus</i> sp. Ec32	<i>N. decipiens</i>	<i>C. okamuranus</i>	<i>S. japonica</i>
GT37	$\alpha$ -1,2-FucTs	–	–	–	–
GT74	$\alpha$ – 1,2-FucTs	–	–	–	–
GT11	$\alpha$ – 1,2/3-FucTs	–	–	–	–
GT10	$\alpha$ – 1,3/4-FucTs	<b>1</b> [1]	<b>1</b> [1]	<b>1</b> [1]	<b>1</b> [2]
GT23	$\alpha$ – 1,6-FucTs	<b>2</b> [7]	<b>2</b> [5]	<b>6</b> [10]	<b>2</b> [9]
GT41	protein O-FucTs	<b>4</b> [10]	<b>7</b> [14]	<b>10</b> [15]	<b>2</b> [9]
GT65	protein O-FucTs	–	–	–	–
GT68	protein O-FucTs	–	–	–	–

The synthesis of homofucan backbones in brown algae involves fucosyltransferases which have not been characterized yet. It is still unknown to which GT families they belong to but some speculations can be made. In eukaryotes, all known FucTs are classified in a restricted number of CAZy GT families as shown. The generated glycosidic linkages identified from characterized enzymes (outside brown algae) are indicated. Our annotation retrieves full length proteins and fragments. Numbers in bold indicate the number of full-length proteins identified. The framed numbers indicate the number of the full-length proteins supplemented by the fragments identified. Note that distinct fragments can derive from the same protein. The hyphen sign ('-') indicates that our analysis retrieved no proteins or fragments in the corresponding genome.

classification that we initiated 30 years ago ([www.cazy.org](http://www.cazy.org)) [85,86]. In *S. japonica*, we observed a lower number of GHs than previously reported with 58 full-length genes, however, the number of predicted GTs was higher with 156 full-length genes. We additionally identified gene fragments not incorporated in this counting, with 30 and 37 fragments for GHs and GTs, respectively. Note that several of those fragments may possibly be part of the same gene. These quantities were in the same range for the 3 other genomes as highlighted for some GTs discussed hereafter, therefore not supporting the hypothesis of an extending GT content in Laminariales as compared to Ectocarpales.

Michel et al. (2010) were the first to speculate on the possible GT members involved in the synthesis of the alginate and fucan backbones. In alginate-producing bacteria, the synthesis of polymannuronate is catalysed by the Alg8 GT2 family member. While the *Ectocarpus* sp. Ec32 genome encodes 9 GT2s homologous to the cellulose synthases (CESA) and cellulose synthase-like (CSL) proteins, no significant homologues to Alg8 have been identified. Some of these GT2 members are likely involved in the synthesis of cellulose and mixed linkage glucans and possible candidate genes have been previously discussed [1,87]. Mannuronate synthases in brown algae might represent additional GT2 members, albeit this hypothesis is still highly speculative [26].

Sulfated fucans/fucoidans from brown algae being highly heterogeneous in term of sugar monomers and glycosidic bonding types, it is anticipated that their biological synthesis involves multiple GTs and accessory enzymes such as sulfotransferases (ST) or acetyltransferases. One current challenge is to integrate the genome-based evidences with our glycome-based evidence, which is much more heterogeneous. While the present review does not aim to gain an exhaustive view of all GTs involved in the FCSP synthesis in brown algae, one focus can be made on fucosyltransferases (FucTs) potentially involved in the synthesis of homofucan backbones. In the CAZy database, several FucTs have been identified and classified in the families GT37, GT74 ( $\alpha$ -1,2-FucTs), GT11 ( $\alpha$ -1,2/3-FucTs), GT10 ( $\alpha$ -1,3/4-FucTs), GT23 ( $\alpha$ -1,6-FucTs) and GT41, GT65, GT68 (protein O-FucTs) [76,88,89]. Michel et al. (2010) initially indicated putative FucTs, from families GT10, GT23 and GT65 in *Ectocarpus* sp. Ec32 as the best targets for fucan synthesis. However, no GT65 members were reported in neither *E. subulatus* nor *S. japonica* [81,83], excluding those genes as realistic actors in fucan synthesis. In addition, the GT11, GT37, GT68 and GT74 were not detected in brown algae so far, which excludes those members as well. By contrast, in our analysis, the GT23 family seems to be a robust candidate given its presence in several copies in the four genomes analysed (Table 1, Supplementary Table S1). Interestingly in *Fucus serratus*, some GT23 genes have been shown to be up-regulated during the first stages of embryogenesis, which correlates with the early deposition of ECM polysaccharides, notably fucans [90]. However, all characterized GT23 enzymes in other eukaryotes catalyze the incorporation of  $\alpha$ -1,6-linked fucose, while a

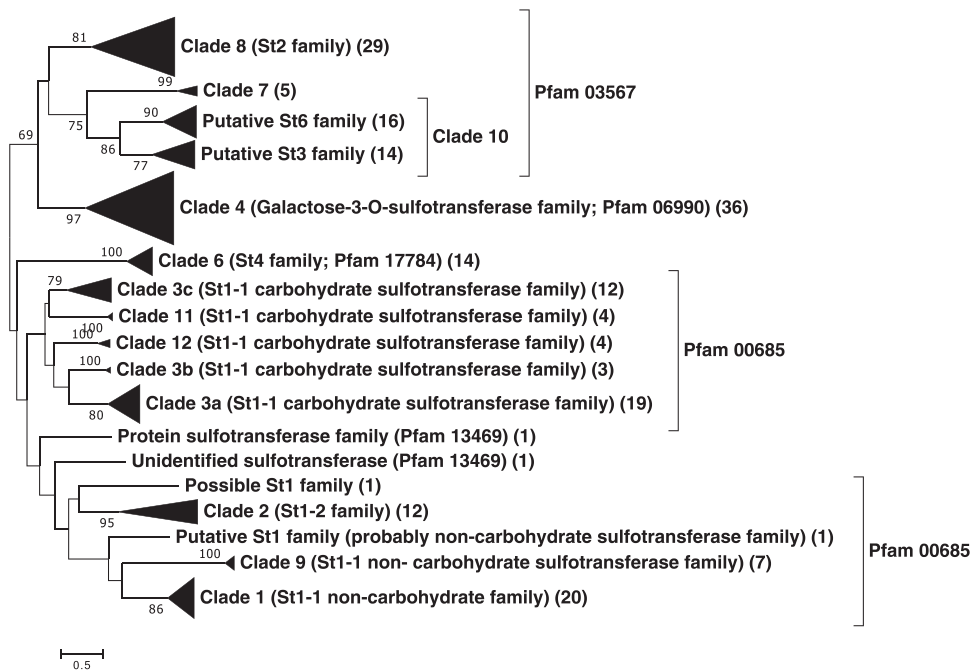
fucan synthase would be expected to incorporate  $\alpha$ -1,3/4-linked fucose. Members of the GT10 family are known to have such a linkage specificity [88,89,91,92], although they are present in a very restricted gene number in the brown algal genomes analyzed (Table 1, Supplementary Table S1). One should note that the GT41 family seems to have been excluded from the initial genomic analyses, while some members are found in those genomes (Table 1, Supplementary Table S1). In other eukaryotic phyla, these enzymes are usually involved in protein glycosylation, therefore it is difficult to predict whether these FucTs are genuine fucan synthases. To conclude, this would leave the GT10 and GT23 families as the best candidates for the synthesis of fucan backbones in brown algae. Albeit, this does not exclude the evolution of distinct and specific GTs dedicated to the synthesis of this glycan in brown algae. In *Ectocarpus* sp. Ec32, more than 36% of the predicted proteins were novel, being *Ectocarpus* or brown algal specific, with no counterpart in other taxonomic groups [24,93]. This point, together with the fact that novel enzymatic activities have been recently discovered by biochemical-screening approaches (see above alginate lyase, DEHU-reductase), leaves opened the possibility of novel and unclassified GT families to be described in future.

#### b. Candidate genes for the sulfate incorporation and depletion on carbohydrates

The sulfation and desulfation of FCSPs in brown algae are predicted to be catalyzed by sulfotransferases (ST) and formylglycine-dependent sulfatases, respectively [26,94,95]. These enzymes are crucial in determining the position and the number of sulfate groups in FCSPs, and thus in catalyzing the last steps of FCSP biosynthesis.

The identification and annotation of ST genes was made in 4 public genomes from brown algae, e.g. *Ectocarpus* sp. Ec32 [1,26,33], *S. japonica* [83,96], *N. decipiens* [69] and *C. okamuranus* [68]. A dedicated analysis by Lu et al. (2020) was recently completed on *S. japonica* and reports the expert identification of 44 ST genes in this species and 41 in *Ectocarpus* sp. Ec32. In contrast, only 24 and 6 STs were reported in *N. decipiens* and *C. okamuranus*, respectively. Such a difference in the ST gene numbers between the three Ectocarpales species is puzzling. In order to prevent any misinterpretation, we re-analysed the ST content on these 4 brown algal published genomes. We identified a rather similar number of full-length ST genes between these four genomes, i.e. 40, 59, 45 and 55 members in *Ectocarpus* sp. Ec32, *N. decipiens*, *C. okamuranus* and *S. japonica*, respectively.

Previous phylogenetic analyses have indicated that STs in brown algae are classified into distinct clades [1,26,96]. Michel et al. (2010) were pioneer in incorporating brown algal sequences in their analyses, later updated in Kloreg et al. (2021). They indicated the clustering of the brown algal sequences into 4 different clades and discussed their



**Fig. 8.** Unrooted phylogenetic tree of sulfotransferases from *Ectocarpus* sp. Ec32, *N. decipiens*, *C. okamuranus* and *S. japonica*. The phylogenetic tree was constructed using the Maximum Likelihood approach. The reliability of the tree was tested by a bootstrap analysis using 1000 resamplings of the dataset. Only bootstrap values above 50% are shown. The Pfam domains and the classification in the different ST families are based from the Pfam 34.0 site and Uniprot database, respectively. We retained but extended the numbering followed by Kloareg et al. (2021). Note that clade 5 is not apparent as it did not retrieve algal sequences in the aforementioned analysis. Numbers in brackets refer to the number of sequences included in the collapsed clades. The detailed method and the uncompressed tree are shown in [Supplementary Fig. S1](#).

relations to other eukaryotic STs. However only 15 brown algal sequences (all from *Ectocarpus* sp. Ec32) were incorporated, which only accounts for a subset of the whole ST content in these organisms. Later on, Lu et al. (2020) focused their phylogenetic analyses on brown algae only and likely identified additional clades (named clade D and clade E). But as stated above some sequences from *N. decipiens* and *C. okamuranus* were not incorporated. Thus, we have extended this analysis to the full set of ST genes we identified above (Fig. 8). A total of 198 sequences were retained in the analysis, the sequences with a low confidence or truncated, were removed. Our analysis indicates that the brown algal STs from these 4 genomes cluster into 15 distinct clades. As a matter of reference, we kept but extended the numbering followed by Kloareg et al. (2021) and in which clades 1–4 were previously discussed. Briefly, the STs from clade 1 likely are involved in the sulfation of phenolic components such as phlorotannins and/or flavonoids in brown algae [26]. Most other members form clades 2–4 are homologous to a variety of carbohydrate STs, including characterized enzymes involved in the synthesis of glycosphingolipids (galactosylceramide STs, clade 4), or glycosaminoglycans (carbohydrates STs, clade 2; heparan sulfate STs, clade 3) [26]. Populating the analysis causes clade 3 to subdivide further in additional clades (clades 3a, 3b, 3c which contain members from previous clade 3; and clades 11 and 12). These clades are well supported by the bootstrap values (Fig. 8., [Supplementary Fig. S1](#)), and they may enclose enzymes with distinct carbohydrate specificities. Additional clades are identified in the present analysis, notably clades 8 and 10 which both encompass a substantial number of ST members. While the fucose residues can be highly sulfated and at various positions in sulfated fucans, additional monosaccharides are known to be sulfated in FCSPs (i.e. galactose, mannose, Fig. 1) [97]. The number of ST members in brown algae, as their clustering in distinct clades, are likely to reflect this diversity in carbohydrate sulfation.

By contrast, the occurrence of sulfatases has not been extensively investigated in brown algae. Genome annotations retrieved 9 S1-sulfatases, all belonging to the S1\_2 subfamily (<http://abims.sb-rosc-off.fr/sulfatlas/>) [95] in *Ectocarpus* sp. Ec32 and in *E. subulatus* [26,81]. All these enzymes are related to GAG sulfatases from animals, which hydrolyze the 4-sulfate groups in GAGs. In brown algae, these enzymes probably hydrolyze 4-sulfate groups from FCSPs (Fig. 7). Sulfatases are anticipated to be ubiquitously present in brown algae.

## 5. Conclusions and perspectives

As in other eukaryotes, distinct functional roles for ECMs in brown algae are likely to be reflected by differences in their composition. The diversity of structures and ECM architectures are probably still underestimated in brown algae. Their heterogeneous chemistry is a limitation to their study. Our knowledge of the brown algal glycomes is only as complete as the methodology to define them. Progress has been made recently by the community as a whole to better define the isolated structures and their ECM context. However, despite the number of studies carried out on ECM polysaccharides, and the large quantities of alginate and FCSPs present in brown algae, little is known about their intracellular origin, subsequent maturation and transport, and of their specific locations at the cell and tissue levels. Similarly, we are still a long way from being able to infer the biochemical functions of many genes involved in the biosynthesis of glycans. Yet, the release of the first genomic sequences in brown algae has allowed progress on the matter, and many additional candidate genes will likely be examined in a near future. Connecting the morphological and molecular data will be an exciting subject to investigate in the long-term basis and the recent development of genetic transformation in brown algae [98] is opening up additional possibilities.

## Funding

This work was supported by the French National Research Agency with regard to the BrownSugar project (grant agreement no. ANR-20-CE44-0011).

## Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

## Acknowledgements

We sincerely thank Moira Galway (St. Francis Xavier University, Canada) for kindly providing a free-copyright micrograph of

*A. nodosum*. We are grateful to Sophie LePanse (MerImage facility, Station Biologique de Roscoff, France) for her help in providing TEM micrographs of brown algae. We also thank Bernard Kloareg for his critical reading of the manuscript.

## Appendix A. Supporting information

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at [doi:10.1016/j.semcdb.2022.03.005](https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2022.03.005).

## References

- [1] B. Kloareg, Y. Badis, J.M. Cock, G. Michel, Role and evolution of the extracellular matrix in the acquisition of complex multicellularity in eukaryotes: a macroalgal perspective. *Genes*, Basel, 2021, p. 12, <https://doi.org/10.3390/genes12071059>.
- [2] Z.A. Popper, G. Michel, C. Hervé, D.S. Domozych, W.G.T. Willats, M.G. Tuohy, B. Kloareg, D.B. Stengel, Evolution and diversity of plant cell walls: from algae to flowering plants, *Annu. Rev. Plant Biol.* 62 (2011) 567–590, <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042110-103809>.
- [3] A. Varki, R.D. Cummings, J.D. Esko, P. Stanley, G.W. Hart, M. Aebi, A.G. Darvill, T. Kinoshita, N.H. Packer, J.H. Prestegard, *Essentials of Glycobiology*. N.Y. Cold Spring Harbor Laboratory Press, ed. Bookshelf ID: NBK310274, 2015.
- [4] N.K. Karamanos, A.D. Theocharis, Z. Piperigkou, D. Manou, A. Passi, S.S. Skandalis, D.H. Vynios, V. Orian-Rousseau, S. Ricard-Blum, C.E.H. Schmelzer, et al., A guide to the composition and functions of the extracellular matrix, *FEBS J.* 288 (2021) 6850–6912, <https://doi.org/10.1111/febs.15776>.
- [5] Carpita NC, and McCann MC (2000). The Cell Wall. In *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. (Rockville, Md.: B. Buchanan, W. Gruissem and R. Jones, eds. American Society of Plant Physiologists).
- [6] N.A.R. Gow, J.-P. Latge, C.A. Munro, J. Heitman, The fungal cell wall: structure, biosynthesis, and function, *Microbiol. Spectr.* 5 5.3.01 (2017), <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.FUNK-0035-2016>.
- [7] L.T. Salgado, L.P. Cinelli, N.B. Viana, R. Tomazetto de Carvalho, P.A. De Souza Mourão, V.L. Teixeira, M. Farina, Filho, A. Gilberto Menezes, A vanadium bromoperoxidase catalyzes the formation of high-molecular-weight complexes between brown algal phenolic substances and alginates, *J. Phycol.* 45 (2009) 193–202, <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2008.00642.x>.
- [8] S.H. Brawley, R.S. Quatrano, Sulfation of fucoidin in *Fucus* embryo. IV. Autoradiographic investigations of fucoidin sulfation and secretion during differentiation and the effect of cytochalasin treatment, *Dev. Biol.* 73 (1979) 193–205, [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(79\)92990063-0](https://doi.org/10.1016/0012-1606(79)92990063-0).
- [9] C. Hervé, A. Siméon, M. Jam, A. Cassin, K.L. Johnson, A.A. Salmeán, W.G. T. Willats, M.S. Doblin, A. Bacic, B. Kloareg, Arabinogalactan proteins have deep roots in eukaryotes: identification of genes and epitopes in brown algae and their role in *Fucus serratus* embryo development, *N. Phytol.* 209 (2016) 1428–1441, <https://doi.org/10.1111/nph.13786>.
- [10] A. Siméon, S. Kridli, B. Kloareg, C. Hervé, Presence of exogenous sulfate is mandatory for tip growth in the brown alga *Ectocarpus subulatus*, *Front. Plant Sci.* (2020) 11, <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.01277>.
- [11] A. Le Bail, B. Billoud, S. Le Panse, S. Chenivisse, B. Charrier, *ETOILE* regulates developmental patterning in the filamentous brown alga *Ectocarpus siliculosus*, *Plant Cell* 23 (2011) 1666–1678, <https://doi.org/10.1105/tpc.110.081919>.
- [12] K. Bogaert, A. Arun, S. Coelho, O. Clerck, Brown algae as a model for plant organogenesis. *Plant Organogenesis*, Volume 959, I. De Smet, ed. (Humana Press), 2013, pp. 97–125, [https://doi.org/10.1007/978-1-62703-221-6\\_6](https://doi.org/10.1007/978-1-62703-221-6_6).
- [13] F. Berger, A. Taylor, C. Brownlee, Cell fate determination by the cell wall in early *Fucus* development, *Science* 263 (1994) 1421–1423, <https://doi.org/10.1126/science.263.5152.1421>.
- [14] S.R. Bisgrove, D.L. Kropf, Cell wall deposition during morphogenesis in fucoid alga, *Planta* 212 (2001) 648–658, <https://doi.org/10.1007/s004250000434>.
- [15] B. Kloareg, M. Demarty, S. Mabeau, Ion-Exchange properties of isolated cell walls of brown algae: the interstitial solution, *J. Exp. Bot.* 38 (1987) 1652–1662, <https://doi.org/10.1093/jxb/38.10.1652>.
- [16] T.A. Torode, S.E. Marcus, M. Jam, T. Tnon, R.S. Blackburn, C. Hervé, J.P. Knox, Monoclonal antibodies directed to fucoidan preparations from brown algae, *PLoS One* 10 (2015), e0118366, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0118366>.
- [17] F.C. Kupper, B. Kloareg, J. Guern, P. Potin, Oligoguluronates elicit an oxidative burst in the brown algal kelp *Laminaria digitata*, *Plant Physiol.* 125 (2001) 278–291, <https://doi.org/10.1104/pp.125.1.278>.
- [18] A. Tsirigoti, G. Beakes, C. Hervé, C.M. Gachon, C. Katsaros, Attachment, penetration and early host defense mechanisms during the infection of filamentous brown algae by *Eurychasma dicksonii*, *Protoplasma* 252 (2014) 845–856, <https://doi.org/10.1007/s00709-014-0721-1>.
- [19] E. Deniaud-Bouët, K. Hardouin, P. Potin, B. Kloareg, C. Hervé, A review about brown algal cell walls and fucose-containing sulfated polysaccharides: Cell wall context, biomedical properties and key research challenges, *Carbohydr. Polym.* 175 (2017) 395–408, <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.07.082>.
- [20] A. Oikawa, C.H. Lund, Y. Sakuragi, H.V. Scheller, Golgi-localized enzyme complexes for plant cell wall biosynthesis, *Trends Plant Sci.* 18 (2013) 49–58, <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2012.07.002>.
- [21] C. Reily, T.J. Stewart, M.B. Renfrow, J. Novak, Glycosylation in health and disease, *Nat. Rev. Nephrol.* 15 (2019) 346–366, <https://doi.org/10.1038/s41581-019-0129-4>.
- [22] N. Hoffmann, S. King, A.L. Samuels, H.E. McFarlane, Subcellular coordination of plant cell wall synthesis, *Dev. Cell* 56 (2021) 933–948, <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2021.03.004>.
- [23] C.M. West, D. Malzl, A. Hykollari, I.B.H. Wilson, Glycomics, glycoproteomics, and glycogenomics: an inter-taxa evolutionary perspective, *Mol. Cell Proteom.* 20 (2021), 100024, <https://doi.org/10.1074/mcp.R120.002263>.
- [24] J.M. Cock, L. Sterck, P. Rouze, D. Scornet, A.E. Allen, G. Amoutzias, V. Anthouard, F. Artiguenave, J.M. Aury, J.H. Badger, et al., The *Ectocarpus* genome and the independent evolution of multicellularity in brown algae, *Nature* 465 (2010) 617–621, <https://doi.org/10.1038/nature09016>.
- [25] A.E. Montecinos, L. Couceiro, A.F. Peters, A. Desrut, M. Valero, M.L. Guillemin, Species delimitation and phylogeographic analyses in the *Ectocarpus* subgroup *siliculosi* (Ectocarpales, Phaeophyceae), *J. Phycol.* 53 (2017) 17–31, <https://doi.org/10.1111/jpy.12452>.
- [26] G. Michel, T. Tnon, D. Scornet, J.M. Cock, B. Kloareg, The cell wall polysaccharide metabolism of the brown alga *Ectocarpus siliculosus*. Insights into the evolution of extracellular matrix polysaccharides in Eukaryotes, *N. Phytol.* 188 (2010) 82–97, <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03374.x>.
- [27] E. Deniaud-Bouët, N. Kervarec, G. Michel, T. Tnon, B. Kloareg, C. Hervé, Chemical and enzymatic fractionation of cell walls from Fuciales: insights into the structure of the extracellular matrix of brown algae, *Ann. Bot.* 114 (2014) 1203–1216, <https://doi.org/10.1093/aob/mcu096>.
- [28] C. Birkemeyer, V. Lemesheva, S. Billig, E. Tarakhovskaya, Composition of intracellular and cell wall-bound phlorotannin fractions in Fucoid algae indicates specific functions of these metabolites dependent on the chemical structure, *Metabolites* (2020) 10, <https://doi.org/10.3390/metabo10090369>.
- [29] R.S. Quatrano, P.T. Stevens, Cell wall assembly in *Fucus* zygotes: I. Characterization of the polysaccharide components, *Plant Physiol.* 58 (1976) 224–231, <https://doi.org/10.1104/pp.58.2.224>.
- [30] E.F. Verhaeghe, A. Fraysse, J.L. Guerquin-Kern, T.D. Wu, G. Deves, C. Mioskowski, C. Leblanc, R. Ortega, Y. Ambroise, P. Potin, Microchemical imaging of iodine distribution in the brown alga *Laminaria digitata* suggests a new mechanism for its accumulation, *J. Biol. Inorg. Chem.* 13 (2008) 257–269, <https://doi.org/10.1007/s00775-007-0319-6>.
- [31] N.M.A. Ponce, C.A. Stortz, A comprehensive and comparative analysis of the fucoidan compositional data across the Phaeophyceae, *Front. Plant Sci.* (2020) 11, <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.556312>.
- [32] B. Kloareg, R.S. Quatrano, Structure of the cell walls of marine algae and ecophysiological functions of the matrix polysaccharides, *Oceanogr. Mar. Biol. Annu. Rev.* 26 (1988) 259–315. ISSN 0078-3218.
- [33] R. Fischl, K. Bertelsen, F. Gaillard, S. Coelho, G. Michel, M. Klinger, C. Boyen, M. Czjzek, C. Hervé, The cell-wall active mannuronan C5-epimerases in the model brown alga *Ectocarpus*: From gene context to recombinant protein, *Glycobiology* 26 (2016) 973–983, <https://doi.org/10.1093/glycob/cwv040>.
- [34] O.A. Aarstad, A. Stanisci, G.I. Sætrom, A. Tøndervik, H. Sletta, F.L. Aachmann, G. Skjåk-Bræk, Biosynthesis and function of long guluronic acid-blocks in alginate produced by *Azotobacter vinelandii*, *Biomacromolecules* 20 (2019) 1613–1622, <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.8b01796>.
- [35] W. Mak, N. Hamid, T. Liu, J. Lu, W.L. White, Fucoidan from New Zealand *Undaria pinnatifida*: Monthly variations and determination of antioxidant activities, *Carbohydr. Polym.* 95 (2013) 606–614, <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.02.047>.
- [36] L.R. Andrade, R.N. Leal, M. Nosedá, M.E.R. Duarte, M.S. Pereira, P.A.S. Mourão, M. Farina, G.M. Amado Filho, Brown algae overproduce cell wall polysaccharides as a protection mechanism against the heavy metal toxicity, *Mar. Pollut. Bull.* 60 (2010) 1482–1488, <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2010.05.004>.
- [37] H.R. Fletcher, P. Biller, A.B. Ross, J.M.M. Adams, The seasonal variation of fucoidan within three species of brown macroalgae, *Algal Res.* 22 (2017) 79–86, <https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.10.015>.
- [38] L.M.L. Laurens, M. Lane, R.S. Nelson, Sustainable Seaweed Biotechnology Solutions for Carbon Capture, Composition, and Deconstruction, *Trends Biotechnol.* 38 (2020) 1232–1244, <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2020.03.015>.
- [39] A. Bruhn, T. Janicek, D. Manns, M.M. Nielsen, T.J.S. Balsby, A.S. Meyer, M. B. Rasmussen, X. Hou, B. Saake, C. Göke, et al., Crude fucoidan content in two North Atlantic kelp species, *Saccharina latissima* and *Laminaria digitata*—seasonal variation and impact of environmental factors, *J. Appl. Phycol.* (2017), <https://doi.org/10.1007/s10811-017-1204-5>.
- [40] L.V. Evans, M.S. Holligan, Correlated light and electron microscope studies on brown algae I. Localization of alginic acid and sulphated polysaccharides in *Dictyota*, *N. Phytol.* 71 (1972) 1161–1172, <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1972.tb01994.x>.
- [41] L.V. Evans, M. Simpson, M.E. Callow, Sulphated polysaccharide synthesis in brown algae, *Planta* 110 (1973) 237–252, <https://doi.org/10.1007/bf00387636>.
- [42] P. Mariani, C. Tolomio, P. Braghetta, An ultrastructural approach to the adaptive role of the cell wall in the intertidal alga *Fucus vesiculosus*, *Protoplasma* 128 (1985) 208–217, <https://doi.org/10.1007/bf01276343>.
- [43] M.E. Callow, S.J. Coughlan, L.V. Evans, The role of Golgi bodies in polysaccharide sulphation in *Fucus* zygotes, *J. Cell Sci.* 32 (1978) 337–356, <https://doi.org/10.1242/jcs.32.1.337>.
- [44] P. Mariani, C. Tolomio, B. Baldan, P. Braghetta, Cell wall ultrastructure and cation localization in some benthic marine algae, *Phycologia* 29 (1990) 253–262, <https://doi.org/10.2216/i0031-8884-29-2-253.1>.

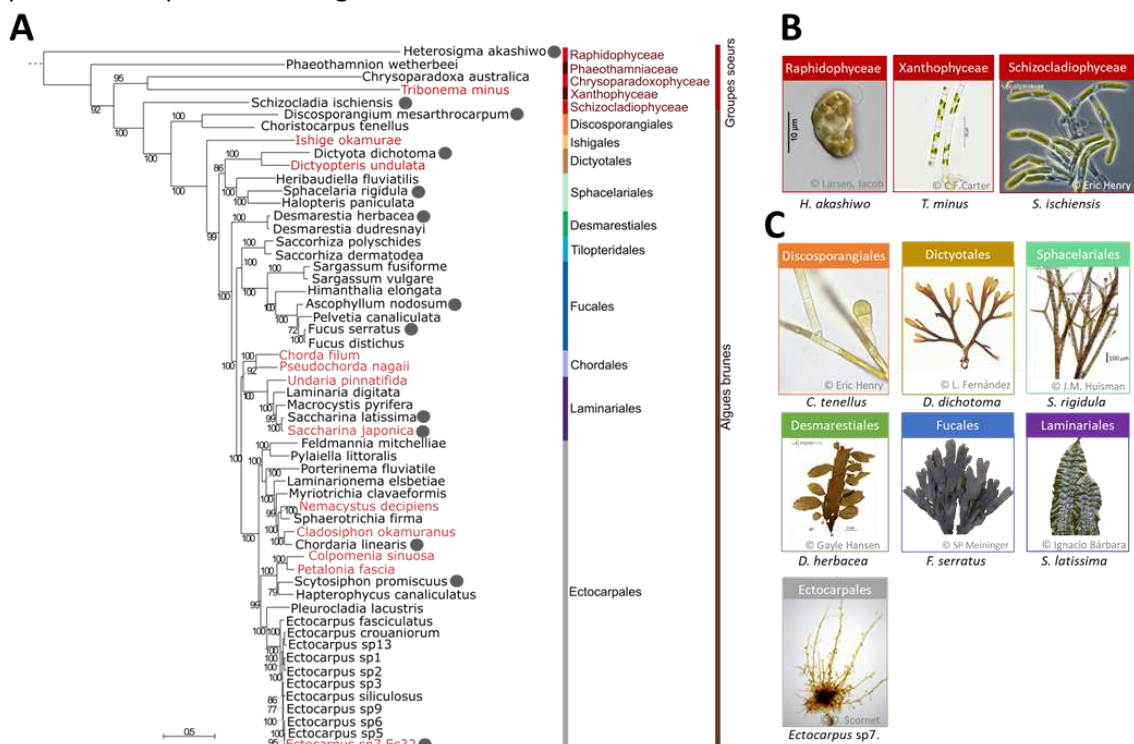
- [45] H. Xu, R.J.D.J. Deckert, D.J.G.J. Garbary, *Ascophyllum* and its symbionts. X. Ultrastructure of the interaction between *A. nodosum* (Phaeophyceae) and *Mycophycias ascophylli* (Ascomycetes), *Botany* 86 (2008) 185–193, <https://doi.org/10.1139/b07-122>.
- [46] D. Karyophyllis, C. Katsaros, B. Galatis, F-actin involvement in apical cell morphogenesis of *Sphacelaria rigidula* (Phaeophyceae): mutual alignment between cortical actin filaments and cellulose microfibrils, *Eur. J. Phycol.* 35 (2000) 195–203, <https://doi.org/10.1080/09670260010001735791>.
- [47] M. Terauchi, C. Nagasato, A. Inoue, T. Ito, T. Motomura, Distribution of alginate and cellulose and regulatory role of calcium in the cell wall of the brown alga *Ectocarpus siliculosus* (Ectocarpales, Phaeophyceae), *Planta* (2016) 361–377, <https://doi.org/10.1007/s00425-016-2516-4>.
- [48] R. Yonamine, K. Ichihara, S. Tsuyuzaki, C. Hervé, T. Motomura, C. Nagasato, Changes in cell wall structure during rhizoid formation of *Silvetia babingtonii* (Fucales, Phaeophyceae) Zygotes, *J. Phycol.* 57 (2021) 1356–1367, <https://doi.org/10.1111/jpy.13178>.
- [49] L. Halat, M.E. Galway, D.J. Garbary, Cell wall structural changes lead to separation and shedding of biofouled epidermal cell wall layers by the brown alga *Ascophyllum nodosum*, *Protoplasma* 257 (2020) 1319–1331, <https://doi.org/10.1007/s00709-020-01502-3>.
- [50] J.R. Green, C.J. Stafford, J.L. Jones, P.J. Wright, J.A. Callow, Binding of monoclonal antibodies to vegetative tissue and fucose-containing polysaccharides of *Fucus serratus* L. N. *Phycol.* 124 (1993) 397–408, <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1993.tb03830.x>.
- [51] V. Vreeland, Immunocytochemical localization of the extracellular polysaccharide alginic acid in the brown seaweed, *Fucus distichus*, *J. Histochem Cytochem* 20 (1972) 358–367, <https://doi.org/10.1177/20.5.358>.
- [52] E.-S. Chi, E.C. Henry, H. Kawai, K. Okuda, Immunogold-labeling analysis of alginate distributions in the cell walls of chromophyte algae, *Phycol. Res.* 47 (1999) 53–60, <https://doi.org/10.1046/j.1440-1835.1999.00151.x>.
- [53] T.A. Torode, A. Siméon, S.E. Marcus, M. Jam, M.-A. Le Moigne, D. Duffieux, J. P. Knox, C. Hervé, Dynamics of cell wall assembly during early embryogenesis in the brown alga *Fucus*, *J. Exp. Bot.* 67 (2016) 6089–6100, <https://doi.org/10.1093/jxb/erw369>.
- [54] C. Nagasato, N. Kajimura, M. Terauchi, Y. Mineyuki, T. Motomura, Electron microscopic analysis of cytokinesis in the brown alga *Silvetia babingtonii* (Fucales, Phaeophyceae), *Protoplasma* 251 (2014) 1347–1357, <https://doi.org/10.1007/s00709-014-0635-y>.
- [55] C. Nagasato, A. Inoue, M. Mizuno, K. Kanazawa, T. Ojima, K. Okuda, T. Motomura, Membrane fusion process and assembly of cell wall during cytokinesis in the brown alga, *Silvetia babingtonii* (Fucales, Phaeophyceae), *Planta* 232 (2010) 287–298, <https://doi.org/10.1007/s00425-010-1188-8>.
- [56] S. Bisgrove, D.L. Kropf, in: D. Verma, Z. Hong (Eds.), Asymmetric cell divisions: zygotes of fucoid algae as a model system. In *Cell Division Control in Plants*, Volume 9, (Springer Berlin / Heidelberg), 2008, pp. 323–341, [https://doi.org/10.1007/7089\\_2007\\_134](https://doi.org/10.1007/7089_2007_134).
- [57] M.E. Callow, L.V. Evans, Localization of sulphated polysaccharides by X-ray microanalysis in *Laminaria saccharina*, *Planta* 131 (1976) 155–157, <https://doi.org/10.1007/bf00389988>.
- [58] L.V. Evans, M.E. Callow, Polysaccharide sulphation in *Laminaria*, *Planta* 117 (1974) 93–95, <https://doi.org/10.1007/bf00388682>.
- [59] S. Coughlan, L.V. Evans, Isolation and characterization of Golgi bodies from vegetative tissue of the brown alga *Fucus serratus*, *J. Exp. Bot.* 29 (1978) 55–68, <http://www.jstor.org/stable/23689475>.
- [60] T.-Y. Lin, W.Z. Hassid, Pathway of alginic acid synthesis in the marine brown alga, *Fucus gardneri* Silva, *J. Biol. Chem.* 241 (1966) 5284–5297, [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)96429-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)96429-X).
- [61] S. Chi, T. Liu, X. Wang, R. Wang, S. Wang, G. Wang, G. Shan, C. Liu, Functional genomics analysis reveals the biosynthesis pathways of important cellular components (alginate and fucoidan) of *Saccharina*, *Curr. Genet.* 64 (2018) 259–273, <https://doi.org/10.1007/s00294-017-0733-4>.
- [62] K.M. Stiers, A.G. Muenks, L.J. Beamer, Chapter Eight - Biology, mechanism, and structure of enzymes in the  $\alpha$ -D-phosphoglucomutase superfamily. *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*, Volume 109, T. Karabencheva-Christova, ed. (Academic Press), 2017, pp. 265–304, <https://doi.org/10.1016/bs.apcsb.2017.04.005>.
- [63] P. Zhang, Z. Shao, L. Li, S. Liu, J. Yao, D. Duan, Molecular characterisation and biochemical properties of phosphomannomutase/phosphoglucomutase (PMM/PGM) in the brown seaweed *Saccharina japonica*, 2687-, *J. Appl. Phycol.* 30 (2018) 2687–2696, <https://doi.org/10.1007/s10811-018-1460-z>.
- [64] P.J. Tatnell, N.J. Russell, P. Gacesa, GDP-mannose dehydrogenase is the key regulatory enzyme in alginate biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*: evidence from metabolite studies, *Microbiology* 140 (1994) 1745–1754, <https://doi.org/10.1099/13500872-140-7-1745>.
- [65] J. Chen, S. Yang, Catalytic mechanism of UDP-glucose dehydrogenase, *Biochem. Soc. Trans.* 47 (2019) 945–955, <https://doi.org/10.1042/bst20190257>.
- [66] R. Tenhaken, E. Voglas, J.M. Cock, V. Neu, C.G. Huber, Characterization of GDP-mannose dehydrogenase from the brown alga *Ectocarpus siliculosus* providing the precursor for the alginate polymer, *J. Biol. Chem.* 286 (2011) 16707–16715, <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.230979>.
- [67] P. Zhang, Z. Shao, W. Jin, D. Duan, Comparative characterization of two GDP-mannose dehydrogenase genes from *Saccharina japonica* (Laminariales, Phaeophyceae), *BMC Plant Biol.* 16 (2016) 62, <https://doi.org/10.1186/s12870-016-0750-3>.
- [68] K. Nishitsuji, A. Arimoto, K. Iwai, Y. Sudo, K. Hisata, M. Fujie, N. Arakaki, T. Kushiro, T. Konishi, C. Shinzato, et al., A draft genome of the brown alga, *Cladosiphon okamuranus*, S-strain: a platform for future studies of ‘mozuku’ biology, *DNA Res.* 23 (2016) 561–570, <https://doi.org/10.1093/dnares/dsw039>.
- [69] K. Nishitsuji, A. Arimoto, Y. Higa, M. Mekaru, M. Kawamitsu, N. Satoh, E. Shoguchi, Draft genome of the brown alga, *Nemacystus decipiens*, Onna-1 strain: Fusion of genes involved in the sulfated fucan biosynthesis pathway, *Sci. Rep.* 9 (2019), <https://doi.org/10.1038/s41598-019-40955-2>.
- [70] A. Tøndervik, O.A. Aarstad, R. Aune, S. Maleki, P.D. Rye, A. Dessen, G. Skjåk-Bræk, H. Sletta, Exploiting mannuronan C-5 epimerases in commercial alginate production, *Mar. Drugs* 18 (2020) 565, <https://doi.org/10.3390/md18110565>.
- [71] A. Inoue, A. Satoh, M. Morishita, Y. Tokunaga, T. Miyakawa, M. Tanokura, T. Ojima, Functional heterologous expression and characterization of mannuronan C5-epimerase from the brown alga *Saccharina japonica*, *Algal Res.* 16 (2016) 282–291, <https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.03.030>.
- [72] M. Terauchi, T. Yamagishi, T. Hanyuda, H. Kawai, Genome-wide computational analysis of the secretome of brown algae (Phaeophyceae), *Mar. Genom.* 32 (2017) 49–59, <https://doi.org/10.1016/j.margen.2016.12.002>.
- [73] A. Inoue, T. Ojima, Functional identification of alginate lyase from the brown alga *Saccharina japonica*, *Sci. Rep.* 9 (2019) 4937, <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41351-6>.
- [74] A. Inoue, T. Ojima, Functional identification of the 4-deoxy-L-erythro-5-hexoseulose uronate reductase from a brown alga, *Saccharina japonica*, *Biochem Biophys. Res Commun.* 545 (2021) 112–118, <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2021.01.090>.
- [75] F. Thomas, L.C.E. Lundqvist, M. Jam, A. Jeudy, T. Barbeyron, C. Sandström, G. Michel, M. Czjzek, Comparative characterization of two marine alginate lyases from *Zobellia galactanivorans* reveals distinct modes of action and exquisite adaptation to their natural substrate, *J. Biol. Chem.* 288 (2013) 23021–23037, <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.467217>.
- [76] E. Drula, M.L. Garron, S. Dogan, V. Lombard, B. Henrissat, N. Terrapon, The carbohydrate-active enzyme database: functions and literature, *Nucleic Acids Res* 50 (2022) D571–d577, <https://doi.org/10.1093/nar/gkab1045>.
- [77] B. Pilgaard, M. Vuillemin, J. Holck, C. Wilkens, A.S. Meyer, Specificities and synergistic actions of novel PL8 and PL7 alginate lyases from the marine fungus *Parandryphiella salina*. *J Fungi*, Basel, 2021, p. 7, <https://doi.org/10.3390/jof7020080>.
- [78] M.M. Rahman, A. Inoue, H. Tanaka, T. Ojima, cDNA cloning of an alginate lyase from a marine gastropod *Aplysia kurodai* and assessment of catalytically important residues of this enzyme, *Biochimie* 93 (2011) 1720–1730, <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2011.06.004>.
- [79] W. Helbert, L. Poulet, S. Drouillard, S. Mathieu, M. Loiodice, M. Couturier, V. Lombard, N. Terrapon, J. Turchetto, R. Vincentelli, et al., Discovery of novel carbohydrate-active enzymes through the rational exploration of the protein sequences space, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 116 (2019) 6063–6068, <https://doi.org/10.1073/pnas.1815791116>.
- [80] S. Ji, S.R. Dix, A.A. Aziz, S.E. Sedelnikova, P.J. Baker, J.B. Rafferty, P.A. Bullough, S.B. Tzokov, J. Agirre, F.L. Li, et al., The molecular basis of endolytic activity of a multidomain alginate lyase from *Defluviitalea phaphyphila*, a representative of a new lyase family, PL39, *J. Biol. Chem.* 294 (2019) 18077–18091, <https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.010716>.
- [81] S.M. Dittami, E. Corre, L. Brillet-Guéguen, A.P. Lipinska, N. Pontoizeau, M. Aite, K. Avia, C. Caron, C.H. Cho, J. Collén, et al., The genome of *Ectocarpus subulatus* – A highly stress-tolerant brown alga, *Mar. Genom.* 52 (2020), 100740, <https://doi.org/10.1016/j.margen.2020.100740>.
- [82] T. Liu, X. Wang, G. Wang, S. Jia, G. Liu, G. Shan, S. Chi, J. Zhang, Y. Yu, T. Xue, et al., Evolution of complex thallus alga: genome sequencing of *Saccharina japonica*, *Front Genet* 10 (2019) 378, <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00378>.
- [83] N. Ye, X. Zhang, M. Miao, X. Fan, Y. Zheng, D. Xu, J. Wang, L. Zhou, D. Wang, Y. Gao, et al., *Saccharina* genomes provide novel insight into kelp biology, *Nat. Commun.* (2015) 6, <https://doi.org/10.1038/ncomms7986>.
- [84] G. Michel, T. Tonon, D. Scornet, J.M. Cock, B. Kloareg, Central and storage carbon metabolism of the brown alga *Ectocarpus siliculosus*: insights into the origin and evolution of storage carbohydrates in Eukaryotes, *N. Phytol.* 188 (2010) 67–81, <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03345.x>.
- [85] D.J. Rigney, X.M. Fernández, The 2022 Nucleic Acids Research database issue and the online molecular biology database collection, *Nucleic Acids Res.* 50 (2022) D1–D10, <https://doi.org/10.1093/nar/gkab1195>.
- [86] B. Henrissat, A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities, *Biochem J.* 280 (Pt 2) (1991) 309–316, <https://doi.org/10.1042/bj2800309>.
- [87] A.A. Salmeán, D. Duffieux, J. Harholt, F. Qin, G. Michel, M. Czjzek, W.G.T. Willats, C. Hervé, Insoluble (1 → 3), (1 → 4)- $\beta$ -D-glucan is a component of cell walls in brown algae (Phaeophyceae) and is masked by alginates in tissues, *Sci. Rep.* 7 (2017) 2880, <https://doi.org/10.1038/s41598-017-03081-5>.
- [88] C. Javaud, F. Dupuy, A. Maftah, R. Julien, J.M. Petit, The fucosyltransferase gene family: an amazing summary of the underlying mechanisms of gene evolution, *Genetica* 118 (2003) 157–170. PMID: 12868606.
- [89] S. Juliant, A. Harduin-Lepers, F. Monjaret, B. Catieau, M.L. Violet, P. Cérutti, A. Ozil, M. Duonor-Cérutti, The  $\alpha$ 1,6-fucosyltransferase gene (fut8) from the Sf9 lepidopteran insect cell line: insights into fut8 evolution, *PLoS One* 9 (2014), e110422, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0110422>.
- [90] M. Linardić, S.J. Cokus, M. Pellegrini, S.A. Braybrook, Growth of the *Fucus* embryo: insights into well-mediated cell expansion through mechanics and transcriptomics, 2021.2029, bioRxiv 2020 (2020), 925107, <https://doi.org/10.1101/2020.01.29.925107>.
- [91] R.K. Grewal, A.R. Shaikh, S. Gorle, M. Kaur, P.A. Videira, L. Cavallo, M. Chawla, Structural insights in mammalian sialyltransferases and fucosyltransferases: we

- have come a long way, but it is still a long way down, *Molecules* (2021) 26, <https://doi.org/10.3390/molecules26175203>.
- [92] B. Ma, J.L. Simala-Grant, D.E. Taylor, Fucosylation in prokaryotes and eukaryotes, *Glycobiology* 16 (2006) 158–184r, <https://doi.org/10.1093/glycob/cwl040>.
- [93] P. Rathor, T. Borza, S. Stone, T. Tonon, S. Yurgel, P. Potin, B. Prithiviraj, A novel protein from *Ectocarpus* sp. improves salinity and high temperature stress tolerance in *Arabidopsis thaliana*, *Int. J. Mol. Sci.* 22 (2021) 1971, <https://doi.org/10.3390/ijms22041971>.
- [94] M. Bäumgen, T. Dutschei, U.T. Bornscheuer, Marine polysaccharides: occurrence, enzymatic degradation and utilization, *ChemBioChem* 22 (2021) 2247–2256, <https://doi.org/10.1002/cbic.202100078>.
- [95] T. Barbeyron, L. Brillet-Guéguen, W. Carré, C. Carrière, C. Caron, M. Czjzek, M. Hoebeke, G. Michel, Matching the diversity of sulfated biomolecules: creation of a classification database for sulfatases reflecting their substrate specificity, *PloS One* 11 (2016), <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0164846>.
- [96] C. Lu, Z. Shao, P. Zhang, D. Duan, Genome-wide analysis of the *Saccharina japonica* sulfotransferase genes and their transcriptional profiles during whole developmental periods and under abiotic stresses, *BMC Plant Biol.* 20 (2020) 271, <https://doi.org/10.1186/s12870-020-02422-3>.
- [97] M.I. Bilan, A.A. Grachev, A.S. Shashkov, M. Kelly, C.J. Sanderson, N.E. Nifantiev, A.I. Usov, Further studies on the composition and structure of a fucoidan preparation from the brown alga *Saccharina latissima*, *Carbohydr. Res.* 345 (2010) 2038–2047, <https://doi.org/10.1016/j.carres.2010.07.009>.
- [98] Y. Badis, D. Scornet, M. Harada, C. Caillard, O. Godfroy, M. Raphalen, C.M. M. Gachon, S.M. Coelho, T. Motomura, C. Nagasato, et al., Targeted CRISPR-Cas9-based gene knockouts in the model brown alga *Ectocarpus*, *N. Phytol.* 231 (2021) 2077–2091, <https://doi.org/10.1111/nph.17525>.

**Chapitre II : Histoire évolutive des**  
**polysaccharides de la MEC chez les algues**  
**brunes**

## 1) Introduction

Ce chapitre est consacré à l'étude de l'histoire évolutive des polysaccharides de la MEC chez les algues brunes (Phaeophyceae). Avec d'une part, une étude générale des CAZymes en collaboration avec l'équipe CAZy (AFMB, Marseille), puis l'analyse spécifique des enzymes associées aux métabolismes des polysaccharides majoritaires de la MEC des algues brunes que sont les alginates et les FCSP qui regroupent les fucanes et les fucoïdanes, les différentes étapes sont présentées dans la Figure I.9 du Chapitre I (Introduction générale). Ces analyses sont menées dans un nombre important de génomes d'algues brunes séquencées dans le cadre du programme Phaeoexplorer (<https://phaeoexplorer.sb-roscoff.fr/home/>). Ce programme qui a vu le jour en 2016, est porté principalement par notre unité (UMR 8227) et vise à séquencer un nombre important de génomes d'algues brunes. Les phases d'extractions et de séquençage sont terminées, et la phase d'annotation est en voie de finalisation, pour une publication et une ouverture au public anticipée en 2024. L'accès aux séquences a été possible en 2021 pour les personnes participant à l'annotation et faisant partie du consortium. Ce programme vise à couvrir le maximum de diversité taxonomique au sein des Phaeophyceae, couvrant 40 génomes répartis dans 10 ordres. La classification phylogénétique des algues dont les génomes ont été séquencés durant ce programme ainsi que celles dont les génomes sont publics est représenté en Figure II.1.A.



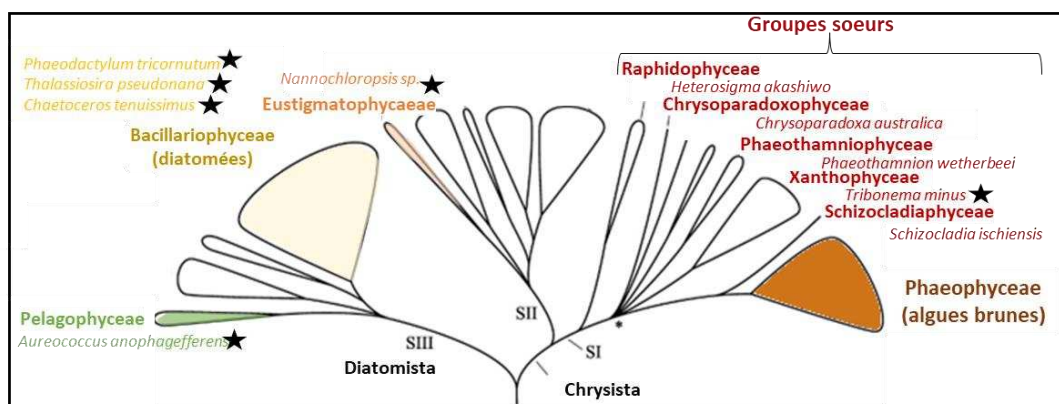
**Figure II. 1. Arbre phylogénétique des algues brunes et de leurs groupes sœurs et illustrations de la diversité de leurs morphologies.**A) Phylogénie réalisée à partir de 32 gènes pour les espèces du programme Phaeoexplorer (en noir) et des données publiques (rouges), les ordres associés aux



différentes espèces sont indiqués. Les points gris indiquent les génomes inclus dans l'analyse globale des CAZymes. En **B**) et **C**), sont présentés respectivement des photos pour des espèces : des groupes sœurs et de différents ordres des algues brunes.

En plus des génomes d'algues brunes, à notre disposition nous avons 4 nouveaux génomes séquencés dans le programme Phaeoexplorer et un génome public appartenant aux groupes sœurs : *Heterosigma akashiwo* (Raphidophyceae) qui est un organisme unicellulaire (Figure II.1.B), *Phaeothamnion wetherbeeii* (Phaeothamniophyceae) qui est une algue qui peut former des filaments, *Chryso paradoxa australica* (Chryso paradoxophyceae) qui est un organisme unicellulaire comportant une paroi avec plusieurs couches (Wetherbee et al., 2019), *Tribonema minus* (Xanthophyceae) (Figure II.1.B), qui est une microalgue filamenteuse et *Schizocladia ischiensis* (Schizocladiphyceae) (Figure II.1.B) qui est une algue filamenteuse de petite taille vivant dans un écosystème marin. *S. ischiensis* est la seule espèce qui compose l'ordre des Schizocladiales (classe des Schizocladiphyceae) qui constitue le groupe sœur le plus proche des Phaeophyceae (Phillips et al., 2020). Outre la présence de pigments de mêmes types que ceux trouvés chez les Phaeophyceae (chlorophylle a et c, et fucoxanthine) (Kawai et al., 2003), la MEC de *S. ischiensis* serait également composée d'alginate, en effet ceux-ci ont été détectés par immunomarquage (Chi et al., 1999 ; Kawai et al., 2003). En revanche, une différence majeure de ces organismes par rapport aux Phaeophyceae, est l'absence de plasmodesmes reliant les cellules (Kawai et al., 2003).

Concernant, les génomes de Phaeophyceae, ils couvrent une diversité d'ordres constitués d'algues ayant des morphologies différentes, allant d'algues filamenteuses telles que retrouvées chez les Ectocarpales ou les Sphacelariales (Figure II.1.C) à des organisations tissulaires plus complexes comme chez les Laminariales ou les Fucales (Figure II.1.C). En dehors des Phaeophyceae et des groupes que l'on qualifie de groupes sœurs, d'autres génomes d'Ochrophyta sont disponibles publiquement (Figure II.2), ils appartiennent aux Pelagophyceae, Bacillariophyceae ou encore Eustigmatophyceae. Ces génomes permettent d'avoir une perspective évolutive plus complète.



**Figure II. 2. Représentation de la phylogénie des Ochrophyta.** Les étoiles représentent les génomes publics en dehors de ceux des algues brunes (arbre tiré de Bringloe et al., 2020).

## 2) Matériel et Méthode

### Programme Phaeoexplorer

Le programme Phaeoexplorer (<https://phaeoexplorer.sb-roscoff.fr/>) est coordonné par Mark Cock de la Station Biologique de Roscoff et France Denoed de France. Les génomes d'algues brunes et de leurs groupes sœurs ont été séquencés soit part nanopore soit par Illumina.

### Annotations

Les annotations des CAZymes ont été réalisée en collaboration avec l'équipe CAZy qui est charge de la base de données CAZy. Le classement des CAZymes en famille au sein des différents groupes (GT, GH, PL, CE, AA, CBM) s'appuie sur des outils bioinformatiques de comparaison de séquences primaires : des profils HMM (*Hidden Markov models*) de chacune des familles et des alignements deux à deux contre les membres caractérisés. Les annotations sont curées et vérifiées manuellement, en particulier lorsque les niveaux de similarité sont faibles. L'annotation des sulfotransférases et sulfatases utilisent également des outils de comparaison deux à deux, ainsi que des modèles HMM qui leurs sont propres et générés dans l'équipe à partir de membres caractérisés (Barbeyron et al., 2016 ; Stam et al., 2023). Ils constituent notamment avec la curation manuelle en interne, la base de la mise en place des données publique SulfAtlas (<https://sulfatlas.sb-roscoff.fr>) pour l'annotation et la classification des sulfatases. Quant aux autres enzymes de la voie de biosynthèse des alginates et des FCSP, elles présentent une forte homologie entre elles et sont donc facilement identifiées et annotées à l'aide d'outils BLAST classiques.

### Alignements et analyses phylogénétiques

Au-delà des annotations propres, des séquences publiques ont également été intégrées dans les analyses. Il s'agit : de CAZymes issues de la banque de données CAZy et sulfotransférases préalablement identifiées en interne, des séquences identifiées par homologie de séquences à partir des bases de données UniProt ou NCBI (e.g. cas ManC5-E ou d'autres enzymes). Dans tous ces cas des séquences caractérisées biochimiquement ont été incorporées aux analyses lorsque cela était possible. Les alignements protéiques ont été réalisés avec le programme MAFFT (<https://mafft.cbrc.jp>), en utilisant une stratégie itérative (FFT-NS-i) et curés manuellement sous Jalview (<https://www.jalview.org>) pour ne garder que les sites informatifs. Les alignements multiples ont ensuite été analysés par l'approche du maximum de vraisemblance puis édités avec le logiciel MEGA11 avec les paramètres par défaut. La robustesse des arbres a été testée par une analyse bootstrap utilisant 100 rééchantillonnages pour toutes les phylogénies, excepté pour la phylogénie de la Figure

II.14. qui a été réalisée avec 1000 rééchantillonnages. Seules les valeurs supportant les nœuds au-delà de 60% sont indiquées.

Les alignements protéiques, avant curation, présentés dans le manuscrit, ont été édités avec le logiciel ESPripts 3.0 (Robert & Gouet, 2014).

#### **Cartes de chaleur basées sur le BLAST Score Ratio**

La construction des cartes de chaleur (ou *heatmaps* en anglais) basées sur le BLAST Score Ratio (BSR) est inspirée de l'article de Hobbs et al., (2022). Pour réaliser le calcul du BSR, une comparaison de toutes les paires de séquences d'intérêts deux à deux a été réalisée en utilisant l'outil BLASTp du NCBI. À partir des résultats de BLAST, nous calculons ensuite le BSR qui correspond au bitscore normalisé par rapport à la longueur de la protéine « query » (requête). Le bitscore est une mesure statistique qui évalue la similarité entre deux séquences. Plus le bitscore est élevé, plus la similitude entre les séquences est significative. Ce score ne dépend pas de la taille de la base de données. Ici la variable 'longueur de la séquence interrogée (query)' (requête) est prise en compte. Les cartes de chaleur et les dendrogrammes associés sont construits en utilisant la fonction `ggheatmap` du package `ggplot2` sous RStudio dans le but de créer une représentation visuelle des BSR entre les séquences d'intérêts.

#### **Modélisation structurale alphaFold2**

Le programme AlphaFold v2 (Jumper et al., 2021), basé sur une intelligence artificielle a été utilisé afin de prédire les structures 3D des protéines à partir de leurs structure primaire (séquences en acides aminés). Le programme PyMOL Molecular Graphics (Schrödinger & DeLano, 2020) a été utilisé pour analyser les modèles.

#### **Région synténique**

Les résultats concernant l'étude d'une région synthétique avec des gènes d'intérêt ont été réalisés par Agnieszka P. Lipinska, chercheuse à l'institut Max Planck de Tubingen (Allemagne) et membre du programme Phaeoexplorer. Les groupes d'orthologues contenant les gènes d'intérêt ont été extraits de l'analyse Orthofinder de Phaeoexplorer. Seules les espèces pour lesquelles les orthologues d'intérêt étaient situés sur le même chromosome ont été sélectionnées pour l'analyse de la synténie. L'analyse de la synténie a été réalisée à l'aide de McscanX (Tang et al., 2008) en suivant le pipeline décrit à l'adresse <https://github.com/tanghaibao/jcvi/wiki/Mcscan>. L'outil AGAT a été utilisé pour traiter les annotations de gènes (<https://github.com/NBISweden/AGAT>). L'outil LASTZ (C-score cutoff =0,7) a été utilisé pour déduire la synténie entre toutes les espèces.

### 3) Résultats et Discussion

#### 3.1) Le nombre de CAZymes varie peu entre les génomes d'algues brunes

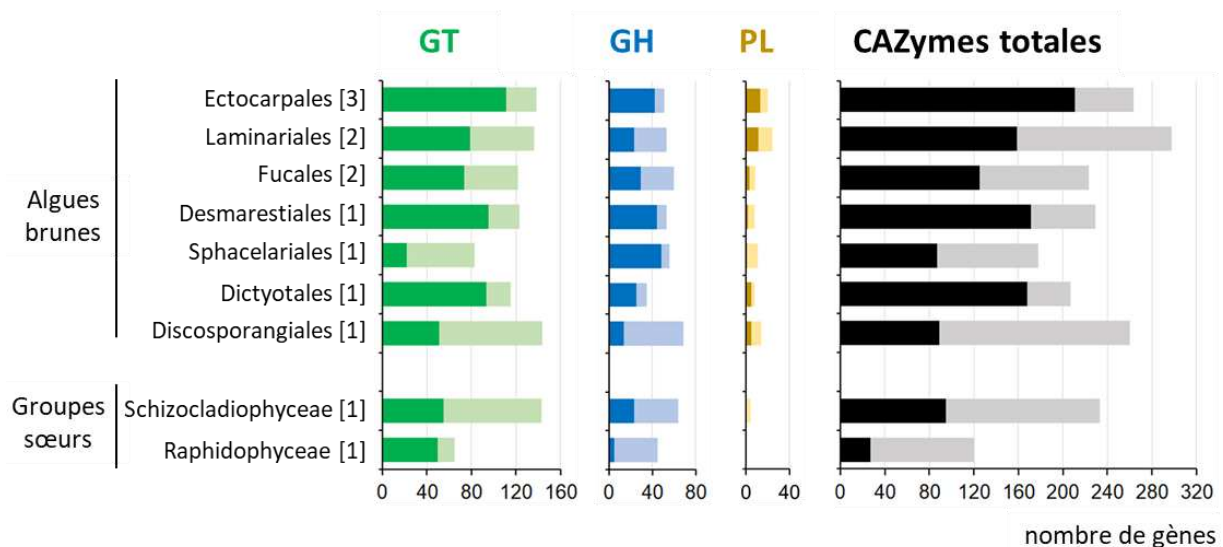
Le séquençage d'un grand nombre de génomes d'algues brunes et de leurs groupes sœurs permet d'avoir une vue d'ensemble des enzymes liés à la synthèse, à la dégradation, et à la modification des glucides. En particulier, nous nous intéressons ici au GT, GH, PL, AA, CE et CBM qui constituent les CAZymes. Ces classes d'enzymes sont composées de nombreuses familles (qui se distinguent par leurs similarités de séquences), certaines montrant une importante spécificité fonctionnelle, et ont des rôles essentiels dans les processus biologiques impliquant des oligosaccharides, polysaccharides et des glycoconjugués.

L'étude à cette échelle permet : 1) d'identifier les familles de CAZymes strictement conservées chez toutes les Phaeophyceae, 2) d'identifier de potentielles expansions de gènes dans certaines familles de CAZymes, et 3) d'identifier la présence potentielle enzymes non classées dans les familles actuelles de CAZymes spécifiquement associées aux algues brunes. Une grande partie des génomes séquencés appartiennent à l'ordre des Ectocarpales (20 génomes sur un total de 40). Par ailleurs, certains génomes sont de moins bonnes qualités en termes de prédiction de structure des gènes, ce qui a conduit à l'identification d'une part importante de gènes CAZy fragmentés suivant les génomes étudiés. Pour certains génomes, l'annotation a même dû être abandonnée car les gènes de CAZymes étaient de très mauvaises qualités (e.g. *Laminaria digitata*). De plus, pour certains génomes (e.g. *Pelvetia canaliculata*), nous avons constaté des familles de CAZymes présentant de fortes homologies avec des séquences bactériennes ou fongiques et absente des autres génomes d'algues brunes, ce qui traduirait une contamination par ces organismes.

Dans ce chapitre, et afin d'avoir une représentativité de la diversité phylogénétique des algues brunes dans nos analyses, nous avons essentiellement focalisé notre étude sur 14 génomes (*Ectocarpus* sp. 7, *Scytosiphon prosmicus*, *Chordaria linearis*, *Saccharina latissima*, *Saccharina japonica*, *Ascophyllum nodosum*, *Fucus serratus*, *Desmarestia herbacea*, *Sphacelaria rigidula*, *Dictyota dichotoma*, *Discosporangium mesarthrocarpum*, *Choristocarpus tenellus*) répartis équitablement sur 7 ordres de la classe des Phaeophyceae, et ayant une qualité de prédiction de gènes satisfaisante (Figure II.1.A). Les 7 ordres correspondent aux Ectocarpales, Laminariales, Fucales, Desmarestiales, Sphacelariales, Dictyotales et Discosporangiales. De plus, 2 classes des groupes sœurs (Schizocladiophyceae et Raphidophyceae) ont également été analysées. Par ailleurs, en 2023, l'équipe du Genoscope a amélioré l'annotation structurale de gènes de CAZymes. Bien que nous ne prévoyions pas de reprendre l'annotation experte des 40 génomes, cela nous permettra à terme d'améliorer notre

jeu de données, notamment sur les familles qui ont fait l'objet d'analyses phylogénétiques (analyses encore en cours, non incluses dans ce manuscrit).

Notre analyse indique que l'ensemble des CAZymes, en incluant les gènes fragmentés, représente  $237 \pm 32$  gènes en moyenne par génome pour les 7 ordres de Phaeophyceae. En termes de nombre total de CAZymes, il existe peu d'écart entre les différents ordres (Figure II.3). En ce qui concerne les groupes sœurs, pour l'unique génome des Schizocladiphyceae, nous référençons 233 gènes, ce qui est proche du nombre retrouvé chez les Phaeophyceae. Quant au génome de Raphidophyceae, le nombre total de CAZymes est de 120 gènes, ce qui est approximativement la moitié du nombre de CAZymes trouvées chez les Phaeophyceae. Le nombre moyen de familles associées à l'ensemble des CAZymes est de  $69 \pm 4$  familles chez les Phaeophyceae. Globalement, cela indique peu de duplication de gènes au sein de ces familles (en moyenne 3 gènes par famille). Cette conclusion, pour un nombre important de génomes provenant de différents ordres d'algues brunes, rejoint celle faite à partir du premier génome d'algue brune *Ectocarpus* sp. 7 par Michel et al., (2010b).



**Figure II. 3. Distribution des CAZymes chez les algues brunes et leurs groupes sœurs.** Le nombre de protéines prédites est indiqué pour les GT, GH, PL, CE, AA et CBM. Ces résultats proviennent d'un nombre limité de génomes, les chiffres encadrés indiquent le nombre d'espèces incluses dans le calcul pour les différents ordres. Les espèces incluses sont indiquées sur la Figure II.1.A Les couleurs foncées indiquent des protéines complètes et les couleurs claires les fragments.

Les nombres de gènes associés aux GT et aux GH sont du même ordre de grandeur entre les ordres de Phaeophyceae et également pour les Schizocladiphyceae (Figure II.3). Pour l'ordre des Raphidophyceae, la différence précédemment observée sur le nombre total de CAZymes, s'explique principalement par un nombre moindre de GT, le nombre de GH étant comparable à celui des Phaeophyceae. Cette différence pourrait venir du fait que ce génome provient d'un organisme

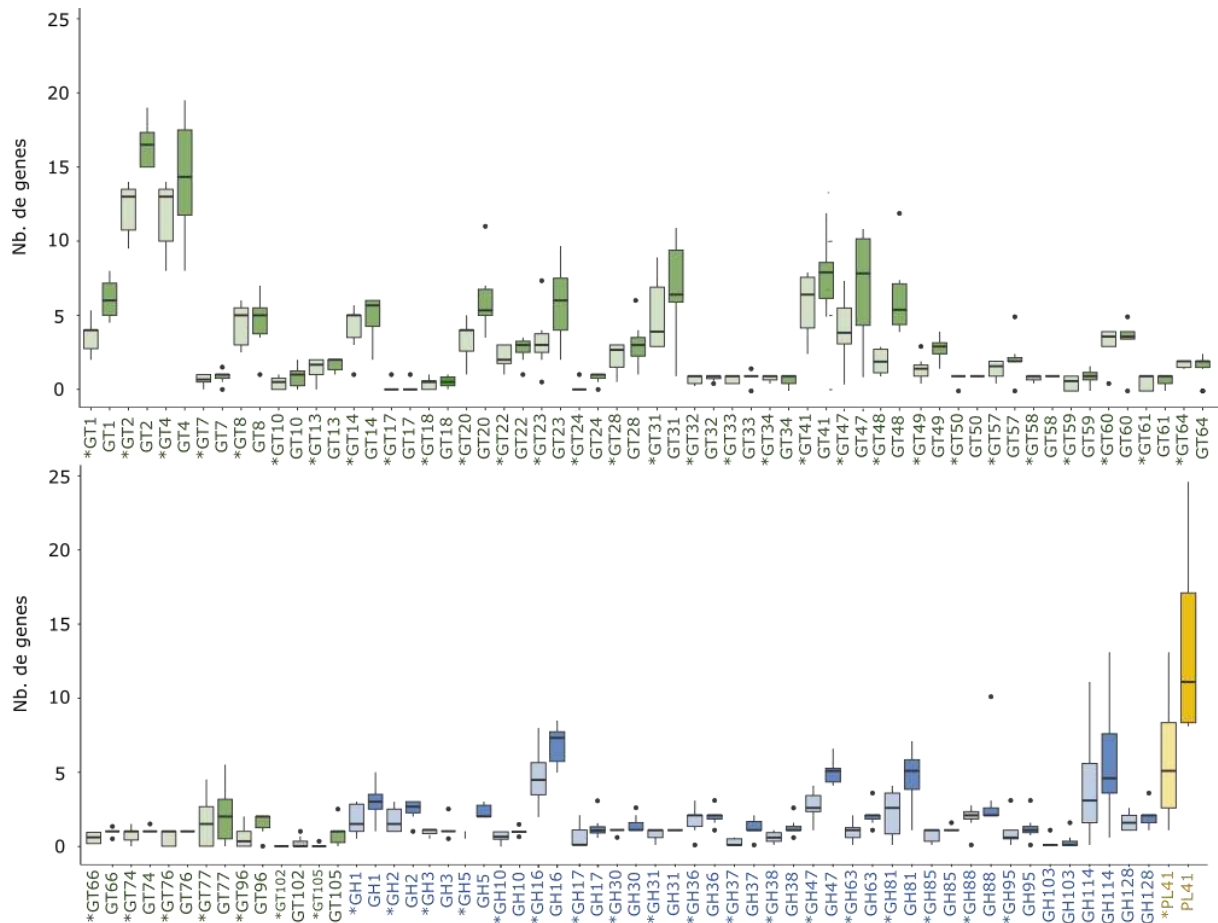
unicellulaire, et pourrait traduire la complexification de la MEC chez les Schizocladiphyceae et les Phaeophyceae avec des synthèses de polysaccharides plus abondants et complexes. En ce qui concerne les PL, elles sont présentes au sein des génomes des Phaeophyceae et de leur groupe sœur des Schizocladiphyceae ce qui semble constituer une innovation par rapport aux Raphidophyceae (Figure II.3).

L'unique famille de PL présente chez les Phaeophyceae est la famille PL41. Une enzyme de cette famille a été récemment caractérisée par son activité alginate lyase (Inoue & Ojima, 2019). Cette famille, créée à partir d'une séquence d'algue brune, s'est révélée fréquente dans ce groupe mais aussi retrouvées chez des bactéries (principalement des Actinomycetes et plus rarement des Alpha- et Gamma-Proteobacteria), des archées et un virus ([http://www.cazy.org/IMG/krona/PL41\\_krona.html](http://www.cazy.org/IMG/krona/PL41_krona.html)). L'histoire évolutive associée à cette famille chez les algues brunes est discutée dans la partie 3.3 de ce chapitre.

L'hypothèse qu'il existe un lien entre l'augmentation du nombre de CAZymes et la complexité tissulaire avait été émise sur la base de l'étude des génomes d'*Ectocarpus* sp. 7 et de *Saccharina japonica* (Liu et al., 2019). Les ordres auxquels appartiennent ces deux espèces sont constitués d'algues pouvant avoir différentes morphologies allant d'algues filamenteuses tel que trouvé chez les Ectocarpales, à des structures plus complexes incluant différents types cellulaires au niveau tissulaire tel que décrit chez les Laminariales (Bringloe et al., 2020). Après notre analyse experte des CAZymes de 4 génomes publics d'algues brunes appartenant à deux ordres seulement (Ectocarpales et Laminariales), nous avons montré que celle-ci n'était a priori pas corrélée à la complexité tissulaire (Mazéas et al., 2023). Le séquençage des génomes par Phaeoexplorer nous a permis de mener une étude plus exhaustive en incluant un nombre plus important d'ordres de Phaeophyceae répartis sur la phylogénie des algues brunes, dont les ordres les plus ancestraux. À nouveau, nous n'avons pas constaté de corrélation entre le nombre de CAZymes et la complexité tissulaire pour les différents ordres étudiés. De plus, le nombre de CAZymes est du même ordre de grandeur chez le groupe sœur des Schizocladiphyceae. La limite de ces observations étant la part des gènes prédits fragmentés par l'annotation structurale.

La répartition des différentes familles de GT, GH et PL au sein des génomes de Phaeophyceae a été étudié afin d'identifier de potentielles particularités propres à leur métabolisme (Figure II.4). Les 5 familles de GT les plus conséquentes en termes de nombre de gènes sont les GT4, GT2, GT47, GT41 et GT31 (Figure II.4). Les GT4 caractérisées des eucaryotes sont majoritairement impliquées dans la synthèse du sucrose (Zheng et al., 2011), et de glycolipides (Dörmann et al., 1999 ; Y et al., 2005). En ce qui concerne les GT2 et les GT47, ce sont aussi des familles importantes chez les plantes et les

métazoaires, elles ont des rôles liés à la synthèse de la paroi et de la MEC. En effet, chez les plantes, la famille GT2 est essentielle à la synthèse de la paroi, elle contient les cellulose-synthases (Stone et al., 2010) et beaucoup d'autres activités.



**Figure II. 4. Distribution des CAZymes chez les Phaeophyceae et leurs groupes sœurs.** Nombre de gènes par famille de CAZymes chez les Phaeophyceae. Les espèces incluses dans les analyses sont les mêmes que celles montrées sur la Figure II.3. Les familles marquées d'une étoile indiquent le comptage des gènes complets uniquement et les autres dénombrements incluent à la fois les protéines complètes et les fragments.

Quant à la famille GT47, elles sont impliquées dans la synthèse des glycosaminoglycans des métazoaires et ont de nombreuses activités pour la synthèse de polysaccharides de paroi des plantes (par exemple xyloglucane, xylane, mannane et pectines) (Zhang et al., 2023). Concernant la famille GT31, elle est également une famille importante chez les autres eucaryotes (par exemple 26 gènes chez *Homo sapiens* et 33 gènes chez *Arabidopsis thaliana*) et elle est associée à de nombreuses activités, les principales référencées étant des  $\beta$ 1,3-galactosyltransferase et  $\beta$ 1,3-N-acetylglucosaminyltransferase agissant sur des glycoprotéines et des glycolipides, elles sont notamment impliquées dans la synthèse des arabinoglycans chez les plantes (Narciso et al., 2021). Contrairement aux autres familles précédemment citées, la famille GT41 est assez peu représentée

dans les autres lignées eucaryotiques avec en moyenne 1 gène par génome chez les champignons et les métazoaires, et 3 gènes par génome chez les plantes terrestres pour les génomes référencés dans la base de données CAZy. La moyenne chez les algues brunes est de 8 gènes de GT41 par génome. L'extension de cette famille peut souligner son implication dans un métabolisme propre aux algues brunes. Nous discuterons de cette famille en détails dans la partie 3.2 de ce chapitre.

La présence d'autres familles peut être soulignée comme la famille GT60 ( $\alpha$ -N-acetylglucosaminyltransférase) qui est absente chez les plantes terrestres, les métazoaires et les champignons, et présente dans la plupart des génomes d'algues brunes (3 gènes en moyenne par génome). Cette famille est aussi fréquemment retrouvée chez d'autres ochrophytes, chez des oomycètes, des amibes et des algues vertes (Mazéas et al., 2023 ; Michel et al., 2010b). De même, la famille des GT74 (en tandem avec une GT2) est absente des plantes terrestres, des métazoaires, mais présente chez les Straménopiles, les Alveolata et les amibes. Les domaines GT74 et GT2 ont, respectivement une activité  $\alpha$ -(1-2)-fucosyltransférase et  $\beta$ -(1-3)-galactosyltransférase et agissent sur une protéine cytoplasmique chez l'amibe *Dictyostelium discoideum* HW120 (Teng-umnuay et al., 1998 ; van Der Wel et al., 2001). Un rôle similaire pourrait être envisagé chez les algues brunes. La famille GT74 sera discutée dans la partie 3.2.2.

La famille GT23 a également une distribution particulière chez les Phaeophyceae par rapport aux autres eucaryotes, en effet aucun membre n'est retrouvé chez les plantes terrestres et les champignons. Chez les métazoaires, 3 gènes sont référencés en moyenne par génome contre 6 chez les Phaeophyceae (Figure II.4). L'extension de cette famille, par rapport aux autres eucaryotes, couplée au fait qu'elle possède un nombre supérieur de gènes par rapport aux autres familles de GT, peut indiquer son implication dans un métabolisme propre aux Phaeophyceae. Nous reparlerons en détail de cette famille dans la partie 3.2.2.

Concernant les familles de GH, les plus conséquentes en termes de nombre de gènes chez les algues brunes sont les GH16, GH81, GH47 et GH114 (Figure II.4). Dans les familles GH16 et GH81, sont référencés des activités  $\beta$ -1,3-glucanases, elles pourraient donc être impliquées dans le métabolisme de la laminarine, le polysaccharide de stockage chez les Phaeophyceae. Les GH16 constitue une famille importante également chez d'autres eucaryotes, avec un large panel d'activités associées (Viborg et al., 2019). Les sous-familles GH16\_3 et GH16\_4 sont principalement représentées parmi les GH16 de Phaeophyceae ainsi que les GH16\_2 pour laquelle aucune activité n'est référencée dans la base de données CAZy. Quant au GH81, elles ont des représentants chez les champignons, les plantes terrestres, les oomycètes et les bactéries avec en moyenne respectivement 1,5 ; 3 ; 7 et 1 membre par



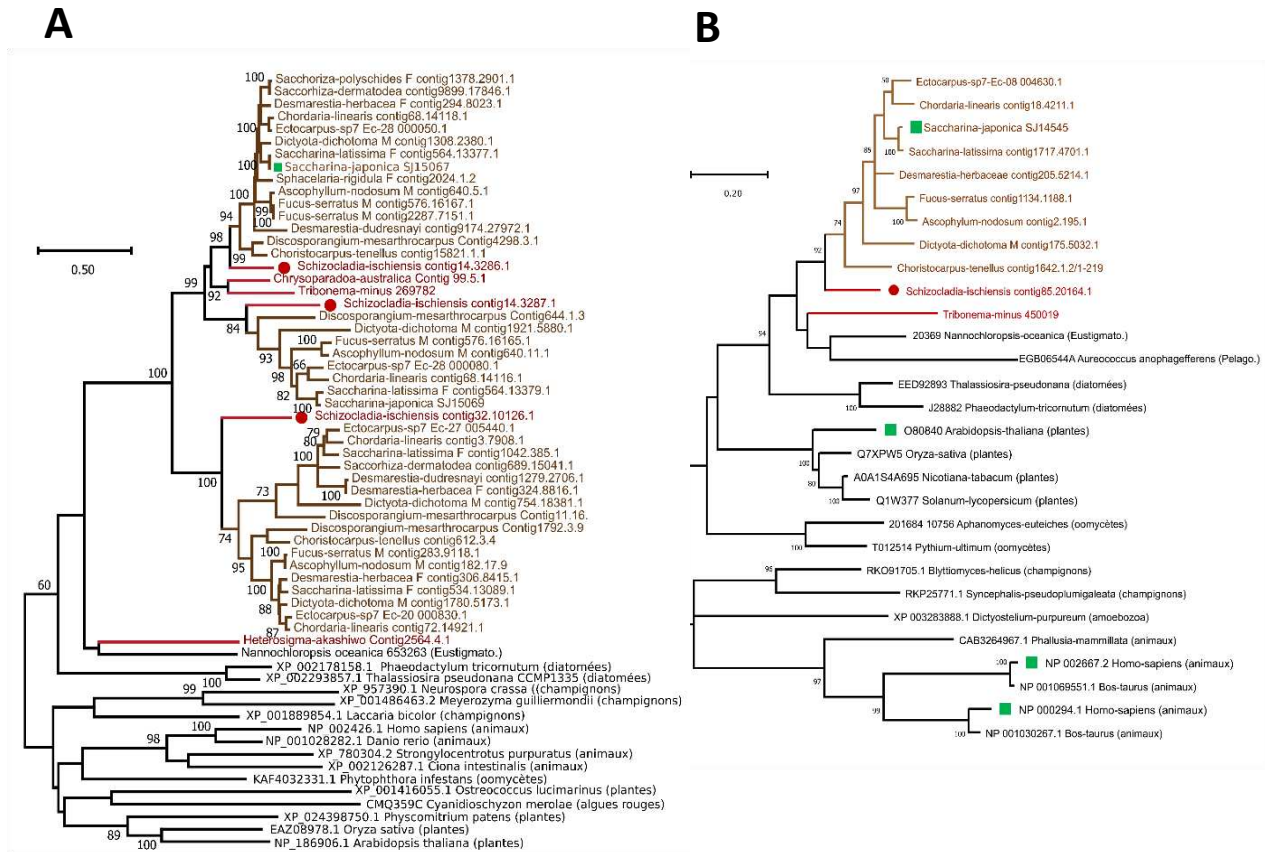
génomique. La famille GH47 est également une famille importante en termes de nombre de gènes chez les Phaeophyceae (Figure II.4), dans la base de données CAZy l'activité qui lui est associée est une activité  $\alpha$ -mannosidase pour des séquences de plantes, métazoaires, champignons et bactéries. Concernant la famille des GH114, elle est assez peu représentée chez les eucaryotes, en effet, elle est absente des génomes de métazoaires et de plantes terrestres, elles sont présentes dans des génomes bactériens et de champignons, la seule activité référencée dans cette famille est une activité endo- $\alpha$ -1,4-polygalactosaminidase. Il est difficile d'identifier des activités associées au métabolisme chez les algues brunes pour ces enzymes. Concernant les PL41, c'est une famille multigénique dont nous discuterons de l'histoire évolutive dans la partie 3.3.

### 3.2) Exploration des gènes candidats pour la synthèse des fucanes

Nous analysons ici l'histoire évolutive associée aux différentes enzymes de la voie de biosynthèse des fucanes. Pour cela, nous avons mené principalement des analyses phylogénétiques à partir des séquences protéiques associées aux enzymes impliquées dans le métabolisme des fucanes.

#### 3.2.1) Gènes impliqués dans la synthèse des précurseurs

Des analyses sur les enzymes impliquées dans la synthèse des précurseurs sont menées sur un plus grand nombre de génomes d'algues brunes afin de confirmer que les hypothèses, initialement faites par Michel et al., (2010b) étaient correctes. La première étape de la synthèse du GDP-Mannose est la production de mannose-6-phosphate à partir de fructose-6-phosphate par une MPI qui a aussi une activité mannose-1-phosphate gulynyltransférase (MPG) permettant la synthèse du GDP-mannose (Chi et al., 2018). Nous confirmons ici, comme indiqué précédemment (Chi et al., 2018 ; Michel et al., 2010b), l'origine eucaryotique des gènes MPI/MPG (Figure II.5.A). En revanche, nous pouvons constater que les séquences des Phaeophyceae, de leurs groupes sœurs et des diatomées forment un large groupe distinct des autres eucaryotes. Au sein de ce groupe, les séquences d'algues brunes appartiennent à différents clades, qui contiennent toutes des représentants chez leurs groupes sœurs, a minima chez *S. ischiensis*. Chez les Phaeophyceae, un événement additionnel de duplication, par rapport aux groupes sœurs, se serait produit (Figure II.5.A).

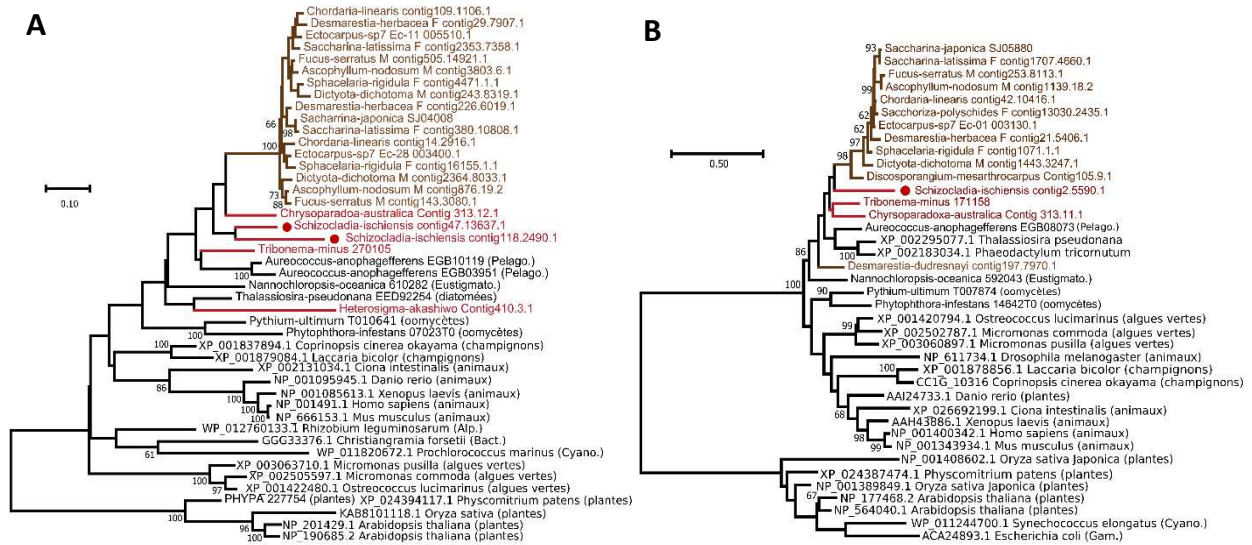


**Figure II. 5. Arbres phylogénétiques des enzymes clés des premières étapes de la synthèse des fucanes et de l'alginate. A) Mannose-6-phosphate isomérases (MPI) et B) phosphomannomutases (PMM).** Les séquences des Phaeophyceae sont indiquées en marron. Les séquences appartenant aux groupes sœurs des algues brunes sont indiquées en rouge. Les ronds rouges indiquent les séquences du groupe sœur Schizocladiophyceae. Les carrés verts indiquent les enzymes caractérisées biochimiquement. Eustigmatophyceae, Eustigmatophyceae, Pelagophyceae.

L'étape intermédiaire de synthèse est réalisée par une PMM/PGM (Chi et al., 2018 ; Zhang et al., 2018). Cette enzyme tout comme les MPI/MPG aurait une origine eucaryotique (Figure II.5.B). À noter que la protéine identifiée et caractérisée par Chi et al., (2018) appartient à une famille d'enzymes différente que celle auparavant identifiée par Michel et al., (2010b). La séquence précédemment identifiée chez *Ectocarpus* sp. 7, bien que prédite comme 'phosphohexose mutase' n'a pas d'homologue caractérisée.

Concernant, les enzymes de synthèse du GDP-fucose, comme les analyses précédentes (Chi et al., 2018 ; Michel et al., 2010b), nous concluons que les GM46D et GFS aurait une origine eucaryotique ancienne. Les GM46D possèdent des homologues chez les autres groupes d'ochrophytes, oomycètes ainsi que les animaux, champignons, algues vertes, plantes (Figure II.6.A). Elle comporte deux représentants par génome pour la plupart des algues brunes. Concernant la GDP-fucose synthase (GFS), elle possède des homologues dans les groupes sœurs, diatomées, algues vertes et animaux, la

phylogénie de cette enzyme suit l'évolution des algues brunes, avec un représentant dans la plupart des génomes (Figure II.6.B).



**Figure II. 6. Arbres phylogénétiques des enzymes clés de la synthèse du GDP-fucose par la voie *de novo*. A) GDP-mannose 4,6-déhydratases (GM46D) et B) GDP-L-fucose synthases (GFS).** Les séquences des Phaeophyceae sont indiquées en marron. Les séquences appartenant aux groupes sœurs des algues brunes sont indiquées en rouge. Les ronds rouges indiquent les séquences du groupe sœur Schizocladiophyceae. Bact. Bacteroidota (bactéries), Cyano. cyanobactéries, Alp. alphaprotéobactéries, Eustigmat. Eustigmatophyceae, Pelago. Pelagophyceae.

Comme indiqué dans l'introduction générale (Chapitre I), il existe probablement une voie alternative pour la synthèse du GDP-fucose chez les algues brunes impliquant une L-FK et une GFPP. Les gènes de cette voie ont précédemment été identifiés dans le génome d'*Ectocarpus* sp. 7 (Michel et al., 2010b), puis Nishitsuji et al., (2019) ont montré que ces deux gènes étaient probablement fusionnés pour former une enzyme bifonctionnelle chez les Ectocarpales *Nemacystus decipiens* et *Cladophoron okamuranus*. Nous avons pu observer cette fusion de gènes dans d'autres génomes de Phaeophyceae, et notamment chez les Discosporangiales, qui est le groupe le plus basal d'algues brunes étudié ici. Par ailleurs, le gène fusionné ainsi que les deux gènes indépendants ne sont pas retrouvés chez le groupe sœur des Schizocladiophyceae. La fusion des L-FK et GFPP serait donc présent chez l'ancêtre commun des Phaeophyceae. Des homologues aux gènes L-FK et GFPP sont présents chez le groupe des Chrysoparadoxophyceae, Xanthophyceae, diatomée mais aussi chez les animaux et les plantes. Nishitsuji et al., (2019) ont identifié une région synténique en amont et aval de ce gène. Nous reviendrons sur cette région synténique dans la partie 3.2.3 de ce chapitre.

### 3.2.2) Fucosyltransférases potentiellement impliquées dans la synthèse du squelette fucane

Dans un premier temps, nous avons étudié les fucosyltransférases candidates pour la synthèse des fucanes au vu des activités fucosyltransférases (FucT) référencées dans la base de données CAZy en se basant sur l'analyse de 4 génomes publics des algues brunes appartenant aux ordres des Ectocarpales et Laminariales (Tableau II.1). Les familles identifiées sont les GT10, GT41 et GT23.

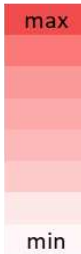
**Tableau II. 1. Nombre de gènes de fucosyltransférases putatives chez 4 génomes d'algues brunes.** Le tableau référence l'ensemble des familles de GT connues pour héberger des activités fucosyltransférases dans CAZy. Les chiffres en gras indiquent le nombre de gènes pleines longueurs identifiés dans ces familles chez les 4 algues brunes, les nombres entre crochets indiquent le nombre total de gènes incluant les gènes fragmentés.

Base de données CAZy		Nombre de gènes candidats chez les algues brunes			
Famille de GT	Activité de FucT connu dans CAZy	<i>Ectocarpus sp. Ec32</i>	<i>N. decipiens</i>	<i>C. okamuranus</i>	<i>S. japonica</i>
GT37	$\alpha$ -1,2-FucT	-	-	-	-
GT74	$\alpha$ -1,2-FucT	-	-	-	-
GT11	$\alpha$ -1,2/3-FucT	-	-	-	-
GT10	$\alpha$ -1,3/4-FucT	<b>1</b> [1]	<b>1</b> [1]	<b>1</b> [1]	<b>1</b> [2]
GT23	$\alpha$ -1,6-FucT	<b>2</b> [7]	<b>2</b> [5]	<b>6</b> [10]	<b>2</b> [9]
GT41	protéine O-FucT	<b>4</b> [10]	<b>6</b> [14]	<b>9</b> [15]	<b>2</b> [9]
GT65	protéine O-FucT	-	-	-	-
GT68	protéine O-FucT	-	-	-	-

Dans un second temps, nous avons approfondi l'analyse de ces familles au sein d'un nombre plus important de génomes et d'ordres de Phaeophyceae, en incluant des études phylogénétiques associées à ces familles. Nous intégrons ici la famille GT74, qui est généralement placée en tandem avec un GT2, qui n'avait pas été précédemment identifiée comme famille candidate, cependant cette famille est présente dans la plupart des génomes analysés (Tableau II.2).

**Tableau II. 2. Nombre de gènes de fucosyltransférases putatives chez les Phaeophyceae et leurs groupes sœurs.** La moyenne est réalisée pour les mêmes génomes qu'inclus dans l'analyse globale des CAZymes (Figure II.3). Les chiffres entre parenthèses après les ordres indiquent le nombre d'espèces incluses dans le calcul. Les chiffres en gras indiquent le nombre des gènes pleines longueurs, les nombres entre crochets indiquent le nombre total de gènes incluant les gènes fragmentés.

	GT10	GT23	GT41	GT74
<b>Ectocarpales (3)</b>	1 [1]	7 [10]	7 [9]	0 [1]
<b>Laminariales (2)</b>	1 [2]	2 [8]	3 [7]	0 [1]
<b>Fucales (2)</b>	1 [2]	4 [8]	7 [8]	2 [2]
<b>Desmarestiales(1)</b>	0 [1]	3 [5]	8 [8]	1 [1]
<b>Sphacelariales (1)</b>	0	0 [3]	2 [5]	0 [1]
<b>Dictyotales (1)</b>	0	4 [6]	6 [6]	0 [1]
<b>Discosporangiales(2)</b>	1 [1]	1 [2]	3 [12]	1 [1]
<b>Schizocladiphyceae (1)</b>	0 [1]	1 [5]	4 [12]	0 [0]
<b>Chrysoparadoxa (1)</b>	1 [1]	0 [0]	5 [9]	1 [1]
<b>Raphidophyceae (1)</b>	0 [3]	0 [0]	2 [5]	0 [0]

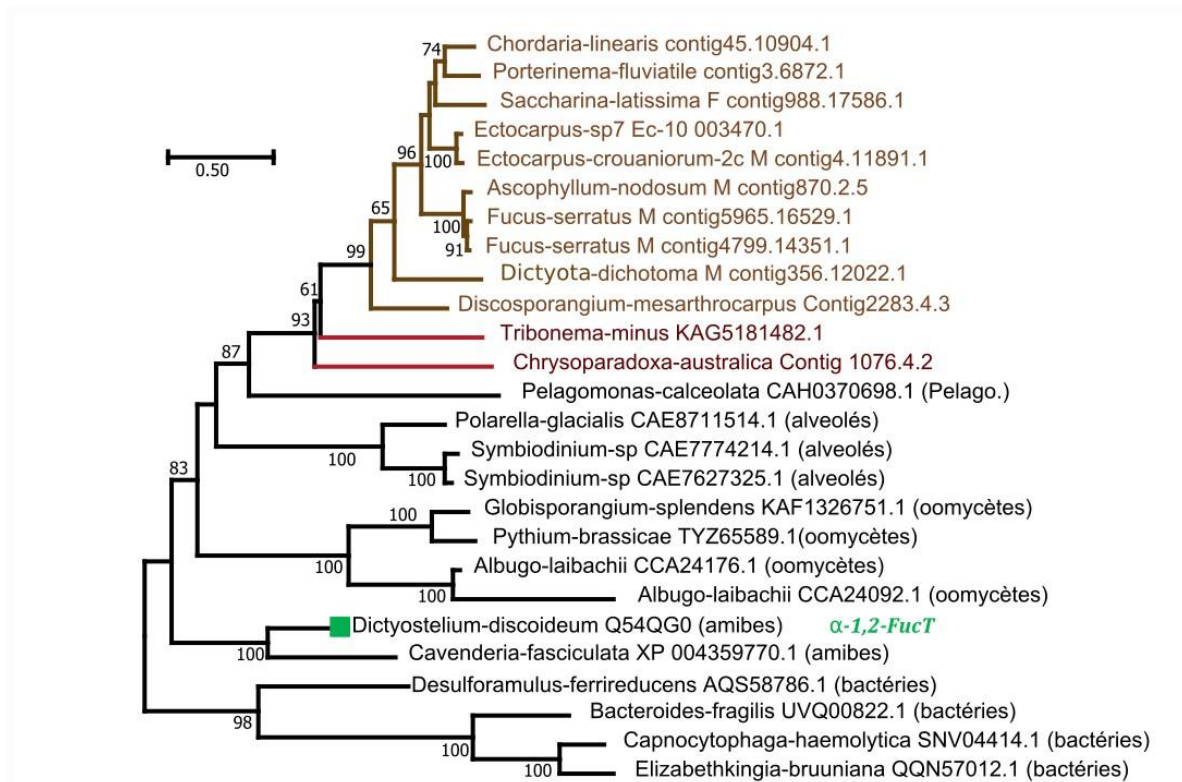


**Les glycosyltransférases GT74 ne semblent pas impliquées dans la synthèse des fucanes**

Une activité  $\alpha$ -(1-2) FucT a été décrite pour une GT74 chez l'amibe *Dictyostelium* (van Der Wel et al., 2001). La GT74 caractérisée appartient à une protéine bimodulaire, l'autre module étant une GT2 qui a une activité  $\beta$ -(1-3) galactosyltransférase. Cette enzyme participe à la glycosylation de la protéine Skp 1 (kinase de la phase S) dans le cytoplasme. En dehors des algues brunes et des amibes, cette famille est retrouvée dans un nombre restreint d'organismes. Elle a été identifiée chez d'autres Straménopiles, chez des alvéolés ainsi que dans des génomes bactériens. La bi-modularité avec une GT2 est retrouvée pour les séquences d'algues brunes ainsi que pour les autres Straménopiles et alvéolés et certaines séquences bactériennes.

Dans les génomes de Phaeophyceae, nous avons identifié en moyenne un gène de GT74 par génome, c'est également le cas pour les groupes sœurs appartenant aux classes des Xanthophyceae et des Chrysoparadoxophyceae (Tableau II.2). La phylogénie montre que les séquences d'algues brunes forment un groupe auquel sont apparentées les séquences de leurs groupes sœurs ancestraux (Figure 7). Cette phylogénie nous indique que les GT74 étaient présentes chez l'ancêtre commun des Straménopiles et des alvéolés. En revanche, ce gène n'aurait pas été conservé dans l'ensemble du phylum des Ochrophyta (par exemple absente chez les diatomées). Par ailleurs, en dehors de

Phaeophyceae, les organismes possédant une GT74, ne sont pas connus pour produire des fucanes ou fucoïdanes.



**Figure II. 7. Arbre phylogénétique de la famille GT74.** Les séquences de Phaeophyceae sont indiquées en marrons. Les séquences appartenant aux groupes sœurs des algues brunes sont indiquées en rouge. Des séquences d'autres Straménopiles sont également présentes (diatomées, Pelagophyceae, oomycètes). Le carré vert indique une séquence caractérisée biochimiquement. Eustigmato. Eustigmatophyceae, Pelago. Pelagophyceae.

Pour conclure, il semble peu probable que les GT74-GT2 soient impliquées dans la synthèse de fucanes. L'implication de cette protéine chez les algues brunes dans la glycosylation de protéines cytoplasmique est possible. À ce stade, les GT74 ne sont pas des candidates privilégiées pour la synthèse de fucanes chez les algues brunes.

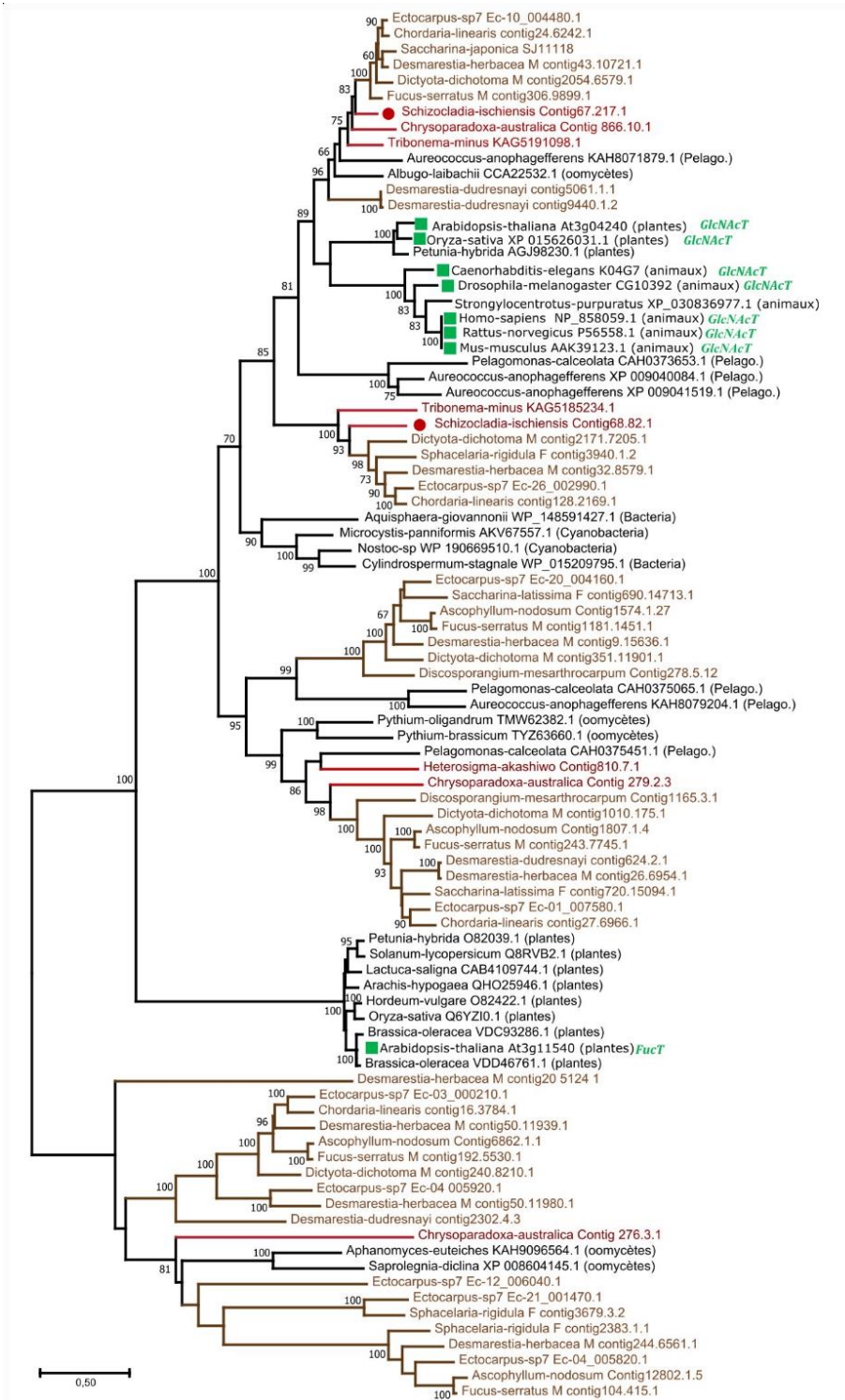
## Des activités difficiles à prédire pour les GT41

Les GT41 n'avaient pas été identifiées comme possibles candidates pour la synthèse de fucanes avant la parution de l'article de revue (Mazéas et al., 2023). Cette famille comporte des GT ayant une activité FucT, ce sont des activités de O-fucosylation, c'est-à-dire qu'elles catalysent le transfert d'un GDP-fucose sur un groupement hydroxyle d'une serine ou thréonine d'une protéine. Les homologues caractérisés des O-FucT sont présents chez les protistes, les plantes terrestres et les algues vertes. L'activité FucT n'est pas la seule activité référencée dans cette famille, on trouve également une activité  $\beta$ -N-acétylglucosaminyltransférase (GlcNAcT). Les enzymes portant une activité GlcNAcT sont retrouvées chez les protistes, les animaux, les plantes terrestres, les algues vertes et les bactéries.

Chez les Phaeophyceae, nous avons constaté une extension de cette famille avec en moyenne 8 gènes par génome (Table II.2). Un nombre de gènes important est aussi observé dans les groupes sœurs avec 12 et 5 gènes par génome respectivement chez les Schizocladiphyceae et Raphidophyceae. La phylogénie réalisée montre que certaines séquences de Phaeophyceae sont plus proches des séquences de métazoaires et de plantes identifiées comme GlcNAcT (Figure II.8).

On observe un clade additionnel plus proche du clade GlcNAcT, ce clade a été appelé clade 'intermédiaire' par (Kumar et al., 2023). En revanche, aucune séquence de Phaeophyceae n'est présente dans le clade comportant la seule séquence caractérisée comme une O-FucT (Figure II.8). Ce clade n'est constitué ici que de séquences de plantes. Il est à noter que d'autres séquences sont incluses dans ce clade, elles proviennent d'autres organismes des Archaeplastida, de protiste et de Bactéries (Kumar et al., 2023). Enfin, un quatrième clade contenant des séquences de Phaeophyceae, mais aussi d'autres ochrophytes et oomycètes se distingue des clades précédant. Les séquences de ce clade additionnel pourraient être impliquées dans un métabolisme propre aux Straménopiles, ce qui laisse place à de potentielles nouvelles activités non décrites.

L'histoire évolutive des GT41 d'algues brunes serait indépendante de celle associée aux séquences de plantes ayant des activités FucT sur des protéines. Au cours de l'évolution, ces protéines ont pu évoluer vers l'acquisition d'une activité FucT chez les plantes, cela pourrait être le cas pour d'autres membres de cette famille. Par ailleurs, les séquences distantes de celles caractérisées forment un clade avec des séquences d'autres Straménopiles, or aucun fucanes n'ont été décrits en dehors des algues brunes ce qui rend la synthèse des fucanes par ces enzymes peu probables.



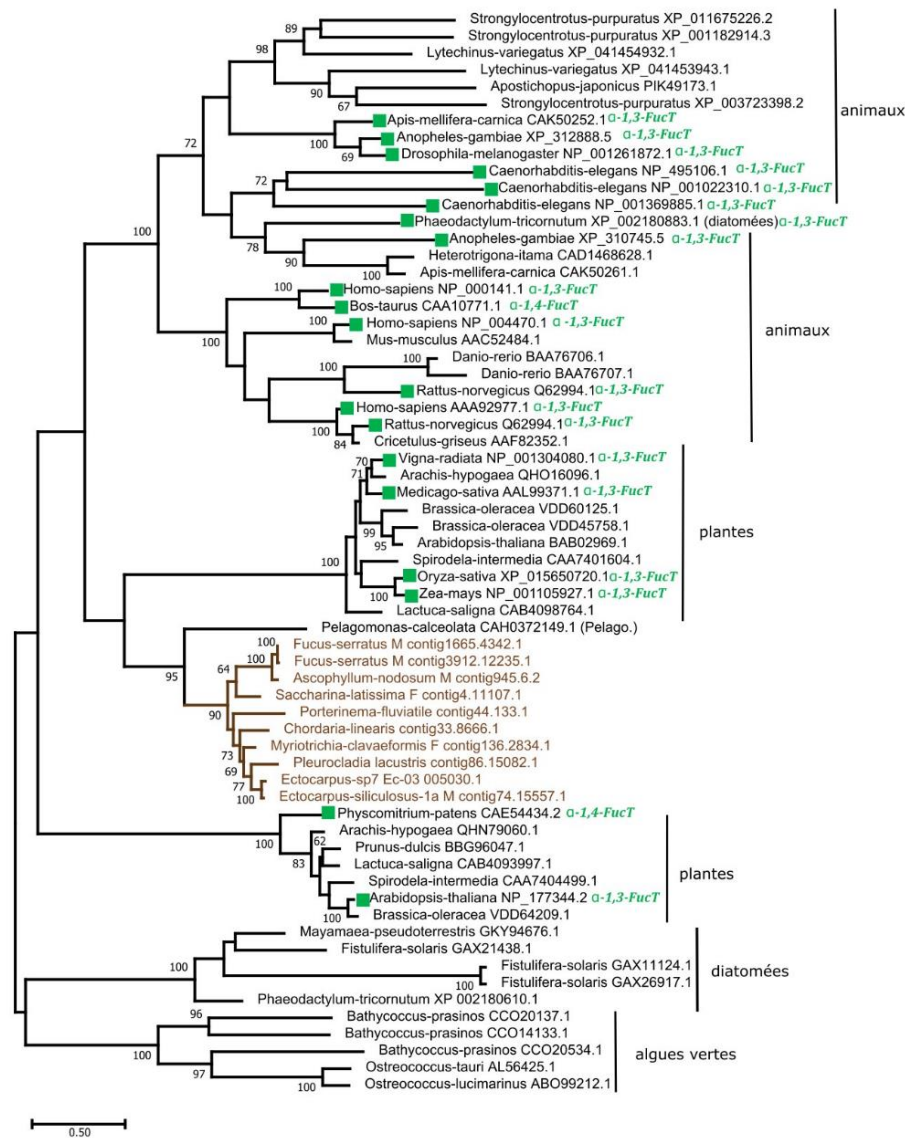
**Figure II. 8. Arbre phylogénétique de la famille GT41.** Les séquences de Phaeophyceae sont indiquées en marron. Les séquences appartenant aux groupes sœurs des Phaeophyceae sont indiquées en rouge. Des séquences d'autres Straménopiles sont également présentes (diatomées, Pelagophyceae, oomycètes). Les carrés verts indiquent des enzymes caractérisées. Eustigmato. Eustigmatophyceae, Pelago. Pelagophyceae.



## Les glycosyltransférases GT10 comme candidates pour la synthèse des fucanes

Parmi les familles de GT possédant une activité FucT référencée dans CAZy, les GT10 sont connues pour former des liaisons de type  $\alpha$ -(1-3) ou  $\alpha$ -(1-4). Ces liaisons sont caractéristiques des fucanes produit par les algues brunes. Les activités décrites dans cette famille concernent le transfert d'un GDP-fucose sur un N-acétylglucosamine (GlcNAc), c'est le seul résidu accepteur décrit jusqu'à présent dans cette famille. Par ailleurs, on distingue au sein de cette famille les transferts de type 'core' lorsque que la réaction se fait sur un GlcNAc lié directement à l'asparagine d'un peptide (Varki et al., 2022), d'une réaction de 'type de Lewis' lorsque le transfert se fait sur le GlcNAc d'une chaîne glycosidique lié à l'asparagine d'une protéine (Chen et al., 1998). Chez les plantes et invertébrés, les deux types de réaction ont été décrits contrairement aux vertébrés pour lesquels uniquement les réactions de type 'lewis' ont été caractérisées. La seule séquence dont la structure a été résolue est une séquence bactérienne, provenant d'*Helicobacter pylori* NCTC 11639, bactérie pathogène intestinale qui aurait acquis cette activité pour mimer des glycosylations humaines, ce qui lui permet d'échapper à la reconnaissance par le système immunitaire (Sun et al., 2007). L'activité attendue est une activité FucT sur le N-acétyllactosamine d'un polysaccharide, potentiellement un lipopolysaccharide. À noter que la séquence de *H. pylori* reste cependant très différente des GT10 eucaryotes.

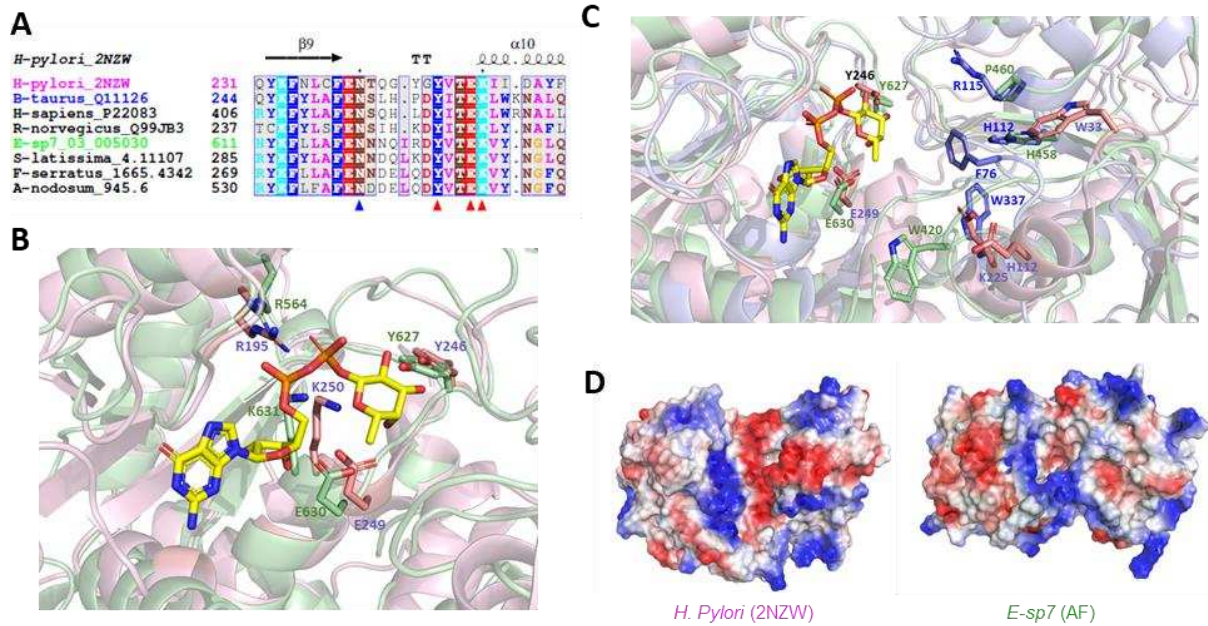
Chez les algues brunes, les GT10 sont retrouvées dans la plupart des génomes et présentes en simple copie. Les séquences d'algues brunes forment un clade lié à une séquence de Pelagophyceae (Figure II.9), classe qui, tout comme les Phaeophyceae, appartient aux Ochrophyta (Figure II.3). La phylogénie montre en revanche une évolution distincte de ces enzymes par rapport à celles d'autres Ochrophyta tel que les diatomées. L'arbre phylogénétique indique que les séquences d'algues brunes seraient plus proches des séquences de plantes ayant une activité  $\alpha$ -1-3 FucT de type 'core' (Wilson et al., 2001). Le nœud n'étant pas fortement supporté, il est difficile de conclure sur une histoire évolutive commune de ces deux groupes d'enzymes. À noter que nous n'observons pas de proximité avec des séquences de GT10 d'Échinodermes, qui, pour rappel, produisent également des fucanes.



**Figure II. 9. Arbre phylogénétique de la famille GT10.** Les séquences d'algues brunes sont indiquées en marron. Les séquences appartenant aux groupes sœurs des algues brunes sont indiquées en rouge. Des séquences d'autres Straménopiles sont également présentes (diatomées, Pelagophyceae). Légende : Pelago, Pelagophyceae. Les carrés verts indiquent des enzymes caractérisées.

Pour approfondir l'étude des GT10, nous nous sommes intéressés de plus près aux motifs peptidiques caractéristiques de cette famille. Le motif appelé ' $\alpha$ -(1-3) motif' est impliqué dans la liaison du donneur pour les GT10 (Breton et al., 1998 ; Martin et al., 1997 ; Oriol et al., 1999). Grâce à un alignement de séquences d'algues brunes avec des séquences caractérisées, nous avons pu observer ce motif et en particulier les acides aminés impliqués dans la liaison au GDP-fucose (Figure II.10.A), pour la séquence GT10 d'*Ectocarpus* sp. 7 (Ec-03\_005030.1) cela correspond aux acides aminés suivants : Arg564, Asn620, Glu630, Lys631 et Tyr627. Cette représentation permet de visualiser le site de liaison du GDP-fucose qui est très fortement conservé entre les séquences de GT10 eucaryotes et

la structure caractérisée de *H. pylori*. Quant au domaine de liaison avec l'accepteur, le motif VLxHH(W/R)(D/E) a été mis en évidence chez les vertébrés, où, une substitution du tryptophane par une arginine impliquait un changement de type de liaison  $\alpha$ -(1-4) vers  $\alpha$ -(1-3) (Dupuy et al., 1999). Chez les algues brunes, ce domaine n'est que partiellement conservé, le motif associé serait de type VLFHxP (non montré ici). On peut constater la présence d'une proline à la position des tryptophane/arginine des vertébrés, ce qui pourrait conduire à une configuration particulière de ce site pouvant indiquer une interaction différente avec l'accepteur chez les algues brunes. Par ailleurs, nous avons localisé les acides aminés liés à la liaison au GDP-fucose, sur un modèle de structure de la GT10 d'*Ectocarpus* sp. 7 (Ec-03\_005030 .1) (Figure II.10.B). Nous avons également identifié certains acides aminés potentiellement liés à l'accepteur. Bien que l'agencement soit conservé avec le modèle de la séquence de *Bos taurus*, la nature des acides aminés est différente dans cette région (Figure II.10.C). Aussi, nous pouvons voir sur la structure montrant la surface de charge électrostatique de la GT10 de *H. pylori* (Figure II.10.D) que la taille de la gorge, site de liaison de l'accepteur, est plus importante que celle d'*Ectocarpus* sp. 7 et *B. taurus*. De plus, c'est une région chargée négativement, cette répartition des charges n'est pas retrouvée sur le modèle de la séquence d'*Ectocarpus* sp. 7. Ces observations suggèrent une différence de type d'accepteur pris en charge. De plus, on peut noter que les GT10 de plantes de type 'core' présentes un domaine additionnel (non montré ici), sûrement impliqué dans la liaison à l'accepteur (Both et al., 2011), ce domaine n'est pas retrouvé dans les séquences d'algues brunes ni pour d'autres séquences eucaryotes en dehors des plantes. Si la nature de l'accepteur est difficile à prévoir dans le cas des GT10 d'algues brunes, elle est certainement différente de celle des GT10 caractérisées, à savoir un GlcNAc associé à une glycoprotéine.



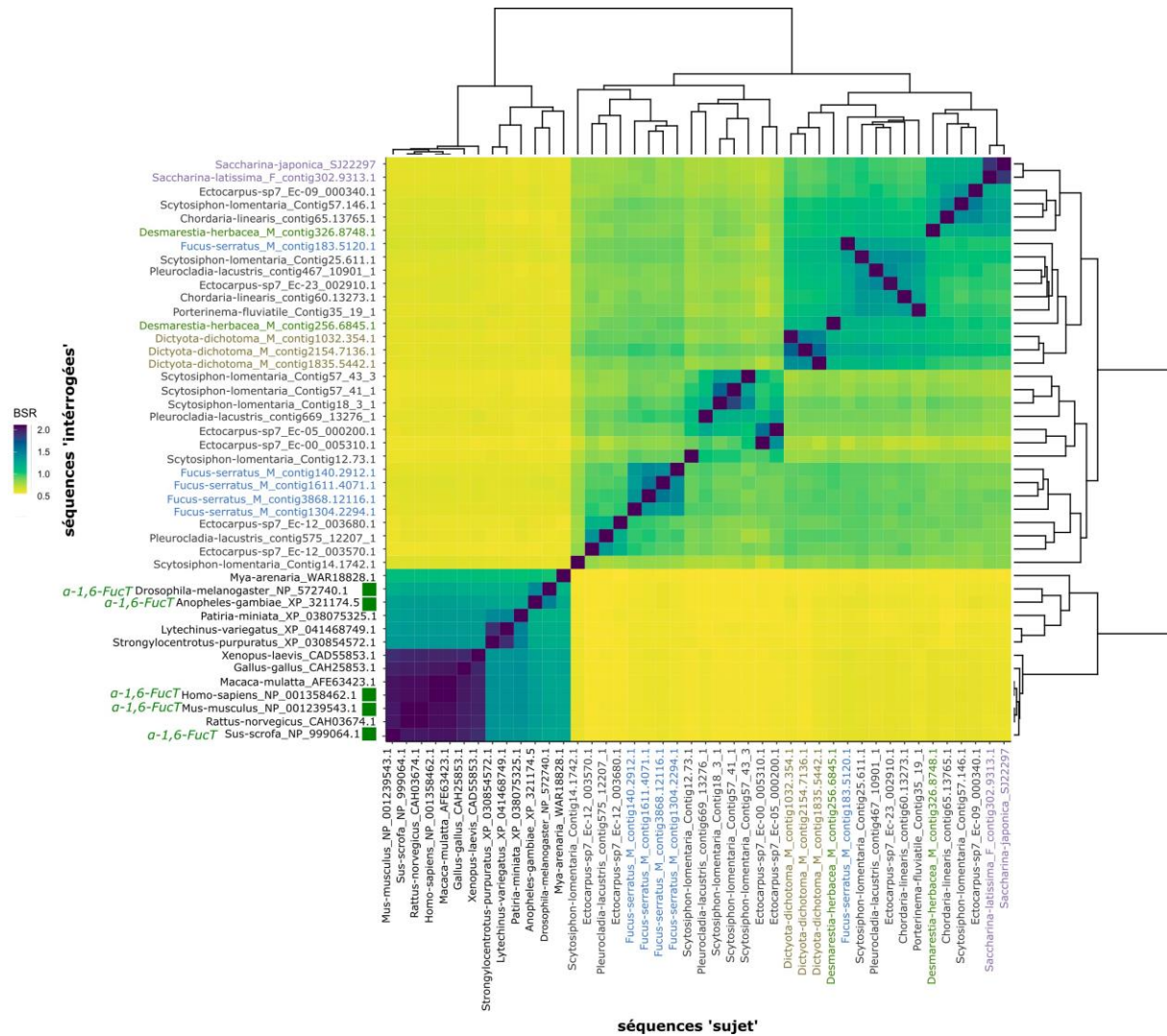
**Figure II. 10. Comparaison de GT10 de l'algue brune avec la protéine bactérienne structurellement caractérisée.** **A)** Extraits d'un alignement de séquences de GT10 d'algues brunes comparées avec la séquence de GT10 de la bactérie *Helicobacter pylori* dont la structure 3D est connue (pdbcode : 2NZW). Des séquences animales sont également alignées. L'extrait se concentre sur le site donneur GDP-fucose tel qu'identifié dans 2NZW. Les attributions de structure secondaire correspondent à celles de 2NZW. Les triangles rouges indiquent les résidus catalytiques conservés Asn240, Tyr246, Glu249, Lys250 qui servent à interagir avec le substrat donneur GDP-fucose. La séquence 2NZW est représentée en rose, une séquence de *Bos taurus* en bleu et la séquence d'*Ectocarpus* sp. 7 en vert, afin de correspondre au code de couleur utilisé dans B, C et D. **B)** Superposition de la structure de *H. pylori* GT10 (2NZW ; rose) et des meilleurs modèles générés par AlphaFold2 des séquences de *Bos taurus* (bleu) et de algues brunes *Ectocarpus* sp. 7 (vert). La représentation se concentre sur le site de liaison du GDP-fucose, où le GDP-fucose apparaît en jaune/orange. Certains résidus catalytiques conservés, y compris ceux mentionnés en A), sont mis en évidence. **C)** Vue large de la superposition présentée en B) qui permet de visualiser le site de liaison de l'accepteur. **D)** Modélisation de la surface moléculaire de la séquence *H.pylori* 2NZW et de la séquence d'*Ectocarpus* sp. 7 (Ec-03\_005030 .1).

Pour conclure, nous pouvons dire que les GT10 d'algues brunes sont très probablement des FucT. De part, les liaisons synthétisées dans cette famille qui correspond à celles trouvées dans les fucanes d'algues brunes, ainsi qu'un type d'accepteur a priori différent de ceux déjà caractérisés, les GT10 restent des candidates pour la synthèse des fucanes. À noter cependant que ce gène n'est qu'en simple copie dans les génomes d'algues brunes, voir absent dans certains génomes. Si cette observation s'avère correcte, cela indiquerait que cette famille ne serait pas la seule à être impliquée dans la synthèse des fucanes chez les algues brunes, car des fucanes sont retrouvés dans l'ensemble des ordres des algues brunes.

## Les GT23 sont les candidates préférentielles pour la synthèse des fucanes

La seule activité décrite chez les GT23 est une activité  $\alpha$ -(1-6) FucT. Des séquences de GT23 ont été décrites et caractérisées chez des *Alphaproteobacteria* de l'ordre des *Hyphomicrobiales* et les métazoaires. Par ailleurs quelques séquences homologues non caractérisées sont présentes chez les algues vertes et dans certains ordres des Ochrophyta. Les séquences bactériennes sont de type 'NodZ' (*Nodulation protein Z*), elles ont été décrites comme actives sur un GlcNAc du facteur Nod (lipochitooligosaccharides) (Quesada-Vincens et al., 1997 ; Quinto et al., 1997). Quant aux séquences de métazoaires caractérisées (FUT8), elles sont actives également sur un GlcNAc lié à une asparagine (Yanagidani et al., 1997). L'activité  $\alpha$ -(1-6) FucT a été décrite pour plusieurs séquences de métazoaires, elle semble donc être conservée au sein des métazoaires, une seule copie par génome est généralement référencée.

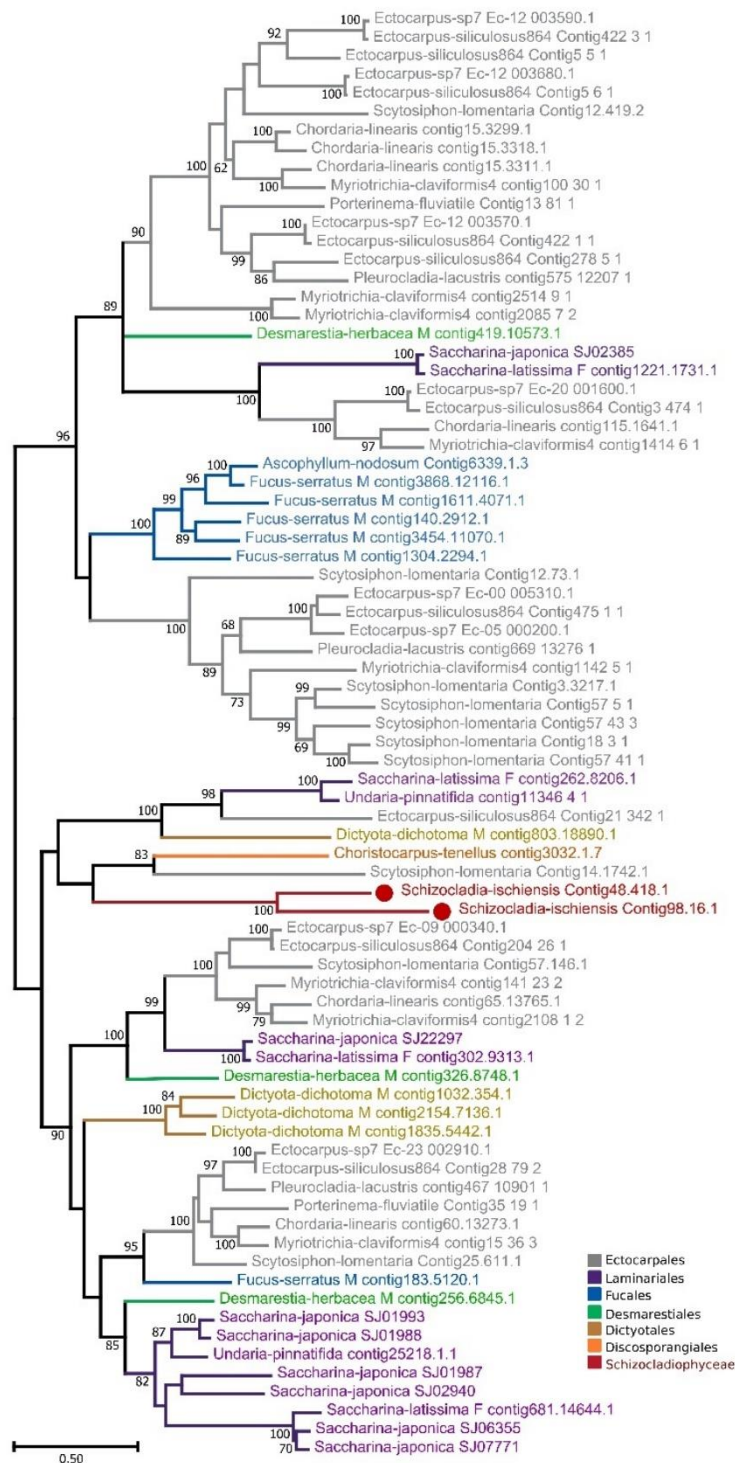
Chez les algues brunes, on trouve en moyenne 6 gènes de GT23 par génome. Nos analyses préliminaires ont indiqué que les séquences de GT23 d'algues brunes étaient distantes des GT23 référencées dans la base CAZy, en particulier les algues brunes disposent d'une extension en N-terminal. La divergence de séquence rend peu pertinent l'analyse phylogénétique, nos séquences d'algues brunes groupant indépendamment des autres GT23. Dans un tel cas, les analyses basées sur le calcul de BLAST Score Ratio (BSR) sont plus pertinentes. Nos analyses confirment que les GT23 d'algues brunes sont distantes des GT23 de métazoaires incluant des échinodermes (Figure II.11). Les GT23 d'algues brunes sont également distantes de celles des séquences bactériennes, non inclus dans le calcul de BSR, car elles sont trop distantes pour un calcul de BSR. Cette distance indique que cette famille a évolué de manière distincte chez les algues brunes par rapport à celle des métazoaires et des autres séquences de GT23. Ce constat pourrait sous-entendre l'acquisition d'un nouveau sous-clade et activité au sein des GT23, spécifiquement associé aux algues brunes.



**Figure II. 11. Carte de chaleur des séquences d'algues brunes et d'animaux au sein de la famille GT23.** La carte de chaleur représente les 'BLAST de score ratio' (BSR) pour des séquences de protéines GT23. Les séquences en noires sont celles d'animaux, les autres étant des séquences d'algues brunes de différents ordres. Les carrés verts indiquent les séquences qui ont été caractérisées biochimiquement.

Nous avons mené une analyse phylogénétique des GT23 restreinte aux algues brunes et leurs groupes sœurs. Parmi les génomes des groupes sœurs étudiés, le seul génome pour lequel nous avons identifié une GT23 appartient à la classe des Schizocladiphyceae (Figure II.12). Il est cependant à noter qu'il existe des GT23 chez d'autres Ochrophytes. En effet, on trouve deux séquences de GT23 chez une diatomée (*Phaeodactylum tricornutum*) et une chez une Eustigmatophyceae (*Nannochloropsis gaditana*). Toutefois ces séquences sont plus proches respectivement, de séquences bactériennes et de métazoaires que des séquences d'algues brunes. La phylogénie indique que les GT23 de Phaeophyceae se divisent elles-mêmes en clades distincts qui seraient apparus à la base de la phylogénie des Phaeophyceae (Dictyotales/Discosporangiales) et chez les Desmarestiales. Une évolution particulière est observée pour les séquences de Fucales qui forment un clade qui leur est

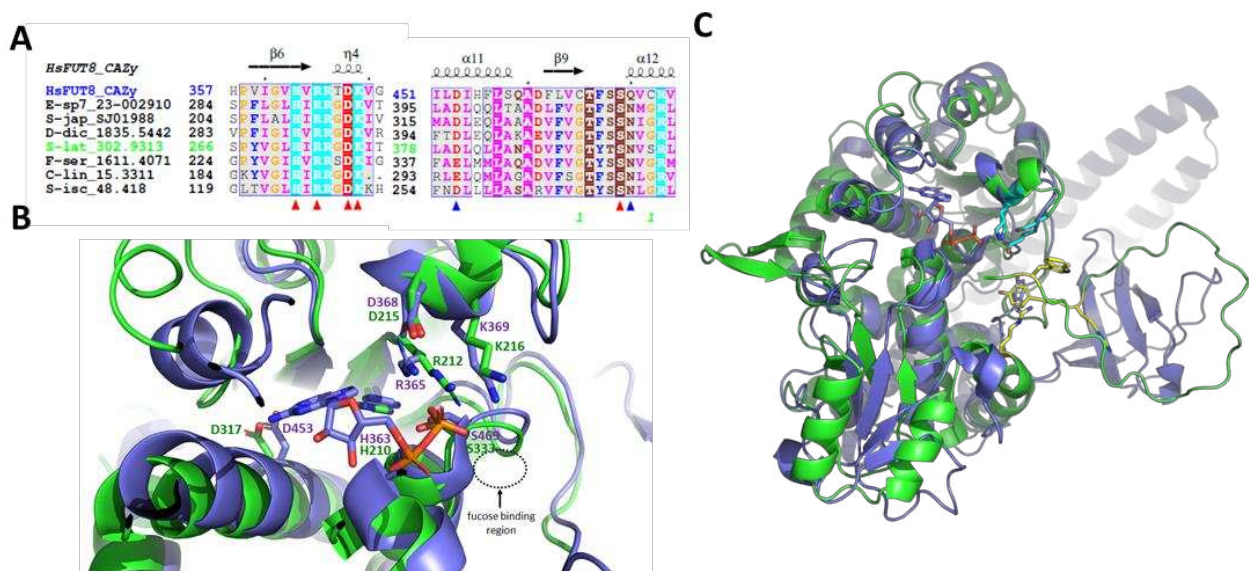
spécifique. Ceci est intéressant au vu de la présence dans cet ordre d'une alternance de liaison  $\alpha$ -(1-3) et  $\alpha$ -(1-4) dans les fucanes, non décrite chez les autres ordres (Deniaud-Bouët et al., 2014). Enfin, pour les séquences d'Ectocarpales il semble y avoir des duplications en tandem, identifiées par la proximité génomique de gènes de GT23 sur certains contigs. L'extension de cette famille chez les algues brunes laisse présager son implication dans un métabolisme important chez les algues brunes. La répartition



**Figure II. 12. Arbre phylogénétique des GT23 de Phaeophyceae et de leur groupe sœur des Schizocladiphyceae.** En rouge sont indiquées les séquences de *S. ischiensis*. Les autres couleurs indiquent les ordres d'algues brunes.

en clades pourrait refléter des activités en lien avec la diversité des fucanes en termes de types de liaisons et/ou fucoïdanes (fucose branchés) chez les algues brunes.

Pour approfondir l'étude des GT23, nous avons aligné des séquences d'algues brunes avec une séquence de GT23 (FUT8) humaine, dont la structure et les sites actifs ont été caractérisés (Boruah et al., 2020 ; García-García et al., 2020). Malgré la distance observée entre les séquences d'algues brunes et de métazoaires (Figure II.13.A) (e.g. 22% d'identité entre la séquence de *S. latissima* contig302.9313.1 et la FUT8 humaine), le site de liaison au GDP-fucose identifié sur la séquence de la FUT8 humaine est conservé chez les séquences de Phaeophyceae et de *S. ischiensis* (Figure II.13.A), indiquant une activité FucT vraisemblable. Le site accepteur identifié pour la séquence FUT8 n'est que très peu conservé dans les séquences d'algues brunes (non affiché ici).



**Figure II. 13. Comparaison d'une GT23 de Phaeophyceae avec la protéine humaine FUT8 caractérisée structurellement. A)** Partie d'un alignement de séquences GT23 de Phaeophyceae et de *S. ischiensis*, par rapport aux caractéristiques structurelles de la séquence FUT8 humaine (pdbcode : 6X5R). La partie de l'alignement montre le site donneur du GDP-fucose tel qu'identifié dans FUT8. Les attributions de structures secondaires au-dessus des séquences correspondent à celles de 6X5R. Les triangles rouges sous les séquences indiquent les résidus catalytiques conservés His363, Arg365, Asp368, Lys369 et Ser469. Les triangles bleus indiquent les résidus catalytiques identifiés dans 6X5R qui peuvent différer dans les séquences d'algues brunes, bien qu'ayant des propriétés biochimiques similaires : Asp453 et Gln470. **B)** Superposition de la structure cristallisée de FUT8 (6X5R) (bleu) et du meilleur modèle généré par AlphaFold2 d'une séquence d'algue brune de *S. latissima* (numéro d'accès : contig302.9313) (vert). La représentation se concentre sur le site de liaison GDP-fucose. Le GDP apparaît en bleu/orange. Les résidus catalytiques conservés mentionnés en A) sont mis en évidence. **C)** Vue globale de la superposition présentée en B). Les résidus catalytiques conservés Lys369 et E373



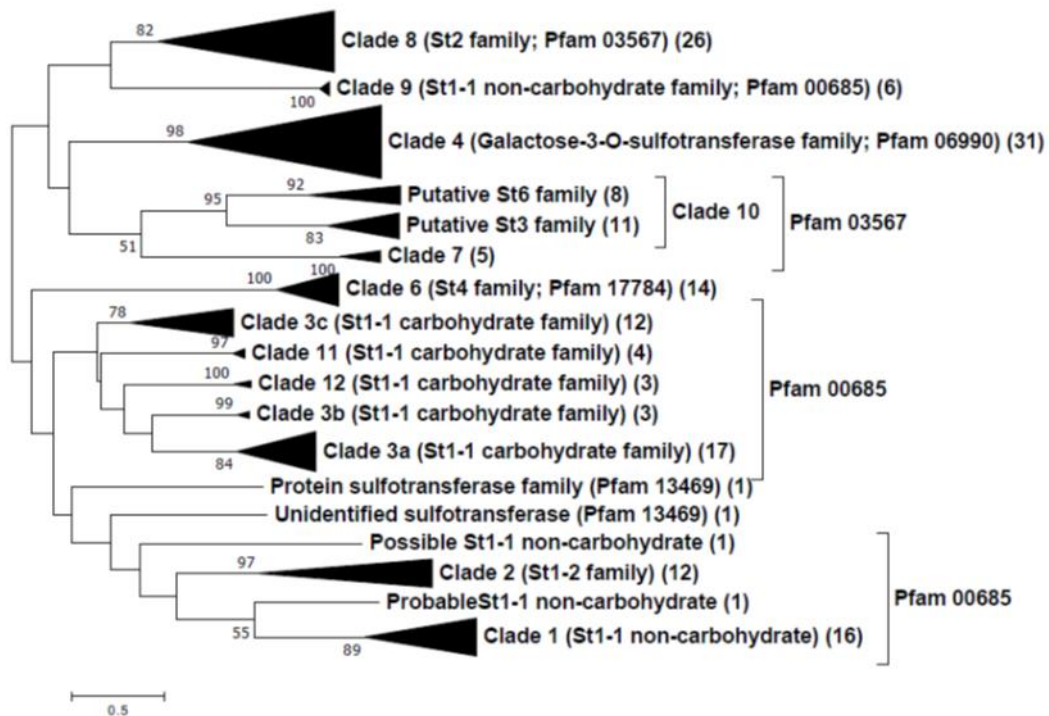
sont représentés en couleur cyan. Les résidus aromatiques présents dans la séquence SIGT23 et éventuellement impliqués dans la fixation de l'accepteur sont représentés en jaune.

Les acides aminés impliqués dans le site de liaison au GDP-fucose ont été identifiés sur un modèle de structure (AlphaFold2) de la séquence GT23 de *S. latissima*, en localisant ainsi la région impliquée dans la liaison au GDP-fucose qui est clairement visible (Figure II.13.C). Plusieurs acides aminés aromatiques seraient aussi présents en bordure de cette région chez la séquence de *S. latissima* et pourraient avoir un rôle dans la réaction et la reconnaissance de l'accepteur (Figure II.13.C). Chez la FUT8 humaine, il a été montré que le domaine *Src homology 3* (SH3) situé en C-terminal a un rôle dans la dimérisation de cette protéine ainsi que pour sa localisation subcellulaire, mais aussi un rôle dans les liaisons à l'accepteur (Tomida et al., 2020). Dans le cas des séquences de GT23 de Phaeophyceae, la région C-terminale est mal prédite par la modélisation, elle pourrait jouer un rôle important dans la reconnaissance et le positionnement de l'accepteur pour ces enzymes. Également, la région N-terminale des séquences de GT23 d'algues brunes est mal prédite, cette région n'est pas montrée sur la structure de *S. latissima* (Figure II.13.C).

Concernant l'étude des gènes impliqués dans le métabolisme des FCSP, Linardić et al., (2020) indiquent la surexpression de gènes lors de l'embryogenèse de *F. serratus*, et notamment des gènes associés à la famille des GT23. Or, il a été montré que l'étape d'intégration des fucanes à la MEC débute dès les premiers stades de l'embryogénèse et notamment avec la polarisation du zygote (Torode et al., 2016). L'expression de gènes de GT23 coïncide avec la mise en place de fucanes dans les premiers stades de l'embryogénèse de *F. serratus*. Une forte surexpression de ces gènes est aussi observée à 3 et 10 jours après fécondation (Linardić et al., 2020). À noter que les données fournies par l'article ne nous permettent pas de retrouver les séquences dans le génome de *F. serratus* séquencé dans le programme Phaeoexplorer, seul le meilleur hit BLAST contre les séquences d'*Ectocarpus* est indiqué. Ces observations issues de la littérature, combinées à mes résultats, renforcent le choix de la GT23 comme famille candidate pour la synthèse des fucanes chez les algues brunes.

### 3.2.3) Sulfotransférases candidates

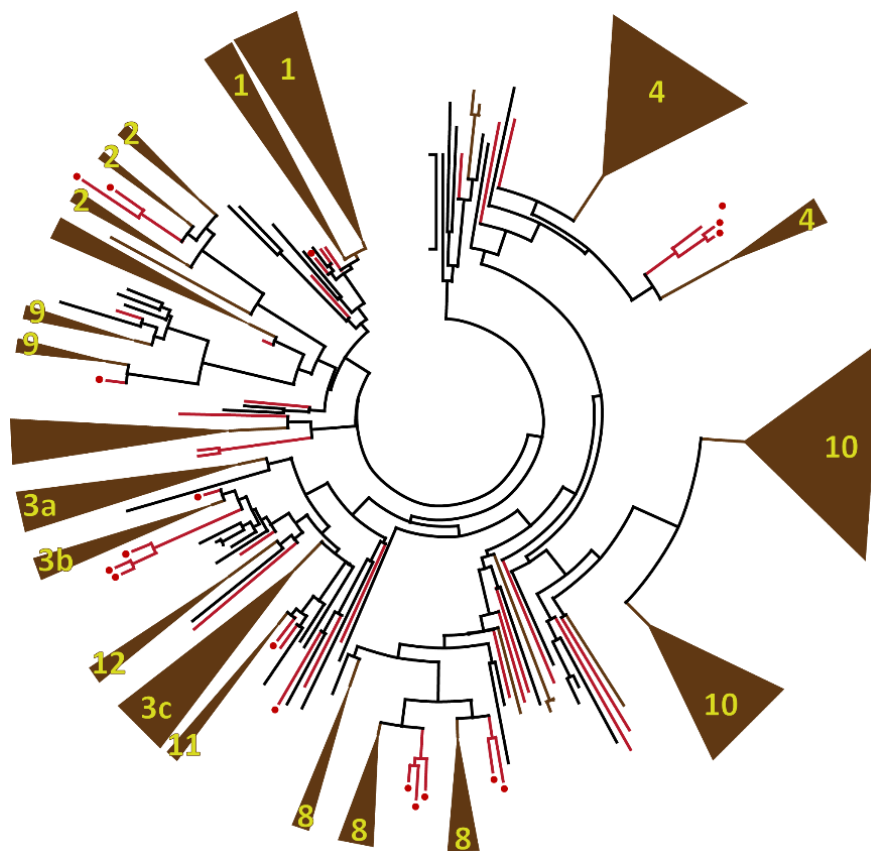
Chez les algues brunes, les monosaccharides présents dans les FCSP peuvent être sulfatés (e.g. fucose, galactose, mannose). Les enzymes prédites à l'origine de cette sulfatation ne sont pas caractérisées. Nous avons revisité l'évolution des sulfotransférases (ST) de 4 génomes d'algues brunes appartenant aux ordres des Ectocarpales et Laminariales, ainsi, nous avons identifié 15 clades de ST d'algues brunes (Figure II.14) (Mazéas et al., 2023).



**Figure II. 14. Arbre phylogénétique non raciné des sulfotransférases d'*Ectocarpus* sp. 7, *Cladosiphon okamuranus*, *Nemacystus decipiens*, *Saccharina japonica*.** Les domaines Pfam et la classification dans les différentes familles de ST sont basés sur le site Pfam 34.0 et la base de données Uniprot, respectivement. Nous avons conservé mais étendu la numérotation suivie par Kloareg et al., (2021). Les chiffres entre parenthèses indiquent le nombre de séquences incluses dans les clades comprimés (Mazéas et al., 2023).

Afin de déterminer l'origine et l'évolution de ces clades, nous avons étendu l'analyse à l'ensemble des Straménopiles, en incluant des génomes de différents ordres de Phaeophyceae, et de leurs groupes sœurs (Raphidophyceae, Chrysoparadoxophyceae, Schizocladiphyceae) ainsi que d'autres groupes d'Ochrophyta (diatomées, Eustigmatophyceae, Pelagophyceae) et oomycètes.

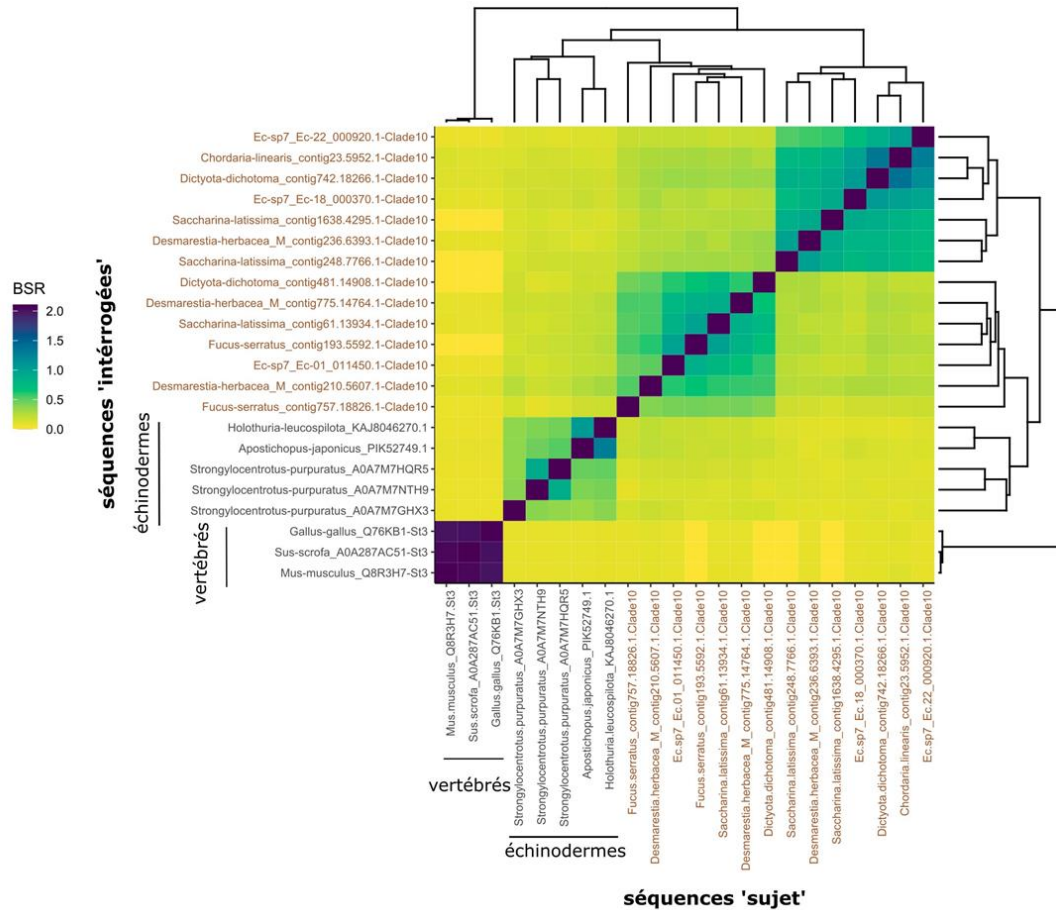
La phylogénie (Figure II.15, arbre ouvert en Annexe1) montre que l'on retrouve bien un nombre important de clades de ST chez les algues brunes (12 clades principaux). À l'exception du clade 1 qui est attendu pour avoir des activités sur des substrats non glucidiques (Kloareg et al., 2021 ; Mazéas et al., 2023 ; Michel et al., 2010b), les autres clades pourraient avoir des activités sur des polysaccharides. La diversité des clades de ST pourrait traduire une diversité de réactions sur différents accepteurs. On peut constater que les clades 4 et 10 présentent un nombre important de duplications chez les algues brunes. Des séquences proches du clade 4 seraient présentes chez d'autres Ochrophyta. Le clade 10, semble être, quant à lui, spécifique aux algues brunes.



**Figure II. 15. Arbre phylogénétique des ST d'algues brunes et d'autres Straménopiles.** Les séquences d'algues brunes sont indiquées en marron. Les séquences des groupes sœurs sont indiquées en rouge. Les séquences de *S. ischiensis* sont spécifiées avec un point rouge.

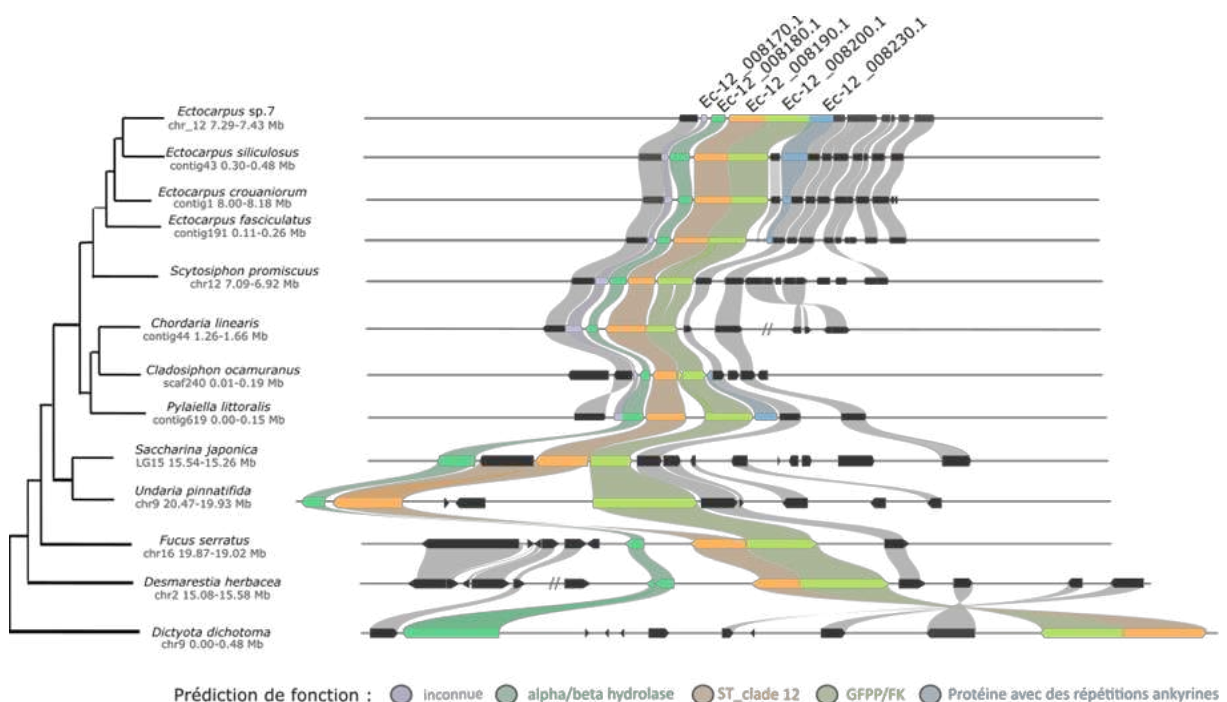
Nous nous sommes intéressés aux homologues des ST d'algues brunes chez certains échinodermes (oursins et concombres de mer), animaux qui produisent des fucanes sulfatés (Pomin & Mourão, 2008 ; Yu et al., 2015). Les fucanes des échinodermes sont sulfatés (en position 2 et 4) avec des motifs de sulfatation variables suivant les espèces (Chen et al., 2023). Parmi l'ensemble des séquences de ST de Phaeophyceae, certaines semblent proches en termes de similarité de celles d'oursin (*Strongylocentrotus purpuratus*) et de concombre de mer (*Apostichopus japonicus*, *Holothuria*

*leucospilota*). Nous avons généré une carte de chaleur basée sur le BSR (Hobbs et al., 2022), celle-ci montre la proximité des séquences d'oursins et de concombres de mer avec les séquences appartenant au clade 10 d'algues brunes (Figure II.16). Cette proximité peut indiquer une fonction similaire de ces enzymes et fait des ST du clade 10 de Phaeophyceae, des candidates pour la sulfatation des fucanes. À noter qu'aucune sulfotransférase d'oursin et concombre de mer n'a été caractérisée à ce jour.



**Figure II. 16. Carte de chaleur entre des séquences de ST d'algues brunes et de métazoaires.** La carte représente les scores BSR, des algues brunes et d'autres métazoaires. Les séquences d'algues brunes sont indiquées en marron.

Il est à noter que les séquences du clade 12 appartiennent aux gènes identifiés au niveau d'une région synténique, ces gènes se situent notamment à côté de l'enzyme FK-GFPP impliquée dans la synthèse des précurseurs (Figure II.17). Cette proximité pourrait suggérer un rôle des ST de la clade 12 dans la sulfatation des fucanes ou fucoïdanes. Il s'avère que la juxtaposition du gène FK-GFPP avec une ST est présente dans les autres génomes d'algues brunes analysées. Cette juxtaposition serait donc apparue chez l'ancêtre commun des Phaeophyceae. La présence d'une hydrolase en 3' du gène codant pour une ST semble être apparue chez les Desmarestiales et conservé au cours du reste de l'évolution des Phaeophyceae (Figure II.17).



**Figure II. 17. Région synténique de gènes pouvant être liés au métabolisme des fucanes.**

Concernant les ST impliquées dans la sulfatation des FCSP, nous avons identifié plusieurs clades candidats chez les algues brunes. Contrairement à ce qui a été observé pour les séquences de FucT, nous avons montré une ressemblance entre des séquences du clade 10 (Figure II.16) et des séquences d'oursins et de concombres de mer. Il pourrait s'agir d'une convergence de fonction. Ces informations, couplées au fait que les ST du clade 10 sont fortement représentées dans les génomes d'algues brunes, pourraient traduire l'implication de ce clade dans la synthèse de fucanes sulfatés chez les algues brunes. Dans l'étude s'intéressant au profil d'expression des gènes chez l'embryon *F. serratus*, les auteurs se sont également intéressés aux séquences de ST, deux séquences montrent une forte expression à 7h et 24h après fécondation suggérant leur implication dans la synthèse de fucanes sulfatés (Linardić et al., 2020). Ces séquences appartiendraient aux clades 2 et 8 que nous avons

identifiés précédemment (Figure II.15). Ce sont aussi des clades d'intérêt potentiel pour la sulfatation des FCSP, et qui sont partagés avec le groupe sœur des Schizocladiphyceae.

#### 3.2.4) Synthèse des fucanes en dehors des algues brunes ?

Les fucanes sont décrits et caractérisés uniquement chez les algues brunes (Deniaud-Bouët et al., 2014) et chez certains échinodermes marins tels que les oursins et les concombres de mer. Les fucanes d'échinodermes sont linéaires, constitués de résidus fucose liés en  $\alpha$ -(1-3), mais peuvent parfois avoir un branchement en  $\alpha$ -(1-4) (Yu et al., 2015). Les fucanes des échinodermes sont sulfatés (en position 2 et 4) avec des motifs de sulfatation variables suivant les espèces (Chen et al., 2023). À ce jour, pour aucun de ces organismes, la voie de biosynthèse des fucanes n'est résolue.

Chez les algues brunes, nous avons étudié les enzymes pouvant être impliquées dans la synthèse du squelette principal des fucanes, la famille candidate préférentielle étant la famille des GT23 (partie 3.2.2). Nous avons annoté et regardé spécifiquement le contenu en FucT de génomes publics disponibles pour des génomes d'oursins (*S. purpuratus*, *L. variegatus*) et d'un concombre de mer (*Apostichopus japonicus*) dans le but d'identifier de potentiels candidats FucT pour la synthèse des fucanes et d'identifier de potentiels candidats communs. Parmi les familles de FucT décrites dans la base de données CAZy, des membres des familles GT10, GT41, GT23, GT65 et GT68 sont présentes dans les génomes d'échinodermes annotés. Les familles de GT10 et GT23 sont multigéniques chez l'oursin avec, par exemple 34 GT10 et 13 GT23 chez *S. purpuratus*. Pour l'holothurie *A. japonicus*, nous dénombrons 97 GT10 et 2 GT23. Nous n'avons pas pu établir d'homologie avec les séquences d'algues brunes. Nous faisons l'hypothèse que la synthèse des fucanes aurait été acquise de manière indépendante chez les échinodermes et les algues brunes.

En dehors des algues brunes et des échinodermes, la présence de fucanes sulfatés est suggérée chez les diatomées des genres *Chaetoceros* et *Thalassiosira* (Vidal-Melgosa et al., 2021). Ces résultats se basent sur des études de composition monosaccharidique (notamment dosage du fucose) et par détection avec des anticorps. Les anticorps utilisés sont principalement les anticorps de type BAM2 et BAM3 (Torode et al., 2015), qui reconnaissent des FCSP mais dont les épitopes précis ne sont pas caractérisés. Il n'est pas établi qu'ils reconnaissent des fucanes au sens strict. De même, l'identification de structures de fucanes n'a pas été montrée chez les diatomées. De par la grande diversité des polysaccharides produits chez ces organismes, très peu de données de structures polysaccharidiques ont été obtenues, la seule structure établie d'un polysaccharide de paroi est du glucuromannane chez la diatomée *P. triconutum* (Le Costaouëc et al., 2017). Il est donc aussi possible que ces anticorps aient une réaction croisée avec des polysaccharides encore non décrits chez ces

organismes. À ce stade, la seule détection par anticorps, en absence d'une validation structurale, ne permet pas à elle d'affirmer la présence de fucanes chez les diatomées. La comparaison avec les fucanes/fucoïdanes d'algues brunes est donc rendue difficile par le manque de données structurales. Parmi les gènes candidats dans la synthèse des fucanes chez les algues brunes (GT10, GT23), nous n'avons pas détecté d'homologues chez les diatomées. Actuellement, rien ne nous permet d'affirmer que la synthèse de fucanes seraient présente chez l'ancêtre commun des diatomées et des algues brunes. Le manque de données structurales de polysaccharides concernant les autres groupes d'Ochrophyta est également limitant. Par ailleurs, si des données de compositions en monosaccharides sont disponibles, elles ne référencent pas la présence de fucose chez *T. minus* (Xanthophyceae) (Huo et al., 2022) ou en faible proportion dans les polysaccharides extraits de la paroi de *N. oceanica* (Eustigmatophyceae) (Bernaerts et al., 2018). Ces informations suggèrent que ces organismes ne produiraient pas de fucanes de manière conséquente et/ou de manière constitutive.

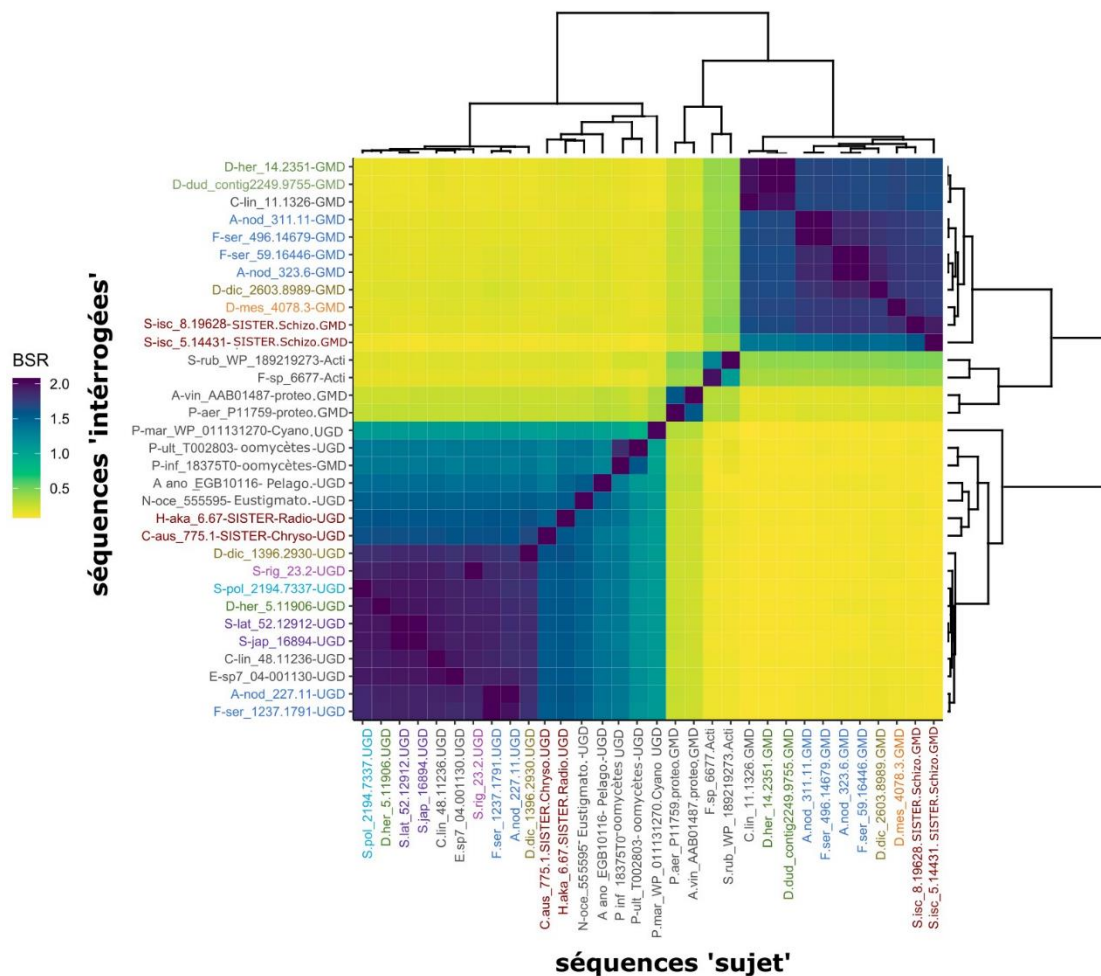
À l'échelle des Ochrophyta/Straménopiles, les GT23 d'algues brunes et *S. ischiensis* sont de proches homologues. Si nos hypothèses sont validées concernant la synthèse du squelette de fucanes par les GT23 chez les algues, des fucanes pourraient être aussi présents chez le groupe sœur des Schizocladiphyceae. Selon cette hypothèse, les fucanes seraient donc apparus chez l'ancêtre commun des Schizocladiphyceae et des Phaeophyceae. Si des alginates ont été immunodétectés chez *S. ischiensis* (Kawai et al., 2003), la présence de FCSP n'a jamais été explorée chez cet organisme. Des données de structure des polysaccharides de la MEC chez Schizocladiphyceae seront donc également nécessaires pour confirmer ces hypothèses.

### 3.3) Origine et évolution de la voie métabolique de l'alginate chez les algues brunes

#### 3.3.1. Origine et évolution de la voie de synthèse de l'alginate

Dans cette partie, je retrace l'histoire évolutive des enzymes liées aux voies de synthèse et de dégradation de l'alginate chez les algues brunes. Les premières étapes de synthèse du GDP-mannose sont communes avec la voie de biosynthèse des fucanes, leur origine est eucaryotique, ce résultat est montré précédemment (partie 3.2.1). Une fois le GDP-mannose produit, l'étape suivante est la synthèse du GDP-acide mannuronique par une GMD. Les GMD et uridine diphosphate-glucose déshydrogénase (UGD) sont classées dans la même superfamille et parfois étudiées sur une même phylogénie (Chi et al., 2018 ; Michel et al., 2010b), cependant elles sont très distantes les unes des autres. La Figure II.18 montre la présence de deux groupes distincts, avec d'une part les séquences associées au UGD et d'autres part celles des GMD. Les gènes associés aux UGD seraient d'origine eucaryote et présents dans les classes des Raphidophyceae et Chrysoparadoxophyceae. Nous nous

focaliserons sur l'étude phylogénétique des séquences de GMD d'algues brunes et de leurs homologues.

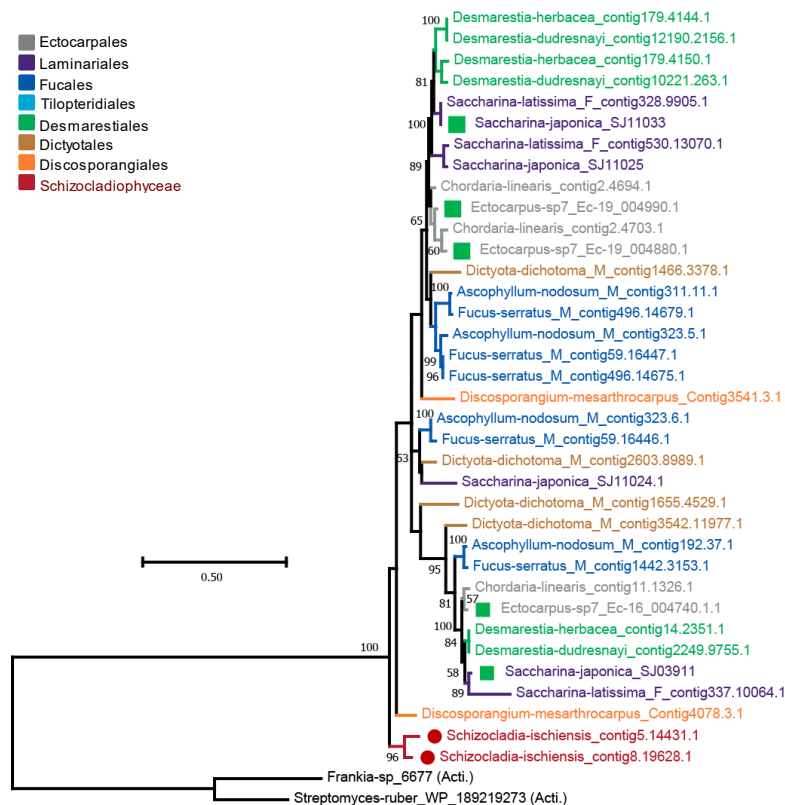


**Figure II. 18. Carte de chaleur des protéines de Phaeophyceae au sein de la superfamille des GDP-mannose/UDP-glucose déshydrogénases (GMD/UGD).** La carte représente les scores BSR pour des séquences GMD et UGD d'algues brunes mais aussi de leurs groupes sœurs indiqués en rouge ainsi que des bactériennes (Act. actinobactérie, Cyano. cyanobactéries, protéo. protéobactéries), d'Eustigmatophyceae (Eustigmatato.) et Pelagophyceae (Pelago.).

La Figure II.19 montre que des homologues des séquences GMD caractérisées sont présents dans plusieurs ordres de Phaeophyceae, depuis le plus ancestral, l'ordre des Discosporangiales, mais aussi dans le génome du groupe sœur des Schizocladiphyceae. Un événement de duplication chez l'ancêtre commun des Phaeophyceae serait apparu, puis des duplications à partir des Dictyotales suivis d'évènements de duplication au sein des différents ordres (notamment Fucales, Desmarestiales, Ectocarpales) se seraient produits (Figure II.19). Les séquences les plus proches de celles des Phaeophyceae et de leur groupe sœur parmi les bactéries décrites proviendraient d'actinobactéries (e.g. 30 % d'identité entre la séquence d'*Ectocarpus* sp. 7 Ec-19\_004880.1 et celle de l'actinobactérie



*Frankia* sp. 6677). Par ailleurs, en recherchant dans la base de données du NCBI, une séquence (MBP7967557.1) d'une bactérie non décrite mais appartenant au phylum "Candidatus Woesebacteriota" et montrant 40 % d'identité avec les GMD a été mise en évidence. À ce stade, nous pouvons suggérer qu'un transfert horizontal d'un gène d'origine bactérien a permis l'acquisition de la GMD chez l'ancêtre commun des Schizocladiphyceae et les algues brunes, mais le genre bactérien ne peut pas être confirmé.



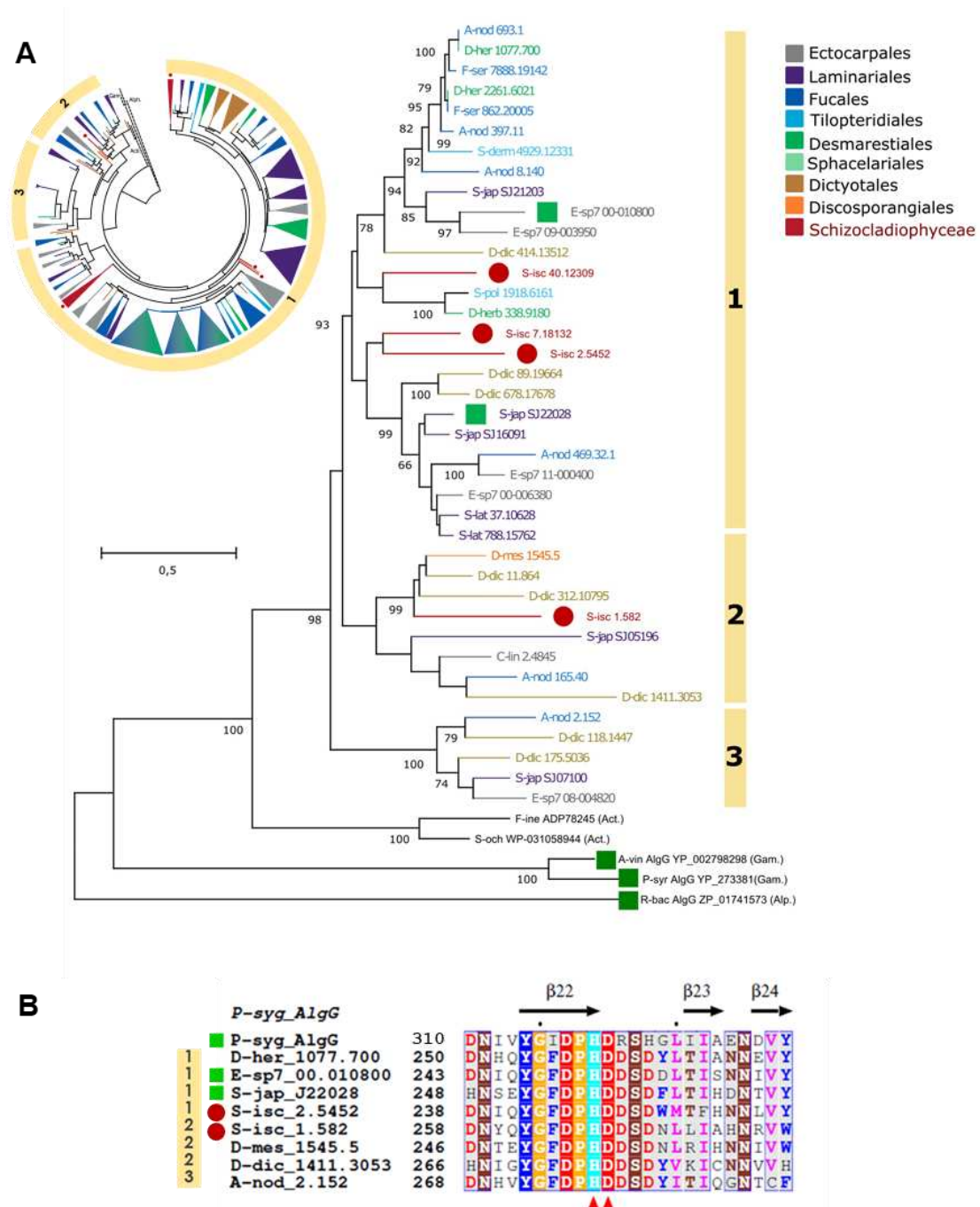
**Figure II. 19. Arbre phylogénétique des GMD d'algues brunes.** Les ronds rouges indiquent les séquences de *S. ischiensis*. Les carrés verts indiquent les séquences qui ont été caractérisées biochimiquement. Acti. actinobactéries.

L'hypothèse concernant l'étape de synthèse de la chaîne d'acide mannuronique est qu'elle serait catalysée par une GT2 (Michel et al., 2010b). La seule activité de polymérisation de GDP-acide mannuronique a été caractérisée pour une GT2 de la bactérie *Pseudomonas aeruginosa* (Remminghorst & Rehm, 2006). Cette GT2 est distante des GT2 de Phaeophyceae (23 % d'identité au maximum pour une séquence d'*Ectocarpus* sp. 7). Par ailleurs, Michel et al., (2010b) indique que le pourcentage est légèrement plus fort avec une séquence d'un GT2 d'une autre bactérie (*Frankia* sp. Eul1c) (environ 30 %) qui produit de l'alginate. Cette GT2 est située dans la région codant pour les gènes impliqués dans la synthèse de l'alginate. Les deux enzymes candidates proposées par Michel et al., (2010b), sont Ec-20\_004280.1 et Ec-06\_009390.1. Pour la première, on trouve des homologues (>

70 % d'identité) dans la plupart des génomes de Phaeophyceae et également dans le génome de *S. ischiensis*. Par ailleurs, pour la deuxième séquence candidate identifiée, des homologues forts ne sont pas identifiés dans l'ensemble des ordres.

Par ailleurs, nous avons interrogé nos collègues de CAZy (et notamment Bernard Henrissat, créateur de CAZy et de la famille GT2) sur la possibilité d'avoir une mannuronane-synthase putative parmi les GT2 d'algues brunes. Parmi les autres membres des GT2 de Phaeophyceae, bien que des sous-familles ne soient pas explicitement décrites, on trouve des homologues des dolichyl-phosphate  $\beta$ -D-mannosyltransférases et dolichyl-phosphate  $\beta$ -glucosyltransférases mais également des homologues des cellulose-synthases et cellulose-synthases *like*. D'autres GT2 sont associées aux GT74. Aussi on trouve d'autres GT2 qui n'ont pas d'homologues proches caractérisés. Si les GT2 d'algues brunes contiennent des mannuronane-synthases, on peut vraisemblablement éliminer les homologues des dolichyl-phosphate  $\beta$ -D-mannosyltransférases ; dolichyl-phosphate  $\beta$ -glucosyltransférases et les GT2 associé au module GT74. Toutes les GT2 restantes, incluant notamment celles identifiées par Michel et al., (2010b) et les cellulose-synthases et cellulose-synthases *like*, sont toutes de possibles candidates pour la synthèse de l'alginate, et qu'il n'y a donc pas lieu de favoriser un gène par rapport à l'autre. Des études phylogénétiques sur ces différents clades resteraient peu informatives tant qu'une activité biochimique n'est pas établie.

Après l'élongation de la chaîne de mannuronane, vient l'action des ManC5-E qui convertissent certains acides mannuroniques en acides guluroniques. En dehors des algues brunes et des bactéries où ont été identifiées et caractérisées des ManC5-E (Xiao et al., 2023), des homologues sont présents dans le génome de *S. ischiensis*, mais pas chez les autres Ochrophyta étudiés. La Figure II.20.A montre que les ManC5-E d'algues brunes forment 3 clades majoritaires. Les séquences de ManC5-E du groupe sœur *S. ischiensis* sont au nombre de 15 et sont présentes dans les clades 1 et 2 (Figure II.20.A). Les séquences ont été identifiées par homologie de séquences, néanmoins l'analyse de l'alignement nous a permis de confirmer la présence du site catalytique pour les séquences présentes dans 3 clades et donc que nous sommes a priori bien en présence de ManC5-E. Ici, nous présentons l'alignement avec la séquence structurellement caractérisée AlgG de *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 (Wolfram et al., 2014) et quelques séquences de Phaeophyceae et de *S. ischiensis* et appartenant à différents clades (Figure II.20.B). L'alignement montre que le motif DPHD, considéré comme faisant partie du site catalytique, est strictement conservé dans les séquences de Phaeophyceae appartenant aux trois clades et celles de *S. ischiensis* (Figure II.20.B). La fonction d'épimérisation est donc a priori bien conservée entre les différents clades de ManC5-E et de manière ancestrale chez *S. ischiensis*.



**Figure II. 20. Mannuronane C5-épimérases chez les algues brunes. .A)** Arbres phylogénétiques des ManC5-E. La phylogénie circulaire indique une phylogénie globale d'un nombre important de ManC5-E dans laquelle on peut trouver 3 groupes principaux. La phylogénie présentée à droite est une version simplifiée de la vue globale. **B)** Extrait d'un alignement de séquences de ManC5-E de Phaeophyceae et de *S. ischiensis*, associé à la structure secondaire de la ManC5-E bactérienne de *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 (pdbcode : 4NK6, YP\_273381). L'extrait de l'alignement se concentre sur le site catalytique tel qu'il a été identifié dans 4NK6. Les triangles rouges sous les séquences indiquent les résidus catalytiques conservés His319 et A320. Dans A) et B), les carrés verts indiquent les séquences qui ont été caractérisées biochimiquement. Les séquences appartenant à *S. ischiensis* sont indiquées

avec un rond rouge. Act., *Actinobacteria* ; Gam. *Gammaproteobacteria* ; Alph., *Alphaproteobacteria*. L'arbre global non compressé est disponible en Annexe2 de ce chapitre.

Les ManC5-E seraient donc apparues chez l'ancêtre commun des classes des Phaeophyceae et des Schizocladiphyceae puis des événements de duplications se seraient produits chez les Phaeophyceae et en particulier plus tardivement chez les Laminariales, les Fucales et les Desmarestiales. Le clade 1 contient les deux séquences caractérisées biochimiquement chez les Phaeophyceae (Fischl et al., 2016 ; Inoue et al., 2016). Les homologues bactériens les plus proches des séquences de Phaeophyceae seraient des séquences d'actinobactéries, qui bien que ces séquences n'aient pas été caractérisées biochimiquement, sont ensuite racinées par d'autres séquences bactériennes caractérisées.

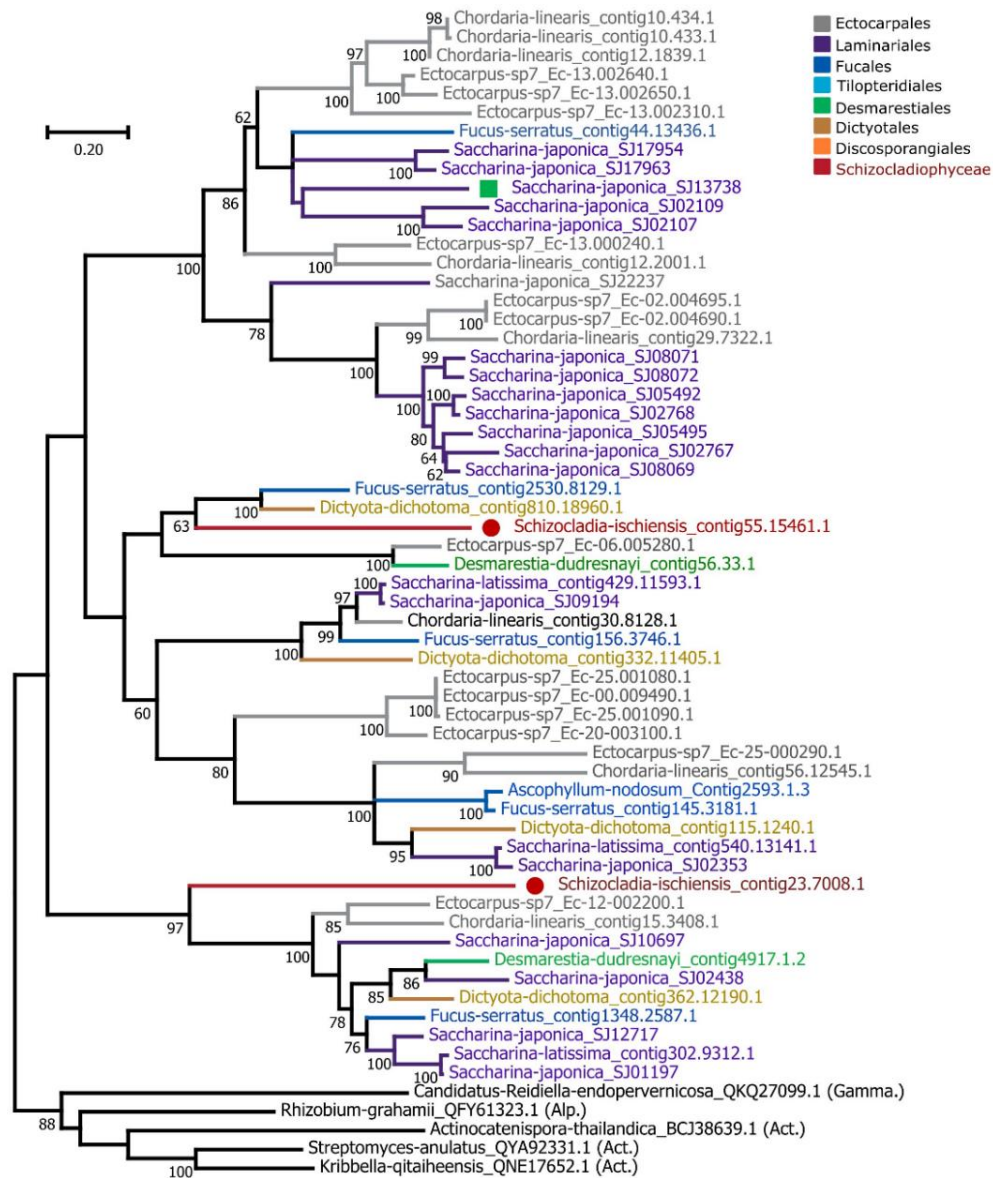
Les mêmes conclusions que pour la GMD s'appliquent ici, le (ou les gènes) de ManC5-E aurait été acquis chez l'ancêtre commun du groupe des Schizocladiphyceae et des Phaeophyceae, probablement par un HGT d'un gène bactérien, puis des événements de duplication seraient apparus dans les génomes d'algues faisant de cette famille, une famille multigénique conséquente.

### 3.3.2. Origine et évolution de la voie de dégradation de l'alginate

La voie de dégradation de l'alginate n'avait pas été décrite par Michel et al., (2010b). En effet, il n'était pas connu que les algues brunes étaient capables de dégrader l'alginate, avant les récentes découvertes d'activités lyases et DEHU-réductase chez les algues brunes (Inoue et al., 2019 ; Inoue & Ojima, 2021). Les polysaccharides lyases associées à la dégradation de l'alginate chez les algues brunes appartiennent à la famille des PL41. Nous avons identifié en moyenne 13 gènes de PL41 chez toutes les algues brunes étudiées (Figure II.3).

Il s'agit de la famille de CAZymes contenant le plus de représentant par génome, ce qui indique très certainement un rôle important de cette famille dans le métabolisme de l'alginate chez les algues brunes. Parmi les génomes des groupes sœurs analysées, des PL41 ont été identifiées chez *S. ischiensis*, avec 3 gènes référencés comme fragmentés, mais deux d'entre eux ont pu être inclus dans la phylogénie. La Figure II.21 montre que les PL41 de *S. ischiensis* et de Phaeophyceae forment 5 clades distincts. Les séquences de *S. ischiensis* sont positionnées de manière ancestrale pour certains de ces clades. La phylogénie montre que des duplications récentes semblent être apparues dans les ordres des Ectocarpales et des Laminariales. Les plus proches homologues des PL41 de Phaeophyceae proviennent de bactéries et de virus. Par exemple, pour la séquence d'*Ectocarpus* sp. 7 Ec-02\_004695.1, les séquences les plus proches proviennent du virus *Feldmannia irregularis virus*

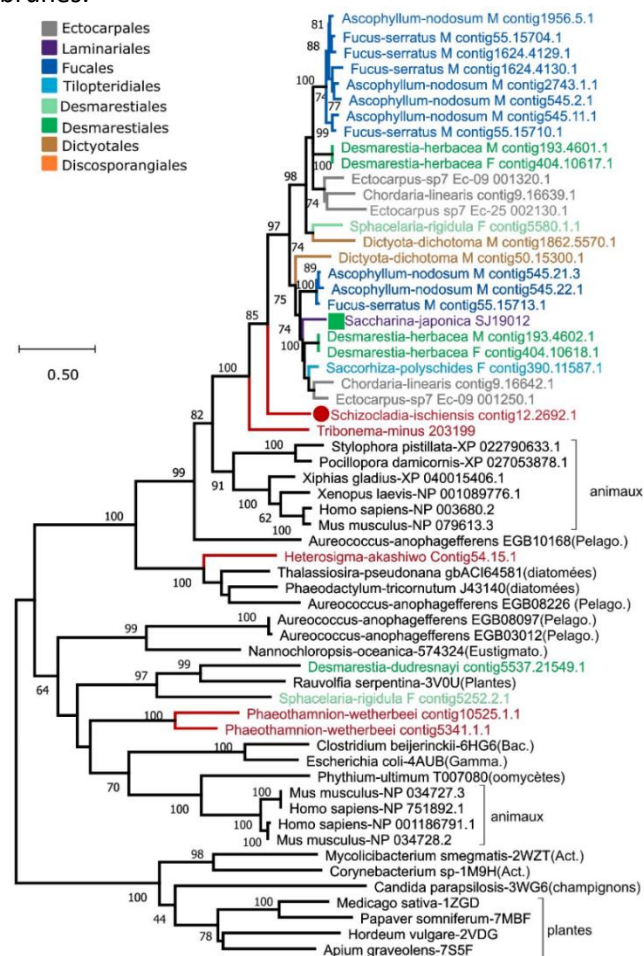
(YP\_009665643.1), de la gammaprotéobactérie *Hahella ganghwensis* (WP\_020409708.1) et de l'actinobactérie *Rhizobium grahamii* BG7 (QFY61323.1). Les taux d'identité entre ces séquences et celle d'*Ectocarpus* sp. 7 sont tous d'environ 40 %. À ce stade, nous pouvons dire que l'acquisition de PL41 chez l'ancêtre commun des Phaeophyceae et de leurs groupes sœurs de Schizocladiphyceae par HGT est possible, en revanche, nous ne pouvons avancer l'organisme à l'origine de cette acquisition.



**Figure II. 21. Arbre phylogénétique des alginates lyases de la famille PL41.** Le carré vert indique une séquence caractérisée biochimiquement. Les séquences de Phaeophyceae sont indiquées dans un code de couleur en relation avec leur taxonomie. Les séquences appartenant au groupe sœur des Schizocladiphyceae sont indiquées en rouge. Gamma. gammaprotéobactérie, Alp. alphaprotéobactérie, Act. actinobactéries.

L'étape suivante est la dégradation des produits issus de l'action des PL41. Inoue & Ojima, (2021), ont identifié et caractérisé une DEHU-réductase chez l'algue brune *Saccharina japonica* qui

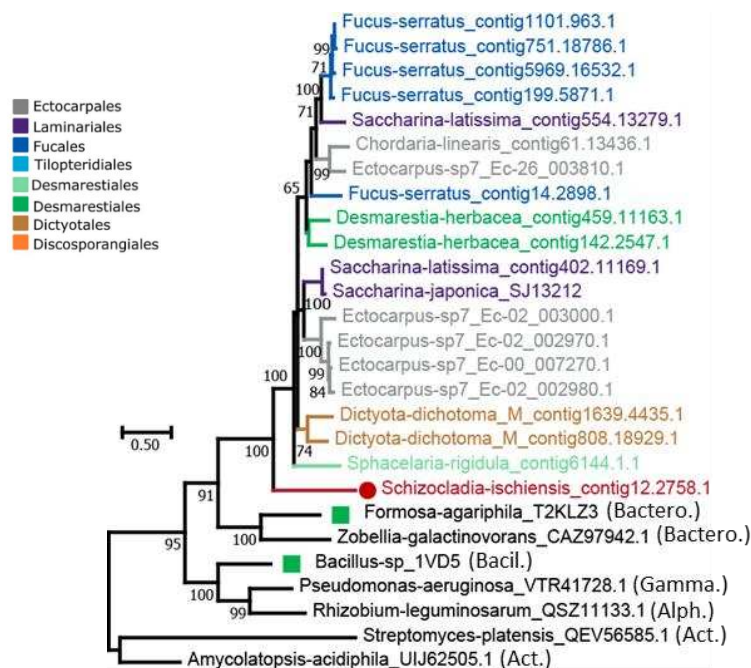
gène un 2-keto-3-deoxy-gluconate (KGD). Des homologues de cette enzyme sont retrouvés dans la majorité des Phaeophyceae ainsi que dans les groupes sœurs des Schizocladiphyceae et des Xanthophyceae. Ces dernières sont distantes de DEHU-réductases d'autres Ochrophyta (Raphidophyceae, diatomées, Eustigmatophyceae) et forment un clade distinct de leurs homologues retrouvés chez les métazoaires (Figure II.22). Cette enzyme, chez les algues brunes, aurait une origine eucaryotique. Les plus proches homologues caractérisés en dehors des Phaeophyceae, ayant une activité Aflatoxin B1 aldéhyde réductase 7 (superfamille AKR), peuvent agir sur plusieurs substrats (O'Connor et al., 1999). Par ailleurs, les enzymes impliquées dans la métabolisation du KGD tel que décrit chez les bactéries (Preiss & Ashwell, 1962) ou chez l'ormeau (Inoue et al., 2019) n'ont pas été identifiées chez les algues brunes.



**Figure II. 22. Arbres phylogénétiques des DEHU réductases, connues pour être impliquées dans la dégradation de l'alginate.** Les séquences appartenant aux groupes sœurs des Phaeophyceae sont indiquées en rouge. Le carré vert indique la séquence d'algue brune qui a été caractérisée biochimiquement. Bac. Bacillota, Gamma. gammaprotéobactérie, Alp. alphaprotéobactérie, Act. actinobactéries.

Une voie alternative de dégradation des oligoalginates produits par l'alginate lyase serait l'hydrolyse par une ou plusieurs GH. Les enzymes bactériennes caractérisées de la famille GH88 sont

connues pour agir sur des monosaccharides insaturés après l'action d'une PL sur des glycosaminoglycanes et des ulvanes (Hashimoto et al., 1999 ; Reisky et al., 2018). Ces enzymes ont été identifiées dans tous les ordres des Phaeophyceae étudiées dans le programme Phaeoexplorer, en moyenne 2 gènes sont dénombrés par génome. Un gène est également présent chez *S. ischiensis* (Figure II.23). La phylogénie de ces enzymes montre que les GH88 de Phaeophyceae et de leur groupe sœur des Schizocladiphyceae forme un clade. Les plus proches homologues bactériens appartiennent au phylum des *Bacteroidota*, dont la séquence caractérisée pour avoir un rôle dans la dégradation de l'ulvane est celle de *Formosa agariphila* M-2Alg 35-1<sup>T</sup> (Figure II.23). Tout comme les enzymes associées à la synthèse (GMD et ManC5-E) et à la dégradation (PL41) de l'alginate, les GH88 semblent avoir été acquis chez *S. ischiensis* par un HGT. Du fait que les GH88 agissent après l'action de PL et que la seule famille de PL chez les Phaeophyceae sont les PL41, les GH88 apparaissent comme des candidates pour l'hydrolyse des produits des PL41. De plus, la présence de cette famille uniquement dans le groupe sœur des Schizocladiphyceae, qui possède les autres enzymes du métabolisme de l'alginate, renforce l'hypothèse que cette famille pourrait participer à la voie de dégradation de l'alginate. La caractérisation biochimique de ces enzymes est nécessaire pour démontrer cette activité putative.



**Figure II. 23. Arbre phylogénétique des GH88.** Les séquences appartenant aux groupes sœurs des algues brunes sont indiquées en rouge. Le carré vert indique la séquence d'algue brune qui a été caractérisée biochimiquement. Bactero. Bacteroidota, Bacil. Bacillota, Gamma. gammaprotéobactérie, Alp. alphaprotéobactérie, Act. actinobactéries.

### 3.3.3. Conclusion sur l'origine et l'évolution du métabolisme de l'alginate chez les algues brunes

Comme nous l'avons montré dans cette étude, la voie de synthèse et de dégradation de l'alginate aurait été acquise chez l'ancêtre commun des Phaeophyceae et de leur groupe sœur les Schizocladiphyceae.

En dehors des algues brunes, la dégradation de l'alginate par des PL est essentiellement décrite chez des bactéries marines qui utilisent l'alginate d'algues brunes comme source de carbone grâce à des PL7 (Inoue et al., 2015 ; Thomas et al., 2013). D'autre part, des bactéries non marines des genres *Azotobacter* et *Pseudomonas* sont capables de produire de l'alginate et de le dégrader en utilisant des lyases des familles PL5 et PL7. Ces bactéries non marines n'utilisent pas nécessairement l'alginate comme source de carbone. La présence des deux voies de synthèses et de dégradation chez ces bactéries peut poser question. Plusieurs hypothèses avaient été avancées. Chez *Pseudomonas aeruginosa*, AlgL serait impliqué dans la régulation de la longueur des chaînes d'alginate accumulés au périplasme, dans une fonction plus globale de régulation osmotique (Gheorghita et al., 2022). Ces bactéries nous montrent que les voies de synthèse et de dégradation de l'alginate peuvent être présentes dans un même organisme.

L'acquisition sans doute conjointe des enzymes de synthèse et de dégradation a pu se produire chez l'ancêtre commun des Phaeophyceae et des Schizocladiphyceae. L'ensemble de ces gènes aurait été conservé au cours de l'évolution menant à l'intégration de l'alginate à la MEC des algues brunes. Les rôles sous-jacents de la voie de dégradation restent encore à définir. Chez les plantes, on retrouve également des PL dégradant un polymère de leur propre MEC, les pectines/pectate-lyases. Ces familles sont aussi multigéniques chez les plantes et seraient présentes dès leur origine (McCarthy et al., 2014). La dépolymérisation des pectines par ces enzymes peut permettre la maturation des fruits ainsi que la croissance et le développement de la plante (Wang et al., 2018), les oligopectines sont aussi impliquées dans de nombreux processus de signalisation cellulaire (Bethke et al., 2014 ; Wang et al., 2022). Chez les algues brunes, des rôles analogues pourraient être associés aux PL41, avec des rôles clés dans les processus développementaux et de croissance. De la même manière, une analogie entre le rôle des ManC5-E chez les Phaeophyceae et pectine méthylestérase (PME) a été émise (Fischl et al., 2016). En effet, les PME, qui constitue une famille multigénique chez les plantes, peuvent créer des blocs de pectine méthylée impactant leurs propriétés biochimiques, ce qui peut avoir des effets sur la rigidité de la paroi (Micheli, 2001). Les ManC5-E en agissant sur la distribution des blocs G des alginates, agissent également sur les



propriétés de la MEC des Phaeophyceae. Avec la mise en évidence de lyases chez les algues brunes, l'analogie aux PME est renforcée.

#### 3.4) *S. ischiensis* possède-t-elle une MEC typique des Phaeophyceae ?

La classe des Schizocladiphyceae est le groupe sœur le plus proche des Phaeophyceae. La MEC de *S. ischiensis* serait également composée d'alginate, en effet ceux-ci ont été détectés par immunomarquage (Chi et al., 1999 ; Kawai et al., 2003). La présence de ce polymère est cohérente avec notre étude *in silico* qui montre l'acquisition de l'ensemble de la voie de biosynthèse de l'alginate chez cet organisme. En ce qui concerne la présence de fucanes sulfatés, ils n'ont été ni caractérisés ni détectés chez *S. ischiensis*. En revanche, si notre hypothèse concernant les gènes candidats pour la synthèse des fucanes par les gènes de la famille GT23 est correcte, et sachant que des gènes homologues sont présents chez *S. ischiensis*, cela pourrait suggérer la présence de fucanes chez ce groupe sœur des Phaeophyceae. *S. ischiensis* pourrait donc contenir les deux polysaccharides majoritaires typiquement retrouvés dans la MEC des Phaeophyceae. Par ailleurs, la MEC des algues brunes contient également de la cellulose mais en faible quantité (1-8%), ce polysaccharide n'a pas été détecté chez *S. ischiensis* (Kawai et al., 2003). En revanche, chez cet organisme, des gènes homologues aux cellulose-synthases ont été identifiés dans les données génomiques et transcriptomique (Yamagishi et al., 2014). Ce polymère pourrait être soit faiblement synthétisé ou soit dans certaines conditions non identifiées. La composition de la MEC de la classe des Schizocladiphyceae pourrait être proche de celle décrite chez les Phaeophyceae, ce qui ne serait pas le cas dans les autres classes du phylum des Ochrophyta et plus largement des Straménopiles pour lesquels, les enzymes associées aux métabolismes des alginate et des fucanes ne seraient pas présentes. À noter qu'il avait été montré la présence d'alginate par immunomarquage chez les Xanthophyceae (Chi et al., 1999) et suggéré, mais non publié, chez les Phaeothamniophyceae (Kawai et al., 2003), des études supplémentaires d'identification et caractérisation des alginate dans ces lignées pourraient être nécessaires. Plus globalement, l'étude des enzymes du métabolisme des polysaccharides de la MEC a permis de montrer un nombre important d'évènements de duplication de gènes chez les Phaeophyceae par rapport à *S. ischiensis*. Notamment pour les gènes associés aux MPI/MPG mais également GMD, ManC5-E, PL41, GT23 et pour les ST où des clades semblent être apparus chez les algues brunes. Ces évènements ont pu conduire à une diversification des fonctions menant à la complexification des polysaccharides de type FSCP chez les algues brunes.

Une différence morphologique entre *S. ischiensis* et les Phaeophyceae est la présence de plasmodesmes qui sont des connexions cytoplasmiques entre les cellules. Cette structure est décrite

dans l'ordre des Discosporangiales, le plus basal des Phaeophyceae (Bringloe et al., 2020 ; Terauchi et al., 2012). Ces structures permettent la communication de cellule à cellule et peuvent avoir des rôles importants dans les mécanismes de coordination du développement, les réponses aux stress et la mise en place de la MEC (Knox & Benitez-Alfonso, 2014 ; Lee, 2014 ; Miras et al., 2022). Ce type de connexions est retrouvé chez tous les organismes multicellulaires (Bloemendal & Kück, 2013). Au cours de l'évolution ce trait est conjoint avec le développement d'une multicellularité complexe acquise de manière indépendante (communication de cellule à cellule). Cette caractéristique marque la complexification de la multicellularité chez les Phaeophyceae par rapport à l'ordre des Schizocladiphyceae.

Chez les plantes, les plasmodesmes sont structurés grâce aux interactions entre le RE, le cytoplasme, la membrane plasmique et la paroi. La mise en place de plasmodesmes nécessite une composition particulière de ces différents composants. Les composés qui varient majoritairement sont les protéines, les polysaccharides de paroi et les lipides membranaires (Li et al., 2021). L'évolution des composés de la MEC peut impacter la mise en place de plasmodesmes. L'obtention, chez les algues brunes, d'une capacité à synthétiser en abondance des polysaccharides de paroi, a pu s'accompagner par l'acquisition de nouvelles fonctions permettant la formation de plasmodesmes. L'acquisition de plasmodesmes a pu également conduire à une complexification de la MEC, des processus développementaux, des mécanismes de défenses par exemple, conduisant à des interactions cellulaires plus complexes donnant lieu à des organismes plus complexes.

#### 4) Conclusion

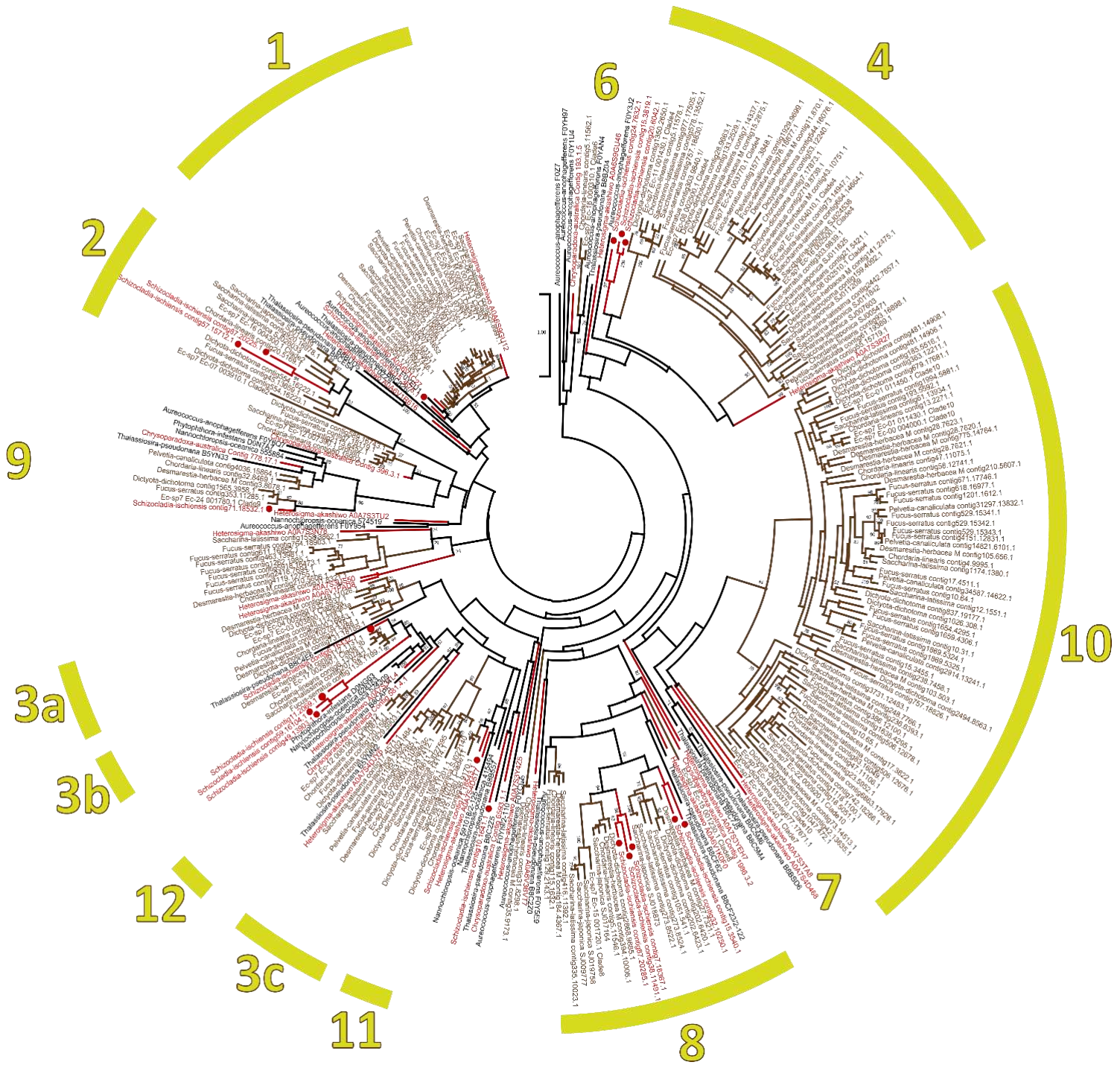
Ce travail a permis de mettre en évidence les familles de CAZymes conservées dans un nombre important de génomes d'algues brunes séquencées lors du programme Phaeoexplorer, grâce aux annotations expertes de l'équipe CAZy. La limite s'est située dans la qualité des prédictions des structures gènes auquel nous avons pu avoir accès, ce qui a donné lieu à un nombre important de gènes fragmentés. Nous avons pris en compte ces fragments lors de l'analyse du contenu global en CAZymes. Un travail pour l'amélioration de la prédiction des gènes des génomes de Phaeoexplorer a été réalisé pour les CAZymes. Ceci va nous permettre, pour les familles d'intérêts, d'obtenir des analyses de meilleure qualité et ainsi avoir des conclusions plus robustes quant aux histoires évolutives. Nous avons pu néanmoins proposer un certain nombre de gènes candidats pour nos voies métaboliques d'intérêt.

Les voies de synthèse et de dégradation des alginates seraient présentes chez l'ancêtre commun des Phaeophyceae et des Schizocladiphyceae. Concernant les fucanes, les faibles données

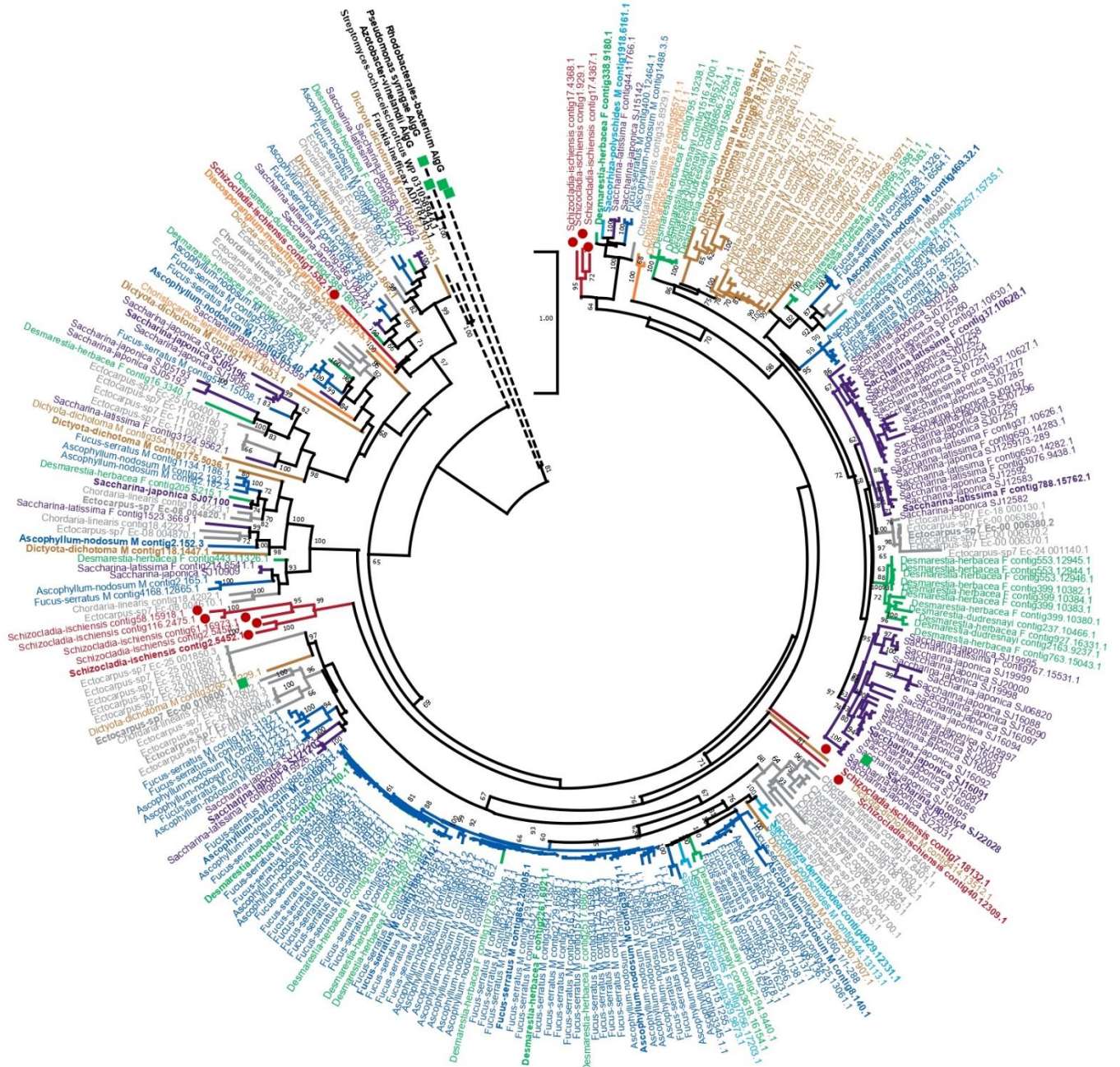
concernant la structure polysaccharidiques des composés de la MEC pour les groupes sœurs sont une limite quant à la corrélation avec les analyses génomiques. C'est une limite pour retracer l'histoire évolutive de ces polysaccharides.

Les gènes impliqués dans l'anabolisme de l'alginate auraient été acquis par transfert de gène horizontal. L'identification de GT impliquées dans la polymérisation de la chaîne d'alginate reste très hypothétique. L'origine des fucanes sulfatés serait quant à elle eucaryotique. Notre étude, nous a permis d'identifier des enzymes candidates pour les étapes de polymérisation de la chaîne de résidus fucose. Nous avons également identifié des enzymes qui seraient impliquées dans la sulfatation des FCSP. La validation fonctionnelle des enzymes codées par ces gènes reste à être réalisée pour confirmer, ou non, nos hypothèses.

Annexe 1. Arbre phylogénétique ouvert des ST de Straménopiles. (Pour la description se référer à la Figure II.15, qui présente le même arbre en version réduite.)



Annexe 2. Arbre phylogénétique ouvert des ManC5-E (Pour la description se référer à la Figure II.20, qui présente le même arbre en version réduite)





## **Chapitre III : Mise en place d'un enrichissement en microsomes**

## 1) Introduction

L'objectif des chapitres III et IV est d'aller au-delà des données de génomique et d'identifier les enzymes exprimées dans la cellule de façon constitutive, et potentiellement impliquées dans la biosynthèse de polysaccharides de la MEC des algues brunes. L'objectif initial était d'identifier et de localiser, au niveau cellulaire, des familles GT candidates pour certaines activités de synthèse des polysaccharides d'algues brunes. La démarche était déclinée en 3 étapes : isoler spécifiquement l'appareil de Golgi qui contient a priori la majorité des GT et notamment celles impliquées dans la synthèse des FCSP, réaliser des dosages d'activités GT sur ce compartiment, et coupler ces résultats à une analyse protéomique. Cependant, tout au long de mon doctorat, j'ai été confrontée à de nombreux défis, décrits dans les pages suivantes et résumés ainsi : 1) l'isolement de l'appareil de Golgi s'est avéré être un vrai challenge chez les algues brunes, du fait de la spécificité de ces modèles (parties 3.1, 3.3, 3.4), 2) la validation des fractions enrichies par l'utilisation de marqueurs conventionnels n'a pas toujours été possible (partie 3.1.5). De plus, le dosage d'activités GT sur des fractions complexes nécessite des équipements et consommables spécifiques. Face aux difficultés rencontrées, les objectifs initiaux ont été revus en se focalisant uniquement sur un enrichissement en microsomes contenant l'appareil de Golgi non purifié et l'analyse de son contenu protéique, les résultats seront présentés dans le Chapitre IV.

### 1.1) Difficultés pour obtenir un enrichissement en appareil de Golgi

Des méthodes d'isolement de l'appareil de Golgi ont été établies pour les animaux, les plantes terrestres mais aussi pour des levures (e.g. Forsmark et al., 2011 ; Sterling et al., 2001 ; Taylor et al., 1997) cependant elles nécessitent des adaptations spécifiques à chaque modèle biologique en prenant en compte leurs particularités structurelles et l'organisation subcellulaire. En particulier chez les plantes, où isoler l'appareil de Golgi constitue un défi technique en raison de sa proximité avec le RE (Boevink et al., 1998). Les principales méthodes d'isolement d'appareil de Golgi ont été développées à partir de tissus broyés ou de cellules en suspension. Les organites sont extraits de la cellule et séparés par différentes méthodes, principalement des centrifugations différentielles et/ou de gradients de densité. Ces gradients peuvent être continus ou discontinus, et ils peuvent être constitués de différentes substances dont le sucrose qui est largement utilisé.

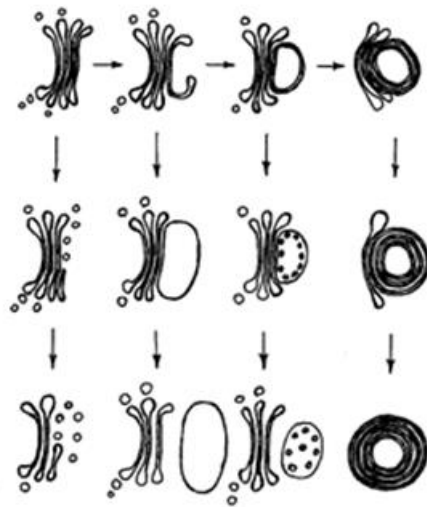
Les algues brunes sont issues d'une endosymbiose secondaire, ce qui implique qu'une partie de ces organites est entouré d'une membrane supplémentaire. Les chloroplastes sont entourés de quatre membranes, dont l'une est fortement liée au RE et forme le REC (voir Chapitre 1, Figure I.5). Ce nombre de membranes plus important peut rendre plus difficile le fractionnement des organites chez les algues brunes. Cependant, dans la littérature, on trouve 2 études anciennes issues du même laboratoire, qui



montrent l'isolement de l'appareil de Golgi chez *F. serratus* à partir soit d'apex (Evans & Coughlan, 1978) soit d'embryons (Callow et al., 1978). Ces études m'ont servie de références pour le développement méthodologique d'isolement subcellulaire chez les algues brunes.

### 1.2) Méthode de validation de l'enrichissement

L'isolement de l'appareil de Golgi nécessite de pouvoir valider son enrichissement, cette validation peut être réalisée à l'aide de techniques immunohistochimiques ciblant des protéines associées à l'appareil de Golgi, ainsi que par des tests enzymatiques spécifiques de ce compartiment. L'observation en MET permet également de confirmer visuellement l'enrichissement des fractions en un organe donné. Il est à noter qu'une fois extrait du compartiment cellulaire, l'appareil de Golgi peut adopter différentes formes, ce qui peut rendre son identification visuelle plus difficile (Morré & Mollenhauer, 1964) (Figure III.1). En général, plusieurs de ces marqueurs sont utilisés dans l'étape de validation, afin de s'assurer de la spécificité de l'enrichissement. Il est également essentiel de disposer de marqueurs pour les autres compartiments cellulaires afin de pouvoir détecter une éventuelle contamination croisée des fractions.



**Figure III. 1. Schématisation des différentes formes adoptées par l'appareil de Golgi après extraction.** En haut à droite l'appareil de Golgi dans sa forme observée classiquement en microscopie. Ces observations ont été réalisées sur une extraction d'appareil de Golgi provenant de cellules de plantes (oignons, racine de maïs) par Morré & Mollenhauer (1964).

Chez les algues brunes, (Evans & Coughlan, 1978) ont montré un enrichissement en appareil de Golgi à l'aide de tests enzymatiques nucléotides disphosphatases (NDPase) et dosage de lipides. Aucun marqueur anticorps spécifique n'a été utilisé dans la littérature pour identifier un enrichissement subcellulaire en appareil de Golgi chez les algues brunes. La validation d'une fraction enrichie en

appareil de Golgi chez les algues brunes est donc dépendante des marqueurs conventionnels utilisés chez d'autres eucaryotes et repose ainsi sur leur efficacité à reconnaître les compartiments cibles chez notre modèle.

### 1.3) Analyse des données de protéomique

L'utilisation de la protéomique comme méthode d'analyse d'une fraction subcellulaire pour un organisme nécessite d'avoir une bonne connaissance du protéome prédit de celui-ci. Dans le cas de ma thèse, les données de protéomique étaient tout d'abord interrogées contre des données transcriptomiques avant l'acquisition plus tardive de données génomiques. L'analyse protéomique d'organismes non conventionnels nécessite de mettre en place une méthodologie d'analyse. Tout d'abord, je me suis basée sur la comparaison des protéines identifiées dans mes fractions avec celles d'*Ectocarpus* sp. 7 (Ec. 32) qui fut la première algue brune avec un génome séquencé et annoté (Cock et al., 2010). J'ai pu utiliser l'outil statistique de prédiction de localisation subcellulaire adapté aux Straménopiles (HECTAR) (Gschloessl et al., 2008) qui permet d'avoir des prédictions principalement pour les fractions chloroplastiques et mitochondriales. Grâce à l'avancée du programme Phaeoexplorer en cours de thèse, les génomes des organismes modèles de mon étude ont été obtenus (*S. latissima* et *F. serratus*, voir prochain paragraphe), et j'ai ainsi pu affiner ma méthode d'analyse. Sur la base de comparaison des protéines d'algues brunes avec des protéines dont la localisation est connue et répertoriée dans la base de données Swiss-Prot, nous avons alors pu constituer une base de marqueurs des chloroplastes, des mitochondries et de l'appareil de Golgi. Par ailleurs, les données de protéomes obtenus dans le cadre de Phaeoexplorer sont associées à des termes de 'Gene Ontology' (GO). Ils se réfèrent à des localisations, des fonctions biologiques et des fonctions moléculaires. Ces termes GO ne sont pas attribués à l'ensemble des protéines (24 % du protéome de *S. latissima* et 40 % du protéome de *F. serratus*). Ces données permettent d'avoir des informations quant à leur localisation subcellulaire probable. J'ai pu inclure ces données de termes GO afin d'évaluer l'enrichissement de mes fractions subcellulaires. Aussi, j'ai intégré à mon analyse les annotations concernant les enzymes impliquées dans le métabolisme des carbohydrates (CAZymes, Chapitre II), la limite se situant dans la part importante de protéines 'inconnues' des protéomes d'algues brunes (e.g. pour le génome public d'*Ectocarpus* sp. 7 cela correspond à 40 % du protéome prédit).

### 1.4) Modèles d'études

Lors de cette étude de fractionnements subcellulaires, j'ai travaillé avec deux espèces d'algues brunes : *S. latissima* et *F. serratus*. Le choix de ne pas travailler avec *Ectocarpus* sp. 7 (Ec. 32) qui est le

modèle génétique principal chez les algues brunes, s'explique par le fait que c'est une algue de petite taille, et ainsi la biomasse nécessaire pour réaliser un enrichissement en appareil de Golgi aurait été difficilement accessible. Par ailleurs son contenu pariétal n'est que peu connu.

La laminaire *Saccharina latissima* est une algue de grande taille, pouvant atteindre jusqu'à 3 mètres au stade sporophyte. On la trouve principalement sur les côtes de la Manche et d'Atlantique. Cette espèce est également cultivée en raison de son intérêt économique et notamment pour ces polysaccharides de la MEC, en particulier pour ces alginates utilisées dans l'industrie des hydrocolloïdes, car comme d'autres laminaires, elle en est riche (Schiener et al., 2015 ; Zhang & Thomsen, 2019). Son cycle de vie est maîtrisé au laboratoire, et la phase de croissance sporophytique est réalisée dans des cylindres de 40 à 300 litres, permettant d'obtenir une biomasse satisfaisante d'algues cultivées dans des conditions relativement standardisées malgré les variations de l'eau de mer naturelle.

Quant aux algues de l'espèce *Fucus serratus*, elles ne sont pas cultivées en laboratoire, mais leur récolte est facilement accessible sur l'estran. Elles sont également retrouvées sur les côtes de la Manche et d'Atlantique. Pour cette espèce, des fécondations sont possibles en laboratoire, permettant ainsi de produire des embryons, ce stade développement ayant permis l'isolement de l'appareil de Golgi (Callow et al., 1978), néanmoins la saisonnalité de la période de reproduction constitue une limite pour ce modèle.

#### 1.5) Présentation du chapitre

Dans ce chapitre, je présente les différentes méthodologies testées pour l'isolement de l'appareil de Golgi chez les algues brunes (partie 3.1). En particulier, je présente la tentative de génération d'un marqueur de type anticorps et ciblant une protéine d'algue brune potentiellement localisée spécifiquement au Golgi (partie 3.2). Ensuite, je discute de l'apport de la MET et des analyses protéomiques pour l'isolement de microsomes chez *S. latissima* (partie 3.3). Dans un dernier point, je présente mes efforts pour reproduire un protocole d'isolement de l'appareil de Golgi chez *F. serratus* (partie 3.4).

## 2) Matériel et méthodes

### Matériel de départ

Les algues *S. latissima* adultes (entre 20 cm et 1,5 m) sont récoltées sur l'estran à Roscoff, France (GPS : 48.73 ; -3.98), ainsi que des individus de *F. serratus*. Également, de jeunes plantules de *S. latissima* (entre 5 et 15 cm) sont cultivées au laboratoire à 13 °C. Les individus sont cultivés en bouteilles de 1 L d'eau de mer stérilisée et complétée avec une solution de Provasoli puis en cylindres de 30/40 litres intégrés à un réseau d'eau de mer naturelle filtrée. Les cultures sont réalisées à 13 °C avec une durée d'éclairage 12 h de jour, 12h de nuit. Après rinçage à l'eau distillée, les tissus sont utilisés tels que pour réaliser les extractions.

### Tampons d'extraction

Le tampon d'extraction est adapté de Coughlan et Evans (1978) et est constitué de 0,1 M MES pH7 ; 1 mM MnCl<sub>2</sub> ; 1 mM MgCl<sub>2</sub> ; 1 M NaCl (tampon A), auquel sont ajoutés 3% de Dextran 200 000, 0,4% de Dextran 40 000, 1 mM DDT, et des anti-protéases (tampon B). Dans certains cas, un fixateur est rajouté au tampon B, tel que 0,5 % glutaraldéhyde ou 1 % de PFA.

### Préparation de fractions à partir de *Saccharina latissima*

Dans le cas de *S. latissima* l'extraction pour les 'microsomes totaux' est réalisée à partir de 100 g de tissus pour 250 mL de tampon B. Les algues sont broyées au hachoir électrique de cuisine (SEB 855306) 5 fois pendant 5 s puis filtrées (nylon 1 mm<sup>2</sup>), l'extrait est ensuite centrifugé 5 min à 700 g, puis le surnageant est prélevé et centrifugé pendant 10 min à 2500 g, l'opération est répétée à 20 000 g pendant 20 min et pour finir une ultracentrifugation est menée à 115 000 g durant 2 h. Les culots sont conservés et constituent les fractions 'chloroplastes' (culot 2500 g), 'mitochondries' (culot 20 000 g) et 'microsomes totaux' (culot 115 000 g). Dans la fraction microsomes 'totaux' on s'attend à retrouver l'appareil de Golgi, le RE, la membrane plasmique et d'autres vésicules. Ces culots ont été repris dans un tampon composé de 3,7 % de glutaraldéhyde, 10 mM de cacodylate de sodium et 1,7 % NaCl pour l'analyse en microscopie électronique à transmission (MET).

D'autres fractions sont préparées pour l'analyse en MET, elles sont réalisées à partir d'une extraction avec un tampon d'extraction contenant du fixateur (0,5 % de glutaraldéhyde ou 1 % de PFA). Le matériel de départ est constitué de petites *S. latissima* ou saccharines sauvages (60 g pour 150 ml de tampon d'extraction) pour l'extraction avec du glutaraldéhyde, et de saccharines cultivées (45 g pour 90 ml de tampon d'extraction) pour l'extraction avec du PFA. Les algues sont broyées au hachoir 5 x 5 s puis l'extrait obtenu est filtré (nylon 1 mm<sup>2</sup>) avant d'être centrifugé 5 min à 700 g puis le surnageant est prélevé et centrifugé durant 10 min à 2500 g, l'opération est répétée à 10 000 g puis le surnageant

est prélevé avant d'être déposé sur un coussin de sucrose à 1,8 M (18 ml d'extrait pour 4 ml de sucrose) et centrifugé 1h à 32 000 g. L'enrichissement sur coussin de sucrose, qui correspond à la fraction que j'appelle 'microsomes', est prélevée, diluée dans du tampon A (1:1), centrifugé à 18 000 g 20 min et repris dans un tampon avec 3,7 % de glutaraldéhyde, 10 mM de cacodylate de sodium, 1,7 % NaCl pour l'analyse en MET. Le même protocole d'extraction est suivi pour une analyse en protéomique d'une fraction de 'microsomes' sans et avec PFA. La préparation de la fraction avec du PFA pour l'analyse en protéomique a nécessité une étape supplémentaire d'incubation dans un tampon A supplémenté de glycine (concentration finale à 250 mM) pendant 15 min à 4 °C. La glycine a pour action de diminuer l'action de la PFA en entrant en compétition avec celle-ci. Les fractions obtenues et associées aux 'microsomes' sont culotées dans des tubes Eppendorf à 18 000 g pendant 20 min à 4 °C avant d'être analysées en protéomique.

Pour l'extraction au Potter et à l'Ultraturax, des jeunes *S. latissima* récoltées sur l'estran sont utilisées. Pour l'extraction avec le Potter, les algues sont préalablement coupées au scalpel (8 g dans 17 ml de tampon d'extraction). Pour l'extraction avec l'Ultraturax, une prédécoupe grossière avec une lame de rasoir est réalisée avant le broyage de 70 g dans 200 ml de tampon B. Le protocole comporte les mêmes étapes que le protocole précédent pour l'obtention de la fraction 'microsomes'. Les fractions 'microsomes' sont reprises dans un tampon composé de 3,7 % glutaraldéhyde, 10 mM sodium cacodylate, 1,7 % NaCl pour l'analyse en MET.

#### **Préparation de fraction de gradient discontinu de sucrose à partir de *Fucus serratus***

Dans le cas de la préparation de fractions de gradients discontinu de sucrose à partir d'une fraction 'microsomes', deux protocoles sont réalisés afin de comparer une extraction au hachoir et au mortier à partir de *F. serratus*. L'extraction au hachoir est réalisée à partir de 30 g d'apex de *F. serratus* qui sont, après les avoir rincés à l'eau distillée, prédécoupés plus finement au scalpel, puis broyés au hachoir électrique 6 x 5s. L'extraction au mortier est réalisée à partir de 30 g d'apex de *F. serratus* également rincés à l'eau distillée. Les étapes suivantes sont communes pour la préparation des fractions. L'extrait est filtré avec une toile de nylon (1 mm<sup>2</sup>) avant d'être centrifugé à 2000 g pendant 5 min, puis le surnageant est centrifugé à 10 000 g pendant 20 min. Les culots des centrifugations à 2000 g et 10 000 g sont conservés et correspondent respectivement aux fractions 'chloroplastes' et 'mitochondries'. Le dernier surnageant est déposé sur un coussin de sucrose à 1,7 M dans le tampon A (4 ml de solution à 1,7 M de sucrose pour 21 ml d'extrait) puis centrifugé à 32 000 g pendant 1 h 15. Le surnageant est retiré en laissant le pré-enrichissement sur le coussin de sucrose au-dessus duquel est ajouté 4 couches de 5 ml de tampon A contenant du sucrose respectivement à 1,5 M, 1,25 M, 1 M

et 0,5 M. Le gradient est centrifugé pendant 3 h à 100 000 *g*. Les interfaces entre les différentes couches du gradient sont prélevées : G1 (interface 0,5 M/1 M), G2 (interface 1 M/1,25 M), G3 (interface 1,25 M/1,5 M) et G4 (interface 1,5 M/1,6 M). Les interfaces prélevées sont diluées dans le tampon B (1 :2) puis centrifugées à 65 000 *g* pendant 20 min avant d'être congelées à -20°C.

### **Dosage des protéines**

Les protéines sont dosées suivant la méthode de Bradford (Bradford 1976) par mesure de l'absorbance à 595 nm. Une gamme étalon est réalisée au préalable avec de l'albumine de sérum bovin (BSA).

### **Gel SDS-page, western blot et immunodot**

Les échantillons sont dénaturés 5 min à 95°C en présence de bleu de charge (60 mM Tris-HCl pH6,8 ; 7,5 % (p/v) glycérol ; 1,5 % (p/v) dodécylsulfate de sodium (SDS) ; 0,02 % (p/v) Bleu de bromophenol) avant d'être déposés sur gel électrophorèse sur un gel de polyacrylamide SDS (SDS-PAGE) 12 % (Mini-PROTEAN® TGX, Bio-Rad). Après migration des protéines, les gels sont incubés dans une solution de bleu de Coomassie 0,1 % afin de détecter l'ensemble des protéines, et décolorés avec une solution à 20 % éthanol et 10 % acide acétique pour éliminer le bruit de fond. Dans le cas des western blots, les protéines après migration sont transférées du gel vers une membrane de nitrocellulose (Trans-Blot Turbo Mini 0,2 µm Nitrocellulose, Bio-Rad) grâce au système Trans-Blot Turbo Transfer (Bio-Rad). La membrane de nitrocellulose est révélée par immunodétection. Pour ce faire, elle est tout d'abord incubée dans du tampon phosphate salin (PBS) lait à 5 % pendant 30 min afin de bloquer les sites aspécifiques. Dans le cas où l'on cherche à détecter une protéine recombinante, la membrane est ensuite incubée avec l'anticorps anti-histidine couplé à la peroxydase de raifort (HRP) (Sigma-Aldrich) diluée au 1/5000 dans du PBS-lait 5 % pendant 1 h. Dans le cas où l'on cherche à détecter une protéine extraite d'algue brune, une incubation avec un anticorps primaire est tout d'abord réalisée avec un anticorps primaire commercial (1/1000) (Agrisera) ciblant les chloroplastes (AS03 037), les mitochondries (AS05 075, AS16 3976, AS04 053A), le RE (AS09 481), l'appareil de Golgi (AS08 325, AS08 327) dans du PBS-lait 5% pendant 1 h avant d'être incubé avec un anticorps secondaire anti-lapin couplé à l'HRP. Dans les deux cas, la membrane est ensuite lavée dans du PBS et la réaction d'électrochimiluminescence (ECL) est réalisée en utilisant les substrats du kit Clarity™ Western ECL (Bio-Rad). Les résultats sont visualisés avec un système Fusion FX (VILBER). Les immunodots sont réalisés en déposant 1 µL de fractions subcellulaires sur une membrane de nitrocellulose. La détection est réalisée de la même manière qu'en western blot.

### Dosage de la chlorophylle

Les échantillons sont additionnés d'acétone 80 % (2:8, v:v) puis centrifugés 10 min à 10 000 g. La chlorophylle est dosée dans le surnageant, l'absorbance est mesurée avec un spectrophotomètre. Un pic d'absorbance à 663 nm indique la présence de chlorophylle a.

### Mesure de l'activité uridine diphosphatase

L'uridine diphosphatase (UDPase) est une enzyme utilisée comme marqueur de l'appareil de Golgi chez les plantes (Ray et al., 1969). Son activité est mesurée par une méthode de dosage du phosphate libéré. Les échantillons sont incubés 1 h à température ambiante en présence de 0,25 mM d'UDP dans un tampon à 60 mM MES pH7, 6 mM MgSO<sub>4</sub>, 0,03 % Triton (inspiré de Zeng et al., 2017). Après incubation, le phosphate libre est révélé avec une solution de vert de Malachite (MAK307, Sigma-Aldrich). L'absorbance est mesurée à 620 nm et convertie en quantité de phosphate libre grâce à la gamme étalon (0 à 20 nmol de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>). Un contrôle négatif d'activité enzymatique est réalisé systématiquement à partir d'échantillons dénaturés à 98 °C pendant 10 min. Un contrôle négatif sans UDP est également réalisé lorsque la quantité de matériel le permet.

### Immunohistochimie et microscopie électronique à transmission

Les immunohistochimies et observations en microscopie électronique sont réalisées par Sophie Le Panse de la plateforme d'imagerie Merimage de la Station Biologique de Roscoff, à partir de coupes de tissus de *S. latissima*. Trois des anticorps commerciaux de chez Agrisera, anti-ribulose-1,5 bisphosphate carboxylase/oxygénase (RbcL) (AS03 037), anti-sérine hydroxymethyltransferase (SHMT) (AS16 3976) et anti-ADP Ribosylation Facteur de type I (ARF1) (AS08 327) sont utilisés pour vérifier leur capacité à détecter les organites ciblés chez l'algue brune, soit les chloroplastes, les mitochondries et l'appareil de Golgi, respectivement. Brièvement, une étape de blocage du tissu est réalisée avec 1% de BSA pendant 15 min. Les tissus sont incubés sur la nuit à 4°C avec les anticorps primaires dilués au 1/100 (anti-ARF1, anti-RbcL) et au 1/1000 (anti-SHMT) dans un tampon phosphate 0,1 M et 1 % BSA. Les coupes sont rincées dans un tampon phosphate 0,1 M, 0,1 % BSA puis incubées avec un anticorps secondaire couplé à l'or (anti-lapin, Cliniscience) avec des dilutions au 1/20 et 1/50 dans du tampon phosphate 0,1 M, 1 % BSA pendant 1h. Après rinçage dans un tampon phosphate 0,1 M puis à l'eau, une étape de coloration est réalisée à l'acétate d'uranyle et au plomb. L'observation des échantillons est faite en MET. Le même protocole est suivi pour l'anticorps anti-Rab6 dont la production est décrite dans les sections suivantes.

Des images en MET de fractions subcellulaires sont aussi réalisées. Les échantillons sont tout d'abord fixés dans un tampon de 3,7 %, glutaraldéhyde, 0,4 M sodium cacodylate, 1,7 % NaCl, pendant 1 nuit.

Ensuite les échantillons sont rincés 3 fois dans un tampon constitué de 0,4 M sodium cacodylate, 1,7 % NaCl puis incubé dans ce même tampon additionné de 1% de tétr oxyde d'osmium OsO<sub>4</sub>. Après rinçage dans ce même tampon sans OsO<sub>4</sub>, les échantillons sont déshydratés à l'alcool en plusieurs étapes progressives en termes de concentration d'alcool (30 %, 50 %, 70 %, 90 % et 100 %). Ils sont finalement inclus dans de l'oxyde de propylène et de l'Epon. L'inclusion et la polymérisation sont réalisées dans des capsules BEEMS<sup>®</sup> 2 jours à 60 °C. Puis les coupes sont contrastées à l'acétate d'uranyle et au plomb avant d'être observée en MET.

### **Production et purification Rab6**

L'ADNc pleine longueur de *EsRab6* (1750 pb) (Ec-23\_001190.1) a été isolé à partir d'une banque d'ADNc de la souche Ec32 d'*Ectocarpus* sp. 7, contenus dans des plasmides pDONR222. La séquence a ensuite été intégrée dans un plasmide d'expression bactérienne (pFO4, modifié du pET15 de Novagen) qui possède un gène de résistance à l'ampicilline et codant une étiquette poly-histidine en N-terminal. Pour ce faire, le plasmide est digéré avec les enzymes BamH1 et EcoR1 puis déphosphorylé. D'autre part, les inserts comportant la séquence de *EsRab6* sont préparés par PCR puis digérés par les enzymes BamH1 et EcoR1. Les amorces utilisées sont pour l'amorce sens : 5'-TTTTTGGATCCGCACAAGCGGGAGAAAATGGCG-3' et pour l'amorce antisens : 5'-AAAAAGAATTCTTAGCACGCGCACGTCTCGCCG-3'. Les inserts et plasmides digérés sont purifiés (kit Qiaquick PCR purification, Qiagen) et dosés au Nanodrop. La ligation est réalisée avec une ligase (T4 DNA, BioLabs) avec une concentration en insert environ 5 fois plus importante que le vecteur. Le produit de ligation est ensuite ingéré par électroporation par des bactéries de clonage *E. coli* DH5 $\alpha$ . L'électroporation est réalisée avec 1  $\mu$ l de plasmide à 10 ng/mL et 50  $\mu$ l de cellules électrocompétentes. Après l'impulsion électrique avec un électroporateur (MicroPulser Electroporator), 1 mL de LB est ajouté, les cellules sont incubées pendant 1 h à 37°C puis 50  $\mu$ l de ce mélange sont étalés sur un milieu solide sélectif et cultivés pendant la nuit. La transformation est validée par une PCR sur colonie et un séquençage. Le plasmide pFO4 contenant la séquence *EsRab6* est ensuite ingéré par électroporation par une souche *E. coli* de type Origami 2 (DE3) permettant la surexpression protéique. La taille attendue de la protéine est de 25 kDa.

Les bactéries sont cultivées en milieu auto-inductible ZYP à 20°C sous agitation (200 ml et 5 L) avec de l'ampicilline (25  $\mu$ g/mL). Après 60 h les cultures sont centrifugées 20 min à 5000 *g*, afin d'obtenir un culot bactérien. Le culot est repris dans un tampon à 40 mM imidazole, 25 mM Tris-HCl pH7,5, 250 mM NaCl. Le contenu intracellulaire est libéré par la lyse des cellules avec une presse de French. Les fractions solubles et insolubles sont récupérées après une centrifugation à 12 000 *g* pendant 20 min.



La purification est réalisée sur colonne HisTrap 5 mL préalablement chargée avec 0,1 M de NiSO<sub>4</sub> et à l'aide d'un système de type chromatographie liquide rapide des protéines (Akta Prime). Après avoir chargé 50 mL de la fraction soluble qui correspond au surnageant d'une centrifugation à 12 000 g filtré à 0,2 µm, les protéines sont éluées de la colonne à l'aide d'un gradient linéaire d'imidazole (40 mM - 500 M). Des fractions de 1 ml sont collectées et analysées en gel-SDS page et western blot avant de regrouper les fractions où la protéine est majoritairement détectée. Les sels ainsi que l'imidazole sont éliminés à l'aide d'une dialyse dans un tampon phosphate salin (PBS). Une chromatographie d'exclusion de taille est réalisée afin d'éliminer au maximum les protéines contaminantes. L'élution est réalisée dans un tampon PBS à pH 7,4. La quantité de protéines présente dans l'échantillon est dosée par la méthode de Bradford. Une partie est lyophilisée pour produire des anticorps polyclonaux et le reste est conservé à -20°C. La purification a été réalisée en période de restriction dû au COVID-19, nous sommes donc satisfaits d'un niveau de purification convenable mais qui aurait pu être amélioré.

#### **Production et tests de validation des anticorps**

Des anticorps polyclonaux contre la protéine *EsRab6* sont commandés à la société Eurogentec. L'immunisation est réalisée avec un programme de 28 jours chez un lapin, comportant 4 injections (avec au minimum 100 µg de protéine Rab6 dans 500 µL injecté).

La validation de l'affinité des anticorps pour la protéine recombinante Rab6 a été réalisée par la méthode ELISA par la société Eurogentec. Nous avons revalidé ceux-ci à la réception des anticorps. Les tests ELISA sont réalisés dans des plaques 96 puits à fond plat (Maxisorp, Nunc). Les protéines recombinantes Rab6 sont déposées dans la plaque à une concentration de 5 µg/ml sur la nuit à 4°C. Un premier blocage dans du PBS-lait (5%) est réalisé pendant 1 h. Après un lavage à l'eau, le sérum contenant les anticorps anti-Rab6 et le pré-sérum (avant immunisation, contrôle négatif) sont testés en 5 dilutions en série (1:25) dans du PBS-lait (5 % de lait) pendant 1h. Après un lavage à l'eau, une incubation est réalisée avec un anticorps secondaire anti-lapin couplé à l'anti-HRP dans du PBS-lait pendant 1 h (dilution 1/1700). La révélation colorimétrique est réalisée avec une solution de 0,1 M sodium acétate, 0,1 mg/ml tétraméthyl benzidine et 0,006 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (v:v). Après 5 min d'incubation, la réaction est stoppée avec 30 µl/puit de 2,5 M d'acide sulfurique. Une lecture d'absorbance est réalisée à 450 nm.

Les anticorps anti-*EsRab6* présents dans le sérum du lapin immunisé sont également testés en western blot et en MET. Le western blot est réalisé de la même manière que décrit dans la section 'Gel SDS-page, western blot et immunodot' à partir de 0,25 µg et 0,5 µg de Rab6 et incubé avec les anticorps anti-Rab6 dilué au 1 :100. L'immunohistochimie est réalisée de la même manière que décrit dans la

section 'Microscopie électronique et immunohistochimie', plusieurs dilutions des anticorps anti-Rab6 ont été testées (1:100 ; 1 :500, 1 :1000, 1 :2000).

### Analyse protéomique

Les échantillons sont envoyés pour analyse à la plateforme Protim (Université de Rennes), sous la forme de culots d'organites. Les fractions associées aux 'microsomes' obtenues à partir de *S. latissima* sont culotées dans des tubes Eppendorf à 18 000 g pendant 20 min à 4 °C. Les fractions de gradients issues d'une extraction à partir de *F. serratus* sont centrifugées dans des tubes d'ultracentrifugeuse à 70 000 g pendant 30 min. Les culots sont directement envoyés en analyse. Les culots sont préparés pour l'analyse protéomique avec le kit PreOmics IST-BCT. Une 1<sup>ère</sup> étape de lyse de 10 minutes à 95°C est effectuée. En cas de présence de PFA dans l'échantillon, le temps de lyse est augmenté à 1h. Une précipitation des protéines à l'acétone est ensuite réalisée afin d'éliminer d'éventuels contaminants et débris de membranes pouvant perturber la suite de la préparation ainsi que l'analyse des échantillons. Après ces deux premières étapes, les échantillons sont préparés en suivant les indications du fournisseur du kit PreOmics. Brièvement, les échantillons sont lysés, réduits, alkylés puis digérés à la trypsine pendant 3 h à 37°C. Les peptides de digestion sont ensuite dessalés. Au cours du dessalage, une étape de lavage à l'aide d'un tampon adapté aux tissus végétaux est ajoutée. Une chromatographie en phase inverse couplée au spectromètre de masse timsTOF Pro (Bruker), est réalisée afin d'améliorer la séparation des peptides, ce qui facilite l'analyse en spectrométrie de masse de type '*electrospray ionization quadrupole time-of-flight*' (ESI Q-TOF). Les protéines sont identifiées en interrogeant des banques de données contenant les séquences protéiques prédites de *S. latissima* ou *F. serratus* à l'aide du logiciel Mascot (Mascot server v2.6.2 ; <http://www.matrixscience.com>) en utilisant les paramètres suivant : trypsine avec un défaut de coupure autorisé ; tolérance de masse pour les MS et MS/MS fixée à 15 ppm et 0,05 Da respectivement ; modifications fixes : carbamidométhylation des cystéines et modifications variables : oxydation des méthionines. Les séquences protéiques ont été prédites à partir des séquences génomiques issues du programme Phaeoexplorer. L'identification des protéines est ensuite validée à l'aide du logiciel Proline Studio (v2.2) (Bouyssié et al., 2020) avec un rang peptidique = 1, un FDR (*False Discovery Rate*) de 1% sur le score au niveau des correspondances spectres/peptides (*Peptide-Spectrum Matche*, PSM).

### Analyse bioinformatique des données de protéomique

Les protéines identifiées en analyses protéomiques sont annotées grâce aux données associées aux génomes de *S. latissima* et de *F. serratus*. Ces annotations ont été réalisées dans le cadre du programme Phaeoexplorer, elles correspondent à l'attribution de numéros associés à la base de

données 'Evolutionary Gene and Ortholog Group (EGGNOG) (Huerta-Cepas et al., 2019), qui fournit des annotations fonctionnelles pour les gènes et les protéines en se basant sur des informations évolutives, de termes de 'Gene Ontology' (GO). L'analyse d'enrichissement en termes GO par rapport au protéome total est réalisé grâce à la fonction ClusterProfiler (R studio). Également, l'analyse BLAST des protéines de *S. latissima* et *F. serratus* est menée contre la base de données Swiss-Prot, en utilisant comme critère de sélection une couverture de 50 % minimum. Le meilleur hit est retenu et associé ensuite à une localisation cellulaire lorsque celle-ci est référencée dans Swiss-Prot pour les compartiments 'chloroplastes', 'mitochondries' et 'appareil de Golgi'. Plus spécifiquement, les CAZymes et sulfotransférases annotées pour les génomes de *S. latissima* et *F. serratus* sont identifiées.

### 3) Résultats et discussion

#### 3.1) Identification d'une méthodologie générale

Dans cette partie, j'expose les différentes étapes sur lesquelles j'ai travaillé afin de mettre en place une méthode pour réaliser et valider un fractionnement subcellulaire chez les algues brunes. La fraction principalement ciblée est celle enrichie en appareil de Golgi, lieu présumé de la majorité des activités de synthèse de polysaccharides. Mon travail s'est concentré sur l'optimisation de cinq aspects clés (Figure III.2) : le matériel de départ, la méthode d'extraction, le tampon d'extraction, le fractionnement et les méthodes de validation des fractions. Ces éléments sont étroitement interconnectés, ce qui implique que chaque nouvelle série d'extractions nécessite l'utilisation de matériel frais pour maintenir l'intégrité des organites et des activités enzymatiques associées. Par conséquent, chaque nouveau test impliquait de reprendre le protocole dans sa totalité. J'aborde ici les différentes approches que j'ai explorées, en mettant en lumière les difficultés rencontrées ainsi que les améliorations apportées.

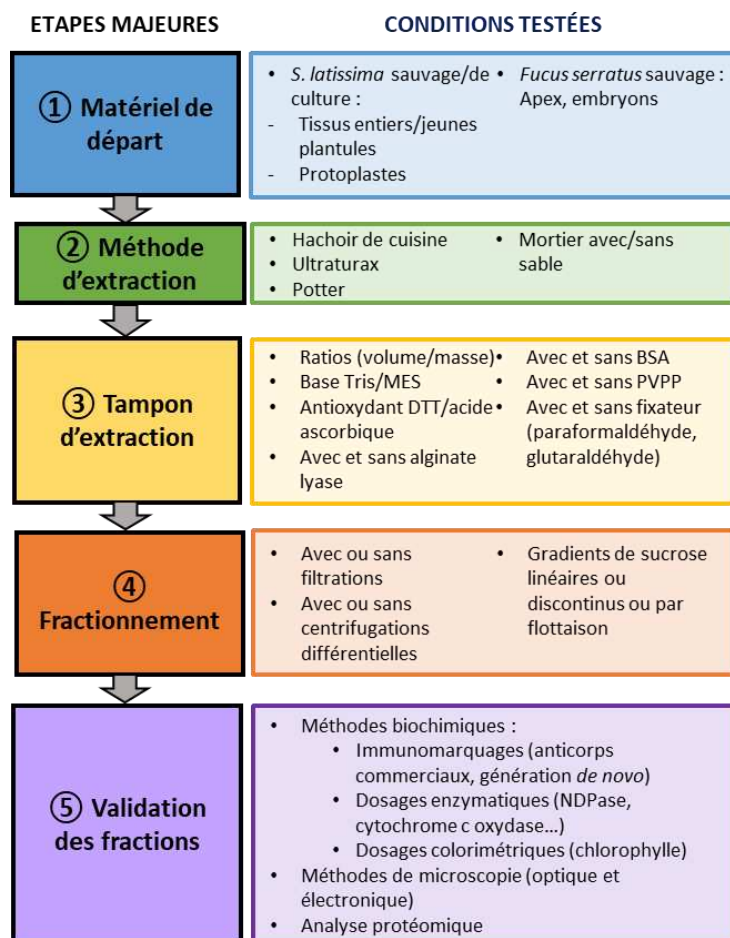


Figure III. 2. Schéma résumant les étapes clés et les conditions testées pour l'isolement d'organites d'algues brunes.

### 3.1.1) Matériel de départ

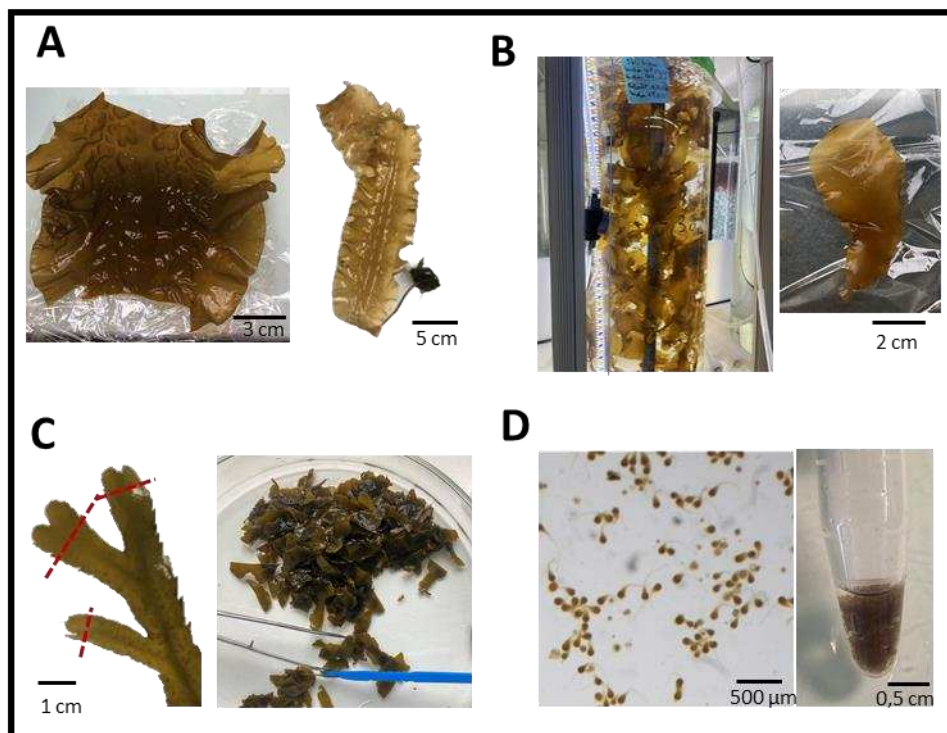
Tout au long de l'optimisation de la méthode de fractionnement subcellulaire, j'ai testé plusieurs espèces et stades de développement comme matériel de départ. Les deux espèces d'algues brunes étaient *S. latissima* et *F. serratus*. À noter qu'une quantité minimum de matériel de départ est nécessaire aux expérimentations (au minimum 30 g par extraction).

J'ai commencé par travailler avec *S. latissima* que nous récoltions à pied sur l'estran à Roscoff lors d'épisodes de grandes marées (Figure III.3.A). Le problème était la variabilité environnementale générée par ce type de récolte. En effet, il est difficile de récolter des individus semblables d'une expérience à l'autre en termes d'âge ou de localisation. J'ai pu constater lors d'extractions estivales, qu'une part importante d'alginate était relarguée lors des extractions. Ceci entraînait une viscosité importante de l'échantillon pouvant impacter la séparation des organites qui étaient englués dans ce gel d'alginate. Par la suite, j'ai focalisé ma récolte sur de jeunes individus qui sont a priori moins riches en alginates (Figure III.3.A, image de droite), j'ai pu constater une amélioration sur ce point. Cependant, il n'est pas toujours possible de trouver de jeunes individus tout au long de l'année. Les limites de la récolte dues aux variations saisonnières, et afin de limiter le prélèvement de la ressource, nous ont fait privilégier le développement de la culture en laboratoire. La culture en cylindre de 40 litres alimentées en eau de mer filtrée a permis d'obtenir une quantité satisfaisante d'individus de petite taille (entre 5 et 10 cm) dans des conditions standardisées (Figure III.3.B). Nous avons également tenté une extraction à partir de protoplastes générés au laboratoire. Mais au vu du temps nécessaire pour les produire (environ 3 jours) et de la difficulté à obtenir du matériel (viabilité et biomasse sommaires), cette option a été abandonnée. Elle aurait été incompatible avec toutes les autres optimisations à mener en parallèle.

L'autre algue que j'ai utilisée est *F. serratus* que je récoltais sur l'estran. C'est avec cette espèce qu'a été produit le premier enrichissement en appareil de Golgi d'algues brunes à partir d'apex (Evans & Coughlan, 1978) et d'embryons (Callow et al., 1978). Ces deux types de matériel de départ ont été utilisés afin de reproduire les protocoles de ces articles. L'apex correspond chez cette algue à la zone de croissance (Figure III.3.C). Quant aux embryons, ils peuvent être facilement générés au laboratoire après récolte d'individus mâles et femelles matures. La fécondation est réalisée au laboratoire et les zygotes se développent librement dans l'eau de mer et de façon relativement synchrone. Ce matériel de départ permet d'avoir un organisme en pleine croissance, dont la MEC et les polysaccharides sont en train de se mettre en place, donc avec potentiellement des cellules riches en appareil de Golgi exprimant nos GT cibles (Figure III.3.D). Les parois sont également encore peu développées donc la richesse en alginates est moindre, limitant l'impact négatif du gel sur l'extraction. En revanche, la limite

de biomasse obtenue et la période de reproduction saisonnière de *F. serratus*, posent un vrai problème d'approvisionnement et n'en font pas un modèle idéal pour mon étude.

En conclusion de cette analyse, j'ai favorisé des individus ou zones en forte croissance pour lesquels nous arrivions à avoir une biomasse importante et qui théoriquement contiennent une activité de biosynthèse de polysaccharides importante, soit les jeunes saccharines de culture et les apex de *F. serratus*.



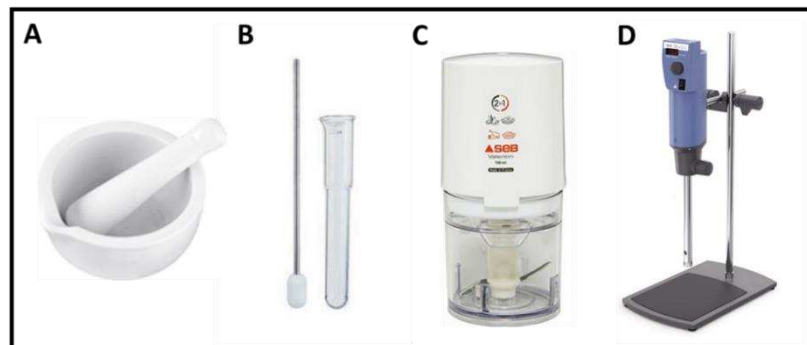
**Figure III. 3. Les différents types de matériel de départ testés. A)** *S. latissima* récoltées sur l'estran, partie d'un individu adulte (3 m) (à gauche) et jeune individu (à droite), **B)** culture de *S. latissima*, à gauche image d'un cylindre de 40 L, à droite individu de ~6 cm, **C)** apex de *F. serratus*, avant (à gauche) et après (à droite) découpe, **D)** Embryons 10 jours (à gauche) et visualisation de la biomasse obtenue en tube Eppendorf.

### 3.1.2) Méthode de broyage

Les principaux enjeux de la méthode d'extraction d'organites résident à la fois dans la quantité extraite et la durée d'extraction. La quantité doit être suffisante pour permettre la détection d'un enrichissement, tout en préservant l'intégrité des organites afin d'assurer leur séparation, et le temps d'extraction doit être minimal, sans surchauffe, pour préserver les activités enzymatiques. Dans le but de prendre en compte au mieux ces critères, j'ai comparé l'utilisation de méthodes d'extraction 'douces', telles que le mortier ou le Potter (Figure III.4.A, B), avec des méthodes plus rapides, permettant d'extraire une plus grande quantité de matériel, telles que le hachoir électrique et l'Ultraturax (Figure III.4.B, C). J'ai également fait des tests avec un pilon, un mortier et du sable de

Fontainebleau. L'extrait était plus visqueux avec du le sable que l'extraction sans celui-ci, dû probablement à un relargage plus important d'alginate. Je n'ai donc pas gardé cette méthode.

Une analyse plus détaillée de la comparaison des méthodes est effectuée en utilisant des images en MET pour les extractions faites à partir de *S. latissima*, ces résultats sont présentés dans la partie 3.3. De plus, une étude comparative basée sur des validations biochimiques et des analyses protéomiques a été menée entre une extraction au mortier et une extraction au hachoir électrique à partir de *F. serratus*, les résultats sont exposés et discutés dans la partie 3.4.



**Figure III. 4. Les différentes méthodes de broyage testées. A) Pilon et mortier, B) Potter, C) hachoir électrique, D) Ultraturax.**

### 3.1.3) Le tampon d'extraction

Le choix du tampon d'extraction est important pour préserver l'intégrité des organites. J'ai principalement utilisé un tampon inspiré de celui qui avait été validé pour l'extraction de l'appareil de Golgi chez *F. serratus* selon le protocole de Evans & Coughlan, (1978). Les premiers tests réalisés avec ce tampon n'ont pas apporté de résultats satisfaisants, c'est pourquoi j'ai testé l'impact de différents composés sur mes résultats. Lors des différents tests mis en place, j'ai évalué les effets de l'utilisation de polyvinylpyrrolidone (PVPP), qui permet de soustraire les polyphénols de l'extrait. L'utilisation du PVPP semblait impacter la détection des activités enzymatiques utilisées pour valider les enrichissements (cytochrome c oxydase, UDPase). Je n'ai donc pas gardé ce composé dans le tampon d'extraction. De plus, j'ai également testé l'ajout de fixateurs en faible quantité afin de garantir un meilleur maintien de l'intégrité des organites et, par conséquent, leur séparation. Des tests avec du paraformaldéhyde (PFA) et du glutaraldéhyde ont été réalisés. Les résultats obtenus seront discutés dans la partie 3.3 de ce chapitre.

Parallèlement, j'ai aussi effectué des tests avec un tampon inspiré du protocole d'extraction des chloroplastes de l'algue brune *Laminaria digitata*, comme décrit par Strbac et al., (1994). J'ai principalement employé ce tampon en début de thèse, qui m'a donné parfois des résultats encourageants, mais que je n'ai pu reproduire. J'ai finalement recentré mes efforts sur l'utilisation du

premier tampon, car, malgré des premières tentatives infructueuses, il est mentionné dans la littérature qu'il permet l'obtention d'un enrichissement satisfaisant en appareil de Golgi d'algue brune (Evans & Coughlan, 1978).

#### 3.1.4) Fractionnement

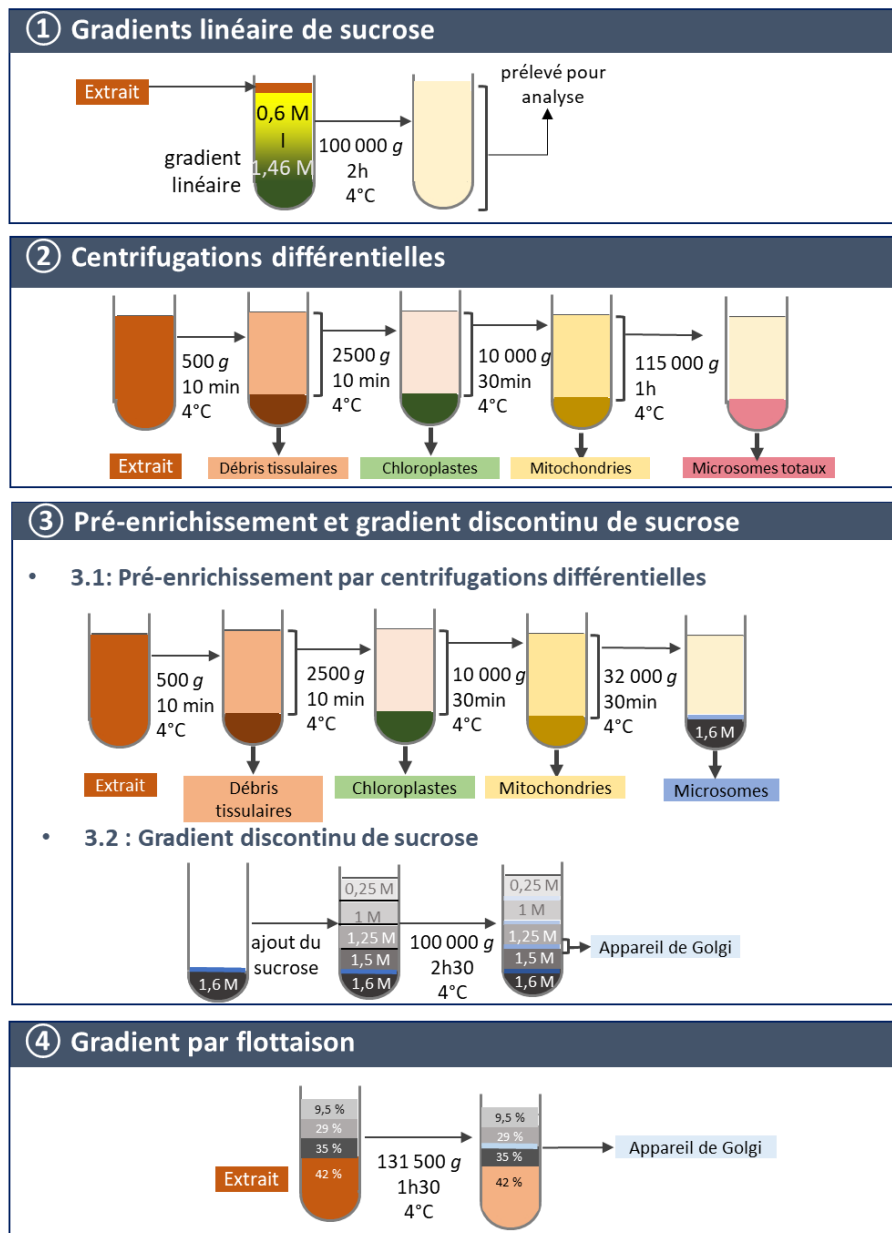
Pour fractionner l'extrait total en différents enrichissements d'organites, les méthodes les plus couramment utilisées sont les centrifugations différentielles et les gradients de densité. Dans mon cas, j'ai basé mes approches sur plusieurs protocoles tirés de la littérature, employant des méthodes de gradients continus (Siegrist et al., 1979), de centrifugations différentielles couplées ou non à des gradients discontinus (Evans & Coughlan, 1978) et des gradients par flottaison (Okekeogbu et al., 2019). Un schéma de ces différentes méthodes est présenté en Figure III.5.

La méthode que j'ai principalement explorée est l'utilisation de centrifugations différentielles couplées ou non à un gradient de sucrose (points 3.2 et 3.3, Figure III.5). Par cette méthode, je réalise des pré-enrichissements en chloroplastes et en mitochondries. Ceci m'a permis de valider l'utilisation de marqueurs associés à ces compartiments, et ainsi de pouvoir évaluer la contamination de la fraction Golgienne par ces autres organites. Concernant les centrifugations réalisées, elles sont de : 1) 500 *g* pour culoter les débris tissulaires, les cellules entières et les noyaux, 2) 2 500 *g* pour culoter les chloroplastes, et 3) 10 000 *g* pour culoter les mitochondries. Ces étapes permettent d'éliminer une grande partie des organites autre que l'appareil de Golgi, avant de se focaliser sur l'isolement de ce compartiment. Le risque est que si elles sont trop longues ou qu'elles ont une vitesse trop importante, elles peuvent entraîner une partie de l'appareil de Golgi dans les premiers culots. Pour les fractions chloroplastes et mitochondries, j'ai travaillé à adapter leur enrichissement pour valider mes marqueurs. En revanche, j'ai investi peu de temps à l'isolement de ces compartiments avec un niveau de pureté élevé, pour me focaliser plus spécifiquement sur l'isolement de l'appareil de Golgi.

Pour l'enrichissement en appareil de Golgi, j'ai principalement travaillé sur une fraction obtenue par centrifugation à haute vitesse (115 000 *g*) que j'appelle 'microsomes totaux' (point 2, Figure 6) qui théoriquement comporte l'ensemble des microsomes, c'est-à-dire l'appareil de Golgi, du RE, des vésicules de transport, la membrane plasmique. Également, j'ai travaillé sur une fraction réalisée sur un coussin de sucrose à 32 000 *g* que j'appelle pour simplifier 'microsomes' (point 3.1, Figure III.5). À cette vitesse de centrifugation, seul une partie des 'microsomes totaux' sera concentré, on s'attend à retrouver l'appareil de Golgi non purifié d'après le protocole de Evans & Coughlan, (1978) mais aussi potentiellement une partie du RE et des vésicules de transport. Le coussin devrait théoriquement amortir la concentration des organites par rapport à une centrifugation dans un tube



sans coussin et ainsi améliorer la conservation de l'intégrité des organites tout en éliminant des éléments de plus grande taille résiduels des étapes précédentes qui forment un culot sous le coussin dans le fond du tube. L'analyse de cette fraction 'microsomes' est discutée dans la partie 3.3 de ce chapitre. Afin de purifier davantage l'appareil de Golgi contenu dans la fraction 'microsomes', j'ai fait des tentatives de concentration sur gradients de sucrose linéaire qui n'ont pas abouti à une validation d'un enrichissement. J'ai également réalisé des tests avec des gradients discontinus à partir du pré-enrichissement 'microsomes' et inspirés de l'article de Evans & Coughlan, (1978), cette étape est résumée au point 3 de la Figure III.5. Le prélèvement des interfaces après centrifugations s'est avéré difficile car les interfaces entre les différentes couches de sucrose étaient peu ou pas visibles. Une autre problématique a été la faible concentration protéique détectée dans ces fractions rendant la validation par tests enzymatiques parfois impossible et peu reproductible. Néanmoins, nous avons pu mener des analyses protéomiques sur des fractions de gradient permettant d'identifier un nombre important de protéines, ces résultats sont exposés et discutés dans la partie 3.4 de ce chapitre.



**Figure III. 5. Principales méthodes de séparation des organites utilisées.** Les molarités des solutions de sucrose sont indiquées. Les compartiments indiqués dans le schéma correspondent aux enrichissements théoriques.

### 3.1.5) Validation multi-approches de l'enrichissement des fractions

La validation expérimentale de l'enrichissement en organites est une étape cruciale. Avoir des marqueurs spécifiques des organites fractionnés permet de valider leur bonne séparation et d'évaluer des possibles contaminations entre fractions. La difficulté est de mener en parallèle l'optimisation des étapes de fractionnement et l'optimisation des méthodes de validation. Parmi les méthodes classiques de validation (Figure III.6), on trouve des méthodes biochimiques avec des dosages colorimétriques, des immunodétections et des dosages enzymatiques. Également, les méthodes de microscopie

(électronique à transmission et optique) sont des méthodes de validation intéressantes. Dans mon cas, les analyses protéomiques ont aussi été un moyen de suivre l'enrichissement.

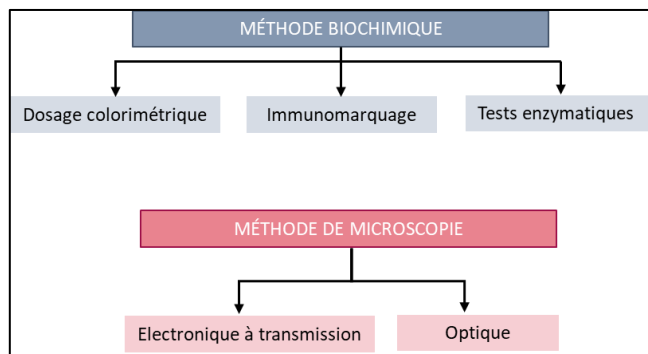


Figure III. 6. Méthodes classiques de validation d'un enrichissement en organites.

### Marqueurs enzymatiques

Les marqueurs enzymatiques associés à différents compartiments subcellulaires sont couramment utilisés pour valider des enrichissements. Les tests d'activité que j'utilise ciblent spécifiquement les mitochondries (cytochrome c oxydase), le RE (cytochrome c réductase, AMPase) et l'appareil de Golgi (nucléotides diphosphatases, NDPases). Seul le test ciblant le RE n'a pas permis de montrer une activité significative dans la fraction attendue.

Le test ciblant les mitochondries, c'est-à-dire le dosage de l'activité cytochrome c oxydase a demandé des optimisations par rapport à notre modèle ou encore au choix du tampon. En effet, j'ai pu coupler deux protocoles, celui du kit cytochrome c oxydase (CYTOCOX1, Sigma-Aldrich) et celui proposé dans l'article de Spinazzi et al., (2012) (voir la partie 2 du chapitre IV pour les détails du protocole), ce qui m'a permis d'optimiser mes résultats. Par ailleurs, le test cytochrome c oxydase est le seul test pour valider l'enrichissement en mitochondries à disposition pour les algues brunes. Idéalement, une autre méthode de validation serait nécessaire.

Après des résultats prometteurs, j'ai choisi dans un premier temps de concentrer mes efforts sur les tests NDPase qui sont théoriquement spécifiques de l'appareil de Golgi. Les NDPases convertissent les nucléotides NDP issus des réactions de glycosylations en NMP qui est ensuite transporté dans le cytosol. Le test repose sur la détection par spectrophotométrie du phosphate libre émis. Les NDP que j'ai testé sont l'uridine diphosphate (UDP) et l'inosine diphosphate (IDP). Pour ces derniers tests, j'ai entrepris de tester plusieurs protocoles de dosage d'activité NDPase (Evans & Coughlan, 1978 ; Zeng et al., 2017). Bien que ces tests aient orienté certaines de mes décisions, les résultats obtenus n'ont pas toujours été reproductibles. Cela met en évidence la complexité de trouver la méthodologie d'enrichissement adéquate et de pouvoir la reproduire, ce qui est directement lié aux différentes

étapes précédentes, telles que le choix du matériel de départ et de la méthode d'extraction. Finalement, j'ai pu détecter une activité reproductible pour un enrichissement dans la fraction 'microsomes' lors d'une extraction avec un tampon à 1 % de PFA. Ces résultats seront exposés dans le Chapitre IV.

#### Dosage colorimétrique

Concernant les dosages colorimétriques, le test le plus simple à mettre en place est le dosage de la chlorophylle présente au niveau des chloroplastes. C'est un dosage réalisé grâce aux propriétés d'absorption de la chlorophylle (a et b) que l'on peut doser à l'aide d'un spectrophotomètre. Cette méthode rapide a permis de suivre l'enrichissement et la contamination en chloroplastes.

#### Immunomarqueurs

L'enrichissement d'une fraction en organites peut être validé par immunomarquage à l'aide d'anticorps ciblant spécifiquement les protéines caractéristiques de chaque compartiment subcellulaire. Cette méthode se révèle rapide et relativement simple à mettre en œuvre. En amont de cette démarche, il est crucial de déterminer quelles protéines peuvent servir de bons marqueurs pour chaque organite.

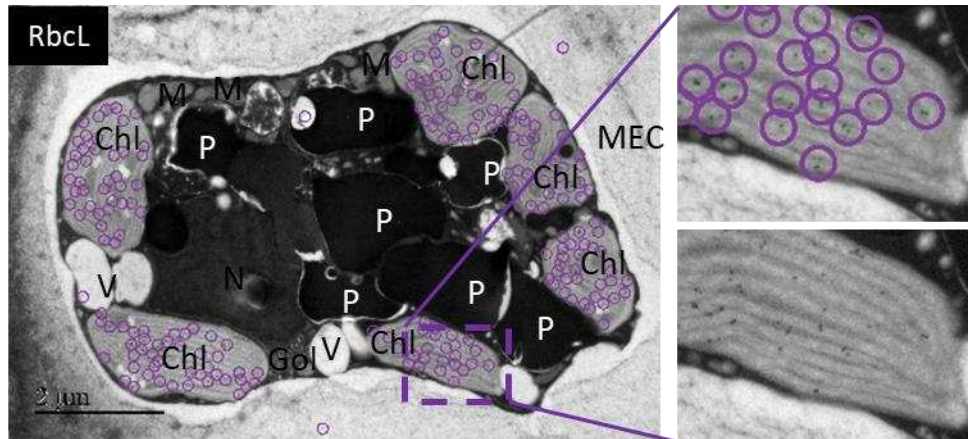
Parmi les anticorps commerciaux avec lesquels j'ai travaillé, on compte ceux ciblant les chloroplastes, le RE, les mitochondries ainsi que l'appareil de Golgi. Les anticorps visant à identifier les chloroplastes sont dirigés contre la grande sous-unité de la *ribulose-1,5 biphosphate carboxylase/oxygénase* (RubisCO) (RbcL). Ceux contre la protéine marqueur du RE ciblent la protéine chaperonne *Binding immunoglobulin Protein* BiP. Pour les mitochondries, trois anticorps ont été testés contre une sérine hydroxyméthyltransferase (SHMT), une ATP-synthase et une cytochrome c oxydase. Concernant, l'appareil de Golgi les deux anticorps testés ciblent le facteur 1 d'ADP-ribosylation (ARF1) et la protéine est Sec21p qui appartient à la sous unité gamma du complexe protéique COPI (*Coat protein*) associé aux vésicules de transport entre l'appareil de Golgi et le RE (Pimpl et al., 2000). Ces anticorps, provenant du fournisseur Agrisera, sont initialement développés pour cibler des protéines de plantes. Nous avons sélectionné ces anticorps en tenant compte de leur spécificité et de l'homologie de la protéine cible avec les protéines de *S. latissima*. Les références des anticorps ainsi que celles des protéines utilisées comme immunogènes sont indiquées dans le Tableau III.1, sachant que parfois l'immunogène est généré à partir d'un peptide synthétique qui dérive d'une séquence consensus entre les séquences de plusieurs organismes ; une seule des protéines est indiquée ici.

**Tableau III. 1. Anticorps commerciaux testés sur les algues brunes *S. latissima* et *F. serratus*.** % id et % sim correspondent, respectivement, aux pourcentages d'identité et de similarité entre les protéines d'algues brunes avec la protéine immunogène. PS correspond à un peptide synthétique. Les croix rouges correspondent à une invalidation, la coche verte correspond à une validation à la taille attendue reproductible, la coche orange correspond à une détection non reproduite. Concernant l'anticorps anti-cytochrome oxidase II, des protéines homologues ne sont pas détectée dans les protéomes prédits actuels de *S. latissima* et *F. serratus*, mais des recherches au NCBI (base 'non redondante ') indique un 55 % d'identité et 71 % de similarité de séquence avec une séquence de *Fucus vesiculosus* (YP\_448626.1).

		Compartiments ciblés							
		Chloroplastes	Mitochondries			RE	Golgi/COPI		
Informations anticorps commerciaux	Anticorps (référence Agrisera)	Anti-Rbcl (AS03 037)	Anti-SHMT (AS05 075)	Anti-ATP synthase (AS16 3976)	Anti-cytochrome oxidase II (AS04 053A)	Anti-BIP (AS09 481)	Anti-ARF1 (AS08 325)	Anti-Sec21p (AS08 327)	
	Immunogène (réf. Uniprot)	(PS) <i>A. thaliana</i> [O03042]	<i>S. oleracea</i> [A0A0K9Q9B1]	<i>A. thaliana</i> [P83483]	(PS) <i>A. thaliana</i> [G1C2Q7]	(PS) <i>A. thaliana</i> [Q9LKR3]	<i>A. thaliana</i> [P36397]	<i>A. thaliana</i> [Q0WW26]	
	Taille immunogène (kDa)	54	53	55	30	73,5-80	21	98	
Informations protéines algues brunes	<i>S. latissima</i>	Réf. Protéine	contig1933.5642.1	contig412.11337.1	contig1028.247.1		contig1933.5642.1	contig212.6488.1	contig929.17055.1
		% Identité avec l'immunogène	58%	62%	73%	x	71%	86%	50%
		% sim	72%	77%	84%	x	85%	94%	65%
	<i>F. serratus</i>	Réf. Protéine	contig5185.15177.1	contig12.1544.1	contig641.17332.1		contig243.7723.1	contig46.13898.1	contig1952.5705.1
		% id	54%	61%	76%	x	69%	84%	49%
		% sim	72%	77%	86%	x	83%	93%	65%
Validation	<i>S. latissima</i>	Western blot	✓	✗	✗		✓	✗	
		MET	✓	✗				✗	
	<i>F. serratus</i>	Western blot	✓			✓	✓		✓

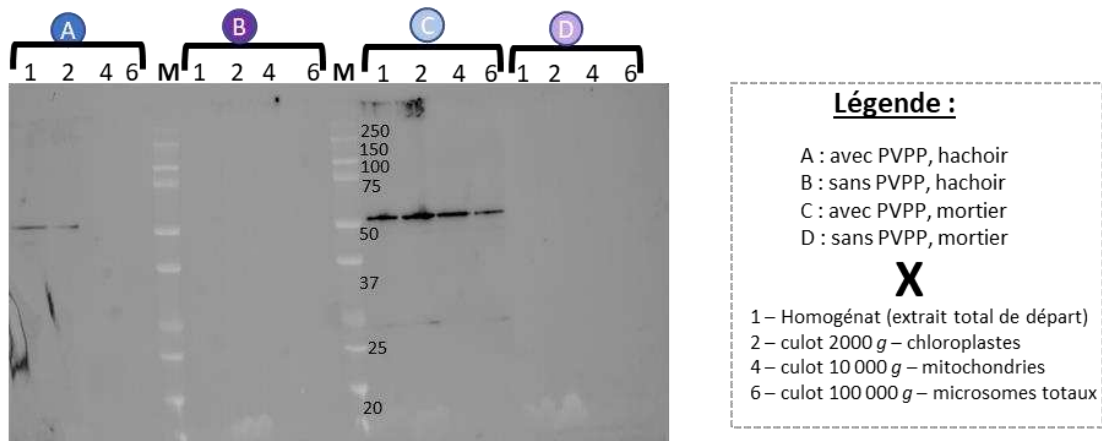
La transposition de l'utilisation de ces anticorps commerciaux sur le modèle d'algue brune a été entreprise par le biais de western blot, visant à confirmer la présence et la taille des protéines détectées. Afin de simplifier la méthode et de la rendre applicable à un grand nombre de fractions, nous avons, en première instance, utilisé la méthode des immunodots, qui renseigne sur la présence putative de la protéine mais suivant un format miniaturisé. Parallèlement, nous avons réalisé des immunomarquages sur des coupes de *S. latissima* en utilisant la microscopie électronique à transmission (MET). Cette approche permet de vérifier la présence et la localisation cellulaire des protéines marqueurs directement sur des tissus d'algues brunes.

La protéine cible choisie pour le chloroplaste, la RbcL, est une enzyme clé de la photosynthèse qui permet la fixation du CO<sub>2</sub> dans les chloroplastes. Le pourcentage d'identité de la RbcL de *A. thaliana* avec la RbcL de *S. latissima* est de 57%, la taille attendue est de 54 kDa. L'anticorps anti-RbcL est le seul qui a pu être validé en MET sur une coupe de *S. latissima*. L'immunohistochimie montre un signal important et spécifique dans les chloroplastes (Figure III.7).



**Figure III. 7. Immunohistochimie des chloroplastes, avec les anticorps anti-RbcL, sur une coupe de *S. latissima*.** Le signal anti-RbcL est spécifiquement détecté dans les chloroplastes par imagerie MET. Pour faciliter la visualisation, les cercles entourent les particules d'or indiquant un marquage (l'encart à droite indique une version de la même image avec et sans cercles). Chl chloroplaste, Gol appareil de Golgi, N noyau, V vacuole, M mitochondrie, P physode, MEC matrice extracellulaire.

Par ailleurs, l'anti-RbcL en western blot réalisé à partir d'extrait de *S. latissima* et *F. serratus* montre des résultats qui ne sont pas toujours reproductibles, pouvant s'expliquer par une faible quantité de la protéine chargée dans le gel-SDS ou un problème de migration des protéines dans celui-ci (protéines bloquées dans les puits). Nous avons constaté, dans le cas d'une extraction avec *F. serratus*, que l'ajout de PVPP avant de réaliser la migration sur gel-SDS améliorait la détection par les anticorps. La Figure III.8 montre un exemple d'amélioration de la détection lors d'une comparaison d'extraction au hachoir versus au mortier avec et sans PVPP. L'action du PVPP est connue pour retenir les polyphénols et ainsi, elle pourrait faciliter la migration et la séparation des protéines, facilitant ainsi la reconnaissance des protéines par les anticorps. En conclusion, l'anticorps commercial anti-RbcL utilisé est un marqueur satisfaisant des chloroplastes chez l'algue brune en MET, mais n'est pas toujours fiable en western blot.

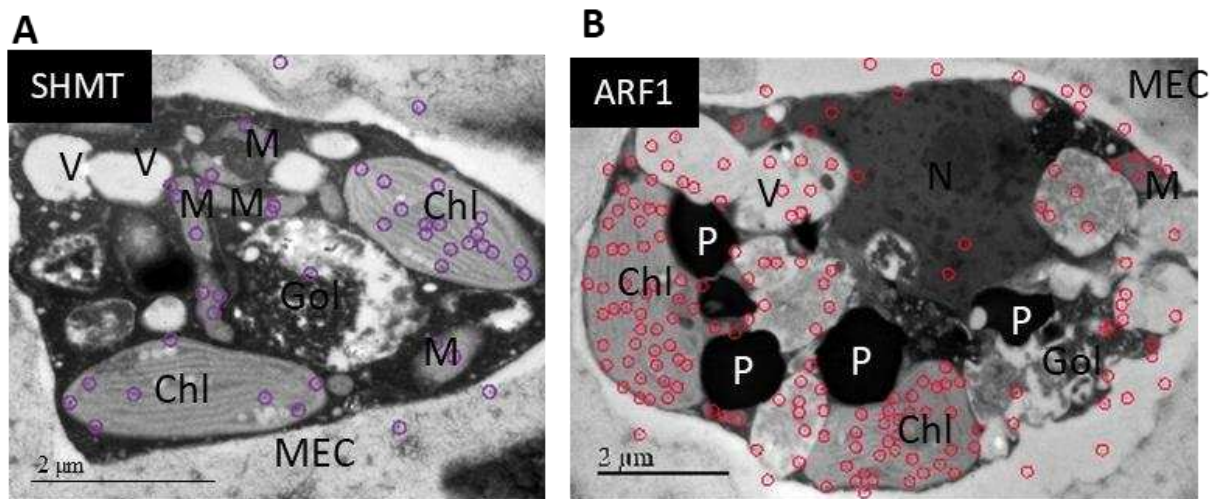


**Figure III. 8. Immunodétection sur gel de la RbcL d’algue brune lors d’une comparaison entre une extraction au hachoir et au mortier, avec et sans PVPP.** Ce résultat est obtenu par WB à partir d’une extraction de *F. serratus*. La protéine cible est détectée à la taille attendue (54 kDa).

Concernant les marqueurs mitochondriaux, nous avons choisi un anticorps contre SHMT qui est impliquée dans la (photo)respiration mitochondriale, elle convertit de manière simultanée la glycine en sérine et le 5,10-méthylènetétrahydrofolate en tétrahydrofolate. Si la localisation préférentielle des SHMT chez les plantes est mitochondriale, certaines isoformes sont présentes dans le chloroplaste et/ou cytosol (Besson et al., 1995). L’anticorps anti-SHMT a été obtenu à partir d’une protéine de *Spinacia oleracea* purifiée. L’isoforme de *S. latissima* est 62% identique avec la séquence de *S. oleracea*. Pour l’anti-SHMT, le signal chez *S. latissima* est présent dans les mitochondries, mais aussi dans les chloroplastes (Figure III.9.A). Ainsi, l’anticorps commercial utilisé reconnaît a priori plusieurs isoformes de SHMT chez *S. latissima*. Cet anticorps anti-SHMT est un marqueur convenable, car l’utilisation du marqueur des chloroplastes permet de discriminer la fraction mitochondriale. L’usage de cet anticorps pour la réalisation de western blot ne s’est cependant pas avéré fiable et reproductible. J’ai également testé deux autres marqueurs mitochondriaux contre les protéines ATP-synthase et cytochrome oxydase, enzymes typiques des mitochondries. Pour la première, je n’ai pas réussi à détecter de protéines en western blot. Pour la deuxième, un signal a été détecté en WB une seule fois, sans réussir à le reproduire, donc je n’ai pas pu utiliser de marqueur anticorps mitochondrial fiable.

Le facteur d’ADP Ribosylation de type I ou ARF1 appartient à une famille de petites protéines G hautement conservées au sein des eucaryotes (Li et al., 2004). Elle a été sélectionnée comme marqueur de l’appareil de Golgi. En effet, ARF1 est impliquée principalement dans la maturation de protéines entre le Golgi et le RE chez les plantes terrestres (Robinson et al., 2011) et les animaux (Donaldson & Honda, 2005). L’anticorps choisi a été obtenu par immunisation à partir d’une protéine recombinante d’*A. thaliana*. Il s’est avéré que malgré une identité de séquence de 84 % et un taux de

similarité de 93 % entre la protéine de *S. latissima* et celle visé par l'anticorps, ce dernier n'était pas spécifique de l'appareil de Golgi chez *S. latissima*. En effet des observations d'immunomarquages de coupes de *S. latissima* en MET ont montré que le signal de l'anticorps anti-ARF1 couplé à l'or est retrouvé dans les chloroplastes, les vacuoles, les mitochondries, l'appareil de Golgi, et la paroi (Figure III.9.C) indiquant donc un marquage aspécifique chez *S. latissima*. Cet anticorps n'est donc pas un marqueur valide de l'appareil de Golgi pour ce modèle.



**Figure III. 9. Immunohistochimie d'une coupe de *S. latissima* en MET. A)** Signal SHMT (marqueur mitochondries) dans les mitochondries et les chloroplastes pour notre modèle. **B)** Marquage avec l'anticorps anti-ARF1 (marqueur Golgi) non spécifique de l'appareil de Golgi pour notre modèle. Pour faciliter la visualisation, les cercles entourent les particules d'or indiquant un marquage. Chl chloroplaste, Gol appareil de Golgi, N noyau, V vacuole, M mitochondrie, P physode, MEC matrice extracellulaire.

Les difficultés de reconnaissance de nos protéines cibles avec les anticorps commerciaux, peuvent provenir de la distance évolutive entre les algues brunes et les plantes. Afin de pouvoir réaliser le suivi de l'appareil de Golgi, nous avons décidé de produire notre propre anticorps contre une protéine recombinante d'algue brune. Le choix de la cible s'est porté sur une protéine théoriquement localisée au niveau de l'appareil de Golgi. La démarche et les résultats obtenus sont exposés dans la partie suivante 3.2. Ces résultats n'ont pas été concluants, c'est pourquoi j'ai tout de même fait une dernière tentative avec un anticorps commercial contre une protéine ciblant l'appareil de Golgi et des vésicules associées (COPI), cette protéine est Sec21p (Pimpl et al., 2000). Pour des extractions à partir de *F. serratus*, j'ai pu détecter une bande à la taille attendue par western blot mais pas toujours de manière reproductible. Ceci venait peut-être d'un problème de concentration protéique qui nécessiterait des optimisations supplémentaires (non réalisées dans le cadre de cette



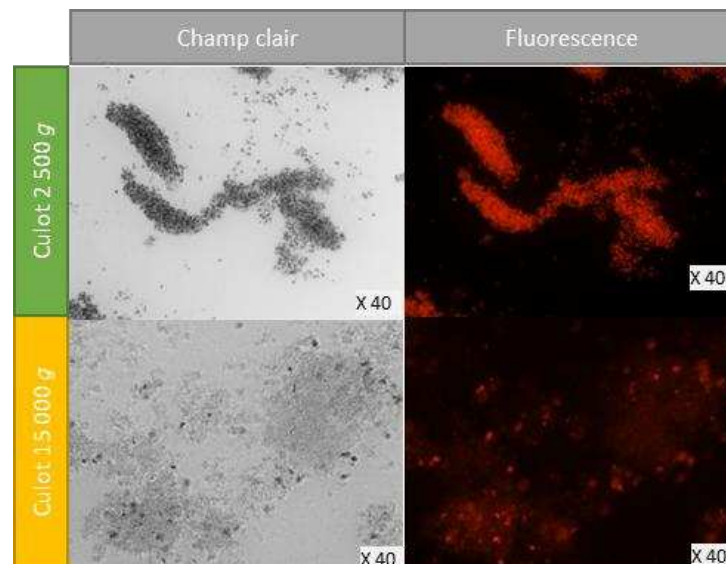
thèse). De plus, il aurait été intéressant de valider cet anticorps par MET avant de pouvoir l'utiliser comme marqueur.

Le marqueur du RE cible la protéine BiP qui est une protéine chaperonne. L'anti-BiP détecte bien une protéine à la taille attendue dans un extrait issu de *S. latissima* (non montré ici). En revanche, lors d'immunodots, la détection par l'anti-BiP est difficilement reproductible, cela peut être dû à une quantité trop faible ou à un problème méthodologique. Une observation par immunomarquage en microscopie électronique pourrait valider la localisation de la protéine détectée dans le RE chez les algues brunes. Ces éléments montrent les limites de l'utilisation des anticorps pour des fractions faiblement concentrées en organites.

L'utilisation de marqueurs anticorps s'est avéré plus compliquée qu'attendu, en raison de l'absence de détection fiable et reproductible dans les extraits d'algues brunes, je n'ai pas conservé cette approche pour la validation des enrichissements subcellulaires.

#### Microscopie optique et électronique

La microscopie optique m'a permis de faire des observations des fractions enrichies en chloroplastes, en utilisant leur propriété d'auto-fluorescence dans le rouge (680 nm) (Krause & Weis, 1991) (Figure III.10).



**Figure III. 10. Suivi de l'enrichissement en chloroplastes chez *S. latissima*.** L'observation est suivie en microscopie optique (x40) et l'enrichissement est particulièrement visible pour le culot à 2500 g contenant les chloroplastes. Dans le culot 15 000 g un enrichissement en mitochondries est attendu, une contamination en chloroplastes est légèrement visible.

La MET constitue un moyen efficace d'obtenir une validation visuelle d'un enrichissement. Dans mon cas, cette approche se révèle pertinente car elle n'exige pas d'optimisations supplémentaires, comme le nécessiteraient les tests enzymatiques ou les immunomarquages. Toutefois, cette méthode engendre un coût élevé et une ressource en temps importante (délai de 3 semaines à 2 mois avant obtention des images), limitant ainsi sa faisabilité pour chaque extraction. Idéalement, elle devrait être employée en tant qu'outil de validation ultime une fois que les autres méthodes ont confirmé l'enrichissement. Au cours de cette étude, la MET a contribué à résoudre des points cruciaux tels que le choix de la méthode d'extraction ou du tampon d'extraction. Je reviendrai sur ces résultats dans la partie 3.3 de ce chapitre.

### Analyse protéomique

Aux vues des difficultés qui ont été rencontrées, j'ai été amenée à utiliser l'analyse protéomique comme méthode de validation ou invalidation de certains protocoles d'enrichissement en organites. Généralement cette méthode arrive une fois les enrichissements validés par des marqueurs tels que ceux présentés précédemment. Je développe des résultats associés à cette méthode dans les points 3.3 et 3.4 pour la comparaison de deux tampons d'extractions pour *S. latissima* et deux méthodes d'extraction pour *F. serratus*. Cette approche a également été menée pour une extraction réalisée à partir d'embryons de *F. serratus*, dans le cadre de l'étude visant à reproduire le protocole de Callow et al., (1978). Il en va de même pour la tentative d'isolement à partir de petites saccharines à l'aide d'un gradient par flottaison inspiré du protocole de Okekeogbu et al., (2019). Les deux dernières approches citées ne seront pas présentées dans ce manuscrit, elles n'ont pas été concluantes.

La combinaison d'approches de validation telles que la MET, les tests enzymatiques et colorimétriques, et les analyses protéomiques, m'a permis de mener une étude robuste sur un enrichissement en microsomes pour *S. latissima*, ces résultats seront présentés dans le Chapitre IV.

### 3.2) Tentative de génération d'un marqueur de l'appareil de Golgi chez les algues brunes

Partant du constat que l'utilisation de marqueurs anticorps commerciaux n'était pas toujours validé pour nos modèles et dans le but d'avoir un marqueur de l'appareil de Golgi spécifique aux algues brunes, nous avons choisi de produire une protéine recombinante a priori localisée dans l'appareil de Golgi puis de faire produire des anticorps contre cette dernière. Le choix s'est porté sur une petite protéine G, Rab6.

## Choix de la protéine marqueur

De manière générale, les protéines de la famille Rab sont impliquées dans le transport des vésicules au sein et entre les organites. Près de 20 membres de la famille Rab sont associées à l'appareil de Golgi chez les mammifères (Liu & Storrie, 2012). En particulier, les protéines de la famille Rab6 agissent au niveau du transport des vésicules de l'appareil de Golgi. Aussi, elles constituent les protéines Rab les plus abondantes dans ce compartiment chez le rat (Gilchrist et al., 2006). Les homologues de Rab6 chez la levure et chez *Nicotiana tabacum* et *Arabidopsis thaliana* ont également un rôle important dans l'appareil de Golgi (Johansen et al., 2009 ; Suda et al., 2013). Sa localisation au niveau de l'appareil de Golgi est favorisée par à une interaction protéique (Echard et al., 1998).

Il existe des anticorps commerciaux dirigés contre des protéines Rab6 animales (Cell Signaling Technology) mais ma première expérience infructueuse avec un anticorps commercial anti-Arf1 m'a incité à privilégier la génération d'anticorps spécifiques contre une protéine d'algue brune. Au laboratoire, la production de protéines recombinantes est courante. De plus, nous disposons en début de thèse d'une banque contenant des plasmides avec des ADNc de l'algue brune *Ectocarpus* sp. 7. Ainsi, il est possible de récupérer des transcrits parfois pleine longueur permettant de réaliser rapidement l'expression hétérologue d'une protéine de cette algue. Une fois la protéine produite en quantité suffisante, la synthèse de nouveaux anticorps peut être réalisée de manière externe au laboratoire (Eurogentec). La protéine Rab6 qui apparaît comme étant spécifique et abondante dans l'appareil de Golgi au sein de cellules eucaryotes a été choisie pour être exprimée de manière recombinante.

## Analyse et expression hétérologue de *EsRab6*

Une seule copie de Rab6 est actuellement référencée dans le génome d'*Ectocarpus* sp. 7 (*EsRab6*, Ec-23\_001190.1). Par ailleurs, aucune étude fonctionnelle d'un membre de cette famille n'a été réalisée à ce jour chez les algues brunes. La prédiction de localisation de la protéine *EsRab6* avec la méthode statistique HECTAR (Gschloessl et al., 2008) indique qu'elle se situe dans la catégorie : « autre localisation », ce qui donne l'information qu'elle a peu de chance d'être située dans les chloroplastes et les mitochondries. Les analyses de la séquence protéique indiquent qu'elle ne présente pas de peptides signaux, ni de site d'ancrage à la membrane. Au vu du rôle et de la localisation des protéines Rab6 chez les métazoaires, la levure et les plantes, l'hypothèse est que *EsRab6* serait localisée dans l'appareil de Golgi.

À partir des banques de transcrits de *S. latissima* (seule donnée à disposition au moment du choix de la protéine) une seule isoforme de Rab6 a été trouvée. Les séquences de *EsRab6* et celle identifiée

à partir de transcriptomes de *S. latissima*, sont identiques à 95 % et sont à 97 % similaires ce qui laisse penser qu'un même anticorps pourrait reconnaître ces deux protéines.

Afin d'identifier une potentielle reconnaissance croisée de l'anticorps contre Rab6 avec les autres familles de Rab, des blasts ont été effectués sur le génome d'*Ectocarpus* sp. 7. (<https://bioinformatics.psb.ugent.be/orcae/overview/EctsiV2>). Les 9 séquences les plus proches sont en moyenne à 39% d'identité de séquence et 63% de similarité avec *EsRab6* (Tableau 2.A). Ces taux relativement faibles laissent présager que la reconnaissance croisée par l'anticorps sera moindre, en revanche une validation de sa localisation à l'appareil de Golgi par microscopie électronique sera nécessaire. L'identité et la similarité avec d'autres GTPases du génome d'*Ectocarpus* ont été analysées, les petites protéines G de la famille des Ran, Ras, Rho, ARF-like et ARF semblent être les plus proches en termes de séquences, mais reste relativement éloignées avec un pourcentage d'identité moyen de 29% (Tableau III.2.B).

**Tableau III. 2. Homologie de *EsRab6* avec d'autres membres de la famille Rab d'*Ectocarpus*. A)** Pourcentage d'identité, de similarité et gaps entre la séquence protéique *EsRab6* et d'autres protéines Rab, et **B)** entre *EsRab6* et d'autres petites protéines G proches.

**A**

	<i>EsRab5</i>	<i>EsRab2A</i>	<i>EsRab1B</i>	<i>EsRab11A</i>	<i>EsRab8D</i>	<i>EsRab18</i>	<i>EsRab8A</i>	<i>EsRab1A</i>	<i>EsRab50</i>	Moyenne
<i>EsRab6</i> (217 acides aminés)	43 % identité 67 % similarité	36 % 59 %	40 % 66 %	37 % 68 %	41 % 64 %	41 % 65 %	42 % 62 %	38 % 61 %	38 % 60 %	39 % 63 %
Taille (acides aminés)	196	208	203	219	223	210	205	202	226	210

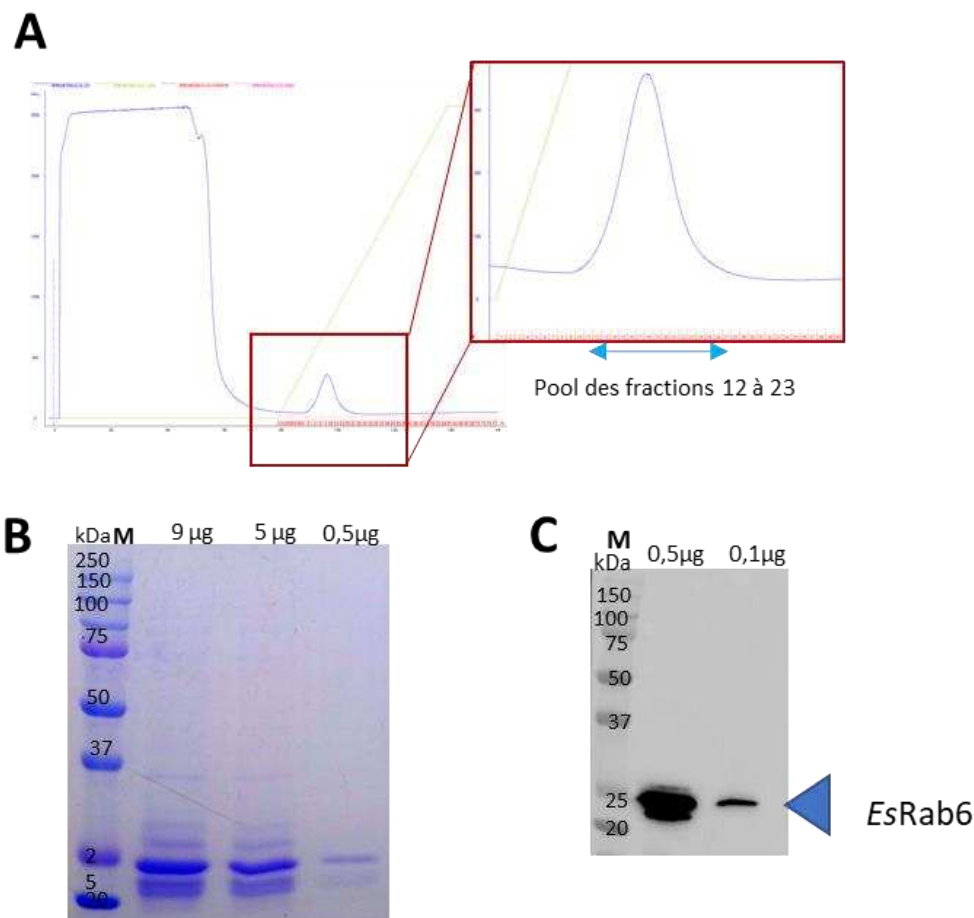
**B**

	<i>EsRAN</i> , Ras superfamily GTPase	<i>EsPG1</i> , Ras superfamily GTPase	<i>EsRAC</i> , RHO family GTPase	<i>EsARL1</i> , ARF- like Ras superfamily GTPase	<i>EsRFRP1</i> , ARF- like Ras superfamily GTPase	<i>EsArf2B</i> , ARF family GTPase	Moyenne
<i>EsRab6</i> (217 acides aminés)	30 % identité 51 % similarité	28 % 52 %	29 % 49 %	24 % 43 %	41 % 48 %	25 % 45 %	30 % 48 %
Taille (acides aminés)	214	238	197	185	195	194	203

### Expression hétérologue

La séquence d'*Ectocarpus* sp. 7 *EsRab6* a été exprimée en système bactérien (Origami 2, DE3). La protéine a été purifiée par chromatographie d'affinité (Figure III.9.A), puis par chromatographie d'exclusion de taille. La protéine a ensuite été dosée et déposée sur gel SDS-page (Figure III.11.B), la présence de la protéine a été ensuite confirmée par WB (Figure III.11.C). Il est à noter que plusieurs bandes sont visibles sur le gel SDS-PAGE coloré (Figure III.9.B). Après obtention des anticorps (délai expliqué par la période de restriction dû au COVID-19), nous avons fait analyser en protéomique les

bandes principales, les résultats indiquent bien la présence majoritaire de *EsRab6* dans les trois bandes principales mais également la présence de protéines bactériennes contaminantes.

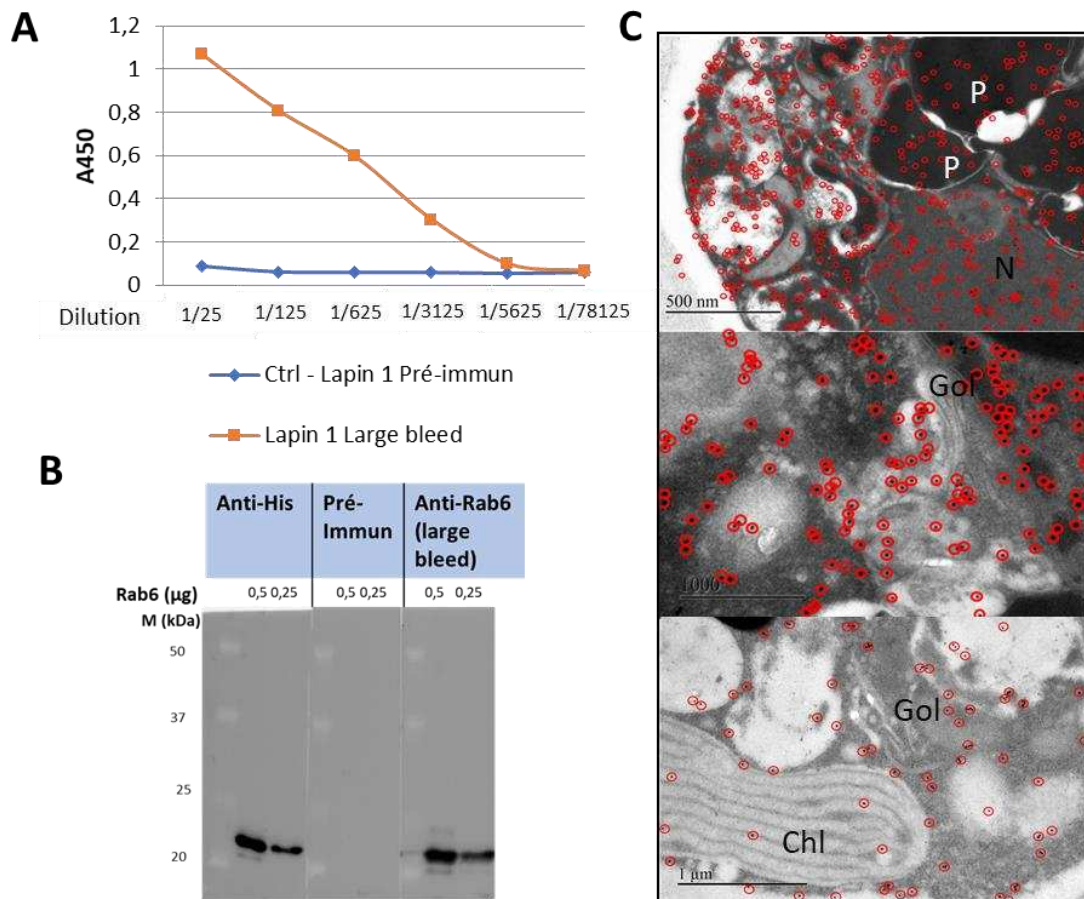


**Figure III. 11. Purification de la protéine *EsRab6* recombinante.** **A)** Profil d'éluion par chromatographie d'affinité, **B)** Gel SDS-page et **C)** Western Blot de la protéine *EsRab6* recombinante, après des étapes de purification par chromatographie d'exclusion de taille (pool des fractions 12-23 visualisé en A)). M : marqueur de taille moléculaire.

Anticorps contre la protéine *EsRab6*

La protéine recombinante *EsRab6* a été envoyée à la société Eurogentec afin qu'ils réalisent la production d'anticorps. Dans un premier temps, une vérification additionnelle à celle d'Eurogentec est menée afin s'assurer que les anticorps produits sont bien spécifiques de la protéine recombinante *EsRab6*. Pour cela, j'ai réalisé des tests ELISA (Figure III.12.A) qui confirment bien l'affinité des anticorps présents dans le sérum du lapin immunisé pour la protéine recombinante. La détection de *EsRab6* par ces anticorps est également confirmée par western blot (Figure III.12.B). Ensuite, afin de valider si l'anticorps est bien spécifique de l'appareil de Golgi, nous réalisons des immunohistochimies sur coupes de *S. latissima* que l'on observe en MET. Les images présentées sur la Figure III.10.C indiquent

que ces anticorps ne seraient pas un marqueur spécifique de l'appareil de Golgi chez l'algue brune *S. latissima* puisque, même si du signal est détecté dans l'appareil de Golgi, il est aussi présent dans de nombreux autres organites et notamment le noyau. Nous avons également fait des tentatives de dilution de l'anticorps qui n'ont pas changé la supposée aspécificité de l'anticorps.



**Figure III. 12. Invalidation de l'anticorps anti-*EsRab6* comme marqueur de l'appareil de Golgi chez l'algue brune *S. latissima*.** **A)** Test Elisa avec un contrôle négatif (pré-immun) et le test du sérum d'un lapin immunisé (*large bleed*). **B)** western blot et **C)** immunohistochimie de *EsRab6* sur coupes de *S. latissima*, observation en MET. Pour faciliter la visualisation, les cercles entourent les particules d'or indiquant un marquage. Les deux images du haut correspondent à des immunohistochemies avec une dilution au 1/500 et celle du bas au 1/100 des anticorps anti-*EsRab6*. Chl chloroplaste, Gol appareil de Golgi, N noyau, P physode.

La génération de cet anticorps n'a pas permis d'obtenir un marqueur anticorps spécifique de l'appareil de Golgi chez les algues brunes. Plusieurs explications sont possibles comme : la production d'anticorps non spécifiques de la protéine *EsRab6* dû à des protéines contaminantes résiduelles dans la fraction utilisée comme immunogène, le fait que l'on travaille avec du sérum et donc un anticorps non purifié qui dilue la réponse de détection. On peut penser également au fait qu'il puisse exister une reconnaissance croisée avec d'autres protéines de la famille des Rab ou encore que cette protéine ne soit pas spécifiquement localisée dans l'appareil de Golgi chez les algues brunes. Compte-tenu des

apports peu fructueux des immunodétections pour valider mes enrichissements, ces méthodes ne seront pas approfondies davantage durant mon travail de thèse.

### 3.3) Développement d'un protocole d'isolement de microsomes à partir du modèle *Saccharina latissima* : l'apport de la MET et des analyses protéomiques

Ayant rencontré des difficultés avec les méthodes de validation par tests enzymatiques et marquage anticorps, une approche d'observation en MET a été mise en place pour *S. latissima* afin de débloquent des points importants (méthode de broyage et tampon d'extraction). Nous y avons également associé des résultats d'analyse protéomique qui ont permis de comparer deux enrichissements de la fraction 'microsomes', produits avec deux tampons d'extraction différents.

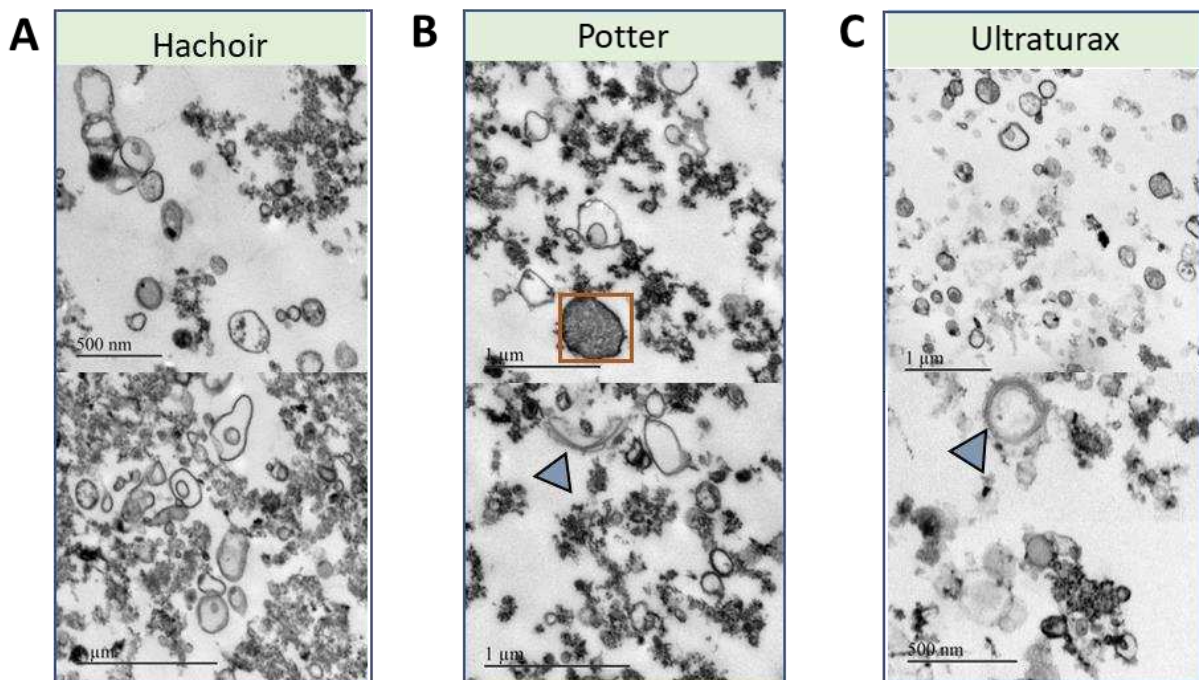
#### Apport de la MET

Plusieurs fractions contenant théoriquement l'appareil de Golgi ont été préparées et observées en MET. Dans un premier temps, afin de valider la méthode et la présence d'appareil de Golgi, une fraction contenant les 'microsomes totaux' a été préparée avec un hachoir électrique. Ces images montrent de nombreux débris cellulaires et des vésicules pouvant être golgiennes (Figure III.13.A), sachant qu'une centrifugation à vitesse élevée peut abimer les organites culotés.

Afin de limiter ce problème, je fais des tests avec une couche de sucrose permettant d'amortir l'effet néfaste de la centrifugation et ce qui contribue théoriquement au maintien de l'intégrité de l'organite concentré sur ce coussin. De plus, j'ai testé d'autres méthodes d'extraction telles que le Potter et l'Ultraturax. Elles m'ont permis de faire des observations de qui se pourrait être des microsomes/appareil de Golgi et vésicules (Figure III.13.B, C). Cependant, nous avons réalisé des images des fractions 'chloroplastes' et 'mitochondries' (non montrées ici) indiquant que le meilleur enrichissement, en termes de qualité et de quantité d'organites visualisés, est obtenu avec le hachoir électrique. La MET a permis de voir que l'utilisation d'autres méthodes d'extraction n'apportaient pas d'amélioration considérable et qu'ainsi le hachoir électrique était a priori une bonne méthode pour l'étape d'extraction des organites chez *S. latissima*.

'microsomes totaux'

'microsomes'

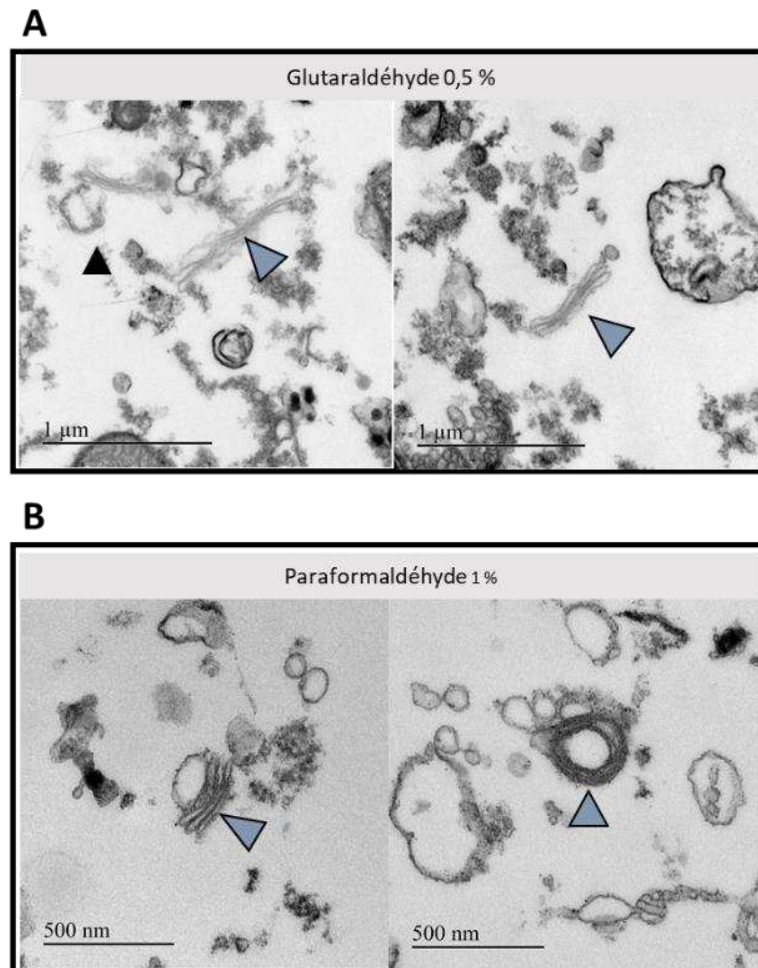


**Figure III. 13. Comparaison en MET de l'impact des méthodes de broyage sur l'obtention d'un enrichissement en microsomes. A)** Observations de la fraction 'microsomes totaux' (culot 115 000 g) issue d'une extraction au hachoir électrique. **B)** Observations de la fraction 'microsomes' (enrichissement sur coussin de sucrose à 32 000 g) obtenue à partir d'une extraction au Potter. **C)** Observations de la fraction 'microsomes' obtenue à partir d'une extraction à l'Ultraturax (C). Les flèches bleues indiquent ce qui pourrait être de l'appareil de Golgi. Les flèches bleu clair indiquent des vésicules pouvant être golgiennes. Le cadre indique une contamination par une mitochondrie.

Dans la littérature, plusieurs exemples reportent l'utilisation de fixateurs (Gillott et al., 1980 ; Morre et al., 1965) pour observer l'appareil de Golgi de façon intègre. Afin d'améliorer nos résultats, et notamment pour mieux préserver l'intégrité de nos organites, j'ai entrepris des extractions en ajoutant du glutaraldéhyde et du PFA au tampon d'extraction. Ces extractions ont été réalisées au hachoir électrique. Les images des fractions 'microsomes' obtenues avec le glutaraldéhyde à 0,5 % (Figure III.14.A) et le PFA à 1 % (Figure III.14.B) permettent d'observer ce qui est a priori de l'appareil de Golgi isolé. L'ajout de fixateur a donc permis de mieux visualiser l'appareil de Golgi extrait. Néanmoins, l'utilisation de ces fixateurs peut impacter la suite des analyses, en limitant potentiellement les résultats de protéomique et en impactant activités enzymatiques en les inhibant. En effet, les deux fixateurs créent des pontages avec les protéines, ils interagissent avec les groupements amines terminaux et les fonctions polaires des chaînes latérales des acides aminés. Cependant, l'action du glutaraldéhyde est plus forte et plus rapide que le PFA. Nous faisons donc le choix de faire des tests avec le PFA à faible concentration (1%) afin d'évaluer l'impact de la présence



de fixateur dans nos extraits, des analyses en protéomique ont été réalisées à partir d'un enrichissement en 'microsomes' traité ou non avec du PFA.

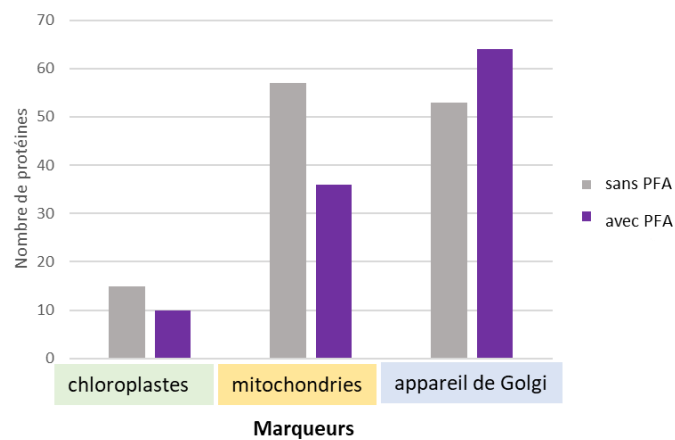


**Figure III. 14. Observations en MET de fraction 'microsomes' obtenues avec un tampon d'extraction contenant un fixateur. A) tampon à 0,5 % de glutaraldéhyde, B) tampon à 1 % de PFA. Les flèches indiquent des structures a priori Golgiennes.**

#### Apport des analyses protéomiques

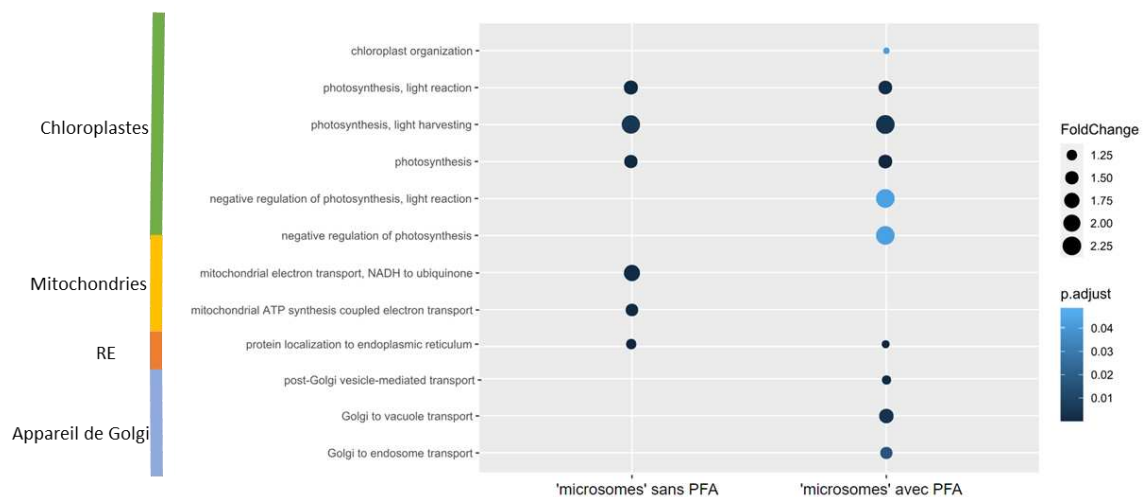
La comparaison des extractions avec du PFA n'a dans un premier temps pas retenu mon attention car je voulais me concentrer sur l'amélioration d'un protocole sans fixateur pour accroître les chances de pouvoir réaliser par la suite des caractérisations d'activités enzymatiques. Tout d'abord, je réalise une comparaison des protéines putativement associées à l'appareil de Golgi mais aussi aux chloroplastes et mitochondries, afin de juger de la distribution de ces organites dans les fractions. Les protéines du protéome de *S. latissima* sont interrogées contre des protéines de Swiss-Prot dont la localisation subcellulaire est connue. La fraction réalisée avec du PFA comporte un nombre de marqueurs associés à l'appareil de Golgi plus important que la fraction sans PFA (Figure III.15). Aussi, le nombre de marqueurs associés aux organites contaminants est moindre dans la fraction

'microsomes' avec PFA que dans celle sans PFA, ce qui traduit une contamination moindre de ces compartiments (mitochondries et chloroplastes) et a priori un meilleur fractionnement.



**Figure III. 15. Avantage du tampon d'extraction contenant du fixateur sur l'enrichissement en protéines référencées.** L'histogramme indique le nombre de marqueurs des chloroplastes, mitochondries et de l'appareil de Golgi dans les fractions 'microsomes' réalisées avec un tampon avec PFA à 1 % et sans PFA.

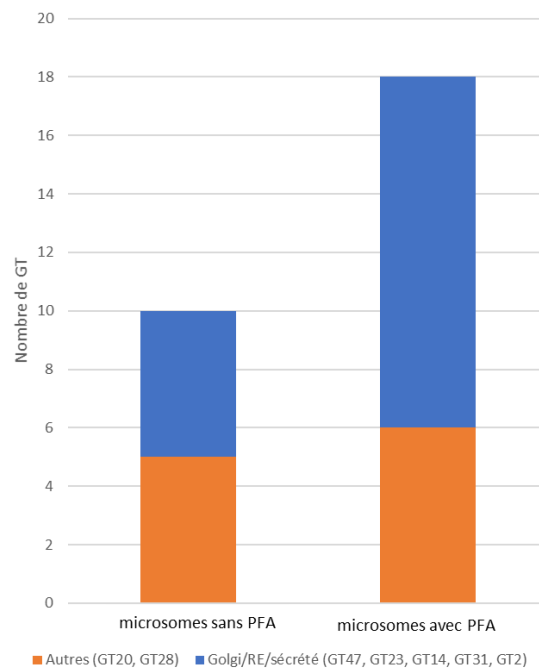
Si l'on regarde l'enrichissement en terme GO dans ces fractions, les termes associés à l'appareil de Golgi sont plus nombreux dans la fraction avec PFA que sans PFA (Figure III.16).



**Figure III. 16. Impact de la présence du fixateur sur l'enrichissement en termes GO des fractions 'microsomes' de *S. latissima*.** Les termes GO affichés sont ceux de la catégorie 'Processus biologique' associés aux chloroplastes, mitochondries, RE et l'appareil de Golgi.

Une analyse préliminaire en termes de GT, montre qu'elles sont plus importantes à être détectées dans la fraction microsomale réalisée avec de la PFA que sans PFA (Figure III.17). On retrouve les familles GT47, GT23, GT14 et GT31 qui sont principalement localisées au niveau de l'appareil de Golgi

chez d'autres eucaryotes (Ali et al., 2012 ; Harholt et al., 2012 ; Kawamoto et al., 2011 ; Sato et al., 2006) et uniquement détectées dans la fraction extraite avec de la PFA chez notre modèle.



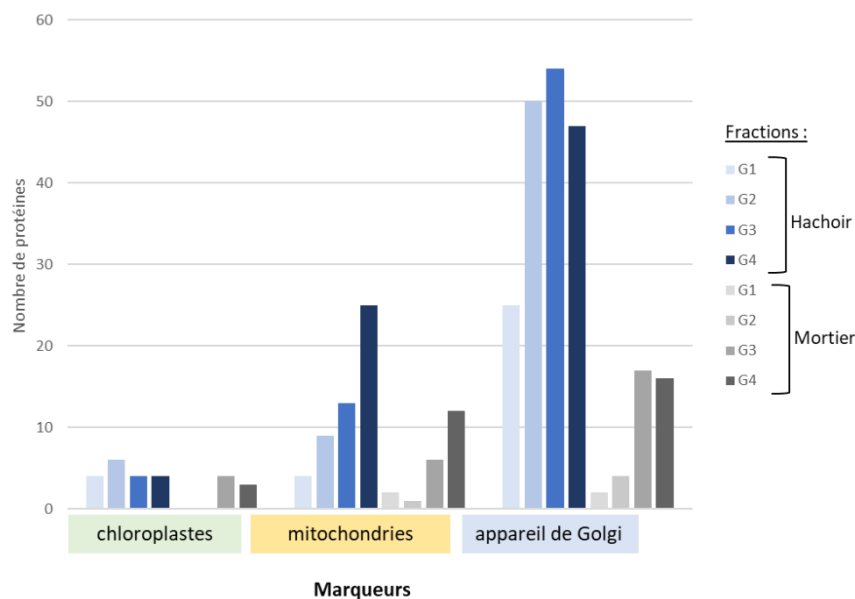
**Figure III. 17. Comparaison du nombre de GT entre les fractions 'microsomes' de *S. latissima* réalisées avec et sans PFA.** Les familles de GT sont classées suivant leurs localisations attendues.

Pour conclure, l'utilisation de la PFA dans le tampon d'extraction constitue la meilleure méthode testée pour observer l'appareil de Golgi dans la fraction 'microsomes'. La présence de celui-ci dans cette fraction est appuyée par des analyses protéomiques. Ce protocole a été reproduit et des méthodes de validation de la fraction ont été mises en place, dont les résultats constituent le Chapitre IV.

#### 3.4) Tentative de purification d'appareil de Golgi à partir de fraction de 'microsomes' d'algues brunes

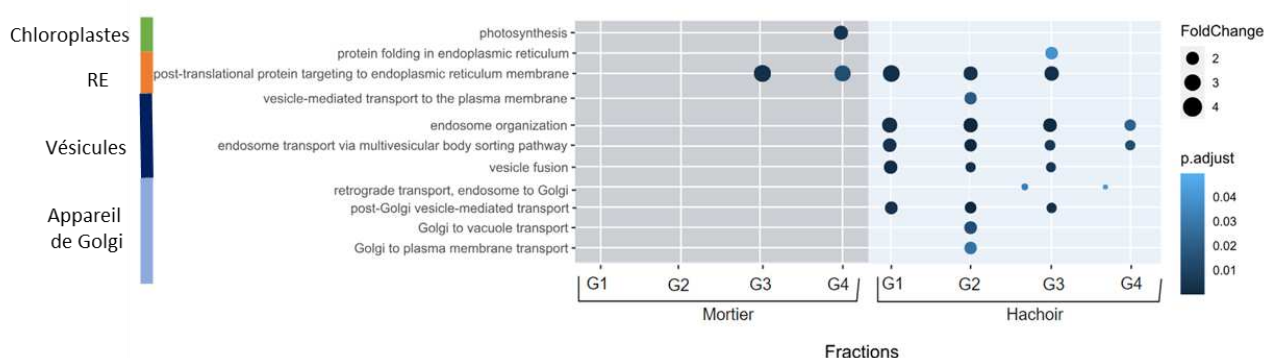
Le but initial de ce travail était de doser des activités GT dans une fraction enrichie en appareil de Golgi. Les extractions avec du PFA n'étant a priori pas les plus favorables pour la réalisation de test enzymatique, j'ai donc essayé en première instance d'obtenir ce type d'enrichissement sans PFA en réalisant enrichissement en microsomes sur un coussin de sucrose suivi d'un fractionnement sur un gradient de sucrose discontinu (Figure III.5, point 3) avec l'algue *F. serratus* dans le but de reproduire le protocole de Evans & Coughlan, (1978). L'appareil de Golgi est attendu les deux couches de sucrose 1 M et 1,25 M. Cette étape permet notamment de séparer les organites résiduels contaminants (mitochondries, chloroplastes, RE et autres vésicules) de l'appareil de Golgi. Les tests enzymatiques

n'ayant pas été concluant, nous avons cependant fait des analyses en protéomique. Celles-ci ont été réalisées pour des fractions prélevées aux interfaces de gradient de sucrose discontinu (G1 : 0,5 M/1M sucrose, G2 : 1 M/1,25 M, G3 : 1 M/1,25 M, G4 :1,5 M/1,6 M). Dans cette étude, je compare les résultats de protéomique d'une extraction réalisée au hachoir électrique avec une extraction faite au mortier. De la même manière que précédemment, j'ai comptabilisé la présence de protéines typiquement associées à l'appareil de Golgi mais aussi aux chloroplastes et mitochondries (Figure III.18). En ce qui concerne, l'extraction au hachoir, le nombre de protéines associées à l'appareil de Golgi est du même ordre de grandeur quelle que soit l'interface, G2 (1 M/1,25 M sucrose), G3 (1 M/1,25 M) et G4 (1,5 M/1,6 M). Il est légèrement plus fort à l'interface G3, avec un nombre de marqueurs moindre appartenant aux chloroplastes et mitochondries. Concernant la méthode au mortier, il y a globalement un nombre moindre de protéines typiques de chaque compartiment, traduisant sûrement un broyage moins efficace et une extraction moindre des organites et de leurs protéines associées. Par cette méthode d'analyse, l'extraction au hachoir permet d'identifier un nombre plus conséquent de marqueurs de l'appareil de Golgi mais ceux-ci ne montrent pas de différence importante entre les fractions du gradient (G2, G3 et G4), il n'y aurait donc pas un enrichissement clair dans une de ces fractions.



**Figure III. 18. Étude préliminaire d'une séparation sur gradient de sucrose pour optimiser l'enrichissement en appareil de Golgi.** L'histogramme présente le nombre de marqueurs associés aux chloroplastes, mitochondries et à l'appareil de Golgi pour des extractions à partir de *F. serratus*, réalisées au hachoir et au mortier. Les fractions de gradients de sucrose discontinu sont comparées ici. G1, G2, G3 et G4 correspondent respectivement aux interfaces entre les couches de gradient 0,5 M sucrose/1 M, 1 M/1,25 M, 1,25 M/1,5 M et 1,5 M/1,6 M.

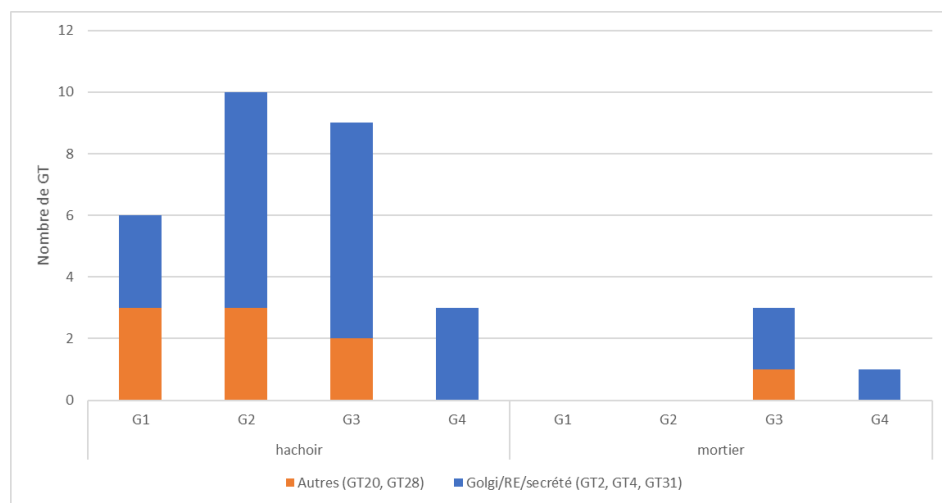
Je me suis également intéressée à l'enrichissement en termes GO par rapport au protéome prédit dans ces différentes fractions de gradient de sucrose discontinu. Les termes affichés ici sont ceux de la catégorie 'processus biologiques' liés aux compartiments : chloroplastes, mitochondries, RE, vacuoles, appareil de Golgi, mais aussi vésicules liées au transport vésiculaire. On peut constater la faible présence des termes GO associés aux chloroplastes et mitochondries pour l'ensemble des interfaces de gradient analysées (Figure III.19), ce qui est cohérent avec l'élimination de ces compartiments avec les étapes de centrifugations différentielles préalables, et avec les observations précédentes sur la recherche de protéines types. Concernant les fractions issues de l'extraction au hachoir, les interfaces G1, G2 et G3 présentent le même profil pour les termes GO associés aux vésicules. On peut constater la présence de deux termes associés à l'appareil de Golgi supplémentaires au niveau de l'interface G2 par rapport à l'interface G3. Ces observations ne montrent pas la présence plus importante de termes GO associés aux vésicules et à l'appareil de Golgi dans une des interfaces. Pour l'extraction au mortier, l'analyse ne montre pas d'enrichissement par rapport au protéome total des termes GO ciblés.



**Figure III. 19. Analyse d'une séparation sur gradient de sucrose par suivi de termes GO.** L'enrichissement en termes GO est évalué par rapport protéome prédit de *F. serratus* pour les fractions de gradient issus d'extraction au hachoir électrique et au mortier. G1, G2, G3 et G4 correspondent respectivement aux interfaces entre les couches de gradient 0,5 M/1 M, 1 M/1,25 M, 1,25 M/1,5 M et 1,5 M/1,6 M sucrose. Les termes GO affichés (catégorie 'processus biologique') sont ceux associés aux chloroplastes, mitochondries, appareil de Golgi, vésicules, endosomes, vacuole.

Concernant les GT, enzymes d'intérêts de l'étude, je les catégorise suivant leurs localisations attendues pour les 8 familles présentes dans ces fractions (Figure III.20). Le nombre de familles potentiellement localisées au niveau de l'appareil de Golgi est plus important pour l'extraction au hachoir. Parmi celles-ci, on trouve 5 membres de la famille des GT2, 1 des GT4 dans la fraction G2, 4 GT2 et 1 GT31 dans la fraction G3 pour l'extraction au hachoir. À noter que, pour les GT2 et GT4 ce ne sont pas des familles strictement retrouvées au niveau de l'appareil de Golgi et qui peuvent être

retrouvées au niveau d'autres compartiments cellulaires. Le nombre de GT et la diversité de famille identifiées paraissent peu satisfaisants par rapport aux à ce qui est classiquement retrouvé chez d'autres eucaryotes (par exemple 29 GT répartie dans 7 familles chez *A. thaliana*, Parsons et al., 2012). De plus, nous n'avons pas pu valider un enrichissement avec un marqueur biochimique pour ces fractions. Ceci, ajouté au fait que l'analyse des données protéomiques n'indiquent pas de différences importantes entre les différentes interfaces, ne m'a pas conforté dans la poursuite de l'amélioration de cette méthode. Malgré de nombreuses tentatives, je n'ai donc pas réussi à reproduire de manière satisfaisante le protocole de Evans & Coughlan, (1978) qui avait montré l'isolement d'appareil de Golgi à partir d'un gradient de sucrose.



**Figure III. 20. Comparaison du nombre de GT entre des fractions de gradient issues d'extraction au hachoir électrique et au mortier à partir de *F. serratus*.** Les familles de GT sont classées suivant leurs localisations attendues.

#### 4) Conclusions

Pour conclure, durant ma thèse, j'ai pu explorer plusieurs approches pour l'isolement de l'appareil de Golgi en testant plusieurs algues comme matériel de départ (*S. latissima* et *F. serratus*). La reproduction d'un protocole montrant l'isolement d'appareil de Golgi purifié n'a pas pu être obtenu de manière satisfaisante, en revanche, j'ai pu obtenir une fraction microsomale intéressante. En effet, après avoir pris du recul sur mes données et mené une réanalyse avec les nouvelles annotations des CAZymes (Chapitre II), l'approche qui a donné les résultats les plus prometteurs est l'extraction réalisée au hachoir électrique à partir de petites saccharines de culture et avec du fixateur dans le tampon d'extraction. En effet, dans cette fraction, nous avons pu identifier plusieurs familles de GT potentiellement localisées au niveau de l'appareil de Golgi et potentiellement impliquées dans la synthèse des fucanes (famille GT23, Chapitre II). Je décide donc de reproduire l'expérience, les résultats obtenus sont exposés dans le chapitre IV.

**Chapitre IV : Enrichissement en microsomes**  
**et identification d'enzymes liées au**  
**métabolisme des polysaccharides chez l'algue**  
**brune *Saccharina latissima***

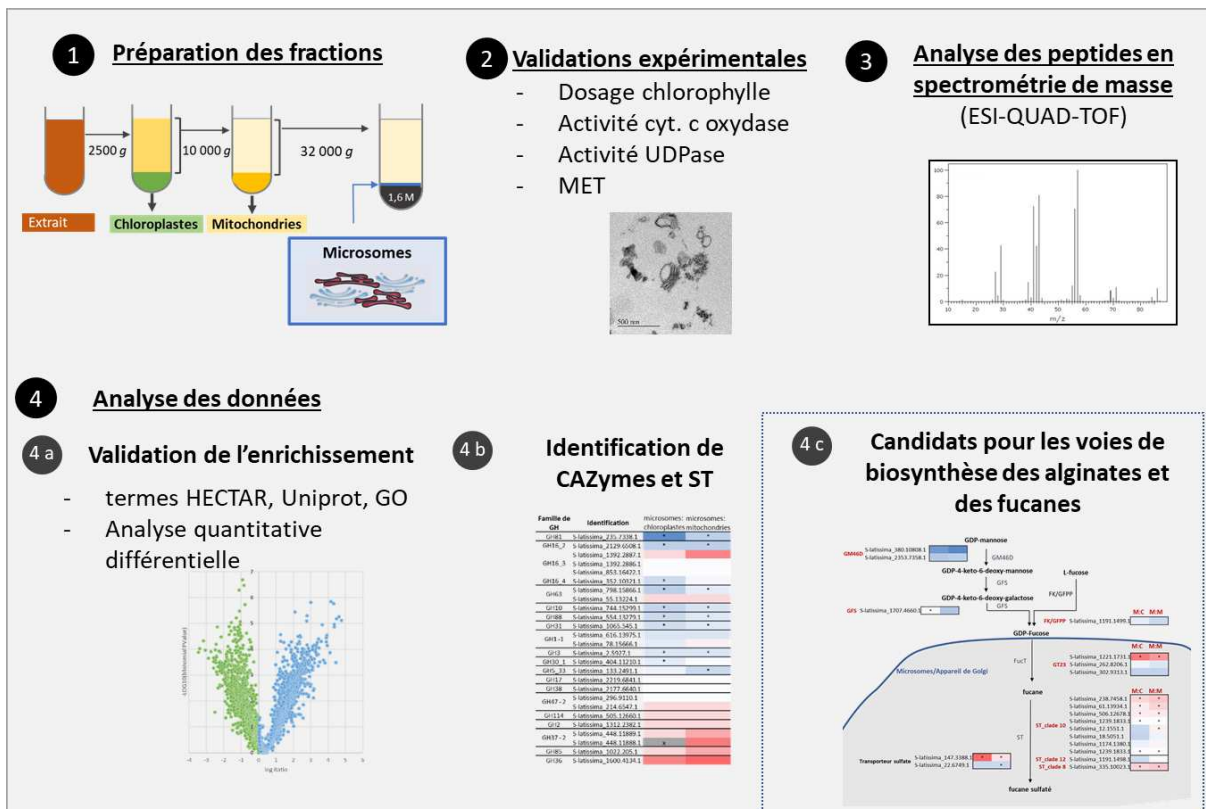
## 1) Introduction

Dans ce chapitre IV, j'utilise les optimisations présentées précédemment (Chapitre III, partie 3.1, 3.3) afin d'analyser le contenu protéique d'une fraction enrichie en microsomes chez une algue brune. Par cette analyse, je souhaite pouvoir identifier et localiser les enzymes impliquées dans la synthèse de polysaccharides de la MEC (principalement FCSP) chez l'algue brune *S. latissima*. Si des gènes candidats ont été suggérés (Mazéas et al., 2023 ; Michel et al., 2010b) (Chapitre II), aucun acteur enzymatique n'a été pour l'instant identifié, validé biochimiquement, ou localisé au niveau subcellulaire. Pour étudier ces candidats, j'utilise une approche combinant l'enrichissement en appareil de Golgi/microsomes avec des analyses protéomiques. La figure IV.1 expose la procédure expérimentale suivie. Le modèle utilisé est celui de la laminaire *S. latissima*, que nous cultivons en laboratoire, ce qui a permis d'avoir une biomasse satisfaisante de jeunes plantules. Le protocole de fractionnement subcellulaire se base sur des centrifugations différentielles et une étape de centrifugation sur coussin de sucrose (Figure IV.1, étape 1). Les analyses réalisées concernent les trois fractions obtenues lors du fractionnement subcellulaire avec un tampon contenant de la PFA 1 % soit les 'chloroplastes', 'mitochondries' et 'microsomes'. Dans la fraction 'microsomes', nous nous attendons à retrouver l'appareil de Golgi ainsi que d'autres compartiments tels que le réticulum endoplasmique ou des vésicules.

Afin d'évaluer l'enrichissement dans les différentes fractions réalisées, j'utilise un dosage colorimétrique (dosage de chlorophylle ciblant les chloroplastes), des dosages enzymatiques (tests d'activité cytochrome c oxydase ciblant les mitochondries et activité UDPase ciblant l'appareil de Golgi) et des observations en MET (Figure IV.1, étape 2). Ces analyses sont couplées à une analyse protéomique des différentes fractions (Figure IV.1, étape 3). Les analyses des protéines identifiées sont basées sur les prédictions de localisation de l'outil statistique adapté aux Straménopiles, HECTAR (Gschloessl et al., 2008), sur l'identification de protéines marqueurs de compartiments subcellulaires et sur l'étude d'enrichissement en termes GO par rapport au protéome prédit (Figure IV.1, étape 4a).

Également, une étude de quantification différentielle est menée entre les fractions sur la base d'une comparaison du nombre de spectres ayant servi à l'identification des protéines (Figure IV.1, étape 4a). Je me focalise ensuite sur l'analyse des différentes familles d'enzymes présentes et impliquées dans le métabolisme des carbohydrates (Figure IV.1, étape 4b). Enfin, je propose des candidats pour la synthèse des fucanes essentiellement, qui seront exposés dans le Chapitre VI (Discussion générale et perspectives).





**Figure IV. 1. Procédure expérimentale d'enrichissement en microsomes et analyse en protéomique associée.** Les extractions sont réalisées avec l'algue brunes *S. latissima*. La première étape (1) représente les centrifugations différentielles et l'enrichissement sur coussin de sucre permettant d'obtenir les trois fractions d'intérêts ('chloroplastes', 'mitochondries', 'microsomes'), la deuxième (2) correspond à l'étape de validation des enrichissements, l'étape trois (3) correspond à l'analyse protéomique réalisée par la plateforme PROTIM de Rennes. La dernière étape (4) correspond à l'analyse des données en bioinformatique. La partie 4.c est détaillée dans la discussion générale (chapitre VI). cyt. c : cytochrome c ; MET : microscopie électronique à transmission ; GO : Gene Ontology ; ST : sulfotransférase

## 2) Matériel et méthodes

### Algues de culture

L'algue brune *Saccharina latissima* est cultivée au laboratoire. Les conditions de culture sont décrites dans la partie 2 du chapitre III.

### Préparation de l'extrait total

Le tampon d'extraction adapté de Leonard V. Evans et Coughlan (1978) est constitué de 0,1 M MES pH 7, 1 mM MnCl<sub>2</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 M NaCl (tampon A), auquel est ajouté 3% de Dextran 200 000, 0,4% de Dextran 40 000, 1 mM DDT, 1 % de PFA et des anti-protéases (tampon B). Les algues sont incubées 1 min dans le tampon B (2,5 mL pour 1 g d'algue), puis broyées avec un mini hachoir de cuisine (SEB 855306), pendant 3 x 3 s avec 20 s d'intervalle. L'extrait obtenu est ensuite filtré avec une toile en nylon de 1 mm<sup>2</sup>. L'ensemble des étapes d'extraction sont réalisées à 4°C.

### Fractionnement subcellulaire

L'extrait est centrifugé pendant 2 min à 500 g pour éliminer les débris tissulaires et les noyaux, puis le surnageant est centrifugé à 2500 g pendant 10 min. À nouveau, le surnageant est prélevé et centrifugé à 10 000 g pendant 20 min. Les culots obtenus à 2500 g et 10 000 g correspondent respectivement aux fractions nommées 'chloroplastes' et 'mitochondries'. Le dernier surnageant est ensuite déposé sur un coussin de sucrose à 1,6 M puis centrifugé à 32 000 g pendant 1 h 15. L'interface concentrée sur le coussin de sucrose correspond à la fraction 'microsomes'. Les trois fractions obtenues sont reprises et incubées pendant 15 min dans le tampon A complété avec de la glycine (250 mM de concentration finale). Ensuite, elles sont centrifugées à 2500 g pour la fraction 'chloroplastes' (10 min), 10 000 g pour la fraction 'mitochondries' (20 min) et 32 000 g pour la fraction 'microsomes' (30 min) puis reprises dans le tampon A. Une étape de centrifugation de ces fractions est ensuite réalisée avant la préparation des échantillons pour l'analyse protéomique. Les conditions de centrifugation sont les mêmes que précédemment citées pour les fractions 'chloroplastes' et 'mitochondries' et à 18 000 g pendant 20 min pour la fraction 'microsomes'. L'ensemble des étapes de fractionnement sont aussi réalisées à 4°C.

### Dosage protéique

Les protéines sont dosées suivant la méthode de 'BiCinchoninic acid Assay' (BCA) par mesure de l'absorbance à 562 nm (Thermo Scientific™, 23225). Une gamme étalon est réalisée au préalable avec de la BSA.

## Dosage de chlorophylle

Le dosage de la chlorophylle permet de détecter la présence de chloroplastes. La méthode de dosage est la même que citée précédemment (chapitre III, partie 2). Dans ce chapitre, le dosage de la chlorophylle est réalisé à concentration protéique égale pour les fractions testées. Les mesures d'absorbances à 645 nm et 663 nm sont retenues pour le calcul de la concentration en chlorophylle :  $c (\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}) = 20.2 A_{645} + 8.02 A_{663}$  (Bruuinsma, 1963).

## Test d'activité cytochrome c oxydase

Le test d'activité cytochrome c oxydase sert de marqueur des mitochondries en évaluant la capacité des cytochromes c oxydases à oxyder le cytochrome c réduit. Dans cette étude, ce test est adapté du protocole de Spinazzi et al., (2012). Le tampon K pH7 (0,1 M  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ; 0,1 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) est préparé. Le cytochrome c (C2506, Sigma-Aldrich) est préparé à une concentration de 12,5 mg/mL dans le tampon K dilué à 20 mM, pH7. Le cytochrome c est réduit à l'aide de dithionite de sodium (quelques grains). La qualité de la réduction est déterminée à partir du ratio  $R=A_{550}/A_{565}$  d'une solution de cytochrome c à 0,25 mg/mL dans le tampon K à 20 mM (pour une qualité satisfaisante, R doit se situer entre 6 et 20). En amont de la mesure d'activité, les échantillons sont incubés 10 min dans une solution de détergeant non ionique afin de solubiliser les membranes (*n*-dodecyl- $\beta$ -D-maltoside, D4641, Sigma-Aldrich) avec un ratio de 1 :0,4. Le suivi de l'activité cytochrome c oxydase est réalisé en mesurant l'absorbance  $A_{550}$  pendant 3 min à 25 °C. La réaction est réalisée avec 10-20  $\mu\text{g}$  de protéines par échantillon dans une solution à 50 mM Tampon K, 0,125 mg/mL de cytochrome c. Les tests sont réalisés en triplicat. Une partie des échantillons est dénaturée à 98 °C pendant 10 min afin de réaliser un contrôle négatif. Un contrôle positif est réalisé à partir de l'enzyme cytochrome c oxydase fournie dans le kit (C8109, Sigma-Aldrich). Le calcul d'activité est réalisé comme suit (inspiré de Spinazzi et al. 2012) :

$$\text{Activité enzymatique (nmol min}^{-1}\text{ mg}^{-1}) = ((\Delta \text{ Absorbance de l'extrait} - \Delta \text{ Absorbance du contrôle négatif}) / \text{min} \times 1,000) / [(\text{coefficient d'extinction molaire du cytochrome c en mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1} \times \text{volume d'échantillon en mL}) \times (\text{concentration protéique de l'échantillon en mg ml}^{-1})].$$

Le coefficient d'extinction molaire du cytochrome c à 550 nm est de 18,5  $\text{mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ .

## Test UDPase

Le test UDPase est réalisé de même manière que décrite dans la partie 2) du chapitre III. Ici, les échantillons testés comportent entre 1 et 2  $\mu\text{g}$  de protéines. Pour le calcul d'activité, la mesure pour l'échantillon est soustraite à la mesure du contrôle négatif. Les tests sont réalisés en quadruplicat. Un contrôle négatif sans UDP a également été réalisé.

## Microscopie électronique à transmission

Les analyses en MET sont menées de la même manière que décrite dans la partie 2 du chapitre III.

## Analyse protéomique

Les fractions sont analysées en protéomique pour trois réplicats issus d'extractions indépendantes. Les analyses sont réalisées de la même façon que celles décrites dans la partie 2 du chapitre III.

## Analyse bioinformatique des données de protéomique

- **Analyse qualitative**

Les données de protéomiques sont réalisées de la même manière que décrite dans la partie 2 du chapitre III. De plus, des prédictions de localisations sont réalisées avec l'outil statistique HECTAR, le score seuil d'attribution d'une catégorie ('chloroplastes', 'mitochondries', 'peptide signal', 'signal d'ancrage membranaire de type II') est fixé à 0,5. (Gschloessl et al., 2008). En plus des CAZymes, les sulfotransférases et les protéines impliquées dans les voies de biosynthèse de l'alginate et des FCSP sont identifiées grâce aux annotations précédemment menées (Chapitre II). La comparaison du contenu protéique entre les réplicats et entre les différentes fractions est réalisée à l'aide de diagrammes de Venn ([bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/](http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/)).

- **Analyse d'abondance relative**

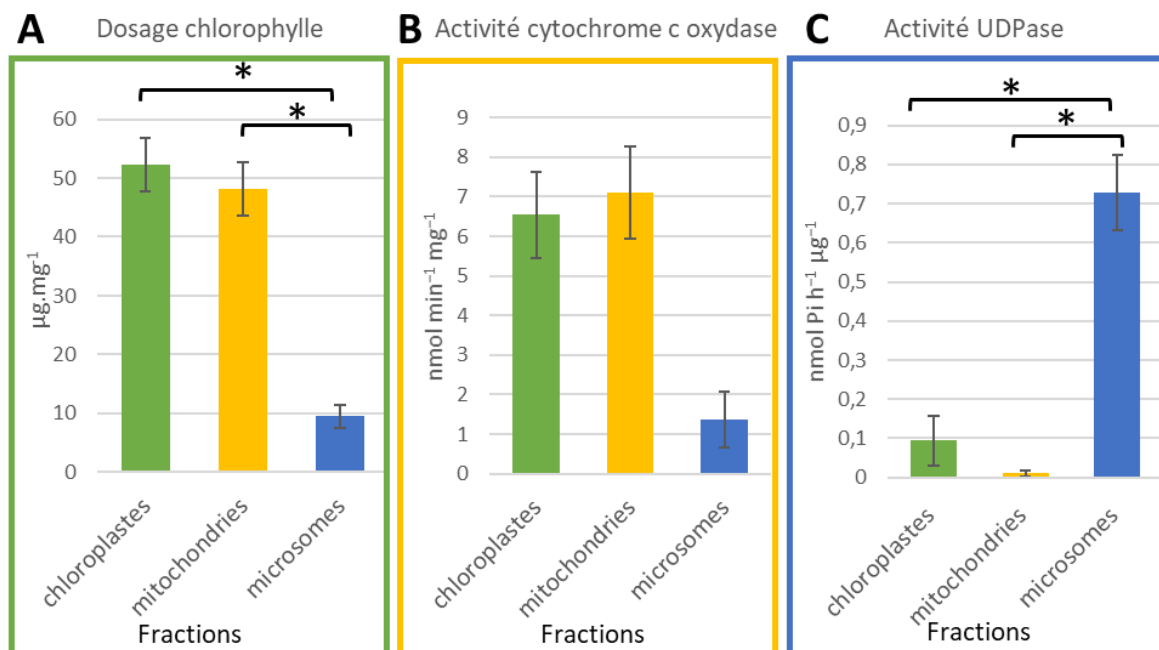
L'identification des protéines par spectrométrie de masse se base sur un nombre de spectres qui sont associés à des peptides. Le nombre de spectres acquis pour une protéine peut donner une indication de l'abondance relative de la protéine dans différents échantillons que l'on compare. L'analyse d'abondance relative menée correspond à une comparaison du nombre de spectres associés à une même protéine dans différentes fractions. Nous réalisons la comparaison du nombre de spectres, des protéines identifiées dans la fraction 'microsomes' avec celles obtenues pour les fractions 'mitochondries' et 'chloroplastes' à l'aide du logiciel Proline Studio (v2.2). Un ratio est ainsi calculé dans le sens 'microsomes'/'chloroplastes' et 'microsomes'/'mitochondries'. Pour le calcul de ratio, les nombres de spectres sont pondérés en fonction de leur implication dans l'identification d'un peptide partagé par plusieurs protéines ou spécifique à une protéine comme suggéré dans Abacus (Fermin et al., 2011). Les résultats sont affichés en  $\log(\text{ratio})$  (logarithme de base 2) et ainsi les  $\log(\text{ratio})$  positifs indiquent un enrichissement du nombre de spectres dans la fraction 'microsomes' par rapport aux autres fractions 'chloroplastes' ou 'mitochondries'. Les  $\log(\text{ratio})$  négatifs correspondent à une 'diminution' du nombre de spectres dans la fraction 'microsomes'. Cela traduit donc une abondance de la protéine plus importante dans la fraction 'microsomes' lorsque le  $\log(\text{ratio})$  est positif et

inversement pour un  $\log(\text{ratio})$  négatif. Une analyse statistique (test binomial implémenté dans Proline Studio) est menée afin de prendre en compte les 3 réplicats de chaque fraction, on parle d'enrichissement/diminution significatif quand la p-valeur est inférieure à 0,05.

### 3) Résultats

#### 3.1) Validation expérimentale de l'enrichissement en microsomes

Une fois les différentes fractions 'chloroplastes', 'mitochondries' et 'microsomes' obtenues par fractionnement subcellulaire, le dosage des différents marqueurs d'organites, permet d'évaluer la qualité d'un enrichissement subcellulaire ainsi que des contaminations pouvant avoir lieu entre les différentes fractions. Le dosage de la chlorophylle permet de détecter la présence de chloroplastes. Un enrichissement en chloroplastes est attendu dans le culot obtenu après une centrifugation à 2 500 *g*. Dans cette fraction, la chlorophylle est dosée en moyenne à 52  $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$  (Figure IV.2.A). La chlorophylle dosée dans la fraction 'mitochondries' est légèrement moindre que dans la fraction chloroplaste mais reste du même ordre de grandeur avec une moyenne de 48  $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ . La contamination en chloroplastes est donc élevée dans cette fraction. Dans la fraction 'microsomes', la teneur en chlorophylle est significativement plus faible que celle des fractions chloroplastes et mitochondries avec une moyenne de 9,5  $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ . Ce qui permet de dire que la majorité des chloroplastes ont été éliminés en amont de l'enrichissement en microsomes.



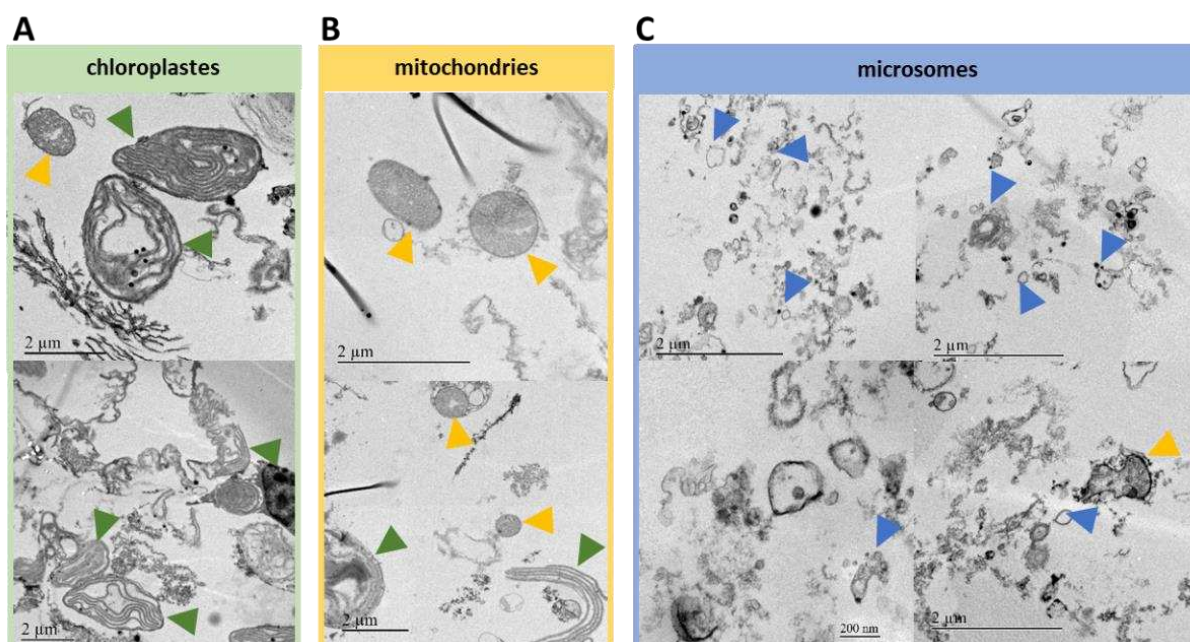
**Figure IV. 2. Mesure de la qualité de l'enrichissement des différentes fractions obtenues. A)** Dosage de la chlorophylle, qui correspond au marqueur des chloroplastes, **B)** Dosage d'activité cytochrome c oxydase, marqueur des mitochondries, **C)** Dosage d'activité UDPase, marqueur de l'appareil de Golgi. La moyenne de 3 réplicats biologiques est affichée pour chacune des fractions. Les analyses ont été effectuées à concentration protéique égale. Les statistiques ont été réalisées avec un test de Student (\*,  $P < 0,05$ ).

La cytochrome c oxydase est un marqueur enzymatique mitochondrial. La plus forte activité est mesurée dans la fraction 'mitochondries' (culot à 10 000 g) avec  $7,11 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  (Figure IV.2.B). L'activité dans la fraction 'chloroplastes' est du même ordre de grandeur avec une activité de  $6,54 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ . Ceci indique que les deux fractions sont difficilement distinguables et que des mitochondries ont pu être entraînées dans le culot chloroplastique dès la centrifugation à 2 500 g. En revanche, l'activité est moindre dans la fraction 'microsomes' ( $1,37 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ ) ce qui suggère que la présence de mitochondries y est plus faible.

Le dosage de l'activité UDPase est couramment utilisé comme marqueur de l'appareil de Golgi. Le test montre une activité 8 et 72 fois plus importante dans la fraction 'microsomes' par rapport aux fractions 'chloroplastes' et 'mitochondries', respectivement (Figure IV.2.C). Ce test montre un enrichissement significatif d'activité spécifique de l'appareil de Golgi dans la fraction 'microsomes'.

Ces différents tests indiquent que la fraction 'microsomes' est enrichie en appareil de Golgi et contient peu de mitochondries et de chloroplastes par rapport aux autres fractions réalisées en amont. Quant aux fractions 'chloroplastes' et 'mitochondries', les tests ne permettent pas de montrer un enrichissement différentiel significatif entre ces fractions.

En plus des dosages de chlorophylle et des tests enzymatiques, nous réalisons des images en MET afin de visualiser l'enrichissement en organites dans les différentes fractions. La microscopie permet d'évaluer l'intégrité et la nature des organites présents pour les différents enrichissements attendus. Dans la fraction 'chloroplastes', les chloroplastes sont clairement identifiables visuellement, ainsi que quelques mitochondries et un certain nombre de débris non reconnaissables (Figure IV.3.A). Les images de la fraction 'mitochondries' permettent de distinguer des mitochondries ainsi que des chloroplastes et fragments de chloroplastes (Figure IV.3.B). Quant à la fraction 'microsomes', de nombreuses vésicules sont présentes (Figure IV.3.C). Il est à noter que l'appareil de Golgi une fois extrait de la cellule peut adopter différentes formes (Morré & Mollenhauer, 1964) (Figure III.1). La nature exacte des vésicules observées est difficile à attribuer par cette seule observation microscopique. Pour les fragments donc les structures non circulaires sont observées, on peut supposer que cela peut correspondre à des fragments de RE, de membrane plasmique, de vésicules diverses et peuvent aussi être des morceaux de chloroplastes et de mitochondries. En conclusion, ces images ont permis de distinguer des organites intègres dans les différentes fractions, mais également la présence de débris d'organites. Les résultats de ces observations restent cohérents avec les analyses biochimiques.



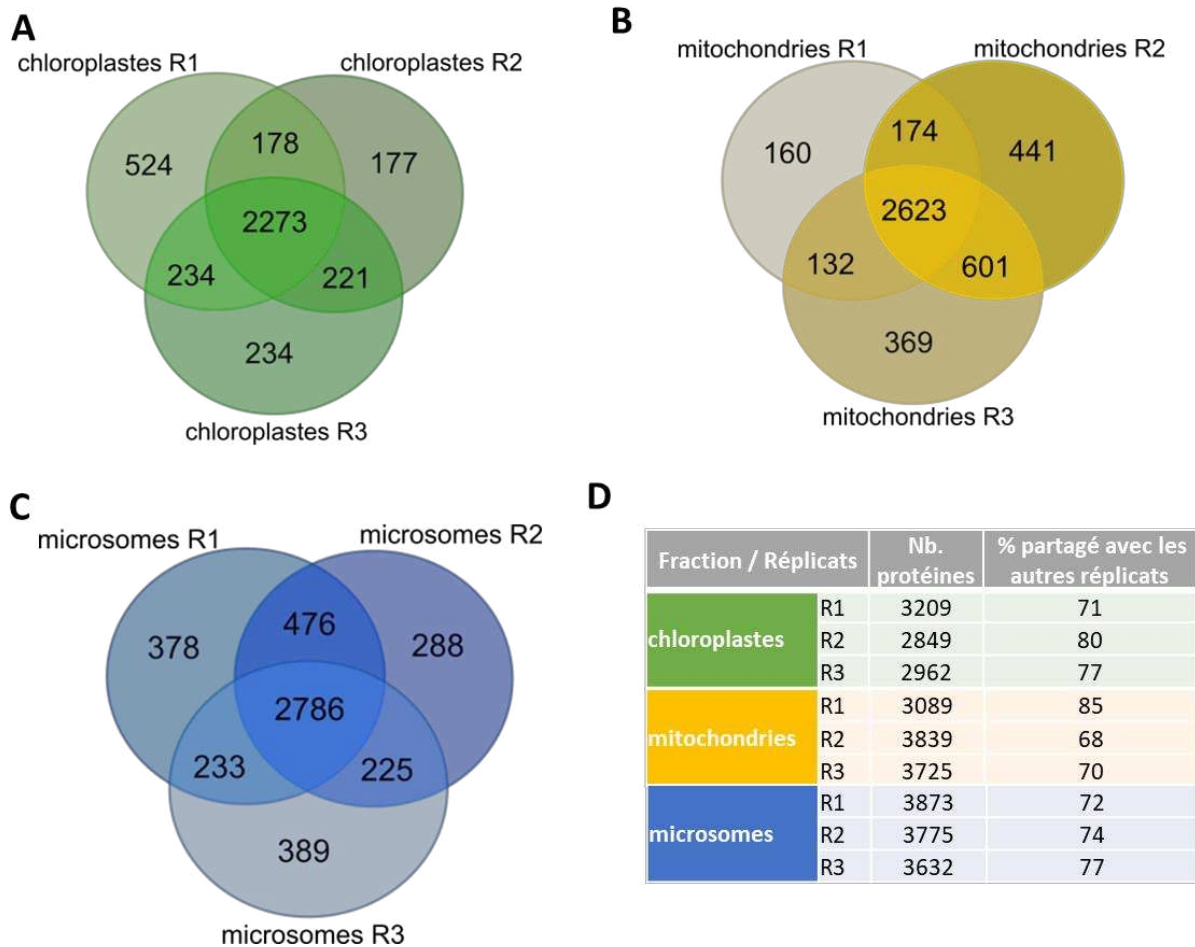
**Figure IV. 3. Images en MET des différentes fractions subcellulaires. A)** fraction ‘chloroplastes’, **B)** fraction ‘mitochondries’, **C)** la fraction ‘microsomes’. Les triangles verts indiquent des chloroplastes, les triangles jaunes des mitochondries, et les triangles bleus des vésicules dont probablement l’appareil de Golgi. n = 1 pour les fractions ‘chloroplastes’ et ‘mitochondries’ et n = 2 pour la fraction ‘microsomes’, les images du premier réplikat sont présentées dans le Chapitre III, Figure III.14.

### 3.2) Analyse protéomique qualitative des fractions obtenues

#### 3.2.1) Description qualitative du contenu des fractions

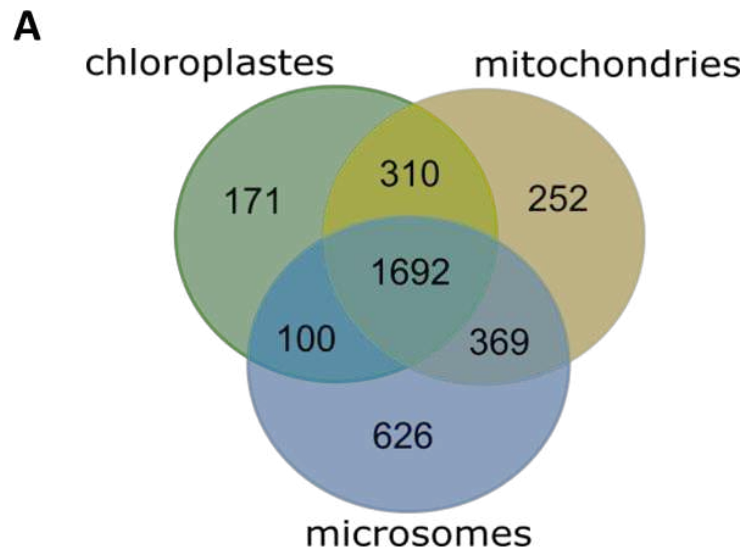
L’analyse protéomique permet d’identifier les protéines présentes dans les différentes fractions. Des analyses ont été menées sur trois réplikat biologiques pour chacune des fractions ‘chloroplastes’, ‘mitochondries’ et ‘microsomes’ (Figure IV.4). Chacun des réplikat comporte entre 2849 et 3873 protéines. La part moyenne de protéines partagées est de 76 % pour les 3 réplikat de la fraction ‘chloroplastes’, 74 % entre ceux de la fraction ‘mitochondries’ et 74 % pour les 3 réplikat de la fraction ‘microsomes’ (Figure IV.4.D). Ces résultats de réplikat biologique sont bons car ils sont du même ordre de grandeur que des pourcentages attendus pour des réplikat techniques en analyse par spectrométrie de masse (Egertson et al., 2013). Ces résultats montrent donc une bonne reproductibilité des extractions, de la réalisation des fractions et de leur analyse en protéomique.





**Figure IV. 4. Description qualitative des analyses en protéomique des fractions obtenues.** Les diagrammes de Venn montrent la répartition des trois réplicats (R1, R2, R3) pour les fractions : **A)** 'chloroplastes', **B)** 'mitochondries', **C)** 'microsomes'. **D)** tableau montrant pour chaque réplikat, le nombre total de protéines identifiées ainsi que le pourcentage de protéines communes pour un réplikat avec les deux autres réplicats.

Pour évaluer les taux de contaminations entre les fractions 'chloroplastes', 'mitochondries' et 'microsomes', les protéines communes aux trois réplicats de chacune des fractions sont comparées (Figure IV.5). Nous pouvons voir que 77 % des protéines présentes dans la fraction 'chloroplastes' sont partagées avec les autres fractions, ainsi que 67 % et 60 % pour respectivement les fractions 'mitochondries' et 'microsomes'. La part de contamination croisée entre les fractions est donc importante, bien que moindre dans la fraction 'microsomes'. Néanmoins, il est important de préciser que cette analyse apporte une vision qualitative de la répartition des protéines suivant si les protéines ont été identifiées ou non dans les différentes fractions. Il ne s'agit donc pas d'une analyse quantitative qui permettrait d'avoir une vision plus juste du taux de contamination entre fractions.



**B**

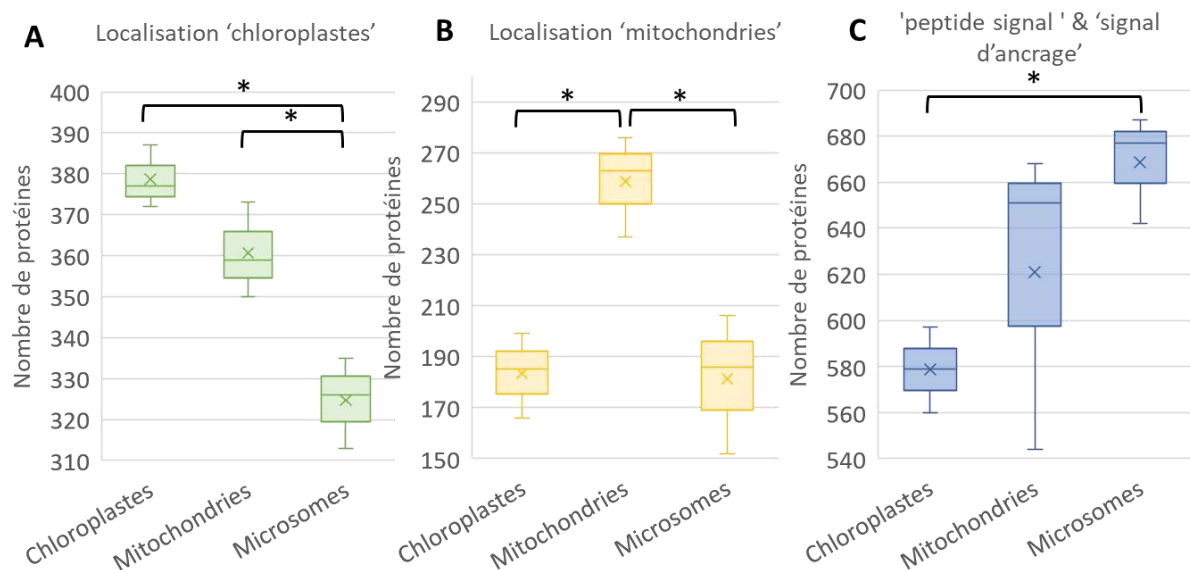
	Nb. de protéines	% partagé avec les autres fractions
chloroplastes	2273	77
mitochondries	2623	67
microsomes	2787	60

**Figure IV. 5. Comparaison qualitative du contenu protéique entre les fractions obtenues. A)** Comparaison réalisée à partir des protéines communes aux 3 réplicats pour chacune des fractions ‘chloroplastes’, ‘mitochondries’ et ‘microsomes’ et montrée sous forme de diagramme de Venn. **B)** Tableau indiquant le nombre de protéines retenues pour chacune des fractions ainsi que le pourcentage de protéines partagées avec les autres fractions.

### 3.2.2) Analyses des fractions à partir de données de localisation subcellulaire propres aux Straménopiles

Afin d'évaluer l'enrichissement en organites dans les différentes fractions réalisées, j'attribue aux protéines identifiées, les localisations subcellulaires prédites par l'outil HECTAR adapté aux Straménopiles (Gschloessl et al., 2008). Pour le protéome prédit de *S. latissima*, l'outil HECTAR prédit 558 protéines associées aux chloroplastes, 758 aux mitochondries, 1732 comme contenant un peptide signal, 575 un signal d'ancrage membranaire (de type II), 481 n'ayant pas de peptide signal et 13 568 protéines catégorisées dans ‘autre localisation’. Contrairement au peptide signal, le signal d'ancrage membranaire n'a pas vocation à être clivé, sa fonction est de maintenir la protéine dans une membrane lipidique. Bien que les protéines associées à l'appareil de Golgi et au système vésiculaire puissent disposer de peptides signaux ou de signal d'ancrage membranaire, il est difficile, à ce stade, de prédire avec précision leur localisation au niveau de l'appareil de Golgi. Dans notre étude, cet outil

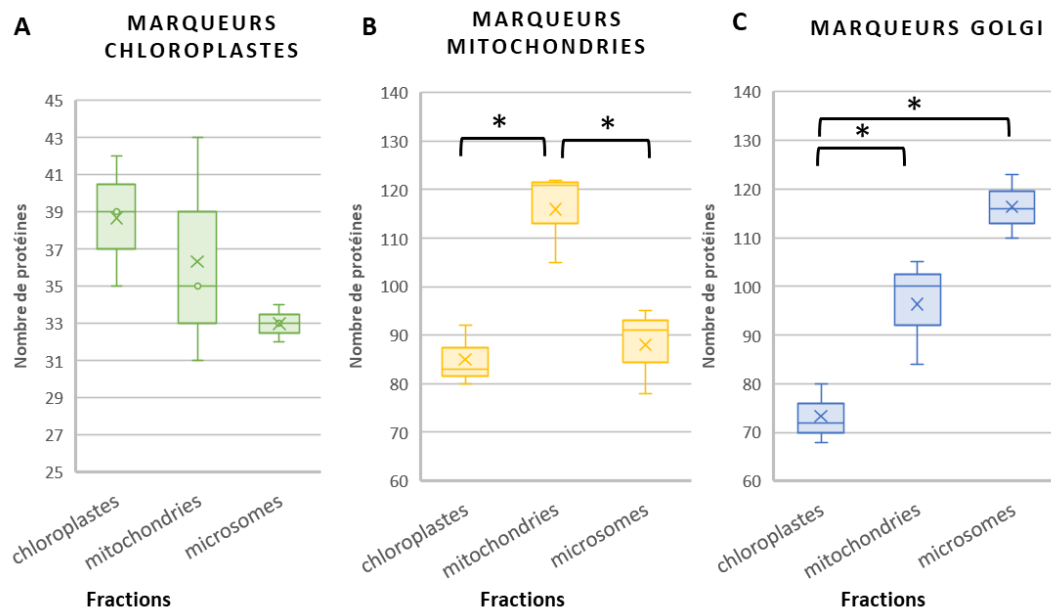
est intéressant principalement pour évaluer l'enrichissement en chloroplastes et mitochondries dans nos fractions et évaluer la contamination par ces compartiments dans la fraction microsomale. Nous incluons, les prédictions de 'peptide signal' et d'ancrage membranaire comme indicateur des protéines qui pourraient être localisées au niveau de l'appareil de Golgi ou dans d'autres compartiments comme le RE. J'ai comptabilisé, dans les 3 réplicats de chacune des fractions, le nombre de protéines associées à un compartiment en particulier (Figure IV.6). Si l'on regarde cela en termes de nombre de protéines associées aux chloroplastes (Figure IV.6.A), le nombre maximum est bien atteint dans la fraction 'chloroplastes'. C'est également le cas pour la fraction 'mitochondries' (Figure IV.6.B). Ces résultats indiquent que la présence des marqueurs 'chloroplastes' et 'mitochondries' est moindre dans la fraction 'microsomes' même s'ils sont tout de même présents. Aussi, dans la fraction 'microsomes', on trouve le maximum de protéines associées à un 'peptide signal' ou un ancrage membranaire (Figure IV.6.C), ce qui est un indicateur positif de la présence d'appareil de Golgi dans cette fraction. Le problème de l'utilisation de cet outil dans notre étude est que nous n'avons aucune possibilité d'évaluer la présence de protéines associées spécifiquement à l'appareil de Golgi. Afin de contourner, ce problème nous mettons en place des méthodes d'analyses alternatives dans la partie suivante.



**Figure IV. 6. Prédiction de localisation subcellulaire des protéines identifiées dans les fractions, à partir d'un outil de prédiction propre aux Straménopiles.** Les boxplots montre, pour chaque fraction, le nombre de protéines prédites par HECTAR pour être localisées : **A)** aux chloroplastes, **B)** mitochondries, **C)** ayant un peptide signal ou signal d'ancrage membranaire. x correspond à la moyenne entre les trois réplicats pour chacune des fractions. Les statistiques ont été réalisées avec un test de Student (\*,  $P < 0,05$ ).

### 3.2.3) Analyses des fractions avec l'utilisation de bases de données publiques regroupant des protéines référencées

En complément des analyses avec les prédictions issues du logiciel HECTAR, nous identifions des protéines en tant que 'marqueurs' cibles de chaque organite dans les bases de données publiques et dont nous recherchons ensuite les homologues dans nos fractions. Pour rappel, ces marqueurs ont été obtenus en réalisant un BLASTp du protéome de *S. latissima* contre la base de données Swiss-Prot puis en identifiant celles pour lesquelles il existe une localisation chloroplastique, mitochondriale ou Golgienne décrite chez d'autres eucaryotes. Ainsi, une liste de marqueurs subcellulaires potentiels pour *S. latissima* a été obtenue. Ensuite, le comptage de ces marqueurs dans les différentes fractions et réplicats est réalisé. Le nombre de marqueurs typiques des chloroplastes est plus important dans la fraction 'chloroplastes' que dans les fractions 'mitochondries' et 'microsomes', mais reste du même ordre (Figure IV.7.A). Ceci indique la présence de protéines associées aux chloroplastes dans l'ensemble des fractions. Les marqueurs mitochondriaux (Figure IV.7.B), sont eux retrouvés en nombre significativement plus important dans la fraction 'mitochondries' que dans les fractions 'chloroplastes' et 'microsomes'. Ce résultat appuie l'enrichissement attendu. Concernant les marqueurs de l'appareil de Golgi, ils sont en nombre plus important dans la fraction 'microsomes' par rapport aux deux autres fractions et de manière significative avec la fraction 'chloroplastes'. Le nombre de marqueurs de l'appareil de Golgi est bien majoritaire dans la fraction 'microsomes' même si important dans la fraction 'mitochondries' (Figure IV.7.C).



**Figure IV. 7. Prédiction de localisation subcellulaire des protéines identifiées dans les fractions, par exploitation de bases de données publiques.** Les protéines marqueurs de *S. latissima* sont identifiées à partir d'homologues dans la base de données Swiss-Prot. Les boxplots indiquent la répartition dans

les trois réplicats de chacune des fractions pour les protéines marqueurs localisées : **A)** aux chloroplastes, **B)** mitochondries, et **C)** à l'appareil de Golgi. x correspond à la moyenne entre les trois réplicats. Les statistiques ont été réalisées avec un test de Student bilatéral (\*, P < 0,05).

### 3.2.4) Analyses des fractions suivant leurs enrichissements en termes de référence (termes GO)

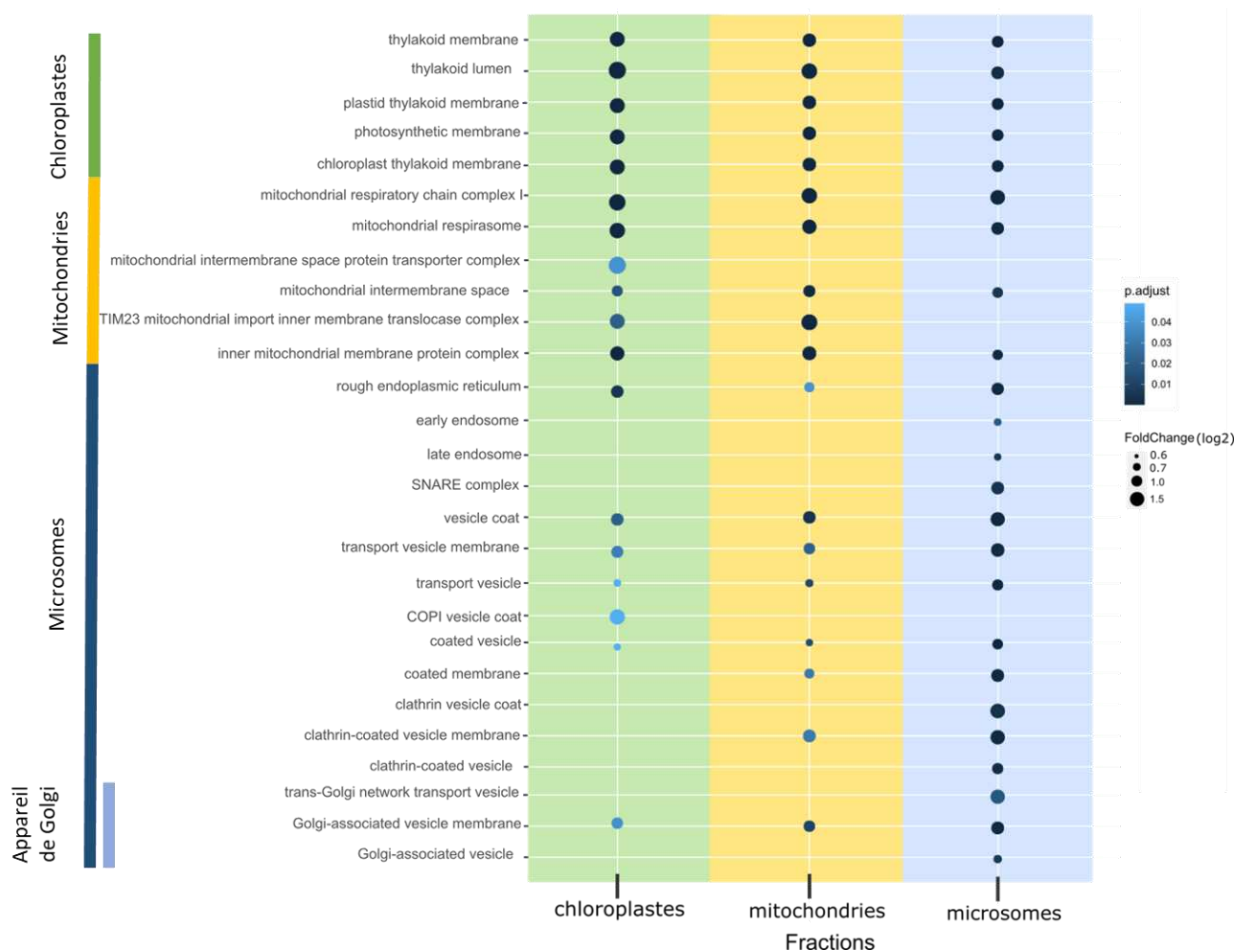
Une autre approche que j'ai explorée est l'évaluation de l'enrichissement en termes GO au sein des fractions. Cette approche permet d'élargir les fonctions analysées. En effet, ces termes se réfèrent à des localisations cellulaires, des fonctions biologiques et fonctions moléculaires et permettent ainsi de classer les protéines en fonction de leur localisation subcellulaire probable. Ces termes sont classés en trois grandes catégories : 'composant cellulaire', 'fonction biologique', 'fonction moléculaire'. À ce stade, il est important de noter qu'une grande partie des protéines du protéome prédit *in silico* de *S. latissima* n'ont pas de termes GO attribués et seul 24 % du protéome possède un terme GO. Pour simplifier l'analyse, je m'intéresse aux protéines systématiquement identifiées dans les 3 réplicats pour chacune des fractions 'chloroplastes', 'mitochondries' et 'microsomes'. Pour les protéines identifiées dans les 3 fractions d'organites distincts, environ 45 % des protéines possèdent un ou des termes GO associés (Tableau IV.1). L'analyse d'enrichissement en termes GO est menée entre les protéines identifiées dans les différentes fractions et le protéome prédits.

**Tableau IV. 1. Nombre de protéines ayant au moins un terme GO associé dans les fractions obtenues.** Le nombre de protéines associées aux fractions ici sont celles présentes systématiquement dans les 3 réplicats biologiques réalisés.

	Nombre de protéines avec au moins un terme GO associé	Nombre total de protéines	% de protéine ayant au moins un terme GO associé
Chloroplastes	1061	2273	47 %
Mitochondries	1257	2623	45 %
Microsomes	1237	2786	44 %
Protéome total	4153	17 672	24 %

Les résultats obtenus avec cette analyse sont montrés sur la Figure IV.8, seuls les résultats d'enrichissement significatifs pour les termes GO d'intérêt sont affichés ici, c'est-à-dire les termes GO indiquent une localisation/activité associée aux différents compartiments subcellulaires ciblés. Ces résultats indiquent que les termes GO associés aux chloroplastes semblent être enrichis par rapport au protéome prédit dans les trois fractions, cependant le facteur de changement ('*fold change*') est moindre pour la fraction 'microsomes'. En ce qui concerne les termes GO associés aux mitochondries, ils sont présents dans la fraction microsomale mais en moindre quantité par rapport aux fractions

mitochondriale et chloroplastique. Pour les termes GO spécifiquement associés à l'appareil de Golgi, 3 sont enrichis dans la fraction 'microsomes' par rapport au protéome total contre un seul pour les autres fractions. Par ailleurs, ce dernier est supporté par une p-valeur moindre pour la fraction 'chloroplastes' par rapport à la fraction 'microsomes' et par un facteur de changement moindre pour la fraction 'mitochondries' par rapport à la fraction 'microsomes'. Les autres termes GO gardés pour la Figure IV.8, sont liés plus largement aux microsomes et au trafic vésiculaire (par exemple RE, endosomes, protéines coatomère associées aux vésicules, etc.). Tous ces termes sont plus fortement représentés dans la fraction 'microsomes'. Ce résultat montre l'enrichissement en vésicules impliquées dans le trafic vésiculaire et en appareil de Golgi dans cette fraction. On peut noter, que le terme associé au RE est autant enrichi dans la fraction 'chloroplastes' que dans la fraction 'microsomes'. De même, on retrouve uniquement dans la fraction 'chloroplastes', un terme associé au coatomère ou protéine du manteau de type COPI : ce sont des protéines impliquées dans le transport rétrograde de vésicules au sein de l'appareil de Golgi et de l'appareil de Golgi vers le RE. Ces observations pourraient suggérer la présence de REC (RE associé aux chloroplastes) dans la fraction 'chloroplastes' et traduiraient la difficulté de séparer les chloroplastes du RE, qui sont tous deux reliés par la structuration subcellulaire des algues brunes (Figure I.5, Chapitre I).



**Figure IV. 8. Enrichissements en termes GO dans les fractions obtenues.** Seuls les termes GO de la catégorie 'composant cellulaire' sont affichés ici. L'enrichissement est indiqué suivant un FoldChange et une P-valeur entre la fraction considérée et le protéome total. Seuls les enrichissements avec une P-valeur < 0,05 sont affichés ici.

Les approches abordées dans cette partie (3.2) apportent une vision qualitative, c'est-à-dire en termes d'identifications ou non des marqueurs dans les différentes fractions. Les marqueurs prédits chez les Straménopiles (HECTAR) nous donnent des informations sur les enrichissements des marqueurs chloroplastes et mitochondries et nous montrent que le nombre maximum de marqueurs est atteint dans les fractions attendues. La recherche de marqueurs validés expérimentalement chez d'autres organismes eucaryotes (SwissProt) nous permet de cibler des marqueurs associés à l'appareil de Golgi et de montrer que ceux-ci sont aussi plus nombreux dans la fraction 'microsomes' chez notre algue brune. Une nuance est à apporter quant aux contaminations croisées entre ces fractions. L'approche avec les termes GO permet d'avoir une vision plus globale des enrichissements de termes GO dans les fractions par rapport au protéome prédit de *S. latissima*. Ceux-ci confirment la présence d'enrichissement en termes GO associés aux microsomes dans la fraction attendue. La limite se situant

dans la part plutôt faible des protéines ayant un terme GO associé et qui ne couvrent pas l'ensemble des protéines identifiées.

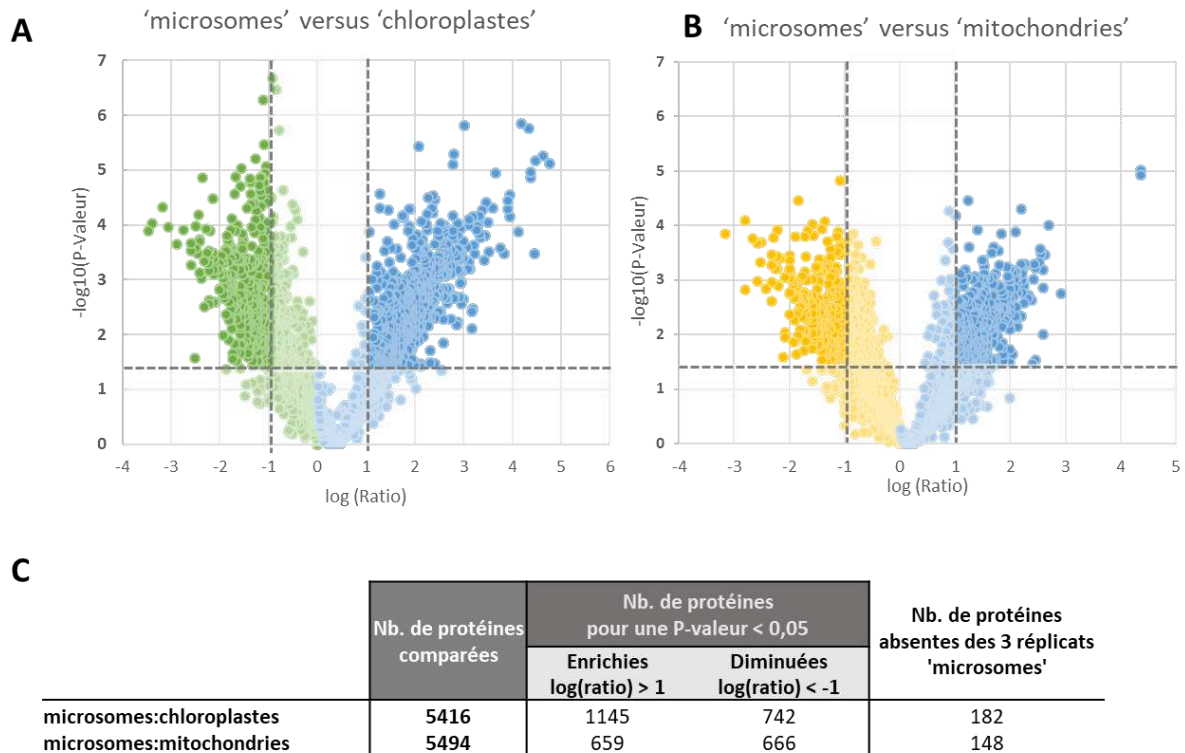
### 3.3) Analyse protéomique quantitative des fractions obtenues

#### 3.3.1) Description des fractions avec une approche quantitative

Afin d'avoir une vision qui se rapprocherait de la quantification, je poursuis l'analyse en évaluant l'enrichissement en une protéine donnée d'une fraction par rapport à une autre. Pour ce faire, je compare le nombre de spectres associés à une protéine donnée entre les différentes fractions. En d'autres termes, j'effectue une comparaison quantitative relative de cette protéine entre les différentes fractions. À l'échelle de toutes les protéines, ceci permet de voir, s'il y a une tendance d'enrichissement des fractions en un compartiment subcellulaire sur la base du type de protéines identifiées. J'ai donc comparé les nombres de spectres pour les protéines identifiées entre la fraction 'microsomes' et les fractions 'mitochondries' et 'chloroplastes' afin de générer un ratio (voir la section 2 matériel et méthode). Afin de visualiser les protéines enrichies dans la fraction 'microsomes', des graphiques de types '*volcano plot*' sont réalisés (Figure IV.9.A, Figure IV.9.B). L'axe des abscisses représente les  $\log(\text{ratio})$ . Un  $\log(\text{ratio})$  positif indique qu'une protéine serait enrichie dans la fraction 'microsomes' par rapport à la fraction 'chloroplastes' (Figure IV.9.A) ou 'mitochondries' (Figure IV.9.B). Un seuil de significativité est fixé à  $\log(\text{ratio}) > 1$ . À l'inverse, un  $\log(\text{ratio})$  négatif indique une abondance moindre dans la fraction 'microsomes' par rapport aux autres fractions. Le seuil de significativité est ici fixé à  $\log(\text{ratio}) < -1$ . L'axe des ordonnées correspond aux  $-10\log(\text{P-valeur})$  ce qui donne l'indication de la valeur statistique : plus il est important plus la p-valeur est significative. Une p-valeur seuil est fixée à 0,05. Elle est visualisée par une ligne à  $-\log_{10}(\text{p-valeur}) = 1,3$  sur les *volcano plots* (Figure IV.9.A, Figure IV.9.B). Nous pouvons voir que la part de protéines différentiellement enrichies dans la fraction 'microsomes' est plus importante pour la comparaison avec la fraction 'chloroplastes' que pour la comparaison avec la fraction 'mitochondries'. Les valeurs chiffrées indiquent 1145 protéines significativement plus abondantes ( $\log(\text{ratio})$  positif) dans la fraction microsomale par rapport à la fraction chloroplastique, et inversement 742 protéines significativement moins présentes ( $\log(\text{ratio})$  négatif) (Figure IV.9.C). La comparaison 'microsomes' versus 'mitochondries' permet de dénombrer 650 protéines qui seraient plus abondantes contre 666 qui le seraient moins (Figure IV.9.B). Si l'on regarde par rapport à l'ensemble des protéines identifiées, la part de protéines présentant un différentiel d'abondance est de 34% et 24 % respectivement pour les comparaisons microsomes:chloroplastes et microsomes:mitochondries. Ces résultats montrent que bien que les fractions soient assez proches en termes de contenu protéique (données qualitatives), il



existe à priori un différentiel d'enrichissement pour un nombre important de protéines (données quantitatives).

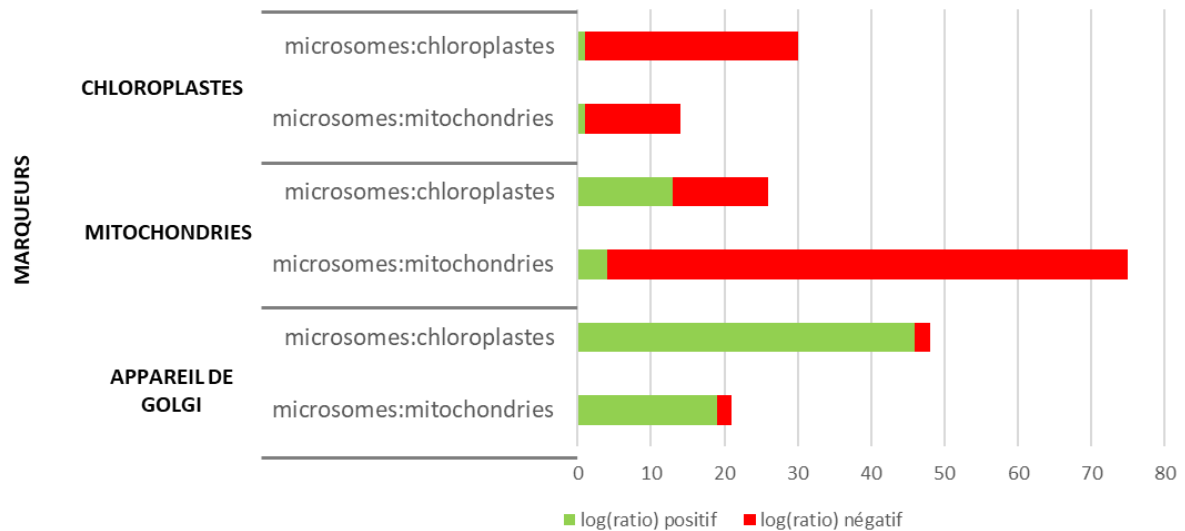


**Figure IV. 9. Abondance relative des protéines identifiées entre les différentes fractions. A)** *Volcano-plot* représentant la comparaison entre les fractions 'microsomes' et 'chloroplastes, **B)** *volcano plot* représentant la comparaison entre les fractions 'microsomes' et 'mitochondries'. Chaque point sur le graphique représente une protéine identifiée, et est positionnée en fonction de son abondance relative  $\log(\text{ratio})$  (axe des abscisses) et de son niveau de significativité statistique ( $-\log_{10}(\text{P-Valeur})$ ) (axe des ordonnées). Ici est affiché l'ensemble des protéines des 3 réplicats pour chacune des fractions. Les protéines en bleues sont les plus abondantes dans la fraction 'microsomes' ( $\log(\text{ratio})$  positif) et celles en vertes et jaunes de moindre abondance par rapport, respectivement, aux fractions 'chloroplastes' et 'mitochondries'. **C)** Répartition numérique des protéines comparées suivant leur  $\log(\text{ratio})$ . microsomes:chloroplastes et microsomes:mitochondries correspondent aux comparaisons de la fraction 'microsomes' avec respectivement les fractions 'chloroplastes' et 'mitochondries'

### 3.3.2) Comparaison quantitative des fractions à partir de protéines 'marqueurs' d'organites

Suite à l'analyse protéomique quantitative relative des différentes fractions, je m'intéresse ici plus spécifiquement aux résultats obtenus pour les protéines marqueurs des différents compartiments (identifiés par comparaison avec la base de données SwissProt). Les résultats montrent que les protéines marqueurs de l'appareil de Golgi sont à priori enrichies ( $\log(\text{ratio})$  positif) dans la fraction 'microsomes' par rapport aux deux fractions 'chloroplastes' et 'mitochondries' avec respectivement

46 et 19 protéines marqueurs significativement enrichies, contre 2 protéines marqueurs appauvries (Figure IV.10).



**Figure IV. 10. Abondance différentielle des protéines marqueurs de compartiments subcellulaires entre les fractions obtenues.** Les protéines enrichies dans la fraction ‘microsomes’ (log (ratio) positif) sont indiquées en vert. Inversement, celles appauvries dans la fraction ‘microsomes’ (log(ratio) négatif) sont indiquées en rouge. Les résultats montrés ne concernent que les différentiels significatifs ( $p < 0,05$ ). microsomes:chloroplastes et microsomes:mitochondries correspondent aux comparaisons de la fraction ‘microsomes’ avec respectivement les fractions ‘chloroplastes’ et ‘mitochondries’.

Les protéines marqueurs des chloroplastes sont pour la plupart appauvries dans la fraction ‘microsomes’ par rapport aux deux autres fractions. En effet, 29 des 30 protéines marqueurs ‘chloroplastes’ identifiées avec une abondance différentielle significative ont un log(ratio) négatif. De même, les protéines associées au compartiment mitochondrial sont majoritairement appauvries (log(ratio) négatif) dans la fraction ‘microsomes’ : 71 des 75 protéines marqueurs des mitochondries identifiés avec une abondance différentielle significative. Ces résultats sont cohérents avec les résultats biochimiques, c’est-à-dire un enrichissement en appareil de Golgi et une diminution de la présence des mitochondries et des chloroplastes dans la fraction ‘microsomes’.

#### 3.4) Identification des enzymes associées au métabolisme des carbohydrates

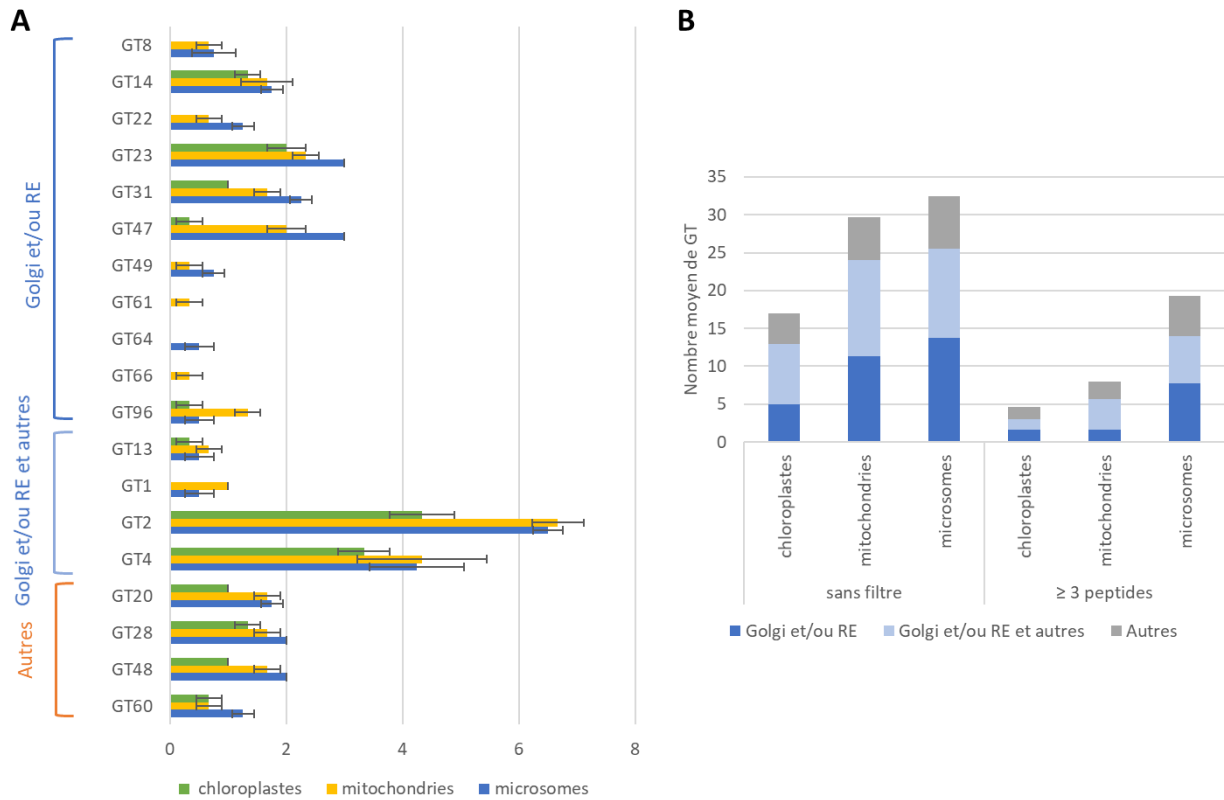
Nous avons montré que, bien qu’il existe une contamination par des protéines chloroplastiques et mitochondriales de la fraction microsomale, celle-ci semble être enrichie en appareil de Golgi et autres vésicules de transport. L’appareil de Golgi est connu pour héberger une grande partie de la synthèse des composés glycosylés tels que des polysaccharides, des glycoprotéines

ou glycolipides. Afin de mettre en évidence la synthèse de polysaccharides d'algues brunes dans ce compartiment, je répertorie les enzymes liées au métabolisme des carbohydrates présents dans ces fractions. J'indique également leur abondance relative dans la fraction 'microsomes' par rapport aux autres fractions.

#### 3.4.1) Glycosyltransférases

Les GT sont les enzymes clés de synthèse des composés glycosylés et sont en majorité retrouvées au niveau de l'appareil de Golgi chez les eucaryotes. La Figure IV.11.A indique la répartition du nombre moyen de GT par famille pour les différentes fractions (informations qualitative). Parmi les protéines identifiées dans la fraction microsomale (quel que soit le nombre de peptides associés), on trouve 32,5 GT en moyenne sur les 3 réplicats réparties en 17 familles (Figure IV.11.B). Un nombre proche de GT est également détecté dans la fraction mitochondriale. Mais lorsque l'on sélectionne les protéines identifiées avec au minimum trois peptides, indiquant une plus forte confiance d'identification, le nombre de GT est 2,4 fois plus important dans la fraction microsomale que dans la fraction mitochondriale (Figure IV.11.B). Ce résultat indique que les GT seraient mieux identifiées dans la fraction microsomale.

Nous répertorions, lorsque cela est connu chez d'autres eucaryotes, les localisations et les principales activités associées aux différentes familles de GT identifiées (Tableau IV.2). Et ainsi, sur la base de ces informations, une localisation putative aux familles de GT identifiées dans les fractions est attribuée. Afin de simplifier le message, je classe ici ces GT en trois catégories : 1) GT associées à l'appareil de Golgi, au RE et pouvant être sécrétées, 2) celles associées à l'appareil de Golgi, au RE mais pouvant avoir une autre localisation subcellulaire (e.g. membrane plasmique) et 3) celles ayant une autre localisation (chloroplastes, cytoplasme, etc.) (Figure IV.11, Tableau IV.2). Cette analyse montre que la majorité des GT identifiées dans toutes les fractions sont présentes dans les deux premières catégories citées et sont en plus grand nombre dans la fraction 'microsomes' en particulier pour les GT les mieux identifiées ( $\geq 3$  peptides) (Figure IV.11.B).



**Figure IV. 11. Nombre de glycosyltransférases identifiées dans les fractions obtenues suivant leurs familles et leur localisation putative. A)** La moyenne et les écarts types du nombre de GT identifiées par famille pour les trois réplicats de chacune des fractions sont affichés. **B)** Le nombre total de GT est affiché (sans filtre) ainsi que le nombre de GT identifiées avec un seuil de 3 peptides minimum. Les GT sont classées suivant trois catégories de localisation basées sur des données de la littérature pour d'autres eucaryotes (Tableau IV.2).

**Tableau IV. 2. Activité et localisation de GT eucaryotes appartenant aux familles identifiées par analyse protéomique chez *S. latissima*.** Les familles de GT indiquées en bleues peuvent être localisées au niveau de l'appareil de Golgi ou RE et sécrété. Les familles en bleues claires indiquent une localisation au niveau de l'appareil de Golgi ou RE mais aussi d'autres localisations subcellulaires. Celles en gris ne sont pas retrouvées au niveau de l'appareil de Golgi.

Famille de GT	Activités référencées dans CAZY	Localisation [réf. Uniprot, organisme]	Références
<b>GT1</b>	UDP-N-acetylglucosamine transférase β-glucosyltransférase UDP-glucuronosyltransférase sterol glucosyltransférase O-β-xylosyltransférase 1-β-galactosyltransférase rhamnosyltransférase ...	RE, noyau [P38242, <i>S. cerevisiae</i> ] Noyau [Q94A84, <i>A. thaliana</i> ] RE [P16662, <i>H. sapiens</i> ] Cytoplasme [Q9Y751, <i>P. pastoris</i> ]	(Sundin et al., 2004) (Huang et al., 2014) (Samokyszyn et al., 2000) (Oku et al., 2003)
<b>GT2</b>	dolichyl-phosphate β-D-mannosyltransférase dolichyl-phosphate β-glucosyltransférase Cellulose synthase N-acetylglucosaminyltransférase β-1,3-glucan synthase β-1,4-mannan synthase α-1,6-Mannosyltransférase β-1,4/1,5-galactofuranosyltransférase α-1,3-L-rhamnosyltransférase β-1,3/4-N-acetylmannan synthase β-1,4-glucuronosyltransférase O-β-glucosyltransférase cellulose synthase ...	RE [P33775, <i>S. cerevisiae</i> ] RE [P40350, <i>S. cerevisiae</i> ] Golgi [Q941L0, <i>A. thaliana</i> ] Mb. plasmique [Q9SWW6, <i>A. thaliana</i> ]	(Strahl-Bolsinger & Scheinost, 1999) (Heesen et al., 1994) (Qiao et al., 2021) (M. Kumar et al., 2016)
<b>GT4</b>	diphosphodolichol α-1,2-mannosyltransférase diacylglycerol α-sulfoquinovosyltransférase α-mannosyltransférase N-acetylglucosaminyltransférase α-glucosyltransférase ...	RE [P53954, <i>S. cerevisiae</i> ] RE [Q9XEE9, <i>A. thaliana</i> ] Chloroplaste [Q8S4F6, <i>A. thaliana</i> ]	(Cipollo et al., 2001) (M. Zhang et al., 2009) (Szpryngiel et al., 2011)
<b>GT8</b>	α-1,3-xylosyltransférase α-glucuronyltransférase α-1,3-galactosyltransférase α-1,2-glucosyltransférase ...	Golgi [O95461, <i>H. sapiens</i> ] RE [Q8NBI6, <i>H. sapiens</i> ] Golgi [Q9LSB1, <i>A. thaliana</i> ]	(Brockington et al., 2005) (Sethi et al., 2012) (Mortimer et al., 2010)
<b>GT13</b>	β-1,2-N-acétylglucosaminyltransférase	Golgi [Q8WZA1, <i>H. sapiens</i> ] Golgi, Cytoplasme, périnucléaire [P26572, <i>H. sapiens</i> ]	(Xiong et al., 2006) (Hassinen et al., 2010) (Akiva & Birgül Iyison, 2018)
<b>GT14</b>	β-1,6-N-acétylglucosaminyltransférase O-β-xylosyltransférase β-1,6-glucuronosyltransferase	Golgi [Q02742, <i>H. sapiens</i> ] Golgi, sécrété [Q86Y38, <i>H. sapiens</i> ] Golgi [Q9FLD7, <i>A. thaliana</i> ]	(Ali et al., 2012) (Kuhn et al., 2001; Schremel et al., 2014), (Knoch et al., 2013)

Famille de GT	Activités référencées dans CAZy	Localisation [réf. Uniprot, organisme]	Références
GT20	trehalose-phosphate synthase Glucosylglycerol-phosphate synthase 7-phosphate valeniolytransférase	Vacuole, secrété, paroi, cytoplasme [Q9SYM4, <i>A. thaliana</i> ]	(Almeida et al., 2007)
GT22	Dol-P-Man: Man6GlcNAc2-PP-Dol $\alpha$ -1,2-mannosyltransférase ...	RE [Q9H6U8, <i>H. sapiens</i> ]	(Frank et al., 2004)
GT23	$\alpha$ -1,6-L-fucosyltransférase	Golgi [ <i>H. sapiens</i> ]	(Kawamoto et al., 2011)
GT28	monogalactosyldiacylglycerol synthase 1,2-diacylglycerol 3- $\beta$ -galactosyltransférase 1,2-diacylglycerol 3- $\beta$ -glucosyltransférase ...	Chloroplaste [O82730, <i>A. thaliana</i> ]	(Awai et al., 2001)
GT31	$\beta$ -1,3-N-acetylglucosaminyltransférase $\beta$ -O-galactosyltransférase $\beta$ -1,6-galactosyltransférase $\beta$ -1,3-glucuronyltransférase $\beta$ -1,4-N-acetylgalactosaminyltransférase	RE [Q6Y288, <i>H. sapiens</i> ] Golgi [A7XDQ9, <i>A. thaliana</i> ] Golgi [Q9MAP8, <i>A. thaliana</i> ]	(Sato et al., 2006) (Basu et al., 2013) (Geshi et al., 2013)
GT47	$\alpha$ -1,5-L-arabinofuranosyltransférase $\beta$ -1,2-galactosyltransférase $\beta$ -glucuronyltransférase (e.g. EXT1, EXT2) $\beta$ -1,4-xylosyltransférase $\alpha$ -1,3-L-arabinofuranosyltransférase $\beta$ -1,4-glucuronyltransférase $\beta$ -1,3-xylosyltransférase $\beta$ -1,2-galactosyltransférase	Golgi [Q6DBG8, <i>A. thaliana</i> ] Sécrété, Golgi [Q7XJ98, <i>A. thaliana</i> ] Golgi, RE [Q93063/Q16394, <i>H. sapiens</i> ]	(Harholt et al., 2012) (Tamura et al., 2005) (Kobayashi et al., 2000)
GT48	1,3- $\beta$ -glucan synthase	Mb. plasmique [Q9ZT82, <i>A. thaliana</i> ] Mb. plasmique [P40989, <i>S. cerevisiae</i> ]	(Ostergaard et al., 2002) (Mazur et al., 1995)
GT49	$\alpha$ -glucuronyltransferase	Golgi [Q8N3Y3, <i>H. sapiens</i> ]	(Brockington et al., 2005)
GT60	$\alpha$ -N-acetylglucosaminyltransférase	Cytoplasme [Q8T1C6, <i>D. discoideum</i> (amibe)]	(Teng-umnuay et al., 1998)
GT61	$\beta$ -1,2-xylosyltransférase O- $\beta$ -N-acetylglucosaminyltransférase $\alpha$ -1,3-arabinofuranosyltransférase $\beta$ -1,4-N-acetylglucosaminyltransférase	Golgi [Q6ZFH6, <i>O. japonica</i> (plante)] RE [Q8NAT1, <i>H. sapiens</i> ]	(Takano et al., 2015) (Yoshida-Moriguchi et al., 2013)
GT64	$\alpha$ -N-acetylhexosaminyltransférase phosphorylceramide mannosyltransférase	Golgi, RE [Q93063/Q16394, <i>H. sapiens</i> ] Golgi [Q9LY62, <i>A. thaliana</i> ]	(Kobayashi et al., 2000) (Fang et al., 2016)
GT66	dolichyl-diphosphooligosaccharide - protéine glycotransférase ; undecaprenyl-diphosphooligosaccharide - protéine glycotransférase	RE [Q8TCJ2, <i>H. sapiens</i> ] RE [P39007, <i>S. cerevisiae</i> ]	(Kelleher et al., 2003) (Huh et al., 2003)
GT96	peptidyl serine $\alpha$ -galactosyltransférase	RE [Q8VYF9, <i>A. thaliana</i> ]	(Saito et al., 2014)

Je me suis intéressée également à avoir une vision quantitative pour les GT identifiées, sur les mêmes critères que précédemment pour les marqueurs de localisations subcellulaires, c'est-à-dire par comparaison protéomique quantitative relative basée sur le comptage du nombre de spectres. Parmi les GT identifiées, 17 semblent être significativement enrichies dans la fraction microsomale, par rapport aux fractions 'chloroplastes' et 13 par rapport à la fraction 'mitochondries' (Figure IV.12). Une GT de la famille des GT28 est quant à elle moins abondante de manière significative dans la fraction microsomale par rapport aux chloroplastes et mitochondries. Cette famille de GT est attendue au niveau du chloroplaste, ce qui est donc cohérent avec cette observation. Une GT4 est aussi significativement moins présente dans la fraction 'microsomes' par rapport aux chloroplastes. Les localisations peuvent être multiples pour cette famille (Tableau IV.2). Cela pourrait être le cas également pour cette famille de GT4 chez les *S. latissima*.

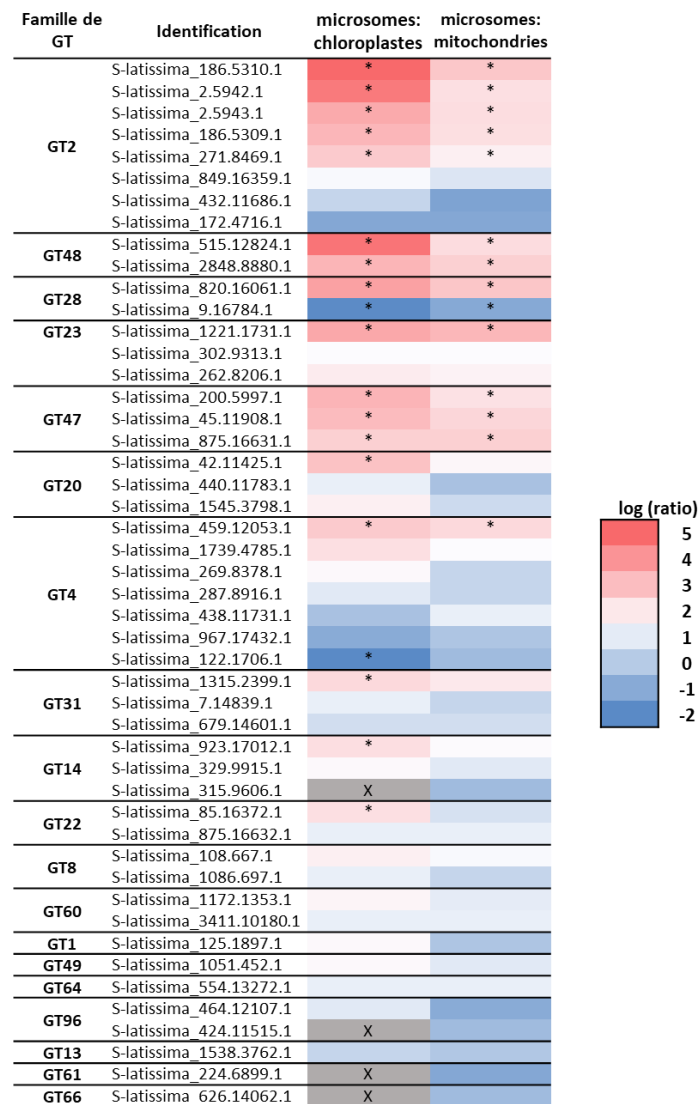


Figure IV. 12. Enrichissement relatif en GT dans la fraction 'microsomes' par rapport aux fractions 'chloroplastes' et 'mitochondries'. Identifications des GT et de leurs familles auxquelles sont associées

une valeur de log(ratio) par rapport aux comparaisons des fractions 'microsomes'/'chloroplastes' et des fractions 'microsomes'/'mitochondries'. Les \* correspondent à une P-valeur < 0,05. X indique que la protéine n'est pas identifiée dans l'une des fractions 'microsomes'.

Concernant les GT les plus abondantes dans la fraction 'microsomes' par rapport aux autres fractions, on trouve des GT48 qui seraient impliquées dans la synthèse de la laminarine ( $\beta$ -1,3-glucane), polysaccharide de stockage chez les algues brunes (Michel et al., 2010a). Leur localisation est attendue dans des vacuoles mais il n'est pas exclu qu'elles soient présentes de manière transitoire au niveau de l'appareil de Golgi. À noter qu'il est possible que la fraction enrichie en microsomes contienne également des vacuoles, ce qui ne contredirait pas l'hypothèse de leur localisation et activité.

Une des autres familles enrichies est celle des GT2. C'est une famille qui comporte de nombreux membres chez les algues brunes. Chez *S. latissima* on dénombre 11 gènes (fragments inclus). Dans cette famille, on retrouve des candidates dolichyl-phosphate  $\beta$ -glucosyltransférase (S\_latissima\_172.4716.1), dolichol-phosphate mannosyltransférase (S\_latissima\_432.11686.1), et d'autres membres dont l'activité n'est pas prédite (S\_latissima\_2.5942.1, S\_latissima\_2.5943.1, S\_latissima\_186.5309.1, S\_latissima\_186.5310.1, S\_latissima\_564.13392.1, S\_latissima\_271.8469.1). Les GT enrichies ici dans la fraction 'microsomes' sont celles pour lesquelles l'activité n'est pas prédite. Néanmoins, l'hypothèse pour cette famille est qu'elle pourrait entre autres être impliquée dans la synthèse de l'alginate néanmoins à ce stade les activités prédites restent spéculatives. Chez les plantes, les GT2 forment des complexes terminaux à la membrane plasmique sous forme de rosettes, mais ceux-ci transitent par l'appareil de Golgi. Bien que de telles configurations ne soient pas décrites chez les algues brunes, les GT2 pourrait aussi être présentes de manière transitoire au niveau de l'appareil de Golgi avant d'être localisées de façon fonctionnelle à la membrane plasmique. Dans le cas d'une implication dans la synthèse d'alginate, leur présence serait attendue au niveau de la membrane plasmique ou au niveau de vésicules osmiophiliques à proximité de la membrane plasmique (Mazéas et al., 2023 ; Nagasato et al., 2010).

La famille des GT47 possède trois membres significativement plus abondants dans la fraction microsomale. Ceci indique que tout comme chez les autres eucaryotes, ces GT seraient localisées au niveau de l'appareil de Golgi chez les algues brunes. Plusieurs activités sont retrouvées dans cette famille (Tableau IV.2). Chez les animaux, les GT47 ont des activités  $\beta$ -glucuronyltransférases et sont impliquées dans la synthèse d'héparane sulfate, chez les plantes les GT47 sont impliquées dans une plus grande diversité d'activité (e.g. galactosyltransférase, xylosyltransférase) et participent à la synthèse de presque tous les polysaccharides de paroi (e.g. xyloglucane, xylane, mannane, pectines) excepté la cellulose (1,3- $\beta$ -glucane), callose (1,3- $\beta$ -glucane) et les glucanes avec des liaisons mixtes ( $\beta$ -



1,3/1,4-glucane) (Zhang et al., 2023). Chez les algues brunes, elles pourraient participer à la synthèse de FCSP, par exemple en ayant une activité galactosyltransférase, xylosyltransférase ou glucuronyltransférases. Les membres de la famille des GT23 sont également enrichis dans la fraction microsomes, avec une protéine (*S-latissima\_1221.1731.1*) enrichie de manière significative. Cette famille serait aussi localisée au niveau de l'appareil de Golgi. Cette famille aurait une activité fucosyltransférase et constitue un candidat fort pour la synthèse des fucanes (voir Chapitre II).

Les familles GT14 et GT31 sont aussi présentes dans la fraction microsomale, avec chacune une protéine significativement enrichie par rapport à la fraction 'chloroplastes'. La famille GT14 regroupe des enzymes avec des activités différentes dont les principales sont des activités  $\beta$ -1,6-N-acétylglucosaminyltransférase, O-xylosyltransférase, glucuronosyltransférase, elles pourraient chez notre modèle être impliquée dans la synthèse de glycoprotéine ou de polysaccharides tel que les FCSP avec des activités  $\beta$ -glucuronosyltransferase par exemple. Quant au GT31, les activités principales référencées étant des galactosyltransférase et acétylglucosaminyltransférase pouvant agir sur des glycoprotéines et des glycolipides, elles sont notamment impliquées dans la synthèse des arabinoglycanes chez les plantes. Chez notre modèle, cette famille pourrait aussi être impliquée dans la synthèse de ce type de composés, des activités de synthèse de polysaccharides ne peuvent pas être exclues et notamment elles pourraient agir en tant que galactosyltransférase pour la synthèse de FCSP.

Une GT de la famille des GT22 est également enrichie de manière significative dans la fraction microsomale par rapport à la fraction chloroplastique. Les enzymes de cette famille sont attendues au niveau du RE et les activités référencées sont impliquées dans la synthèse de glycoprotéines avec des activités mannosyltransférase.

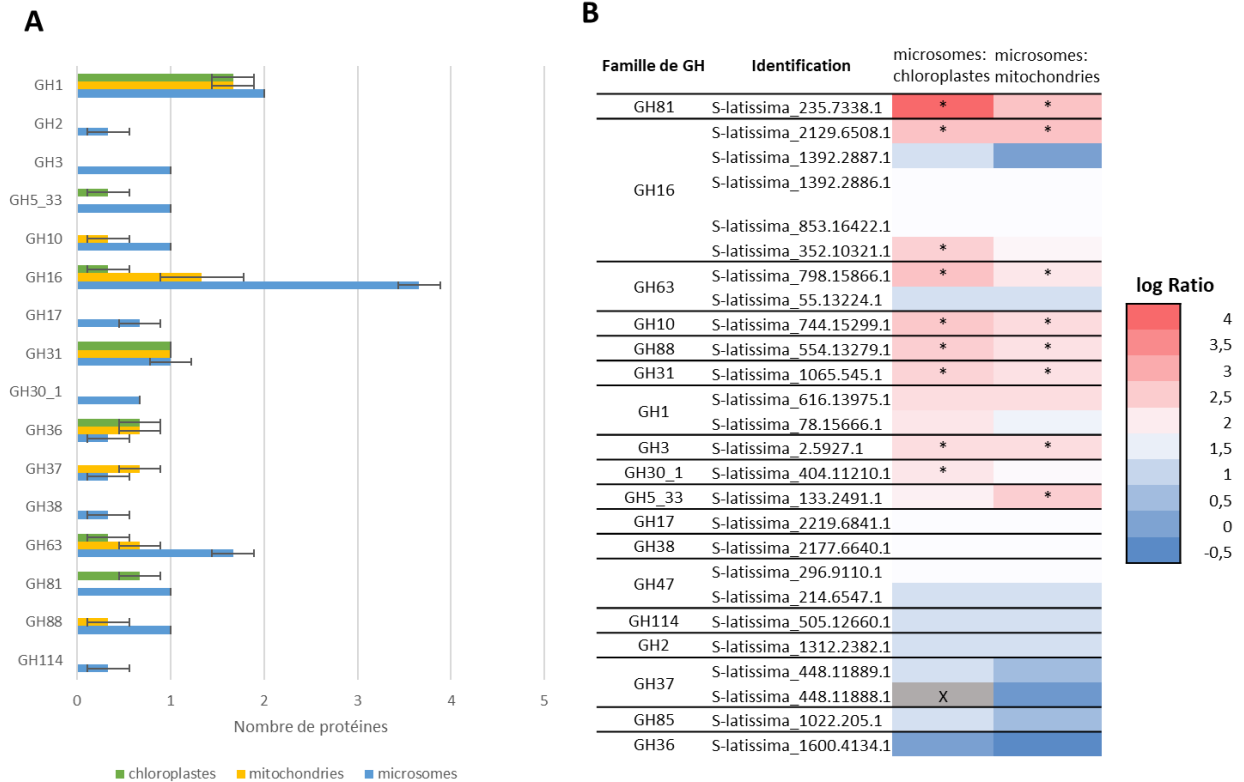
Également, les enzymes des familles des GT64 (e.g.  $\alpha$ -N-acetylhexosaminyltransférase, mannosyltransférase), GT49 ( $\alpha$ -glucuronyltransférase), GT13 (acétylglucosaminyltransférase) et GT8 (e.g. galactosyltransférase, glucuronyltransférase) sont présentes dans la fraction 'microsomes' et font parties des enzymes qui peuvent être localisées au niveau de l'appareil de Golgi chez les eucaryotes (Tableau IV.2).

#### 3.4.2) Glycoside hydrolase

Les GH sont une autre famille importante dans le métabolisme des composés glycosylés, elles sont impliquées dans la dégradation des liaisons glycosidiques pour l'absorption et le métabolisme des sucres et pour le renouvellement des glycoconjugués dans divers processus cellulaires. Contrairement aux GT, elles sont moins attendues à un compartiment en particulier, chez les eucaryotes. Les GH présentes dans les différentes fractions sont au nombre de 26 répertoriées dans 19 familles (Figure

IV.13.A). Cinq de ces familles sont retrouvées dans les 3 fractions et 8 sont retrouvées uniquement dans la fraction microsomale. D'après la comparaison protéomique quantitative relative, on peut noter que 7 protéines GH seraient plus abondantes de manière significative dans la fraction microsomale par rapport aux fractions 'chloroplastes' et 'mitochondries' (Figure IV.13.B). Trois protéines seraient enrichies dans la fraction 'microsomes' par rapport à l'une des autres fractions (GH16\_2, GH30\_1 et GH5\_33).

De la même manière que pour les GT, le Tableau IV.4 récapitule les activités et localisations subcellulaires connues chez d'autres eucaryotes pour les familles de GH identifiées dans les fractions. Une GH81 fait partie des GH les plus enrichies dans la fraction 'microsomes' comparé aux 2 autres fractions. Dans cette famille sont répertoriées des activités endo- $\beta$ -1,3-glucanases (Tableau IV.3). Chez la levure, une protéine de cette famille a été localisée dans le cytoplasme. Chez les algues brunes, les GH81 seraient impliquées dans le catabolisme de la laminarine (Michel et al., 2010a). Les membres de la famille des GH16 pourraient aussi être impliqués dans le catabolisme de la laminarine. Également, on trouve de manière plus abondante une protéine de la famille GH88, cette famille n'est pas retrouvée chez d'autres eucaryotes. Chez les bactéries, elle a une activité d'hydrolyse sur des composés insaturés, ce qui pourrait aussi être le cas chez les algues brunes. Elle pourrait dans ce cadre participer à la dégradation de l'alginate.



**Figure IV. 13. Nombre de GH et enrichissement relatif dans les différentes fractions. A)** Nombre de GH par familles dans les fractions ‘chloroplastes’, ‘mitochondries’ et ‘microsomes’. La moyenne et les écarts types entre les trois répliqués sont affichés ici. **B)** Identification des GH et de leurs familles auxquelles sont associée une valeur de log(ratio) qui correspond aux comparaisons des fractions ‘microsomes’/‘chloroplastes’ et des fractions ‘microsomes’/‘mitochondries’. Les \* correspondent à une P-valeur < 0,05. X indique que la protéine est absente de la fraction ‘microsomes’ et ‘chloroplastes’.

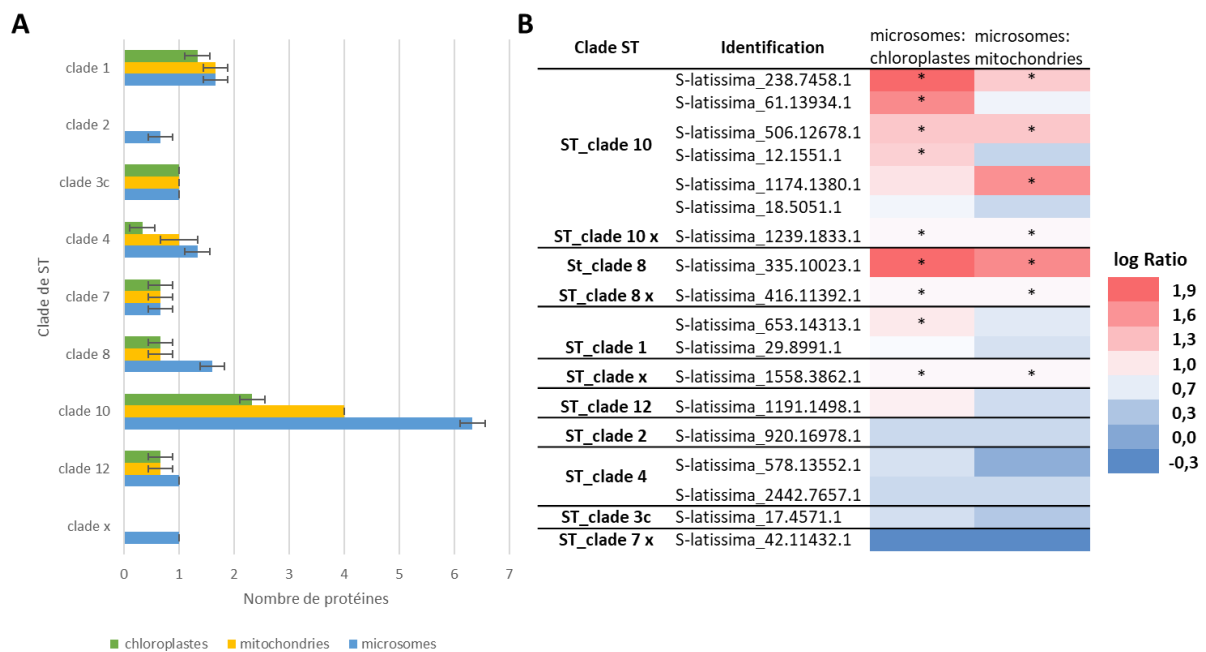
**Tableau IV. 3. Activité et localisation des familles de GH appartenant aux familles identifiées par analyse protéomique chez *S. latissima*.**

Famille de GH	Activité	Localisation [réf. Uniprot, organisme]	Référence
<b>GH1</b>	$\beta$ -glucosidase lactase-phlorizin hydrolase $\beta$ -galactosidase ; $\beta$ -mannosidase ; $\beta$ -xylosidase ; $\beta$ -D-fucosidase ...	Chloroplaste [Q93Y07, <i>A. thaliana</i> ] RE [Q9SE50, <i>A. thaliana</i> ] Membrane plasmique [P09848, <i>H. sapiens</i> ]	(Kelly et al., 2003) (Ogasawara et al., 2009) (Panzer et al., 1998)
<b>GH2</b>	$\beta$ -mannosidase $\beta$ -galactosidase ; $\beta$ -glucuronidase ...	Sécrété [O74168, <i>A. aculeatus</i> (fungi)] Lysosome [Q95327, <i>C. hircus</i> (animaux)]	(Takada et al., 1999) (Jones & Dawson, 1981)
<b>GH3</b>	$\beta$ -glucosidase 1,4- $\beta$ -xylosidase ; $\beta$ -glucosylceramidase ; $\beta$ -N-acetylhexosaminidase ; $\alpha$ -L-arabinofuranosidase ...	Lysosome [Q23892, <i>D. discoideum</i> ]	(Cardelli et al., 1986)
<b>GH5_33</b>	?		
<b>GH10</b>	endo-1,4- $\beta$ -xylanase ; endo-1,3- $\beta$ -xylanase ...	Sécrété [Q00177, <i>A. nidulans</i> (fungi)]	(Martins et al., 2014)
<b>GH16</b>	xyloglucanase endotransglycosylase $\beta$ -1,3-glucanase (active sur de la laminarine algale)	Bacteria, Animaux ( <i>Haliotis discus hannai</i> )	(Kumagai & Ojima, 2009 ; Labourel et al., 2015)
<b>GH17</b>	glucan endo-1,3- $\beta$ -glucosidase ...	Sécrété, paroi [P15703, <i>S. cerevisiae</i> ]	(Cappellaro et al., 1998)
<b>GH30_1</b>	$\beta$ -glucosylceramidase ; endo- $\beta$ -1,4-xylanase ; $\beta$ -glucosidase ; $\beta$ -glucuronidase ; $\beta$ -xylosidase ; $\beta$ -fucosidase ...	Lysosome [P04062, <i>H. sapiens</i> ]	(Lieberman et al., 2007)
<b>GH31</b>	$\alpha$ -glucosidase ; $\alpha$ -galactosidase ; $\alpha$ -mannosidase ; $\alpha$ -1,3-glucosidase ...	RE [P38138, <i>S. cerevisiae</i> ]	(Wilkinson et al., 2006)
<b>GH36</b>	$\alpha$ -galactosidase ; $\alpha$ -N-acetylgalactosaminidase exo- $\alpha$ -1,6-galactosidase ...		
<b>GH37</b>	$\alpha$ , $\alpha$ -trehalase	Membrane [Q9SU50, <i>A. thaliana</i> ]	(Frison et al., 2007)
<b>GH38</b>	$\alpha$ -mannosidase	Golgi [Q9LFR0, <i>A. thaliana</i> ]	(Strasser et al., 2006).
<b>GH63</b>	$\alpha$ -glucosidase processing $\alpha$ -glucosidase ; $\alpha$ -1,3-glucosidase ...	RE [F4HTM3, <i>A. thaliana</i> ]	(Saint-Jore-Dupas et al., 2006)
<b>GH81</b>	endo- $\beta$ -1,3-glucanase	Cytoplasme [Q12168, <i>S. cerevisiae</i> ]	(Baladrón et al., 2002)
<b>GH88</b>	d-4,5-unsaturated $\beta$ -glucuronyl hydrolase ...	Caractérisé uniquement chez des bacteries	
<b>GH114</b>	endo- $\alpha$ -1,4-polygalactosaminidase		

### 3.4.3) Sulfotransférases

Les sulfotransférases appartiennent à une famille d'enzymes impliquées dans l'ajout d'un sulfate sur un accepteur qui peut être un carbohydrate, un phénol ou une protéine. Chez les eucaryotes, les ST peuvent être localisées au niveau de l'appareil de Golgi ou dans le cytoplasme (Rini et al., 2022). On dénombre 18 sulfotransférases identifiées par analyse protéomique appartenant à différents clades de ST (Figure IV.14.A). Six sont significativement plus abondantes dans la fraction 'microsomes' par rapport aux fractions 'chloroplastes' et 'mitochondries' et 3 autres par rapport à l'une de ces deux fractions (Figure IV.14.B). Il n'existe pas de ST caractérisée chez les algues brunes, en revanche des hypothèses ont été émises sur les ST impliquées dans la sulfatation des FCSP (voir Chapitre II), avec notamment les enzymes des clades 10 puis 8. Ici, nous pouvons voir que plusieurs membres du clade 10 sont particulièrement enrichis dans la fraction microsomale. C'est également le cas pour le clade 8 avec deux membres significativement plus abondants dans la fraction microsomale que dans les autres fractions. Ces données supportent que les ST de ces clades pourraient être localisés au niveau de l'appareil de Golgi.

Les ST des clades 7, 3c, 4 semblent être appauvries dans la fraction 'microsomes' par rapport aux autres fractions. Pour ces clades, il n'existe pas d'hypothèse de fonction, mise à part leur activité putative sur des carbohydrates (Chapitre II).



**Figure IV. 14. Nombre de ST identifiées par clades et enrichissement relatif dans les fractions. A)** Nombre moyen de ST identifiées dans les différentes fractions suivant leurs clades respectifs. **B)** Identification des ST et de leur enrichissement relatif dans la fraction 'microsomes' par rapport aux fraction 'chloroplastes' et fraction 'mitochondries'. Les \* correspondent à une P-valeur < 0,05. Les

clades 10 x, 8 x et 7 x indiquent que les séquences ne sont pas présentes dans la phylogénie des ST (Chapitre II, Figure II.15, Annexe 1), l'attribution des clades putatifs se base sur l'homologie avec les séquences pour lesquelles un clade a été attribué. La séquence du clade x est incluse dans l'analyse phylogénétique mais n'a pas de clade assigné.

#### 4) Discussion

Cette étude a permis d'identifier un enrichissement différentiel de protéines issues de trois fractions subcellulaires ('chloroplastes', 'mitochondries' et 'microsomes') chez l'algue brune *S. latissima*. Les résultats ont montré que l'on pouvait mettre en évidence un enrichissement protéique différent entre les fractions bien que des contaminations entre ces fractions existent, et notamment entre les fractions 'chloroplastes' et 'mitochondries' pour lesquelles les tests enzymatiques censés discriminer ces fractions, n'ont pas été significatifs. Dans cette étude, le but était d'obtenir un enrichissement en microsomes/appareil de Golgi et non d'atteindre des enrichissements purs en chloroplastes et en mitochondries. L'obtention d'un enrichissement satisfaisant pour ces fractions aurait nécessité des étapes supplémentaires comme l'ajout de centrifugation, l'utilisation de gradient de densité (sucrose ou autre), de filtration ou encore la séparation par cytométrie (tri suivant la taille des compartiments ou validation quantitative d'un enrichissement couplé avec un marqueur fluorescent). Au vu des difficultés pour l'obtention d'une fraction enrichie en appareil de Golgi, je me suis concentrée sur l'obtention de celle-ci et je n'ai pas poursuivi les améliorations des fractions 'chloroplastes' et 'mitochondries' faute de temps.

Toutefois, j'ai pu obtenir un enrichissement cohérent et identifier des familles d'enzymes clés de synthèse de polysaccharides dans la fraction 'microsomes', et cela malgré les difficultés engendrées par le modèle 'algue brune'. En effet, comme évoqué en introduction, la configuration subcellulaire comportant un double système membranaire, cela peut rendre difficile le fractionnement des organites. De plus, l'alginate présent de manière importante dans la MEC des algues brunes, de par sa nature peut créer des gels pouvant également impacter la séparation d'organites. À cela s'ajoute, la présence de peu de marqueurs connus et pertinents pour valider nos différents enrichissements. Tout cela a rendu difficile l'isolement des organites et leur validation.

Au-delà des problèmes techniques, la part de protéines dont la fonction est inconnue reste conséquente pour le modèle de cette étude, en effet si l'on regarde les protéines homologues de *S. latissima* par rapport au génome de référence d'*Ectocarpus* sp.7 (Ec32) (Cock et al., 2010), 42 % sont annotées de 'fonction inconnue' ou n'ont pas d'homologue identifié. De plus, en termes d'assignation de termes EGGNOG (Huerta-Cepas et al., 2019) cela correspond à 51 % du protéome prédit de *S. latissima*. Cette part de protéine inconnue limite l'assignation putative de ces protéines à un

compartiment lors de l'analyse protéomique. Lors de l'analyse, je me suis principalement focalisée sur les familles de protéines impliquées dans le métabolisme des polysaccharides, mais d'autres informations pourraient être extraites de ce jeu de données, telles que l'identification de protéines impliquées dans le transport vésiculaire par exemple. Plus largement, cette étude pourrait permettre de souligner la présence de protéines potentiellement localisées aux niveaux des chloroplastes, des mitochondries et des microsomes, cela constitue un premier jeu de données pour le modèle *S. latissima*.

Les perspectives pour améliorer l'enrichissement subcellulaire en appareil de Golgi, auraient été de poursuivre le fractionnement de la fraction microsomale en réalisant un gradient de sucrose. L'approche principalement testée a été d'ajouter des couches de sucrose au-dessus d'un pré-enrichissement (fraction 'microsomes') réalisé sur un coussin de sucrose. J'ai durant ma thèse fait de nombreuses tentatives d'isolement sur des gradients de sucrose, mais je n'ai pas obtenu la validation biochimique attendue. Plusieurs raisons peuvent expliquer cela tel qu'une quantité en protéines trop faible au niveau des interfaces, tel qu'un enrichissement au niveau des interfaces trop peu concentré, ce qui limite le dosage protéique et donc la validation d'activités biochimiques. Des optimisations pourraient être envisagées comme la concentration au préalable sur coussin de sucrose d'une quantité plus importante d'extrait ou l'utilisation de marqueurs plus sensibles, tel que des anticorps.

D'autres méthodes techniques ont permis d'améliorer la description du protéome associé à l'appareil de Golgi chez d'autres organismes, notamment l'électrophorèse à flux libre ('*Free Flow Electrophoresis*', FFE) (Okekeogbu et al., 2019 ; Parsons et al., 2012) qui peut être couplée au marquage isotopique (ICAT) pour l'analyse protéomique (Parsons et al., 2019). La FFE permet l'amélioration du fractionnement, en se basant sur les différences de charges présentes à la surface des organites et vésicules de natures distinctes, permettant ainsi leur séparation. Une séparation suivant leur taille peut aussi être prise en compte. Cette technique a permis d'améliorer la pureté d'un enrichissement en appareil de Golgi et ainsi améliorer la connaissance sur son protéome pour d'autres organismes eucaryotes. Chez les algues brunes, nous avons pensé à mettre en place cette technique qui est désormais assez peu répandue (peu d'équipements accessibles en Europe) et nécessite une optimisation conséquente pour trouver les bonnes conditions de séparation des organites ciblés. De plus, les algues brunes sont riches en alginate qui est un polymère chargé négativement, la présence de ce polysaccharide dans l'extrait subcellulaire pourrait impacter le fractionnement par FFE de l'appareil de Golgi chez les algues brunes. En outre, nous n'avons pas de connaissance du niveau de charge de nos organites par comparaison à ce qui est connu chez d'autres eucaryotes. Dans le cadre d'une analyse en protéomique, la technique de marquage isotopique consiste en une amélioration de

la quantification des protéines ce qui permet d'avoir des comparaisons plus sûres en termes de quantité entre différents enrichissements. Ces techniques requièrent du matériel technique pouvant être coûteux et une expertise associée. Dans mon cas, la priorité a été d'obtenir un enrichissement en appareil de Golgi et microsomes satisfaisant afin d'analyser son contenu par analyse protéomique.

Enfin, lorsque l'on cherche à obtenir le protéome associé à l'appareil de Golgi, une partie des protéines sont présentes de manière transitoire dans ce compartiment et peuvent avoir un rôle dans d'autres compartiments subcellulaires. C'est le cas pour des GT2 chez les plantes terrestres. En effet, certaines GT2 impliquées dans la synthèse de la cellulose et forment des complexes de manière transitoire au niveau de l'appareil de Golgi avant d'être intégrées de manière active au niveau de la membrane plasmique (Crowell et al., 2010).

Un enrichissement validé biochimiquement en microsomes a été obtenu dans les derniers mois de ma thèse, ce qui ne m'a pas permis de mener une étude poussée des activités glycosyltransférases associées à cette fraction, ce qui faisant partie de l'objectif initial de ma thèse. Le dosage d'activités GT dans un extrait subcellulaire nécessite d'utiliser des sucres donneurs (par exemple des GDP-fucose) et un accepteur. Dans le cas de mesure d'activités GT d'un extrait subcellulaire, le dosage par une méthode en radioactivité (NDP-sucres marqués au  $^3\text{H}$  ou  $^{14}\text{C}$ ) est préféré car les autres méthodes de dosage d'activité de ces enzymes mesurent de manière indirecte l'incorporation de nucléotides ce qui n'est pas compatible avec un extrait pouvant contenir du phosphate ou des nucléotides libres. J'ai pu mener des tentatives de dosage d'activité biochimique en radioactivité qui n'ont pas été fructueuses et auraient nécessité d'avantage d'optimisations. Par ailleurs, notre salle habilitée à accueillir des manipulations de produits radioactifs a été fermée définitivement pendant ma fin de thèse, et de nombreux NDP-sucres radiomarqués ne sont désormais plus commercialisés (dont le GDP-fucose). Les accepteurs que j'ai pu néanmoins tester étaient des oligofucanes synthétisées chimiquement (collaboration V. Ferrières, ENSC Rennes) et des oligo-FCSP extraits de parois d'algues brunes (*S. latissima* et *H. elongata*). L'apport de l'étude de telles activités auraient permis de pouvoir attribuer des activités à un groupe de GT identifiées en protéomique. Une autre approche pour l'étude d'activités GT est la caractérisation biochimique de GT recombinantes. J'ai participé durant ma thèse à des essais dans ce sens, cela fait l'objet de mon prochain chapitre.



**Chapitre V : Tests d'expression hétérologues**  
**de glycosyltransférases d'algues brunes**

## 1) Introduction

Les dosages d'activités de GT natives issus d'un enrichissement en organites donnent une information de localisation des activités GT présentes naturellement dans l'algue. Le dosage d'activités étant réalisé à l'échelle de l'organite, l'activité mesurée est au mieux associée à un pool de GT candidates. Cette méthode ne permet pas de relier l'activité mesurée à un gène candidat spécifique. La production de GT recombinantes permet de caractériser plus finement l'activité d'une GT donnée. Dans ce chapitre, l'expression hétérologue sera étudiée comme approche pour la caractérisation de GT d'algues brunes.

Les GT sont connues pour être difficiles à produire de manière recombinante sous forme soluble et active. Nous évoquons ici uniquement le cas de l'expression de GT de type II localisées au Golgi, dont la partie catalytique est pleinement apparente dans le lumen. Afin de garantir l'expression, la partie d'ancrage membranaire est généralement tronquée. Cette modification peut entraîner une mauvaise configuration de la protéine exprimée et une mauvaise solubilisation de cette dernière. L'environnement oxydant et les modifications post-traductionnelles peuvent aussi être limitants. En effet, la partie catalytique est dans un environnement réducteur (lumen) favorisant notamment la formation de ponts disulfures pouvant être présents dans les GT (Moremen et al., 2018). De plus, les GT subissent souvent une modification post-traductionnelle de type N-glycosylation qui ne peut pas avoir lieu dans les systèmes d'expression bactériens (Welner et al., 2017). Les bactéries (Welner et al., 2017), les levures (Petersen et al., 2009), les cellules de mammifères et d'insectes (Moremen et al., 2018) sont les organismes majoritairement choisis pour l'expression hétérologue de GT.

Le système bactérien, généralement le premier testé, est facile à mettre en place et permet d'atteindre de grandes densités de cellules, pouvant se corrélérer à la quantité de protéines exprimées. En revanche, il ne permet pas de modifications post-traductionnelles comme c'est le cas dans un système eucaryote. Dans ce cas, le système levure peut être envisagé, il engendre plus de contraintes de mise en place (temps de culture, etc.) mais permet également d'atteindre des densités intéressantes (Petersen et al., 2009). Les cellules d'insectes et animales permettent aussi de réaliser des modifications post-traductionnelles nécessaires au bon repliement des protéines (Moremen et al., 2018). En revanche, ces systèmes sont plus difficiles à mettre en place car ils demandent souvent d'être équipés spécifiquement. De plus, les densités cellulaires sont plus faibles et les temps de culture sont plus longs. De manière générale, chaque système a des avantages et des inconvénients ce qui ne permet pas de définir l'un d'entre eux comme « système idéal » pour l'expression et la caractérisation de GT. Dans le cas des GT, des efforts récents ont permis d'améliorer les rendements de production

en cellules animales (système HEK293) avec des taux d'expression solubles satisfaisants de GT humaines (Moremen et al., 2018) et GT de plantes (Amos & Mohnen, 2019).

En ce qui concerne la caractérisation biochimique des GT, plusieurs méthodes existent pour mesurer leur activité tel que des techniques utilisant des NDP-sucres radiomarqués, des techniques de dosage indirect de l'activité basées sur de la bioluminescence (e.g. Glo-kits, Promega), des méthodes chromatographiques, etc. Les analyses par spectrométrie de masse permettent une assignation définitive des produits obtenus. Cette liste n'est pas exhaustive. La technique basée sur des mesures en radioactivité est couramment utilisée pour des dosages réalisés sur des organites ; elle permet une grande sensibilité de détection. Par ailleurs, c'est une technique coûteuse et qui génère des déchets importants.

Chez les algues brunes, les études portant sur la caractérisation fonctionnelle de GT recombinantes sont inexistantes. Dans notre cas, le système bactérien est maîtrisé au laboratoire et peut être facilement mis en place. Récemment, Welner et al., (2017) ont montré qu'une co-expression de protéines chaperonnes en système bactérien pouvait améliorer l'expression soluble de la GT recombinante. C'est pourquoi, la production d'une GT d'algue brune recombinante a en premier lieu été entreprise au laboratoire dans *E. coli* avec co-expression de protéines chaperonnes.

Le choix des cibles a été réalisé sur la base de génome d'*Ectocarpus* sp. 7 (Ec32) (Cock et al., 2010) et de transcriptome de *S. latissima* (Monteiro et al., 2019). Le travail entrepris sur les GT recombinantes d'algues brunes a été réalisé en amont de notre accès aux génomes de Phaeoexplorer (Chapitre II), c'est pourquoi nous nous basons sur des données disponibles publiquement. Durant ma thèse, j'ai pu travailler sur deux familles de GT, la famille 23 et 64.

La production de manière recombinante de la GT64 a été entrepris avant mon arrivé au laboratoire (2017) dans un système bactérien en co-expression avec une protéine chaperonne permettant sa solubilisation. La séquence de cette GT64 a été récupérée au laboratoire à partir des séquences physiques pleines longueur d'ADNc d'*Ectocarpus* sp. 7. Chez les animaux, le domaine GT64 est associé à un domaine GT47 formant des protéines appelées exostosines (EXT). Elles sont impliquées dans la synthèse de l'héparane sulfate (Sugahara & Kitagawa, 2002) en ayant une activité N-acétylglucosamine transférase associée au domaine GT64 et glucosyltransférase au domaine GT47. Les protéines exostosines *like* 2 (EXT-L2) sont composés juste du domaine GT64, elles ont une activité transférase du N-acétylgalactosamine (GalNAc)/ N-acétylglucosamine (GlcNAc) et sont impliquées dans le contrôle de la biosynthèse des glycosaminoglycanes (Kitagawa et al., 1999; Nadanaka et al., 2013). Chez les plantes, l'activité des GT64 d'*A. thaliana* est essentielle à la croissance et à l'adhérence cellulaire, une activité dans la synthèse des pectines (partie galactane) avait été suggérée (Singh et al., 2005).

Cependant, il a été montré par la suite que des GT64 d'*Arabidopsis thaliana* sont impliquées dans le transfert du GlcNAc sur des sphingolipides (Ishikawa et al., 2018), leur implication dans la synthèse d'un polysaccharide de la MEC est donc remis en cause. La séquence GT64 d'*Ectocarpus* sp. 7 (*EsGT64*) était la seule séquence de GT pleine longueur directement disponible sous forme d'ADNc au laboratoire en 2017. Les tests d'expression hétérologue avaient été initiés sur cette enzyme, à la fois pour permettre d'établir une preuve de concept d'expression des GT d'algues brunes et avec l'idée de pouvoir étendre le système utilisé à d'autres GT d'intérêts, mais également parce que l'on pensait cette GT64 impliquée dans la synthèse des fucoïdanes chez les algues brunes (Michel et al., 2010b), une idée largement tempérée après la publication de Ishikawa et al., (2018).

Les GT23 ont été choisis car cette famille fait partie des candidates pour la synthèse des fucanes (Mazéas et al., 2023; Michel et al., 2010b). Par ailleurs, nous avons approfondi l'étude de cette famille grâce au nombre important de génomes d'algues brunes dans le cadre de Phaeoexplorer (Chapitre II). Dans le cadre de cette étude, j'ai participé à supervision de Chloé Langlet en stage de Master 2 (2020-2021) qui a travaillé sur l'expression hétérologue d'une GT23 d'*Ectocarpus* sp. 7 (Ec 32) (*EsGT23*) et de *S. latissima* (*SlGT23*). Le but de son stage était de comparer différents systèmes d'expression hétérologue : un système bactérien, un système en levure et des cellules humaine (HEK). J'ai travaillé avec elle sur l'expression en système bactérien, travail que j'ai ensuite poursuivi dans le cadre de ma thèse.

Dans ce chapitre, je présente le travail sur l'expression en système bactérien de plusieurs cibles de GT de Phaeophyceae : *EsGT64*, *EsGT23* et *SlGT23*. Ces protéines ont été produites de manière soluble grâce à la co-expression avec des protéines chaperonnes. L'étape de purification de ces protéines sera évoquée. Pour finir, je présenterais les tentatives de dosage d'activité de celles-ci.

## 2) Matériel et méthodes

### Analyse bioinformatique des séquences

Les trois cibles sont une GT64 d'*Ectocarpus* sp. 7 EsGT64 (Ec-06\_001180.1) et deux GT23 EsGT23 (Ec-09\_000340.1) et S1GT23 (S-latissima\_302.9313.1). L'analyse des domaines transmembranaires et des peptides signaux ont été effectuées à l'aide TMHMM Server 2.0 et SignalP 4.0, respectivement. Les ILS ont été supprimés des séquences clonées (Figure IV.1).

```
>EsGT64
MGMVLRKSNTSLPTHQYTRVSVEPQHATRQAQLPPSGRFLSSSSSSSVLGSLLKRAVLVVGVVAP
VVFILWRHLF SIDAGAVLAENGGSGS SIENTFTVRMNTFRNDLLKRSAEHLASCDCVGQIQVWV
SDQENAPPSMDLFTERTRRKVVFEVHDTNSLSHRFNVTSTLGTGDGVFSTDDDL EISCADLKFGFET
WRASQNTMVGFS PRLVTRNPGTGRHSYRSWRVVRWNGVYNVILTKCCFLHRDHLR TYVDEMTAPLL
AYIDEHRNCEDIAMSVVAKFHKT PPVWVGGRVKEIGGDGISGLAHHFDARSNCVDFFAEEFGDMP
LLESSVKVYPMHTGLLSWL

>EsGT23
MMALCRRRVGFKSIAIIFLLLQHFRALTGTPHLSTIGVEAHADGHVLSVEERHNHFNSTGLFSRE
WEAMYASGHVGC DLGRKRYWRPCGLG SNIVHLLNAFVYALT VNKWSDVAVMSPPGTLKFLQCQGD
QGQSLRGYHCFRPM PHVCNFGTEKEWKNYMTRKGVSKEDLVEAPKVHWQIRRSRQAWRAQEEALK
EYGVDTFGALSVMARLLWKNLTPWLQEDVRKALERPDLDFVRRKPFVGLHVRRGDKVSQGEAQKVE
TKEYLSAAARFFDNEASQDKQDMKAIWVASDDHNVVEEVRSIARQYFPNVLDEDIVVWSSGGARGGA
VTHTKSEGYQGFVMVFADLKMLAAGSVFVGTYTSNVSRLVALLREGIHGHARDSCISLDKTEFGL
QY

>S1GT23
MMHRC SAGGRAGAGGSARRRNLRAWAQLLAVACLA FPGHFVRAEGEP AVKVTIVDRESLMLGGSQN
GAAPNETTEAAKPARTGPPQLFSPWEKMYSSARIGCHLGRKRYVWRPCGFGSNIVHLLNAFVYGL
AVKKWVDVAVISPPGQLDSLHCTRDDGVALSGFDCLFRPM PHVCTFSSIDEWKQYMTKKTVRKMQ
EESNQLTWQYIRLHQGHAQTNALKPFVDSYGALAVMARYMWGNIEPALQEHVRRREVESPDLDVFR
QSPYVGLHIRRGDKITEGEMQMVETKEYLEAARKYLEDGADPANPATGLARVDEIRSFVASDDDN
AVEEVRS LVPDFFPNVEPDNIAWISGGGKDDVQTRSKLESYNGFIFILADLQLLANADVFGTYTS
NVSRLVALLREGIHGKPRDSCISLDKERFGVNRYRKLRTTSRSDPNINNNSTDP SWQIDPWFV
```

Légende :  
Peptide signal  
Séquence clonée

Figure V. 1. Séquences protéiques de EsGT23, S1GT23 et EsGT64.

### Clonage en plasmide bactérien

La séquence EsGT64 provient d'un ADNc pleine longueur (Figure V.1). Elle était déjà disponible au laboratoire avant mon arrivée dans le plasmide d'expression pFO4 et la souche d'expression d'*E. coli* BL21 (DE3) préalablement transformée avec un plasmide additionnel pTf16 codant pour une protéine chaperonne Tigger Factor *Tig*. Les séquences de la EsGT23 et S1GT23 ont été synthétisées par ThermoFisher avec une optimisation des codons pour le système bactérien. Le clonage de ces

séquences dans le plasmide d'expression pFO4 est réalisé de la même manière que pour EsRab6 avec une étape de ligation sur la nuit à 4°C jusqu'à la validation des séquences (partie 1.2 Chapitre III). Les amorces utilisées sont pour EsGT23, sens : 5'-TTTTTGGATCCCTGAGCAGCACCATTGGTGTGAAGC-3', antisens : 5'-AAAAAAGAATTATACTGCAGGCCAAATTCGGTTTTA-3' et pour S1GT23, sens : 5'-TTTTTGGATCCGCAGTGAAAGTTACCATTGTTGATC-3' et antisens : 5'-AAAAAAGAATTAACAAACCACGGATCAATCTGCCA-3'.

#### Transformation des souches de clonage et d'expression d'*E. coli*

Les transformations en souche de clonage (DH5a) et en souche d'expression sont réalisées de la même manière que pour EsRab 6 (partie 1.2 chapitre III). Afin d'améliorer l'expression soluble des protéines cibles, la souche d'expression utilisée (BL21(DE3) et Origami2(DE3)) sont préalablement transformées avec des plasmides codant des protéines chaperonnes provenant du Kit TaKaRa Bio Plasmid set<sup>®</sup> (Tableau IV.1). Le protocole de transformation est le même que suivi précédemment (partie 1.2 chapitre III).

#### A

Plasmide	Chaperonne	Inducteur	Marqueur de résistance
pTf16	tig	L-Arabinose	chloramphénicol
pGro7	groES-groEL	L-Arabinose	chloramphénicol
pG-KJE8	dnaK-dnaJ-grpE groES-groEL	L-Arabinose Tétracycline	chloramphénicol
pKJE7	dnaK-dnaJ-grpE	L-Arabinose	chloramphénicol
pG-Tf2	groES-groEL-tig	Tétracycline	chloramphénicol

#### B

Chaperonne	Poids moléculaire (kDa)
tig	56
groES	10
groEL	60
dnaK	70
dnaJ	40
grpE	22

**Tableau V. 1. Stratégie de clonage avec les chaperonnes du kit Takara Bio Plasmid set<sup>®</sup>.** A) Correspondance des plasmides et les protéines chaperonnes associées, C) Correspondance des chaperonnes et de leurs poids moléculaires.

#### Test d'expression en moyen débit

Pour tester en parallèle les différentes combinaisons de co-expression des protéines chaperonnes et des protéines cibles, des tests à moyen débit sont mis en place. Pour se faire, des précultures de 2 mL (LB) à 37°C des souches d'expression transformées sont réalisées sur la nuit afin d'ensemencer un au 1/100 8 mL de milieu d'expression (LB), contenant les antibiotiques adéquates (ampiciline à 100 µg/mL et chloroamphénicol à 50 µg/mL). Les cultures sont réalisées à 37°C jusqu'à l'induction de l'expression des chaperonnes. Celle-ci est réalisée à une densité optique mesurée à 600 nm (DO<sub>600</sub>) comprise entre

0,1 et 0,2, et en ajoutant de l'arabinose ou de la tétracycline en fonction du plasmide utilisé (Tableau IV). L'expression des GT est ensuite induite entre 0,4 et 0,6 de densité optique, par l'ajout de 0,1 mM d'IPTG dans le milieu de culture. Les bactéries sont cultivées pendant 24 heures à 20°C et puis centrifugées à 5500 *g* pendant 20 minutes.

Les culots obtenus sont repris avec un tampon de lyse (25 mM Tris pH 7,5 ; 250 mM NaCl ; lysosyme 25 µg/mL ; ADNase ; Antiprotéase cOmplete™ (Roche)) au 1/50 par rapport au volume de culture. Puis le mélange est soniqué avec une microsonde à 15 % d'intensité (5 x 10 secondes). Et enfin, une centrifugation à 12 000 *g* de 20 min permet de récupérer d'une part la fraction comportant l'extrait soluble et d'autre part le culot qui contient des agrégats et les protéines insolubles. Ce dernier est repris dans une solution d'urée à 6 M et correspond à la fraction insoluble.

### **Expression en grands volumes**

Dans le cas de l'expression de la *EsGT64*, des tests d'expression sont réalisés en multi-fermenteur afin de tester différentes concentrations d'inducteurs (arabinose à 0,5 et 4 mg/mL et IPTG à 0,1 et 1 mM). Les cultures sont réalisées dans 100 ml de milieu suivant le protocole décrit ci-dessus. Les cibles *EsGT23* (Ori2(DE3), ptF16) et *SIGT23* (BL21(DE3), pKEJ7) sont exprimées dans des cultures bactériennes de 5 L suivant le protocole décrit ci-dessus sur une durée de 48 h. Une culture d'*E. coli* Origami2 (DE3) sans plasmide est réalisée de la même manière afin d'avoir un contrôle négatif pour l'étude d'activité GT.

### **Purification des protéines par chromatographie d'affinité**

Les étapes de purification sont les mêmes que celles décrites dans la partie 2 du Matériel et Méthodes du chapitre III. Les culots bactériens sont repris dans un tampon à 25 mM Tris-HCl pH7,5, 250 mM NaCl, contenant 5 et 10 mM d'imidazole, pour respectivement *EsGT23* et *SIGT23*. Le contenu intracellulaire est libéré par la lyse des cellules avec une presse de French. Les fractions solubles et insolubles sont récupérées après une centrifugation à 12 000 *g* pendant 20 min. La fraction insoluble est reprise dans une solution d'urée à 6 M. Après avoir chargé la fraction soluble sur la colonne d'affinité, nous réalisons un lavage avec le tampon contenant 20 mM d'imidazole dans le cas de la *EsGT23*. Les protéines sont éluées avec un gradient d'imidazole et collectées dans des fractions de 1 mL avant d'être analysées.

### **Immunodot, gel SDS et Western Blot**

Les immunodots, gels et western blot sont réalisés de la même manière que celle décrite dans la partie 1.2 du Chapitre III.

### Mesure d'activité par radioactivité

Dans le cas de la *EsGT64*, je réalise des tests en radioactivité avec l'enzyme non purifiée. Un lysat d'*E.coli* origami2 (DE3) sans plasmide sert de contrôle négatif. Dans le cas des GT23, avant de procéder au test d'activité enzymatique, je réalise une dialyse des protéines purifiées contre 2 L de tampon 25 mM Tris-HCl pH7,5, 250 mM NaCl.

Le milieu réactionnel est composé des éléments suivants : 25 mM Tris HCl pH7,5, 5mM MnCl<sub>2</sub>, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mg/ml d'accepteur, 20 μM de sucre activé non radiomarqué, 2 μM de sucre activé radiomarqué. Dans le cas de la GT64, deux accepteurs sont testés, il s'agit de mélanges oligosaccharidiques obtenus par l'hydrolyse chimique de FCSP extraits de *H. elongata* et *S. latissima*. Les sucres donneurs radiomarqués utilisés sont l'UDP-<sup>3</sup>H -GlcNAc et le <sup>3</sup>HGDP-fucose (PerkinElmer). Les donneurs non marqués, UDP-GlcNAc et GDP-fuc viennent de Promega. Différents volumes d'enzymes de la fraction soluble dans le cas de *EsGT64*, ont été testés, 5, 10 et 15 μL pour un volume final de réaction de 30 μL. La réaction est incubée à 30 °C pendant 1 h (ou une nuit pour certains tests). Pour éliminer les sucres activés radiomarqués non incorporés en fin de réaction, 500 μL de résine échangeuse d'anions (DOWTEX 1x8, de 200-400 mesh, Merck, préalablement préparée à raison de 1 g dans 4 mL d'eau distillée) sont ajoutés. La solution est centrifugée pendant 2 minutes à 13 000 *g*. Le surnageant est récupéré (~420 μL). Pour la révélation, 1 mL de liquide de scintillant est ajouté et la radioactivité incorporée est mesurée (Tri-Carb, PerkinElmer).

### Mesure d'activité par bioluminescence

Une méthode alternative à l'utilisation de radioactivité, et pertinente pour des protéines recombinantes, est l'utilisation d'un kit *GDP-Glo™ Glycosyltransferase Assay* (Promega) basé sur un dosage indirect de l'activité par émission de bioluminescence. La réaction est schématisée sur la Figure V.2. Les réactions sont réalisées dans un tampon à 20 mM Tris-HCl pH 7,5 ; 200 mM NaCl ; 2 mM MnCl<sub>2</sub> ; 8mM MgCl<sub>2</sub> ; 2mM CaCl<sub>2</sub>. Le volume final de réaction est de 25 μL, en plaques 96 puits (LUMITRAC 200, Greiner). Les sucres donneurs testés sont le GDP-fucose et le GDP-mannose (Ultrapure, Promega) à une concentration de 100 μM. L'activité attendue des GT23 est de type fucosyltransférases, aussi le GDP-mannose sert de contrôle négatif putatif. Les accepteurs testés sont les mêmes que ceux indiqués précédemment, utilisés à une concentration finale de 4 mg/ml. Les tests sont réalisés pour les enzymes *EsGT23* et *S/GT23* purifiés. Des contrôles négatifs sont réalisés à partir d'enzymes bouillies 10 min à 98 °C.

Les réactions sont incubées à température ambiante pendant 1 h puis stoppées avec l'ajout de 25 μL de 'GDP Detection Reagent' qui contient l'enzyme GDP-Glo et la luciférase. La luminescence est



mesurée après 1 h d'incubation à température ambiante avec un luminomètre Berthold pour microplaques.

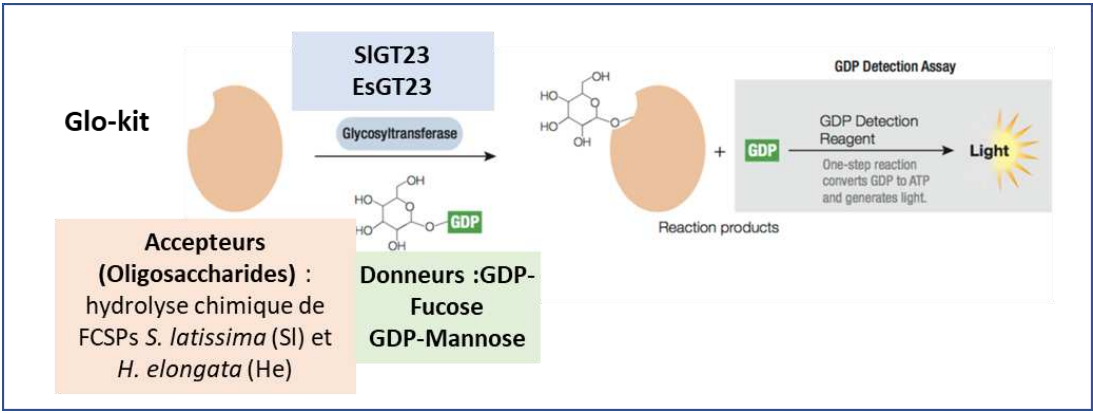


Figure V. 2. Détection d'activité glycosyltransférase à l'aide du Glo-Kit (Promega).

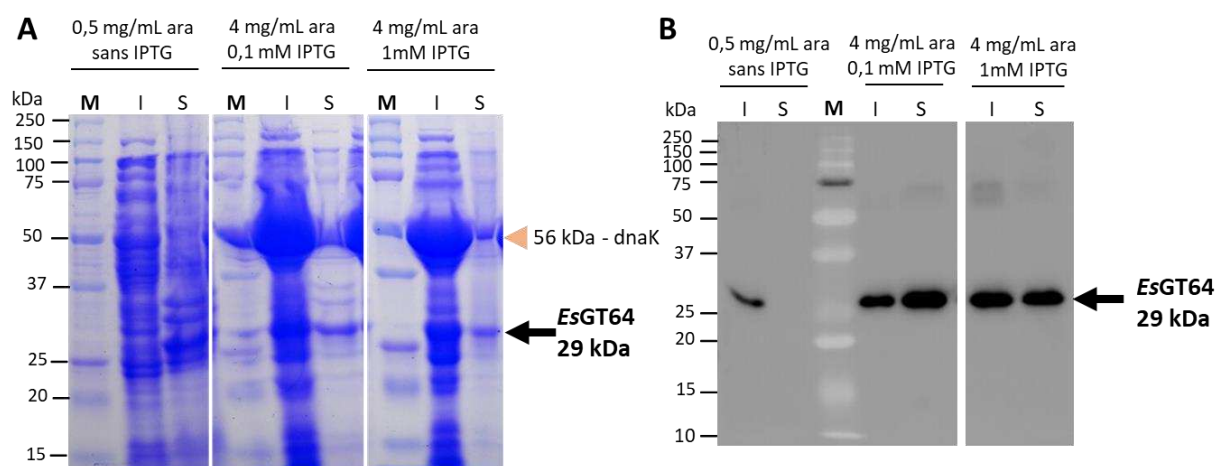
### 3) Résultats et discussion

#### 3.1) Expression hétérologue

##### 3.1.1) Test de plusieurs conditions d'expression hétérologue de *EsGT64*

Dans le cas de la *EsGT64*, le choix de la production avec la protéine chaperonne avait été fait avant mon arrivée au laboratoire. J'ai pour mon part participé la culture de cette protéine dans différentes conditions d'expression.

La mise en place de cultures bactériennes en multi-fermenteur permet de tester plusieurs conditions en parallèle. Dans notre système, une double induction est nécessaire pour induire l'expression de la protéine chaperonne (plasmide pTf16) puis de la *GT64* (plasmide pFO4), respectivement. Les inducteurs sont l'arabinose et l'IPTG. Trois cultures ont été menées afin de tester différentes conditions de concentrations d'inducteurs. Dans la première condition, seule la protéine chaperonne est induite. Le WB de la fraction insoluble récupérée montre un signal à 29kDa, ce qui correspond à la taille attendue pour la *EsGT64* (Figure V.3). Ce signal indique une expression de fuite de la protéine sans induction IPTG. Dans les conditions 2 et 3, la concentration d'arabinose (4 mg/mL) est identique alors que celle d'IPTG varie (respectivement 0,1 mM et 1 mM). Dans les fractions solubles de ces conditions, les protéines chaperonnes sont visibles à 56 kDa sur gel SDS-page coloré au bleu de Coomassie, leur quantité est importante (Figure V.3). On peut également voir une bande conséquente à 29 kDa qui correspond à la *EsGT64* dans les fractions solubles et insolubles dans les deux conditions de culture (Figure V.3). Le WB confirme la présence de la *EsGT64* dans les fractions solubles et insolubles des deux cultures. Pour conclure, nous avons pu obtenir la protéine *EsGT64* de manière soluble et valider des concentrations en inducteurs à utiliser, le choix préférentiel étant les conditions à 4 mg/mL d'arabinose et 1 mM d'IPTG.



**Figure V. 3. Expression de la *EsGT64* recombinante dans trois conditions de concentrations d'inducteurs.** **A)** Gel SDS-PAGE coloré au bleu de Coomassie et **B)** Western blot des fractions soluble (S), insoluble (I) et purifiées (P) de la *EsGT64*, produites en milieu contenant des concentrations d'inducteur différentes, ara : arabinose.

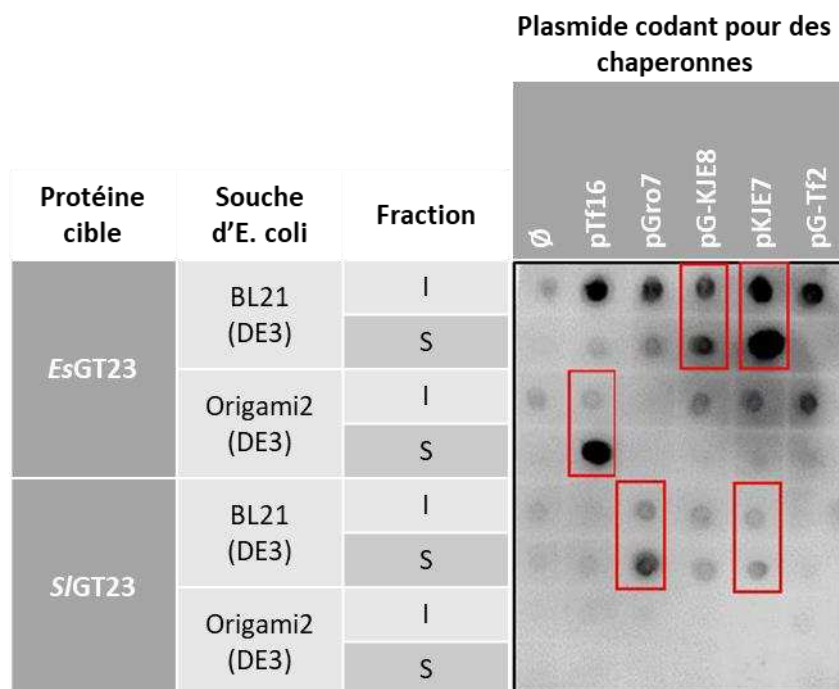
Une culture en plus grand volume a été réalisée et n'a pas permis de purifier la *EsGT64*. En effet la protéine n'a pas été retenue sur colonne d'affinité et a été détectée seulement dans la fraction de lavage de la colonne. Ce résultat peut être dû à un repliement de la protéine masquant la queue poly-histidine, ne permettant ainsi pas à la colonne de retenir la *EsGT64*. Pour remédier à ce problème, j'ai fait des tentatives de clonage dans un plasmide pET28B permettant d'avoir une queue histidine en N-terminal et C-terminal. Le clonage n'a pas été concluant malgré plusieurs tentatives.

### 3.3.2) Expression hétérologue de *EsGT23* et *SIGT23*

#### 3.3.2.1) Tests de co-expression avec chaperonnes

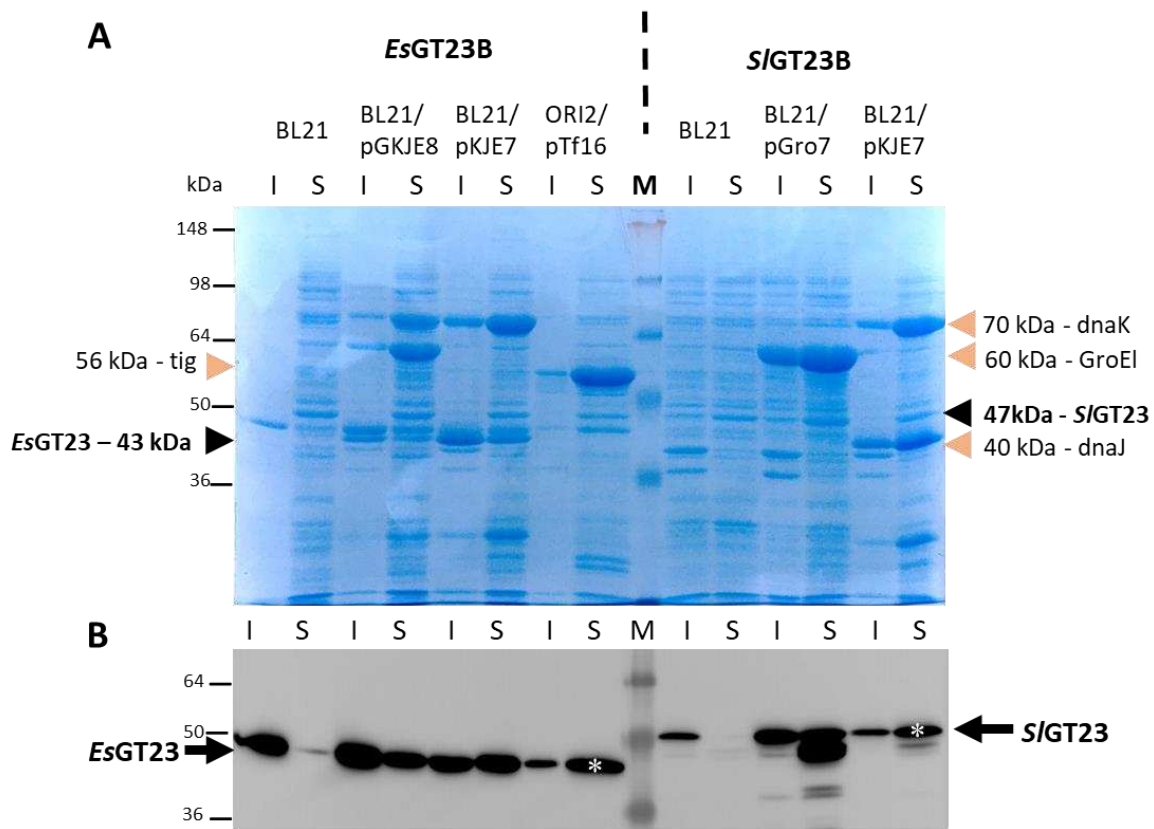
Les différentes combinaisons d'expression des *EsGT23* et *SIGT23*, avec co-expression de chaperonnes, sont réalisées en parallèle, ce qui représente 24 conditions.

Des immunodots sont réalisés afin de rapidement évaluer dans quelles conditions d'expression, la protéine cible est présente dans la fraction soluble. Les résultats (Figure V.4) montrent que l'expression avec des chaperonnes permet de détecter les protéines *EsGT23* et *SIGT23* dans au moins une fraction soluble. Pour la *EsGT23*, l'expression dans la fraction soluble est observée dans la souche BL21 (DE3) avec les chaperonnes codées par le plasmide pG-KJE8 (soit les protéines chaperonnes *dnaK*, *dnaJ*, *grpE*, *groES*, *groEL*) et pKJE7 (*dnaK*, *dnaJ*, *grpE*), ainsi que dans la souche origami2 (DE3) avec la chaperonne codée par le plasmide pTf16 (*tig*) (Figure V.4). Concernant la *SIGT23*, les meilleures conditions d'expression dans la fraction soluble sont celles exprimées dans la souche BL21 (DE3) avec les plasmides pGro7 (*groES*, *groEL*) et pKJE7 (*dnaK*, *dnaJ*, *grpE*) (Figure V.4). Ces cibles sont par la suite analysées sur gel SDS-PAGE.



**Figure V. 4. Immunodot montrant les résultats des tests d'expression hétérologue à moyen débit.** En rouge sont encadrés les meilleures combinaisons de co-expression pour l'obtention des protéines cibles dans la fraction soluble. I correspond au dépôt de la fraction insoluble et S à la fraction soluble.

Dans les deux cas (*S/GT23* et *EsGT23*), les gels SDS-PAGE ne nous permettent pas d'identifier avec certitude une bande correspondant à la protéine cible. Par ailleurs, les bandes correspondant aux chaperonnes sont conséquentes (Figure V.5.A). Cela traduit la bonne surexpression de celles-ci. Le western blot permet de valider l'expression des protéines à la taille attendue, soit 43 kDa pour *EsGT23* et 49 kDa pour *S/GT23* (Figure V.5.B). Il est à noter que la détection des protéines cibles dans la fraction insoluble reste importante. L'expression dans la souche d'*E. coli* origami2 (DE3) avec la chaperonne codé par le plasmide pTf16 semble donner le meilleur résultat (Figure V.4). Concernant la *S/GT23*, la meilleure condition d'expression est celle dans la souche d'*E. coli* Origami 2 (DE3) avec le plasmide pKJE7 (Figure V.4.B).

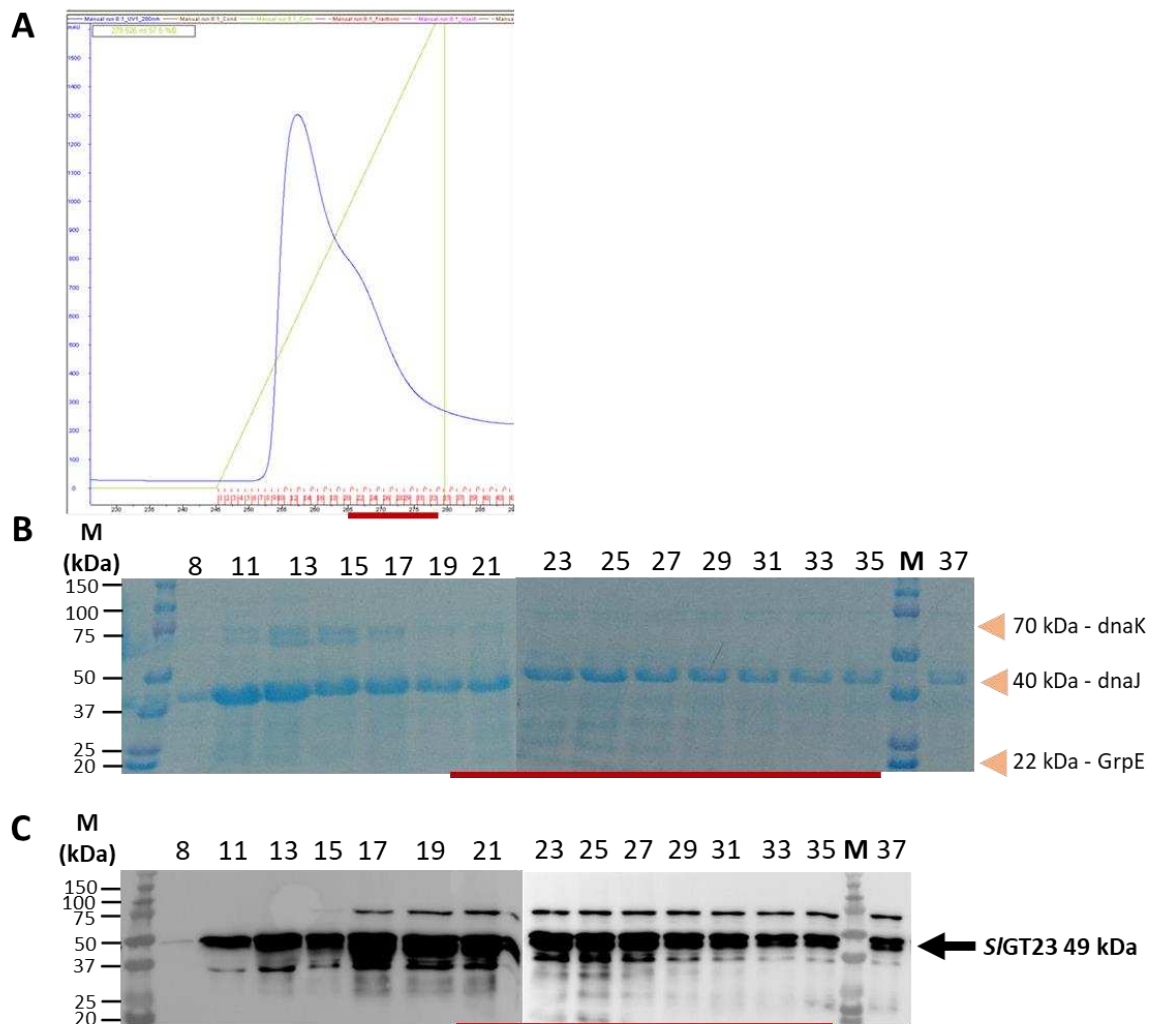


**Figure V. 5. Détection des GT23 pour différentes co-expression avec des protéines chaperonnes. A)** Gel SDS-page coloré au bleu de Coomassie, **B)** Western blot avec une détection avec des anticorps anti-histidine. Les flèches orange indiquent la taille attendue pour les différentes protéines chaperonnes exprimées. La taille attendue pour la *EsGT23* est de 43 kDa et de 49 kDa pour la *S/GT23*. I correspond à la fraction insoluble et S à la fraction soluble.

### 3.3.2.2) Expression en grands volumes des souches sélectionnées

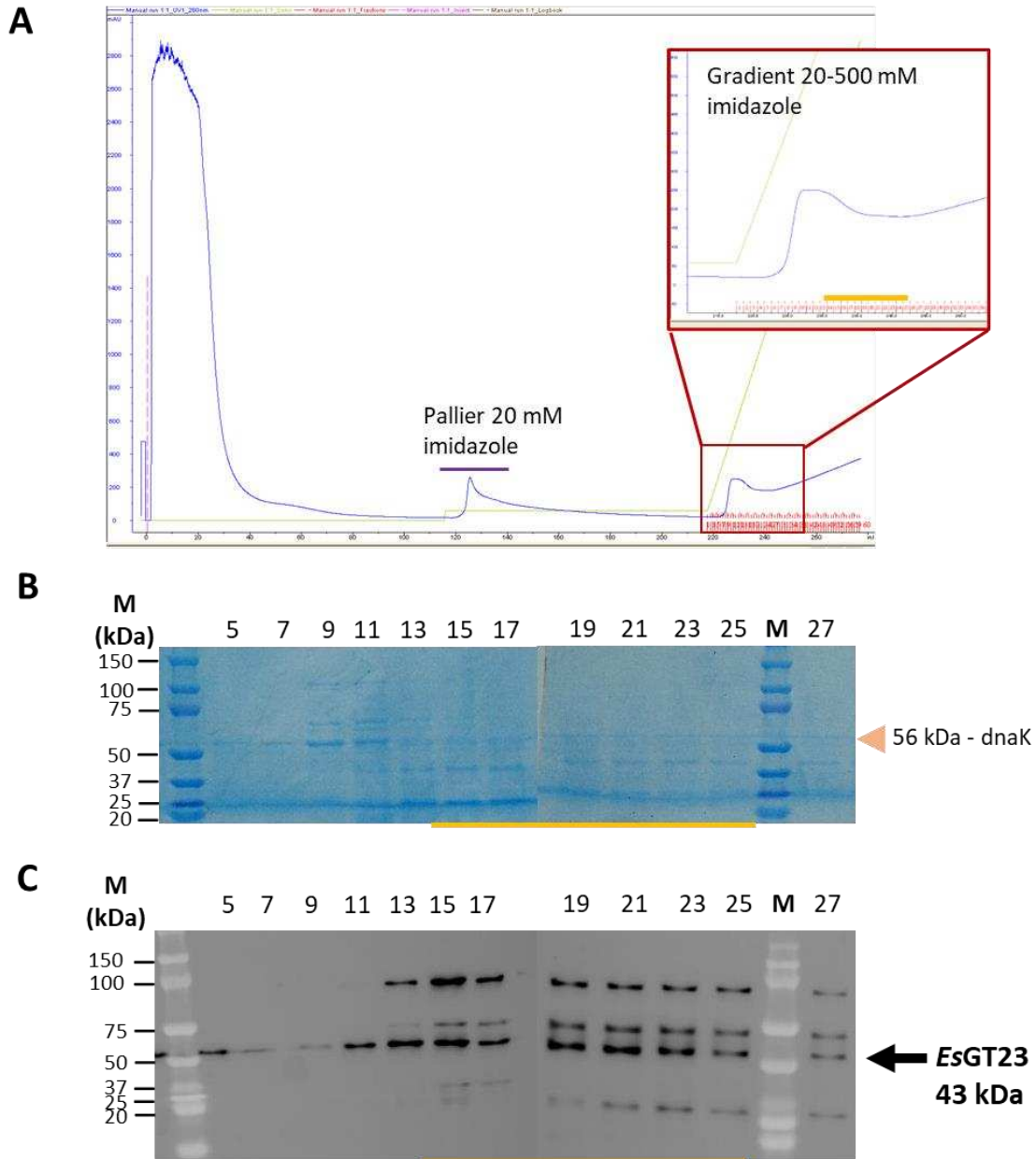
Les deux souches précédentes sont cultivées en plus grands volumes afin d'obtenir des quantités plus importantes de *EsGT23* et *S/GT23* et de procéder à leur purification. Cette dernière est réalisée sur colonne d'affinité. Pour les deux protéines, nous observons un pic d'absorbance d'UV sur le chromatogramme lors de l'élution (Figure V.6.A, Figure V.7.A), en revanche grâce à un gel SDS-PAGE, nous avons pu voir que celui-ci contenait beaucoup de protéines contaminantes et notamment des protéines chaperonnes, sur l'ensemble des fractions, et en particulier pour la *S/GT23* (Figure V.6.B). Dans le cas de la *S/GT23*, la bande correspondant à la taille de la protéine attendue n'est pas visible sur gel SDS-PAGE mais est visible en western blot (Figure V.6.B). Les protéines contaminantes sont en quantité importante et sont potentiellement encore liées à la protéine recombinante *S/GT23*. On peut également constater pour les deux protéines que des bandes additionnelles de plus bas poids moléculaires, sont détectées en western blot. Les protéines seraient, soient dégradées soient exprimées que de manière partielle (avec une étiquette de détection pour rappel située en N-

terminal). Les rendements d'expression sont très faibles, soit 1,2 mg/L et 60 µg/L pour respectivement *EsGT23*, et qui correspondent des protéines largement contaminées. L'expression hétérologue sur ces 2 protéines est décevante. Il est probable que ces 2 protéines soient mal repliées, et donc toujours associées aux chaperonnes dans la cellule, et pour partie agrégée en corps d'inclusion. L'intérêt de la co-expression avec des chaperonnes n'est donc pas complètement démontré dans ce cas, ou nécessiterait des optimisations supplémentaires.



**Figure V. 6. Purification de la protéine S/GT23 sur colonne d'affinité. A)** Profil d'élution d'un gradient Imidazole 10 - 500 mM, **B)** Fractions d'intérêt déposées sur SDS-Page coloré au Bleu de Coomassie, **C)** Western Blot avec l'anticorps anti-His. 8-65 fractions issues du gradient d'imidazole. Le trait rouge indique les fractions regroupées pour les tests d'activités.

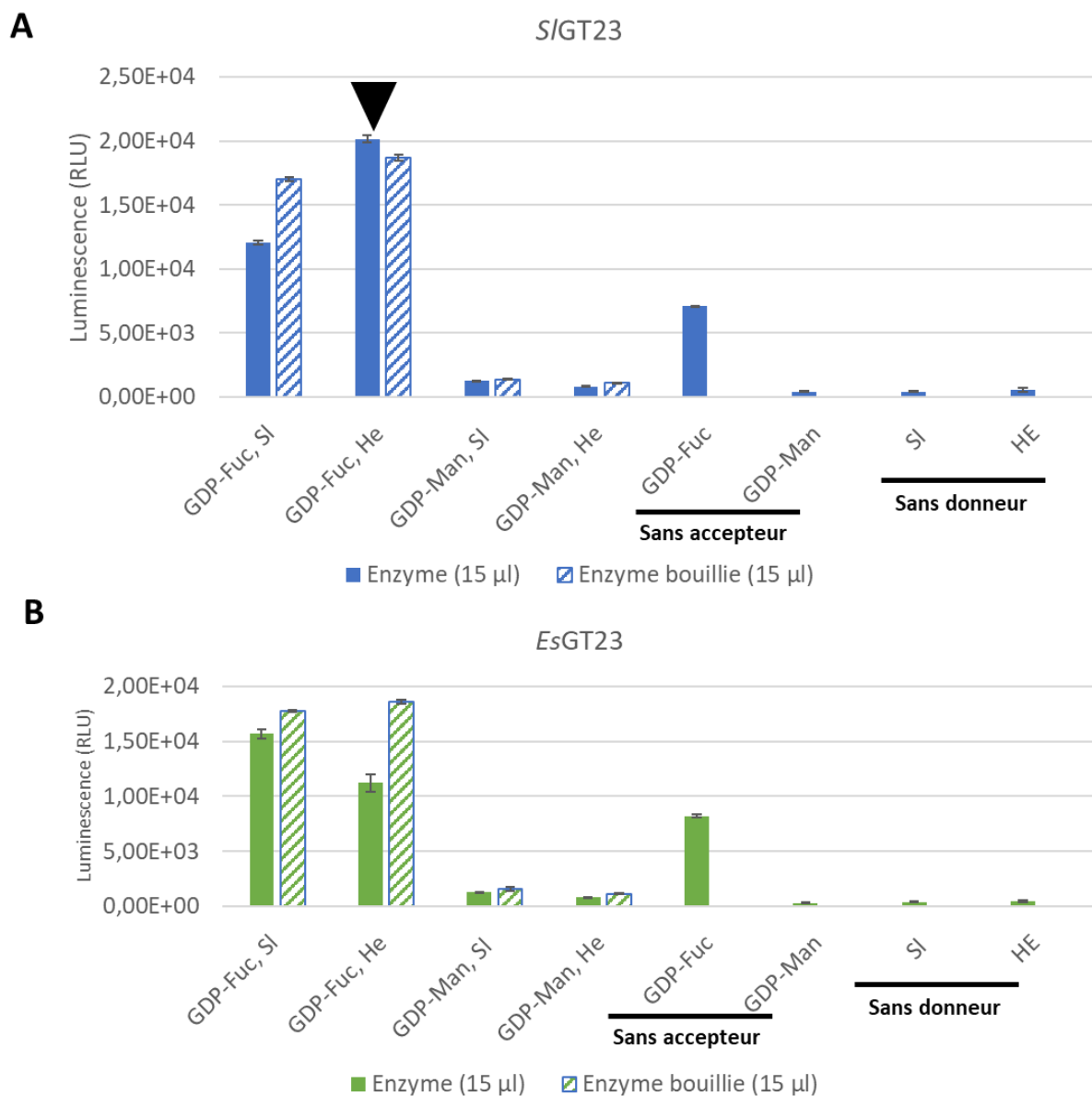
Il est à noter qu'au cours de ma thèse, j'ai pu participer à une autre étude d'expression hétérologue de gènes de champignons marins, où j'ai pu à nouveau mettre en place la co-expression avec chaperonnes. Dans ce cas également, les chaperonnes restent intimement associées à la protéine exprimée, mais l'activité a pu être démontrée (Cochereau et al., 2023), article en fin de chapitre).



**Figure V. 7. Purification *EsGT23* sur colonne His-Tag. A)** Profil d'éluion avec palier à 20 mM d'imidazole et un gradient entre 20 et 500 mM d'imidazole. **B)** Fractions d'intérêt déposées sur SDS-Page coloré au bleu de Coomassie, **C)** Western Blot avec l'anticorps anti-His. T total, I insoluble, S soluble, 20 fraction du lavage à 20 mM d'imidazole, 8-57 fraction du gradient d'imidazole.

### 3.2) Tests d'activités glycosyltransférases

Malgré des expressions hétérologues de nos GT décevantes, j'ai tout de même entrepris des tests préliminaires d'activités sur certaines fractions. Ils ont globalement été infructueux : i) des premiers tests m'ont fait supposer que la *EsGT64* avait bien une activité de transfert du GlcNAc, mais ils n'ont pas été reproduits, ii) la *S/GT23* semblait être active en présence de GDP-fucose et d'oligo-FCSP dérivés d'*H. elongata* (Figure V.8), mais ces résultats n'ont pas été reproduits, iii) aucune activité n'a été détectée pour *EsGT23*.



**Figure V. 8. Test d'activité avec des GT23 recombinantes de Phaeophyceae. A) Test avec la *S/GT23*, B) Test avec la *EsGT23*. Pour les deux enzymes les mêmes conditions sont testées. Le GDP-Fuc est à 200 µM, le GDP-Man à 200 µM, les accepteurs à 0,8 mg/ml (SI hydrolysate de *S. latissima*, He hydrolysate**



de *H. elongata*). Chaque mesure est effectuée en triplicata technique, la moyenne est représentée ainsi que l'écart-type moyen.

Plusieurs hypothèses peuvent être faites quant à l'absence d'activité pour ces enzymes, la première étant un problème lié à l'expression hétérologue, avec une production de la protéine en trop faible quantité et mal repliée. Le problème peut également provenir de la nature des accepteurs ou des donneurs qui ne seraient pas pris en charge par les enzymes. Les conditions de réaction peuvent également ne pas être optimales.

#### 4) Conclusion

En résumé, l'ensemble de ces tests ne m'a pas permis de conclure sur l'activité des GT d'algues brunes produites de manière recombinante en système bactérien. Toutefois, ces résultats ont permis d'établir une preuve de concept de la possible expression d'une GT recombinante soluble d'algues brunes en système bactérien. Cependant, étant donné que l'optimisation de la production et de la caractérisation de ces enzymes n'étaient pas au cœur de mon projet de thèse, je n'ai pas poursuivi davantage cette voie. La production et la caractérisation de ces enzymes fait l'objet d'une thèse effectuée par Ahlem Bouguerba (2021-2024). Ahlem a réalisé des essais de production des protéines *SlGT23* et *EsGT23* en cellules eucaryotes (système levure, cellules humaines HEK) et d'autres souches bactériennes. Après 2 ans d'investigation, Ahlem a réussi à produire (de façon significative) et purifier une isoforme de *SlGT23* dans un système bactérien. L'activité fucosyltransférase est confirmée (octobre 2023). Une partie de ce travail est réalisée en collaboration avec une équipe du Complex Carbohydrate Research Center aux États-Unis.

Article en collaboration : Heterologous Expression and Biochemical Characterization of a New Chloroperoxidase Isolated from the Deep-Sea Hydrothermal Vent Black Yeast *Hortaea werneckii* UBOCC-A-208029. (Coucherou et al., 2023)



# Heterologous Expression and Biochemical Characterization of a New Chloroperoxidase Isolated from the Deep-Sea Hydrothermal Vent Black Yeast *Hortaea werneckii* UBOCC-A-208029

Bastien Cochereau<sup>1,2</sup> · Yoran Le Strat<sup>1,2</sup> · Qiaolin Ji<sup>1,2</sup> · Audrey Pawtowski<sup>1</sup> · Ludovic Delage<sup>3</sup> · Amélie Weill<sup>1,6</sup> · Lisa Mazéas<sup>3</sup> · Cécile Hervé<sup>3</sup> · Gaëtan Burgaud<sup>1</sup> · Nina Gunde-Cimerman<sup>4</sup> · Yves François Pouchus<sup>2</sup> · Nathalie Demont-Caulet<sup>5</sup> · Catherine Roullier<sup>2</sup> · Laurence Meslet-Cladiere<sup>1</sup>

Received: 21 March 2023 / Accepted: 4 June 2023 / Published online: 24 June 2023  
© The Author(s) 2023

## Abstract

The initiation of this study relies on a targeted genome-mining approach to highlight the presence of a putative vanadium-dependent haloperoxidase-encoding gene in the deep-sea hydrothermal vent fungus *Hortaea werneckii* UBOCC-A-208029. To date, only three fungal vanadium-dependent haloperoxidases have been described, one from the terrestrial species *Curvularia inaequalis*, one from the fungal plant pathogen *Botrytis cinerea*, and one from a marine derived isolate identified as *Alternaria didymospora*. In this study, we describe a new vanadium chloroperoxidase from the black yeast *H. werneckii*, successfully cloned and overexpressed in a bacterial host, which possesses higher affinity for bromide ( $K_m = 26 \mu\text{M}$ ) than chloride ( $K_m = 237 \text{ mM}$ ). The enzyme was biochemically characterized, and we have evaluated its potential for biocatalysis by determining its stability and tolerance in organic solvents. We also describe its potential three-dimensional structure by building a model using the AlphaFold 2 artificial intelligence tool. This model shows some conservation of the 3D structure of the active site compared to the vanadium chloroperoxidase from *C. inaequalis* but it also highlights some differences in the active site entrance and the volume of the active site pocket, underlining its originality.

**Keywords** Marine fungi · Black yeast · Halogens · Enzymes · Vanadium chloroperoxidase

✉ Catherine Roullier  
catherine.roullier@univ-nantes.fr

✉ Laurence Meslet-Cladiere  
Laurence.Meslet@univ-brest.fr

<sup>1</sup> Univ Brest, INRAE, Laboratoire Universitaire de Biodiversité et Ecologie Microbienne, F-29280 Plouzané, France

<sup>2</sup> Institut des Substances et Organismes de la Mer, Nantes Université, ISOMER, UR 2160, F-44000 Nantes, France

<sup>3</sup> Integrative Biology of Marine Models (LBI2M), UMR8227, Station Biologique de Roscoff (SBR), CNRS, Université, 29680 Roscoff, Sorbonne, France

<sup>4</sup> Molecular Genetics and Biology of Microorganisms, Dept. Biology, Biotechnical Faculty, University of Ljubljana, Ljubljana, Slovenia

<sup>5</sup> INRAE, University of Paris, UMR ECOSYS, INRAE, Université Paris-Saclay, 78026 Versailles, AgroParisTech, France

<sup>6</sup> Univ Brest, UBO Culture Collection (UBOCC), F-29280 Plouzané, France

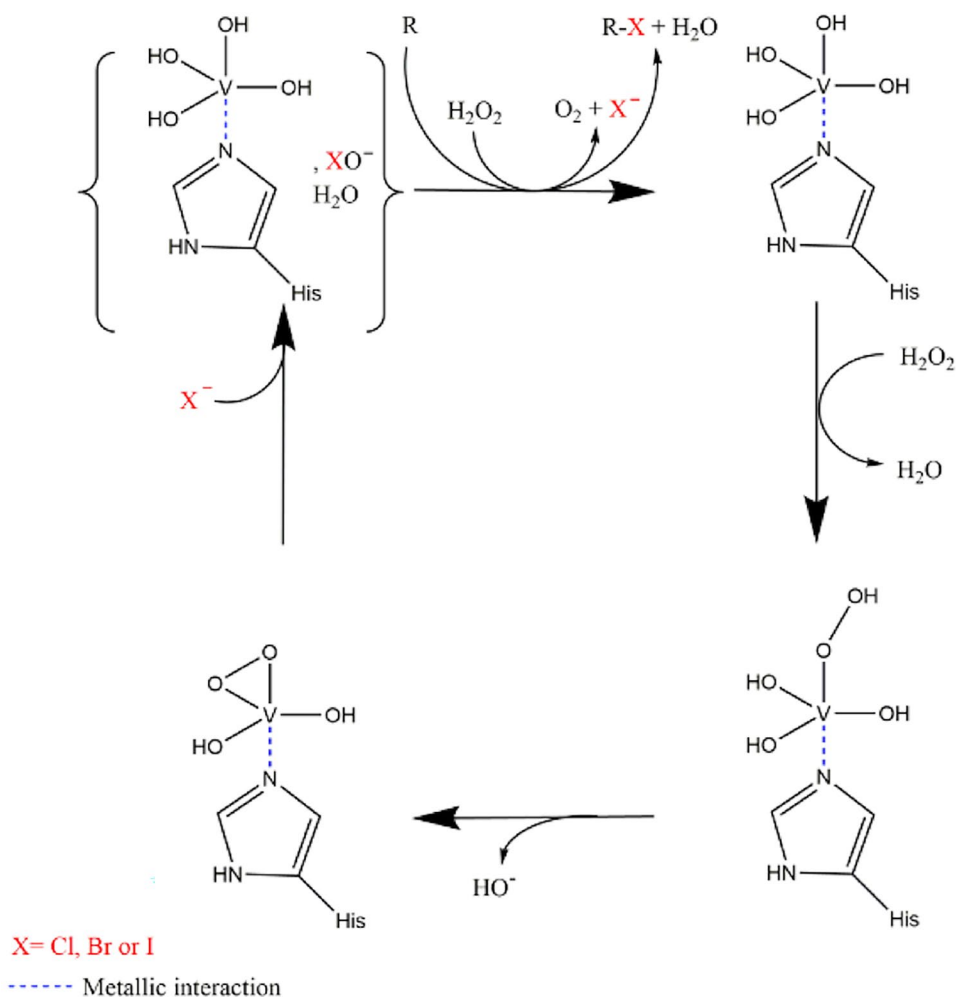
## Introduction

Halogenated natural products (NPs) in nature are characterized by a wide variety of bioactivities. As specialized metabolites, they can be involved in different mechanisms from communication to chemical defense. Halogenated NPs represent approximately 10,000 compounds which harbor fluorine, chlorine, bromine, or iodine on their structures (Cochereau et al. 2022). Among these, 1003 compounds are produced by fungi, and our previous work has shown the potential of marine species in this area (Roullier et al. 2016). Halogenated NPs have attracted much attention, especially in the marine environment where chloride and bromide concentrations are 20 to 60 times higher than in the terrestrial environment (Dickson and Goyet 1994; Gribble 2010). In nature, to produce these halogenated compounds, organisms include genes in their genome encoding different halogenating enzymes (Butler and Sandy 2009). Nowadays, a catalog of halogenating enzymes has been drawn up from different clades of organisms, i.e., flavin-dependent

halogenases (FDH), haloperoxidases, non-heme iron-dependent halogenases, or SAM-dependent halogenases (Agarwal et al. 2017). Specifically, the haloperoxidase family includes heme-dependent haloperoxidases (hHPOs) and vanadium-dependent haloperoxidases (vHPOs). Vanadium-dependent haloperoxidases are metalloenzymes which stabilize vanadate ( $\text{VO}_4^-$ ) in their active site. Vanadate can then react with hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) to oxidize halides ( $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Br}^-$  and  $\text{I}^-$  but not  $\text{F}^-$  due to its high electronegativity) and form the corresponding hypohalous acid ( $\text{OH}^- \text{X}^+$ ). This reactive species is then released in the proximal environment where it can react with a non-specific substrate to form halogenated metabolites (Leblanc et al. 2015; Cochereau et al. 2022) (Fig. 1). vHPOs are named according to the most electrophilic halogen they can oxidize: (i) a chloroperoxidase can oxidize chloride, bromide or iodide; (ii) a bromoperoxidase can oxidize bromide or iodide, and (iii) an iodoperoxidase can only oxidize iodide (Agarwal et al. 2017). vHPOs were first described in the alga *Ascophyllum nodosum* in 1984 (Vilter 1984). To date, thirteen vHPOs have been described from

algae: seven are from the brown algae *Laminaria digitata*, *Pelvetia canaliculata*, *Laminaria hyperborean*, *Laminaria saccharina*, and *A. nodosum* (Almeida et al. 2000, 2001; Colin et al. 2005; Wischang et al. 2012). The remainder are from the red algae *Corallina officinalis*, *Corallina pilulifera*, *Gracilaria changii*, *Ceramium rubrum*, and *Laurencia nipponica* (Krenn et al. 1987; Carter et al. 2002; Ohshiro et al. 2004; Baharum et al. 2013; Kaneko et al. 2014). Interestingly, all the vHPO described in algae are bromoperoxidases (vBPOs) or iodoperoxidases (vIPOs). Subsequently, additional vHPOs were identified in members of the bacterial domain (24 proteins) (Agarwal et al. 2017), for example in *Streptomyces* sp. (Mckinnie et al. 2018) or in marine bacteria such as *Zobellia galactanivorans* (Fournier et al. 2014). In fungi, only three vHPOs have been reported so far. One was structurally described from the terrestrial fungus *Curvularia inaequalis* (Messerschmidt and Wever 1996), another has been described in terms of its primary structure and has been characterized biochemically. It is the chloroperoxidase from the marine fungus *Embellisia didymospora*, isolated from seawater samples of the Adriatic

**Fig. 1** Vanadium-dependent haloperoxidase enzymatic mechanism (Cochereau et al. 2022)



Sea, recently renamed *Alternaria didymospora* (Barnett et al. 1998). The third one has bromoperoxidase activity and is detected in the lichen *Xanthoria parietina* with a protein of 65 kDa but, it is not known whether this belongs to the fungal or the algal part of this organism (Plat et al. 1987). Vanadium haloperoxidases present several advantages: (i) they allow the halogenation of many different electron-rich compounds because the halogenation is unspecific, (ii) these enzymes are very stable in organic solvents, and (iii) some vHPOs can be regioselective (Agarwal et al. 2017; Younes et al. 2019; Chen et al. 2022). Consequently, they represent very attractive alternatives to usual synthetic reagents for halogenation from the perspective of greener chemistry (Höfler et al. 2019). For example, the chloroperoxidase from *C. inaequalis* is widely studied today for its biocatalytic capacities (Höfler et al. 2019; Younes et al. 2019). Because vHPOs are interesting in the biocatalysis field, and because fungi have been very poorly investigated in this area, we recently showed their potential by analysis of 82 genomes showing 105 sequences matching the vHPO genes in the MycoCosm database (Cochereau et al. 2022). Regarding the interest for this type of enzymes, one strain from our collection of marine fungi was further investigated from this perspective.

In this study, we report the discovery and the biochemical characterization of the second vHPO from a marine fungus. We describe a vanadium-dependent chloroperoxidase from *Hortaea werneckii* (Hw, UBOCC-A-208029), an impressive extremely halotolerant black yeast collected from the Rainbow hydrothermal vent field (Gunde-Cimerman et al. 2009). *H. werneckii* (Capnodiales, Ascomycota) is a black yeast, globally present in hypersaline environments (Zalar et al. 2019; Romeo et al. 2020). *H. werneckii* grows like yeast cells in liquid culture media, but it can switch to filamentous growth on solid substrates and into meristematic clumps at extreme conditions (Kogej et al. 2007). This polymorphic yeast-like melanized fungus was originally known as the causative agent of human tinea nigra, a characteristic type of colonization of salty human hands (de Hoog and Guého 2010). Here, the recombinant *HwvCPO* was successfully overexpressed in *Escherichia coli* by co-expression with chaperone proteins to optimize protein folding. Finally, we describe the biochemical and enzymatic properties of this novel enzyme.

## Materials and Methods

### Fungal Strains

*Hortaea werneckii* UBOCC-A-208029 was collected from the Rainbow hydrothermal vent field, in the mid-Atlantic ridge in 2007 and is part of the UBO Culture Collection (UBOCC) of the University of Brittany (Burgaud et al.

2010). This isolate was cultivated on potato dextrose agar (PDA) media (BD Difco™ dehydrated culture media: potato dextrose agar; 39 g/L), minimal media (MM, glucose 5 g/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1 g/L, KCl 0.5 g/L,  $\text{NaNO}_3$  2 g/L,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  2.5 g/L, TE solution 2 mL/L); Czapek media (CZA, glucose 16 g/L, yeast extract 5 g/L,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  1 g/L, Czapek concentrate 10 mL/L) and Wickerham (W, glucose 10 g/L, peptone 5 g/L, yeast extract 3 g/L, malt extract 3 g/L). MM, CZA, and W solid media contain 20 g/L of agar. Culture media were supplemented with sea salts (3%) (Sigma-Aldrich) with or without the addition of halogenated salts (10%) (NaF 0.02 g/L, KBr 0.09 g/L, and KCl 0.6 g/L). Trace elements (TE) solution contained (g/L): citric acid 5 g,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  5 g,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  4.75 g,  $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  1 g,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0.25 g,  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  0.05 g,  $\text{H}_3\text{BO}_3$  0.05 g, and  $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.05 g. Czapek concentrate solution contains (g/L):  $\text{NaNO}_3$  30 g, KCl 5 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  5 g,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.1 g,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.1 g, and  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0.05 g.

### Bacterial Strains

Recombinant plasmid was maintained in *E. coli* JM109 (Promega) before being used to transform *E. coli* BL21(DE3) for the overexpression of recombinant proteins (Invitrogen, ThermoFisher Scientific). *E. coli* BL21(DE3) was first-transformed with plasmid pKJE7 from Takara Bio which permits co-expression of protein chaperones DnaK, DnaJ and GRP E (Takara Bio, Kusatsu, Japan). These cells were used for the overexpression of recombinant proteins. Bacteria were cultivated at 37 °C and 18 °C on Lysogeny Broth solid medium (LB) (0.1% peptone, 0.05% yeast extract, 0.1% sodium chloride, 0.1% agar) or Lysogeny Broth low salt liquid medium (LB Low Salt) (0.1% peptone, 0.05% yeast extract, 0.05% sodium chloride) or Terrific Broth liquid medium (TB) (1.2% peptone, 2.4% yeast extract, 0.4% glycerol 87%, 10% phosphate buffer pH 7.5 10x). Culture media were supplemented with chloramphenicol (20 µg/mL) and ampicillin (50 µg/mL) for selection.

### Phylogenetic Analysis

The selected set of vHPO proteins was retrieved from several NCBI Blastp searches. *HwvCPO* sequence was used to identify homologous sequences against the fungi and the bacterial RefSeq databases. In addition, eukaryotic sequences, absent from Refseq, were found by querying the nr database. Finally, the crystallized vHPO sequences and their closest counterparts plus three acid phosphatases constituting an outgroup were added to the dataset (see Supplementary Table 1 for complete information). A total of 105 sequences were loaded into a “A la carte” pipeline analysis on the “NGPhylogeny.fr” website. The protein sequences were aligned under default parameters using

MAFFT tool resulting in 1200 amino acid positions. A selection of 469 informative positions was obtained by trimAl. The maximum likelihood phylogenetic tree construction was carried out using default parameters of the PhyML-SMS tool allowing the best substitution model selection (WAG + G + I + F). The resulting Newick file was formatted and annotated using the MEGA v10.1.1 software to show the major supported nodes and groups (100 bootstrap replicates; support value > 80%) leading to the corresponding simplified phylogram. A limited number of fungal sequences were deliberately taken (limited to about half of the total) to avoid biasing the choice of informative positions (IPs) in favor of these same fungi by the IP selection tool.

### mRNA Extraction

Extractions were performed using the NucleoSpin RNA Plus from Macherey Nagel according to the manufacturer's protocol with 30 mg of yeast. mRNAs were stocked at  $-80^{\circ}\text{C}$  until analysis. mRNA concentrations were estimated with a NanoDrop 2000.

### RT-qPCR Analysis

Production and expression of the vHPO mRNA from *H. werneckii* UBOCC-A-208029 were analyzed in four different culture media as described previously (MM, PDA, W, and CZA) with added sea salts and with or without halogens supplementation (Cf. 2.1). Analyses were performed using a CFX96 BioRad®. This device allowed the automated calculation of mRNA concentrations using a pre-established standard range (0.5 to 100 ng/ $\mu\text{L}$ ). mRNA extractions were carried out in triplicate. Two technical replicates were also prepared for each biological replicate. Results were normalized with mRNA of a reference gene, the phosphofructokinase, involved in glycolysis (GenBank ID: OTA38163.1) (Gillot et al. 2017).

### Cloning of *H. werneckii* Vanadium-dependent Chloroperoxidase in *E. coli*

A putative vHPO-encoding gene was first identified in the related isolate Hw EXF-2000, obtained from marine solar salterns, for which whole genome sequence is available in MycoCosmo platform ([www.ex-genebank.com](http://www.ex-genebank.com)) (Lenassi et al. 2013). Hw EXF-2000 was used as a model to design specific primers to amplify homologous sequences from the isolate UBOCC-A-208029 obtained from deep-sea hydrothermal vent samples (Burgaud et al. 2010). The vHPO gene from *H. werneckii* UBOCC-A-208029 was amplified using mRNA extracted using the NucleoSpin® RNA Extraction kit (Macherey–Nagel, Hoerd, France). cDNA was obtained

using the Invitrogen™ ThermoScript™ RT-PCR System for First-Strand cDNA Synthesis kit following the manufacturer's recommendations (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Amplification of the specific cDNA encoding the vHPO was achieved using specific primers: *Hw\_vHPO\_Fw* (5'-ATGATTCCACTT CACCAGCG-3') and *Hw\_vHPO\_Rev* (5'-TTAGGGCTT TCCAAGGCGTCCACACCTATGCCTG-3'). Once cDNA was synthesized, PCR amplification was carried out with the Phusion® HF DNA Polymerase kit (BioLabs) using 30  $\mu\text{L}$  distilled water, 10  $\mu\text{L}$  Phusion Buffer, 1  $\mu\text{L}$  DNTP 10 mM, 0.5  $\mu\text{M}$  Primer vHPO Forward (Eurofins Genomics), 0.5  $\mu\text{M}$  Primer vHPO Reverse (Eurofins Genomics), 1.5  $\mu\text{L}$  DMSO 100%, and 0.5  $\mu\text{L}$  Phusion Polymerase for 2–3 ng cDNA. The amplification consisted of an initial denaturation step at  $94^{\circ}\text{C}$  for 2 min followed by 5 iterations of 1 min  $98^{\circ}\text{C}$ , 1 min  $60^{\circ}\text{C}$ , and 2 min 30 s  $72^{\circ}\text{C}$ . Then 30 iterations of 1 min  $98^{\circ}\text{C}$ , 1 min  $65^{\circ}\text{C}$  and 2 min 30 s  $72^{\circ}\text{C}$  with a final extension step of 10 min  $72^{\circ}\text{C}$ . The amplified fragments were extracted and purified from a 1% agarose gel using the NucleoSpin Gel PCR Clean-up kit (Macherey–Nagel, Hoerd, France). For protein overexpression, the vHPO gene was ligated into previously linearized (*Pst*I and *Hind*III, Promega) pQE-81L vector (Qiagen, Hilden, Deutschland) with In-Fusion® HD Cloning kit (Takara Bio, Kusatsu, Japan) (primers for cloning: *Hw\_IF-fw*: 5'-TACCCCGGGTCGACCTGCAGATGATTC CACTTACCAGCGTCC3-' and *Hw\_IF\_Rev*: 5'-TCAGCT AATTAAGCTTTAGGGCTTTCCAAGGCGTCC-3'). The ligated plasmid was used to transform BL21 (DE3)+pKJE7 strain, generating strain BL21 (DE3)+pKJE7+vHPO\_Hw.

### Expression and Purification of the Recombinant vHPO

For protein expression, the recombinant strain BL21(DE3)+pKJE7+vHPO\_Hw was grown in 100 mL LB low salt medium containing 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ampicillin and 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  chloramphenicol at 180 rpm O/N at  $37^{\circ}\text{C}$ . Subsequently, the preculture was used to inoculate 500 mL of TB containing 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ampicillin and 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  chloramphenicol at 0.05  $\text{OD}_{600\text{nm}}$  (UV-2401 PC, Shimadzu). The culture was grown under agitation at  $37^{\circ}\text{C}$ . Chaperone expression was induced when the  $\text{OD}_{600\text{nm}}$  reached approximately 0.1, by the addition of 0.5 mg/mL of L-arabinose (final concentration). The expression of recombinant enzyme was induced by adding Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside (IPTG) to a final concentration of 0.25 mM between  $\text{OD}_{600\text{nm}}$  of 0.6–0.8. After induction, the culture was grown under agitation at  $20^{\circ}\text{C}$  for 24 h. Cells were then collected by centrifugation at 8150 g for 15 min and resuspended in Tris/ $\text{H}_2\text{SO}_4$  pH 8.1 0.1 M. Cells were broken by sonication (10 cycles of 10 s with 1 min rest on ice between each cycle, power 40%). Lysates were centrifuged for 15 min at 20,124 g at  $4^{\circ}\text{C}$  and supernatant was collected and frozen at  $-20^{\circ}\text{C}$ . Protein purification was performed using an Äkta Avant

system at 20 °C (GE Healthcare, Chicago, IL, USA) with protein detection by UVs absorption at 280 nm. His-Tagged proteins were purified on immobilized nickel (Ni) tetradentate absorbent (NTA) medium, using a HisTrap FF 5 mL column (GE Healthcare). Chromatographic methods used (Buffer A: Tris/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pH 8.1 0.1 M, 10 mM Imidazole and Buffer B: Tris/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pH 8.1 0.1 M, 500 mM Imidazole). An isocratic gradient (0–100%) of buffer B was used to elute the protein from the HisTrap FF column and fractions were collected every 2 mL. The presence of the recombinant protein was immunorevealed in collected fractions using an antibody raised against His6-tag (Monoclonal Anti-poly-Histidine – Peroxidase antibody produced in mouse A7058, Sigma–Aldrich, Saint-Louis, MO, USA). Fractions were dialyzed, pooled and concentrated using Amicon® Ultra-15 Centrifugal Filter Devices 30 KDa (Merck Millipore, Burlington, Massachusetts, USA). 2 mL of concentrated proteins were then further purified using gel filtration on GF HiLoad Superdex 200 prep-grade column (GE Healthcare). Two column volumes of Tris/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pH 8.1 0.1 M were used to equilibrate the column. One column volume was used to elute proteins. The fractions were then tested in enzymatic assays. The final concentration of purified protein was estimated to be around 5 mg/mL (by BCA assay) and aliquots of recombinant proteins were stored at –20 °C.

### SDS-PAGE and Western-Blot

The presence and size of recombinant protein were checked on 12% SDS-PAGE and Western-Blot to validate fully expressed protein. The protein samples were loaded with Laemmli 4X (60 mM Tris–HCl pH 6.8, 10% glycerol, 2% SDS, 5% bromophenol Blue, 5% β- mercaptoethanol). A preliminary step of heating at 100 °C during 10 min was done before electrophoresis. The proteins were visualized by staining the gel with 0.2% Coomassie blue solution for 30 min and then destaining in a 20% ethanol and 10% acetic acid solution overnight, or transferred to Bio-Rad nitrocellulose membrane using a Trans-blot system (Bio-Rad) for Western blotting.

For Western-Blot, Nitrocellulose membranes were immersed in Tris-Buffer-Saline pH 7.6 0.1% Tween containing 5% milk for 30 min., then immersed in TBS-Tween-5% milk containing anti-his tag antibody (Monoclonal Anti-polyhistidine-Peroxidase antibody produced in mouse A7058, Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, USA) at 1/5000 dilution for 45 min. Membrane was washed three times for 5 min in TBS-Tween. Detection was carried out using ECL™ Prime Western Blotting System (Cityva life sciences, Marlborough, USA). The protein marker used was Precision Plus Protein™ Prestained Standards all blue (BioRad).

## Enzymatic Assays

### Thymol Blue Assay

Thymol blue (TB, pKa = 8.9, λ<sub>max</sub> = 430 nm) assay was used to determine enzymatic activity regarding bromide and iodide (Verhaeghe et al. 2008). It is based on the formation of dibromothymolsulfonphthalein (TBB<sub>2</sub>, pKa = 7.2; λ<sub>max</sub> = 620 nm) or diiodothymolsulfonphthalein (TBI<sub>2</sub>, pKa = 7.3; λ<sub>max</sub> = 620 nm) at pH 8 or 7 and can be observed by a color change of the reaction medium from yellow to blue/green. For BPO reaction, the medium contained 100 mM phosphate buffer pH 8.0, 100 μM thymol blue, 10 mM NaBr, 0.25 μg/mL enzyme, and 0.1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> complemented with ultrapure water. For IPO reaction, the medium contained 100 mM phosphate buffer pH 8.0, 100 μM thymol blue, 1.5 mM NaI, 0.25 μg/mL enzyme, and 0.35 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> complemented with ultrapure water. Final volume was 50 μL. The stock solution of thymol blue (TB) 1 mM was prepared in H<sub>2</sub>O/DMSO (4:1), and the final DMSO content never exceeded 2%. Reactions were performed at 20 °C. The positive control was ZgIPO1 iodoperoxidase from *Z. galactanivorans* (Fournier et al. 2014) or the native *Ascophyllum nodosum* bromoperoxidase I (Hartung et al. 2008). The negative controls were buffer and protein crude extract of BL21 + pKJE7 culture.

**o-Dianisidine PAGE Assay** The electrophoresis of pure proteins was carried-out on non-denaturing acrylamide gel (10%). Native loading buffer (200 mM Tris–HCl pH 6.8, 40% (v/v) glycerol, 0.2% (m/v) bromophenol blue in pure H<sub>2</sub>O Milli-Q®) was used for electrophoresis. Native migration buffer without SDS was used for migration (Tris buffer 25 mM pH 8.3, glycine 192 mM). The *o*-dianisidine PAGE assay measures the halogenation of *o*-dianisidine by vHPO with chloride, bromide or iodide. The production of halogenated *o*-dianisidine causes a modification of the absorption properties of the molecule with the appearance of a pink-brown coloration observable on the native gel (Jordan and Vilter 1990). Solution 1 contained *o*-dianisidine (100 mM in 1 mL of acetic acid) in 100 mM phosphate buffer pH 7.4 (final volume 100 mL). Solution 2 contained 5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. After the native electrophoresis, the gel was first incubated in 50 ml of solution containing 100 mM phosphate buffer pH 7.4, 4.5 mL solution 1, 1 mM KI, or 2 mM KBr or KCl in ultrapure water, for 1 h with stirring at 20 °C. Then, the gel was transferred to 50 mL of solution 2 for either 1 h. For iodoperoxidase (IPO) reaction, or overnight for BPO and CPO reactions, then subsequently washed with 50 mL of ultrapure water to stop the reaction. Peroxidase activity was checked by omitting halogen from the first incubation step. The positive control used Zg-

vIPO1 from *Z. galactanivorans* or the native *Ascophyllum nodosum* bromoperoxidase I (Hartung et al. 2008; Fournier et al. 2014). In the negative control, the vHPO protein/enzyme was replaced by water. 10  $\mu\text{L}$  of purified *HwvCPO* (5 mg/ml) were used for this assay.

### Monochlorodimedone Assay

An MCD assay was used to determine enzymatic activity and specificity. This assay monitors the enzymatic conversion of monochlorodimedone (MCD) ( $\epsilon = 19.9 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) by vHPO in dichlorodimedone or bromochlorodimedone ( $\epsilon = 0.2 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ). A decrease in the absorption at 290 nm reveals the enzymatic activity and is measured throughout the assay using a UV spectrophotometer (UV-2401 PC, Shimadzu). The Kinetics of the reaction were evaluated by measuring absorption every 0.5 s for 180 or 490 s. The following components were then added to the UV cuvette: 50 mM Buffer (pH 4 to 9), 50  $\mu\text{M}$  MCD, various concentrations of KCl 2 M or KBr 2 mM (for constant calculations) or 200 mM KCl or 200  $\mu\text{M}$  KBr (for pH assessment), 2  $\mu\text{L}$  enzymatic solution (2.5 mg/mL), 10  $\mu\text{M}$   $\text{Na}_3\text{VO}_4$  and various amounts of distilled water to obtain a final volume of 900  $\mu\text{L}$ . Then 100  $\mu\text{L}$  of  $\text{H}_2\text{O}_2$  12 mM were added to start the reaction. A negative control was used to confirm the enzymatic activity by replacing the enzyme solution with buffer. A positive control reaction was also prepared using the *Ascophyllum nodosum* vBPO (Hartung et al. 2008). Enzymatic activity calculations were carried out using the RStudio software by calculating non-linear regression (Marasović et al. 2017). To calculate enzymatic parameters, increasing amounts of KCl (20 to 500 mM), KBr (5 to 500  $\mu\text{M}$ ), and  $\text{H}_2\text{O}_2$  (1 to 500  $\mu\text{M}$ ) were used. All reactions were performed in triplicate at 20 °C.

### Tolerance to Solvents Assay

MCD assays were also carried out to test the organic solvent tolerance of the *HwvCPO* protein by replacing distilled water with a mixture of  $\text{H}_2\text{O}$ /solvent (50:50 v/v). Solvents tested were acetonitrile (ACN), methanol (MeOH), N,N-dimethylformamide (DMF), dimethylsulfoxide (DMSO), and ethanol (EtOH). The final proportion of each solvent in the enzymatic reaction was 39.3%, following the addition of other solutions added in the reaction, i.e., 50 mM of buffer pH 7, 50  $\mu\text{M}$  of MCD, 100  $\mu\text{M}$  of KBr, 2  $\mu\text{L}$  of *HwvCPO* (2.5 mg/mL), 10  $\mu\text{M}$  of  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , and 1.2 mM of  $\text{H}_2\text{O}_2$ ; resulting in 786  $\mu\text{L}$  of  $\text{H}_2\text{O}$ /solvent (50:50 v/v) in the final reaction volume of 1 mL. Blanks were prepared without MCD for each solvent system, and the negative control by replacing the enzyme solution with distilled water. All reactions were performed in triplicate. Differences between groups were determined using one-way

analysis of variance (one-way ANOVA) and post-hoc LSD tests, after verifying (i) the normality distribution with the Kolmogorov–Smirnov normality test and (ii) the equality of variances with a Bartlett test.

### Homology Model Building

AlphaFold 2 artificial intelligence program was used to build models for *HwvCPO*. AlphaFold is based on predicted Local Distance Difference Test (pLDDT) to estimate model confidence on a scale from 0 to 100 (Mariani et al. 2013). pLDDT > 90 are expected to be modelled to high accuracy and can be used for any application (Jumper et al. 2021; Varadi et al. 2022). The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.0 Schrödinger, LLC, was used to analyze the models and align the best one with 1VNI crystal structure of *CivCPO*. The web tool Caver 1.1 was used to calculate the volume of the catalytic pocket of *HwvCPO* and *CivCPO* (Stourac et al. 2019). InterProScan tool was used to analyze the primary structure of *HwvCPO* (Paysan-Lafosse et al. 2023).

## Results

### The *Hortaea werneckii* Vanadium-dependent Chloroperoxidase Gene Isolation

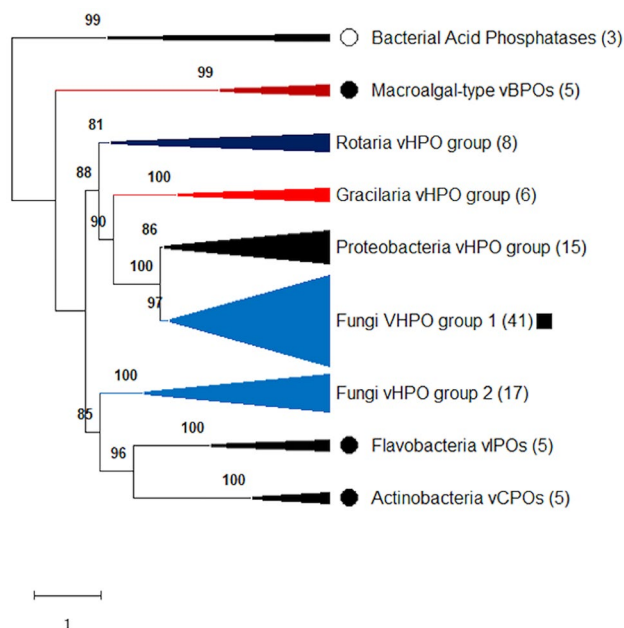
Following our previous analysis of the fungal genome databases to find fungi which possess genes encoding vanadium haloperoxidases using *CivCPO* protein sequence and Blastp tools (Cochereau et al. 2022), one of them from the EXF-2000 genome from *H. werneckii*, attracted our attention as this strain was available in our marine fungal collection. It contained a sequence matching with a vanadium haloperoxidase protein. This strategy was preferred because genomes are available online, along with search tools, thus avoiding a more time-consuming PCR screening and PCR products sequencing. The sequence identified in the EXF-2000 genome from *H. werneckii* contained a sequence matching with the characteristic conserved active site of vHPO, i.e., P<sub>x</sub>Y<sub>x</sub>SGHA and L<sub>xxxx</sub>A<sub>xx</sub>R<sub>xxx</sub>G<sub>x</sub>H<sub>xxx</sub>D (where x represents any amino acid) (Leblanc et al. 2015; Wever et al. 2018) (HWER\_13832R0, Protein ID: 8190, Location: scaffold\_292:29,540–31,629). Based on this sequence, specific primers were designed to amplify a homologous gene in the isolate *H. werneckii* Mo34 (UBOCC-A-208029) in our culture collection. The nucleotide sequence of the amplified product was obtained and aligned with the sequence of the gene found in *H. werneckii* EXF-2000. The putative protein product corresponded to a 627 amino acid protein sharing 97.2% identity with the putative vHPO from EXF-2000 strain. The alignment with the vCPO sequence of



*C. inaequalis* showed that both proteins share 48.41% of identity. In addition, the active site residues are strictly conserved (UniProt entry: P49053). The nucleotide sequence for the *H. werneckii* vHPO is available on GenBank database (*HwvCPO*, OP555106).

### Phylogenetic Study of *HwvCPO*

A phylogenetic study was performed by including sequences from different living organisms from different databases. Among the different sequences used for this phylogenetic study: fungal vHPO sequences are divided into two subgroups: (i) Fungi vHPO group 1 (with 41 sequences) and (ii) Fungi vHPO group 2 (17 sequences) (Fig. 2), and are not clustered together. Fungi vHPO group 1 containing the described vHPO from *H. werneckii* (*HwvCPO*), *C. inaequalis* (*CivCPO*) and *A. didymospora* (*AdvCPO*) is linked with two other clades: *Rotaria* vHPO group (8 sequences) and *Gracilaria* vHPO group (6 sequences). Fungi vHPO group 1 seems to be more related to Proteobacteria vHPO group as it forms a direct cluster with Proteobacteria sequences supported by a very high bootstrap value (100%). These four monophyletic groups are in a first clade supported by a bootstrap value of 88% (Fig. 2).



**Fig. 2** Global phylogenetic analysis showing the positions of the *Horetaea werneckii* and the overall fungal vHPO sequences. The branches including exclusively sequences of bacteria, fungi, rotifers, and rhodophytes are represented respectively in black, blue, dark blue and red colors. The branch composed of a macroalgal and cyanobacterial sequences is shown in brown. Black circles represent the location of biochemically and structurally characterized vHPO enzymes. White circle shows the biochemically and structurally characterized acid phosphatases. Black square identifies the newly discovered vHPO sequence of this study

The second clade present in this tree is composed of fungi vHPOs group 2 which are more related to Flavobacteria vIPOs (containing vIPOs from *Z. galactanivorans*) and Actinobacteria vCPOs (containing vCPOs from *Streptomyces* sp. CNQ-525). These three monophyletic groups are clustered together with a bootstrap value of 85%. Fungal vHPO in this second group are not described yet (Fig. 2).

There are two other outgroups, composed by bacterial acid phosphatases (3 sequences) and by macroalgal-type vBPOs containing both macroalgal and cyanobacterial proteins (5 sequences). Detailed sequences are available in supplementary information in Table S1.

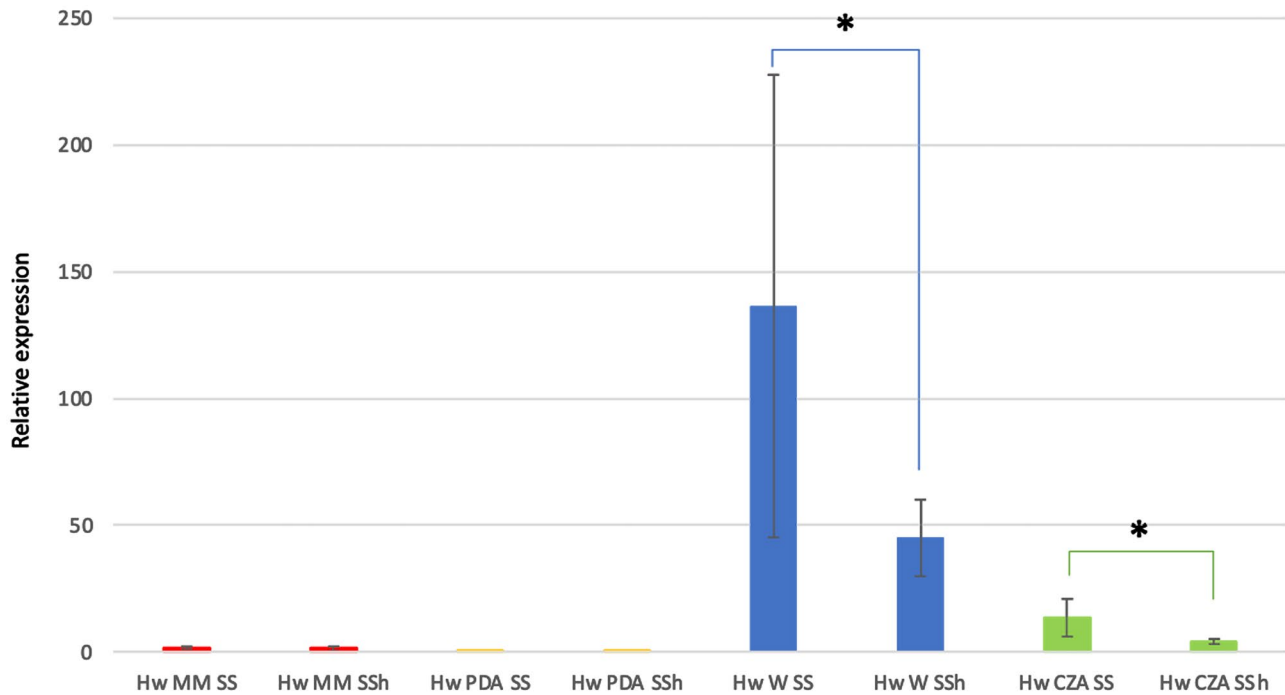
### Relative Expression of *HwvCPO* mRNA in 4 Different Culture Media

The nucleotide sequence of the *HwvCPO* gene made it possible to monitor the expression level of *HwvCPO* mRNA in *Horetaea werneckii* with 4 different culture media (Fig. 3). The aim here was to compare the mRNA expression between the different media and determine whether the addition of halogens could impact gene expression of this enzyme. Furthermore, we wanted to see if any correlation could be observed between specialized metabolites production by *H. werneckii* and mRNA expression level from the same culture to identify potential target metabolites for in vivo halogenation (HPLC-HRMS analysis, personal data). So far, no significant result has been obtained for halogenated metabolite production.

Our experiments showed that *HwvCPO* mRNA expression was influenced by the culture conditions. Indeed all the tested conditions show significant difference in mRNA expression ( $p$ -value < 0.05). mRNA levels were lower in poor culture media such as PDA or Minimal Medium and higher in rich culture media like Wickerham and Czapek. The gene was more highly expressed on the Wickerham culture medium although the variation between “Hw W + SS” replicates was high. Interestingly, for Wickerham and Czapek culture media, supplementation with halogen salts had an impact on the relative mRNA expression. Actually, we detected a significant reduction in SSH media compared to SS media. The halogen concentration in media seems to inhibit *HwvCPO* mRNA production or affect its stability in these cases. Even if Wickerham medium was identified as the best medium to have the vHPO mRNA expressed, the protein purification in its native form remained unsuccessful, leading to further experiments of heterologous expression.

### Overexpression and Biochemical Characterization of the Recombinant *HwvCPO*

The gene encoding the *H. werneckii* vanadium chloroperoxidase protein was successfully cloned in the pQE-81L



**Fig. 3** Relative expression of *HwvCPO* mRNA in different culture media in triplicates (MM: minimal media (red), PDA: potatoes dextrose agar (yellow), W: Wickerham (blue) and CZA: Czapek (green) + SS: sea salts or SSh: sea salts + halogens). Results were calculated using a pre-established standard range of mRNA concentra-

tions (0.5 to 100 ng/ $\mu$ L). Results were normalized using expression of phosphofructokinase mRNA expression. \*: Significant difference with addition of halogens in the culture media on the mRNA expression (CI 90)

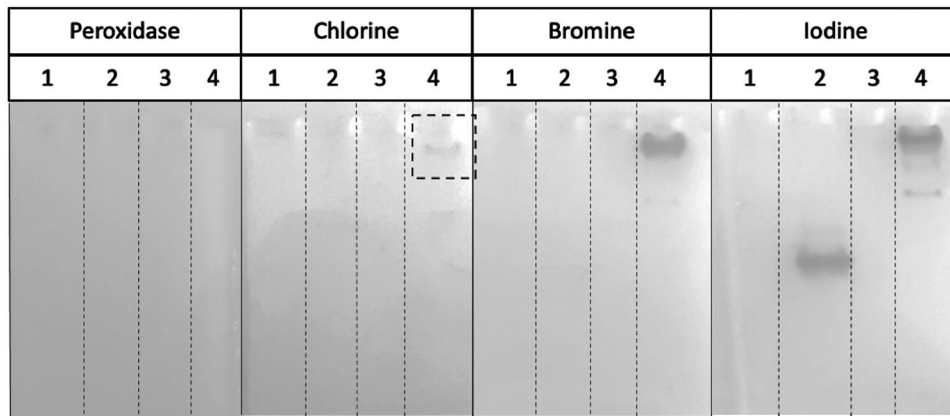
plasmid (Fig. S1). The protein expression in *E. coli* was achieved using a strain harboring the commercial plasmid pKEJ7 to enhance protein refolding (Nishihara et al. 1998, 2000). Without these co-expressed chaperones, vHPO formed inclusion bodies.

The molecular weight of the recombinant protein was approximated at 75 kDa which is consistent with the predicted molecular weight (72.3 kDa). It was validated by a western blot analysis using an anti-His tag antibody (Fig. S2). Surprisingly, the results also showed probable copurification of chaperone proteins DnaK and DnaJ (protein sizes are consistent with chaperon sizes) with the recombinant vHPO using affinity chromatography. Further purification on gel filtration column was attempted but removal of chaperone proteins was not effective. Indeed, it seemed that chaperones and recombinant vHPO formed a complex or remained linked. The recombinant vHPO was then biochemically characterized using MCD assay, thymol blue assay and *o*-dianisidine assay.

Thymol blue assay was first used to demonstrate iodoperoxidase and bromoperoxidase activities (Verhaeghe et al. 2008) (Fig. S3-S4). This assay successfully validated both iodo- and bromoperoxidase activities of *HwvCPO* compared to the positive control *Ascophyllum nodosum* vBPO I and diverse negative controls. Indeed, the positive control

showed a color change for both iodo- and bromoperoxidase activity which is consistent with a vanadium bromoperoxidase. *HwvCPO* highlights color changes for both iodine and bromine-containing wells (Fig. S4). Thymol blue assays without vanadate supplementation clearly indicate that *HwvCPO* is a vanadium-dependent haloperoxidase. Indeed, the addition of vanadate improves the reaction rate of the enzyme obtained with a more intense and faster blue coloration. This indicates a faster formation of brominated thymol blue. Boiled enzymes show no activity during assays validating no artifactual effect driven by medium components (Fig. S3-S4).

Additionally, haloperoxidase activities were checked on native PAGE using *o*-dianisidine, allowing further investigation of the chloroperoxidase and peroxidase activities (Fig. 4). *HwvCPO* presents no peroxidase activity but iodo- and bromoperoxidase activities and a weak chloroperoxidase activity. Positive control confirmed previous results based on thymol blue assay as only iodoperoxidase activity was highlighted. Negative control also validated our results since no haloperoxidase or peroxidase activities were revealed. Another assay available in supplementary information validates that the reaction is driven by the presence of the enzyme with a boiled enzyme control showing a loss of activity (Fig. S5).



**Fig. 4** *o*-dianisidine assay presenting the 4 native PAGE conducted on (1) the negative control (buffer), (2) the positive control *ZgvIPO1*, (3) an inactive recombinant vHPO co-expressed with the same chaperon proteins (BL21+pKJE7+pQE-80L\_vHPO, personal communication), and (4) the studied enzyme *HwvCPO*. Peroxidase, chloroperoxidase, bromoperoxidase, and iodoperoxidase activities were evaluated respectively. Solution 1 contained *o*-dianisidine (100 mM in 1 mL of acetic acid) in 100 mM phosphate buffer pH 7.4 (final

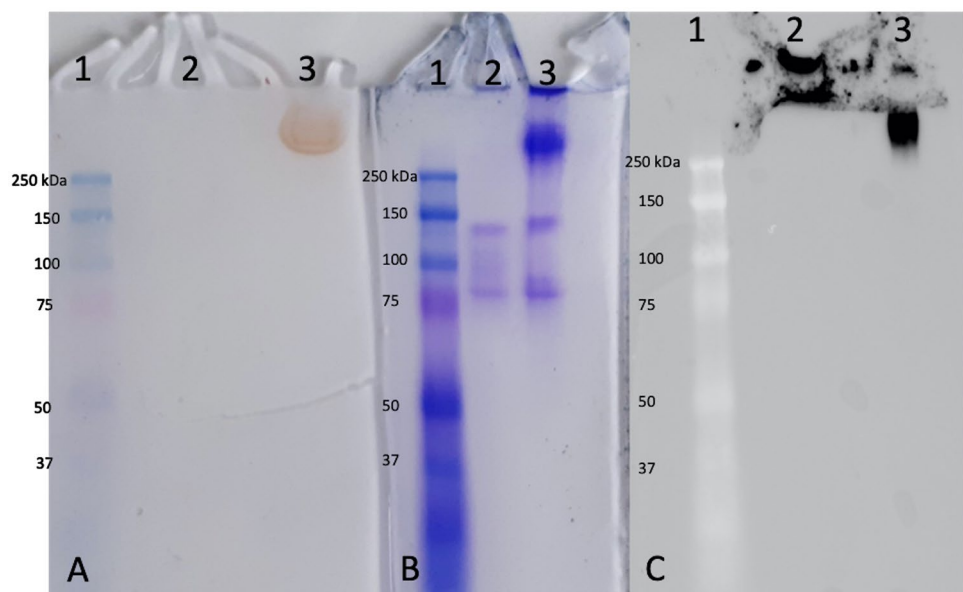
volume 100 mL). Solution 2 contained 5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. First incubation: 50 ml of solution containing 100 mM phosphate buffer pH 7.4, 4.5 mL Solution 1, 1 mM KI, or 2 mM KBr or KCl in ultrapure water, for 1 h with stirring at 20 °C. Second incubation: 50 mL of solution 2 for either 1 h (for KI) or overnight (KCl, KBr and peroxidase) at 20 °C. Peroxidase activity was checked by omitting halogen from the first incubation step (20 °C)

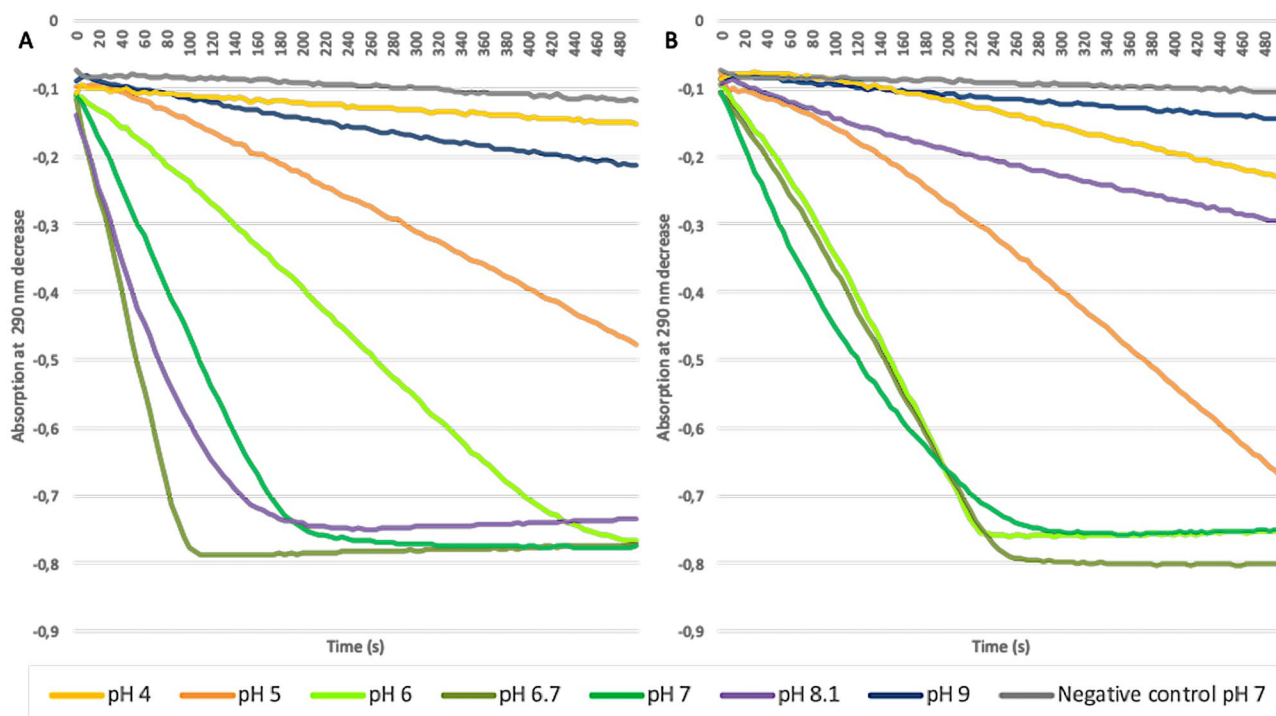
It can be observed on the native PAGE that the native size of *HwvCPO* is greater than 250 kDa. This observation can be explained by the formation of a complex, possibly with co-expressed chaperone proteins. This specific protein band is also responsible of the enzymatic activity observed during *o*-dianisidine assay (Lane 3 on Fig. 5A). This complex is no longer observable when the enzyme is boiled as well as the corresponding enzymatic activity (Lane 3 on Fig. 5A and lane 2 on Fig. 5B). The thermal denaturation of the enzyme causes its precipitation. Thus, it can no longer penetrate the gel for migration. This explains the signal observed in the

stacking for the boiled protein (Lane 2 on Fig. 5C). On the other hand, when the enzyme is not denatured, it can be observed that the complex is indeed composed of the recombinant *HwvCPO* enzyme because the antibody targets this complex (Lane 3 on Fig. 5C).

Finally, by performing a monochlorodimedone (MCD) assay we were able to provide further evidence of chloroperoxidase and bromoperoxidase activities of *HwvCPO*. The results showed that the optimal pH for *HwvCPO* activities both with chloride and bromide was pH 6.7 to 8.1 or pH 6 to 7 respectively (Fig. 6A and B).

**Fig. 5** **A** *o*-dianisidine assay to assess bromoperoxidase activity on native PAGE. Lane 1: size marker (8  $\mu$ L); Lane 2: boiled *HwvCPO* (12  $\mu$ L); Lane 3: *HwvCPO* (12  $\mu$ L). **B** Native PAGE revealed with Coomassie blue. Lane 1: size marker (8  $\mu$ L); Lane 2: boiled *HwvCPO* (12  $\mu$ L); Lane 3: *HwvCPO* (12  $\mu$ L). **C** Western-blot revealed with anti-his tag antibody. Lane 1: size marker (8  $\mu$ L); Lane 2: boiled *HwvCPO* (12  $\mu$ L); Lane 3: *HwvCPO* (12  $\mu$ L)





**Fig. 6** MCD assays with purified recombinant *HwvCPO* at different pH (pH 4 (yellow), pH 5 (orange), pH 6 (light green), pH 6.7 (khaki green); pH 7 (dark green), pH 8.1 (purple), pH 9 (dark blue)) with both KCl (A) and KBr (B). The following components were then added to the UV cuvette: 50 mM Buffer (pH 4 to 9), 50  $\mu$ M MCD,

200 mM KCl or 200  $\mu$ M KBr, 50  $\mu$ L enzymatic solution (5 mg/mL), 10  $\mu$ M  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  and various amounts of distilled water to obtain a final volume of 900  $\mu$ L. Then 100  $\mu$ L of  $\text{H}_2\text{O}_2$  12 mM were added to start the reaction

Following these enzymatic assays, *H. werneckii* vHPO can be described as a vanadium-dependent chloroperoxidase: *HwvCPO*. Indeed, the enzyme showed activities for both chloride, bromide and iodide with optimal pH around 6–7 (for chlorination and bromination). Higher pH conditions (> 7) led to a drastic decrease in the enzyme activity in the tested conditions for bromide (blue and purple curves, Fig. 6B). While chlorination can still occur at pH 8.1 (purple curve, Fig. 6A), a drastic decrease is also observed for higher pH (blue curve, Fig. 6A). Similarly, chloride and bromide oxidation were not significantly different to negative control levels in acidic conditions (yellow curves, Fig. 6).

### Enzyme Kinetics

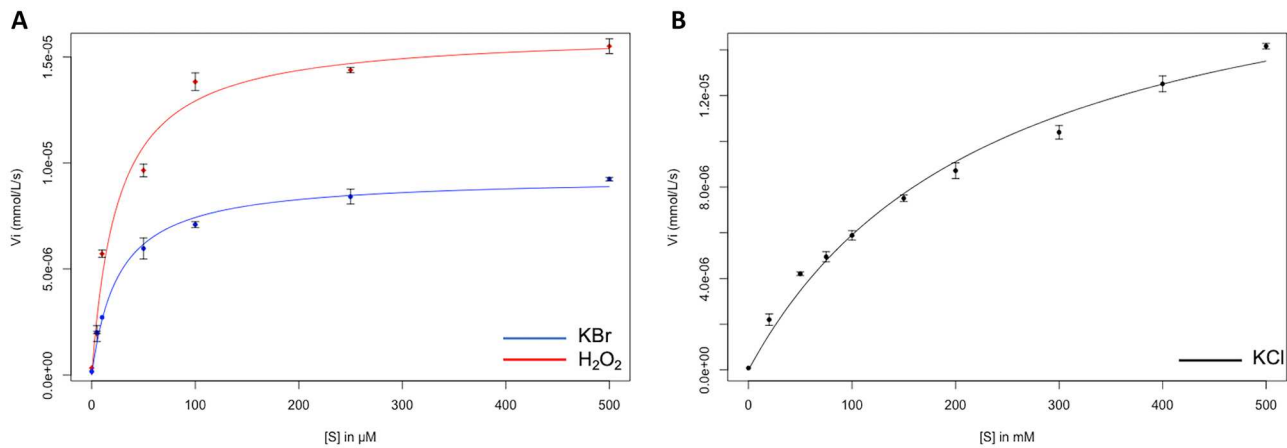
Based on Michaelis–Menten curves obtained for the different substrates  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Br}^-$  and  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Fig. 7) with the *HwvCPO* enzyme at pH 7,  $V_{\text{max}}$ ,  $K_m$ , and  $k_{\text{cat}}$  constants for each reaction were calculated (Table 1). Higher concentration of KCl (up to 500 mM) has not been used to avoid enzymatic inhibition (Schijndel et al. 1994).

The results showed that *HwvCPO* possesses downer Michaelis–Menten constant for bromide ( $K_m = 26 \mu\text{M}$ ) than chloride ( $K_m = 237 \text{ mM}$ ) with a  $10^4$  factor difference

(Table 1). The Michaelis–Menten constant for  $\text{H}_2\text{O}_2$  is in a similar range to bromide with a  $K_m$  of 17  $\mu\text{M}$ . The turnover number ( $k_{\text{cat}}$ ) are in the same range for both chloride and bromide but a little bit higher for hydrogen peroxide. Maximum rates ( $V_{\text{max}}$ ) are close between the three substrates. For bromide and hydrogen peroxide, catalytic efficiency is respectively  $4.94 \times 10^3$  and  $1.24 \times 10^4 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$ , which is below the median catalytic efficiency distribution ( $1.0 \times 10^5 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$ ) calculated by Bar-Even et al. (Bar-Even et al. 2011). However, as indicated in this article, our enzyme is among the 60% enzymes that possess a catalytic efficiency between  $1.0 \times 10^3$  and  $1.0 \times 10^6 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$ .

### Organic Solvent Tolerance of the Recombinant *HwvCPO*

Considering the potential application of vHPO in biocatalysis, especially regarding their high tolerance to organic solvents (Höfler et al. 2019), the new *HwvCPO* was evaluated in this context. As many organic molecules are not soluble in distilled water, the possibility of adding organic solvents to the reaction medium widens the potential use of this type of enzyme. The enzymatic activity of *HwvCPO* in the presence of different organic solvents



**Fig. 7** Michaelis–Menten curve obtain for *HwvCPO* using **A**  $\text{H}_2\text{O}_2$  (red) and KBr (blue) and **B** KCl (black) in MCD assays. MCD assays for KCl and KBr constant calculations were carried as followed: 50 mM buffer pH 7, 50  $\mu\text{M}$  MCD, 10  $\mu\text{M}$   $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , 1.2 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 1  $\mu\text{L}$  *HwvCPO* (5 mg/mL), and KCl (20 mM, 50 mM, 75 mM,

100 mM, 150 mM, 200 mM, 300 mM, 400 mM, and 500 mM), KBr (5  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$ , 250  $\mu\text{M}$ , and 500  $\mu\text{M}$ ). For  $\text{H}_2\text{O}_2$  constant calculations: 100  $\mu\text{M}$  KBr are used and different concentration of  $\text{H}_2\text{O}_2$  (1  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$ , 250  $\mu\text{M}$ , and 500  $\mu\text{M}$ ). Final volume is 1 mL

was then measured. Bartlett test gives a  $p$ -value of 0.8584, (therefore  $> 0.05$ ). In fact, the variances can be considered equal and therefore we can carry out an ANOVA. A  $p$ -value of 5.4E-08 was obtained ( $< 0.05$ ). This means that there are very highly significant differences between the different conditions (Fig. 8).

Compared to the level of enzymatic activity in distilled water, the closest level of activity was obtained using ethanol and dimethylsulfoxide (respectively 84% and 74% of the enzymatic activity in water). Enzymatic activity in *N,N*-dimethylformamide decreased by approximately 50% (54% of the enzymatic activity in water). Acetonitrile and methanol reduced *HwvCPO* activity more strongly with 35% and 39% of remaining activity compared to the control. Statistical analysis highlights three groups with significant different means: group d gathering ethanol and dimethylsulfoxide tests, group c with only *N,N*-dimethylformamide and group b with methanol and acetonitrile. These three groups are

significantly different from the control test with only water as solvent (group a).

### Structural Analysis Using Bioinformatic Tools

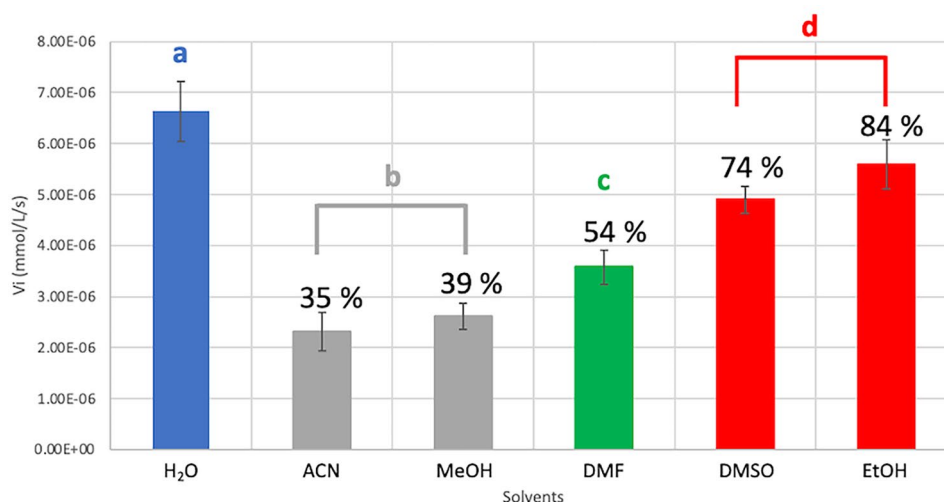
The InterProScan results show that the protein belongs to the superfamily “Phosphatidic acid phosphatase type 2/ haloperoxidase (IPR036938)” with a “Phosphatidic acid phosphatase type 2/haloperoxidase (IPR000326)” domain. More precisely, it belongs to the superfamily “Bromoperoxidase/chloroperoxidase C-terminal (IPR016119)” and finally has a domain “Vanadium chloroperoxidase, N-terminal (IPR041067).

While crystallization of the purified protein was unsuccessful because of the presence of chaperon proteins, its structural analysis was performed using bioinformatics tools. The AlphaFold 2 program was able to produce five models with a high confidence index (88.7 to 89.3 on a 100 scale). The coverage of the sequence with a high pLDDT (predicted

**Table 1** Enzymatic parameters obtained by nonlinear regression with Michaelis–Menten equation. These results are the average of three replicates for each substrate (Cl, Br and  $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Standard deviation is indicated in the margin. MCD assays for KCl and KBr constant calculations were carried as followed: 50 mM buffer pH 7, 50  $\mu\text{M}$  MCD, 10  $\mu\text{M}$   $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , 1.2 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 1  $\mu\text{L}$  *HwvCPO* (5 mg/mL), and KCl

(20 mM, 50 mM, 75 mM, 100 mM, 150 mM, 200 mM, 300 mM, 400 mM, and 500 mM), KBr (5  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$ , 250  $\mu\text{M}$ , and 500  $\mu\text{M}$ ). For  $\text{H}_2\text{O}_2$  constant calculations: 100  $\mu\text{M}$  KBr are used and different concentration of  $\text{H}_2\text{O}_2$  (1  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$ , 250  $\mu\text{M}$ , and 500  $\mu\text{M}$ ). Final volume is 1 mL

Substrate	$V_{\text{max}}$ ( $\mu\text{mol/L/s}$ )	$K_m$ (M)	$k_{\text{cat}}$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$k_{\text{cat}}/K_m$ ( $\text{s}^{-1} \text{M}^{-1}$ )
KCl	0.02 ( $\pm 1.59 \times 10^{-4}$ )	0.237 ( $\pm 1.15 \times 10^{-2}$ )	0.14 ( $\pm 1.0 \times 10^{-3}$ )	$5.91 \times 10^{-1}$
KBr	0.009 ( $\pm 2.18 \times 10^{-4}$ )	2.63E-05 ( $\pm 3.67 \times 10^{-6}$ )	0.13 ( $\pm 9.0 \times 10^{-3}$ )	$4.94 \times 10^3$
$\text{H}_2\text{O}_2$	0.014 ( $\pm 1.5 \times 10^{-3}$ )	1.78E-05 ( $\pm 6.55 \times 10^{-6}$ )	0.22 ( $\pm 2.2 \times 10^{-2}$ )	$1.24 \times 10^4$



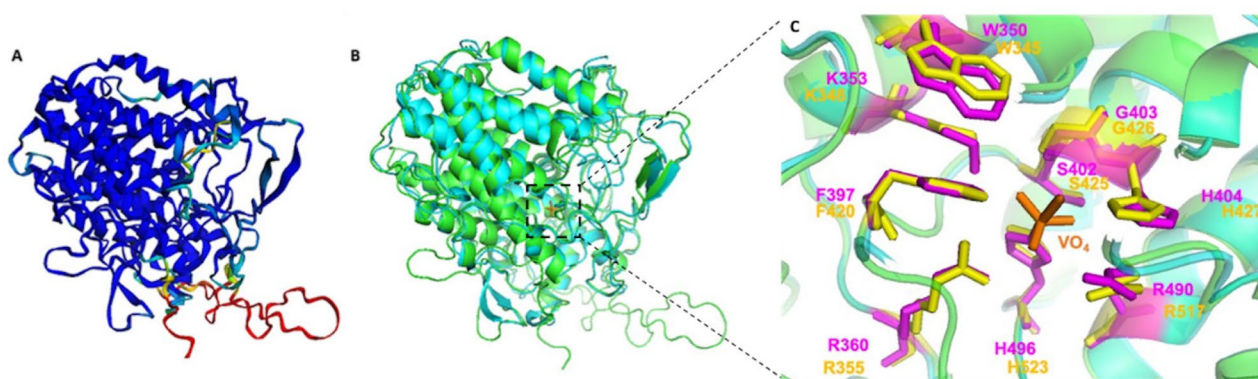
**Fig. 8** Enzymatic activity of *HwvCPO* according to the tested solvent (50:50 v/v water:solvent). These assays were carried out in triplicates. H<sub>2</sub>O: water (blue), ACN: acetonitrile (grey group), MeOH: methanol (grey group), DMF: N,N-dimethylformamide (green), DMSO: dimethylsulfoxide and EtOH: ethanol (red group). Groups **a**, **b**, **c** and

**d** are discriminated by a one-way ANOVA test ( $p$ -value of 5.4E-08) coupled to a Fisher LSD test. MCD assays were carried out as followed: 50 mM buffer pH 7, 50  $\mu$ M MCD, 100  $\mu$ M KBr, 1  $\mu$ L *HwvCPO* (5 mg/mL), 10  $\mu$ M Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1.2 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in a 50:50 v/v water/solvent mix to reach a final volume of 1 mL

Local Distance Difference Test) is important (Mariani et al. 2013). Up to 3000 sequences were found in the databases to align to *HwvCPO* sequence. Overall, the sequence identity to *HwvCPO* is low but some sequences share up to 40% sequence identity to query. These sequences were used to build the model. The PAE plots indicate a very similar pattern for all the models that correlates to the pLDDT and sequence coverage per position (supplementary data, Fig. S6). There are 4 regions that exhibit an uncertain probability of folding. These regions are a long insertion loop 363–397

and three shorter zones (35–42, 539–552, and 618–627) and are schematized on the model from yellow to red (Fig. 9A).

This analysis revealed that the structure of *HwvCPO* is very similar to the structure of *CivCPO*, forming a monomeric compact core enzyme composed of 10 alpha helices assembled into 2 distinct bundles. *CivCPO* possesses three anti-parallel beta sheets whereas only one of those is present in *HwvCPO* (an additional study performed with Phyre2 of secondary structures in comparison to *CivCPO* is available as additional information, Fig. S7). *CivCPO* has



**Fig. 9** **A** Cartoon 3D structure representation of the best *HwvCPO* model build using AlphaFold 2. Blue regions indicate good modelling while yellow to red regions indicate uncertain modelling. **B** *HwvCPO* and *CivCPO* secondary structure elements are in green and cyan colored. Vanadate cofactor of the *CivCPO* crystallized structure (1VNI) is present in orange at the center of the protein. *HwvCPO* is represented here by the best model (model 3) structure obtained

using AlphaFold2 pipeline analysis. **C** Overlay of the *CivCPO* crystallized structure and the best *HwvCPO* model generated by AlphaFold2. Global structures are showed in cartoon representation where *HwvCPO* is green and *CivCPO* is cyan colored. The 9 residues of the active site are respectively represented in yellow and magenta for *HwvCPO* and *CivCPO*. Vanadate ion is represented in orange

also an external loop longer than its equivalent in *HwvCPO* between amino acids 116 and 128 (Fig. 9B). There are five additional loops found at the surface of *HwvCPO* compared to *CivCPO*.

Regarding the active site, *HwvCPO* exhibits 100% identity of active site amino acids corresponding to the first coordination sphere of vanadate with the 1VNI template (*CivCPO*, *C. inaequalis*). This result shows the high conservation of the active site of proteins from the vanadium haloperoxidase family (Fig. 9C). This result is in agreement with the previous alignment of the two sequences.

## Discussion

### Vanadium-Dependent Haloperoxidases in Fungi and Phylogenetic Analysis

The *H. werneckii* vanadium chloroperoxidase described in this work is the fourth to be biochemically characterized in the fungal kingdom. Interestingly, *HwvCPO* is present in the same monophyletic group as *CivCPO* and *AdvCPO* and it possesses the same halogen specificity. In contrast to algae and marine bacteria where all the vHPO that have been described are bromoperoxidases or iodoperoxidases, fungal vHPO correspond to chloroperoxidases even though their affinity for bromine is higher. To validate the vanadium dependencies of *HwvCPO*, enzymatic assays were performed without vanadate supplementation after dialysis of pure *HwvCPO*. It was not possible to completely remove the traces of vanadium present in the purified enzyme and test the apoenzyme. The traces of vanadium certainly originate from the empirical culture media. Therefore, some enzyme activity can be observed when no vanadate supplementation is used, but when vanadate supplementation is performed, better enzyme activity on thymol blue can be observed, suggesting a dependence of *HwvCPO* for vanadium (Figs. S3 and S4).

The vHPO enzyme family shares a common ancestor with bacterial acid phosphatases as described by Leblanc et al. (Leblanc et al. 2015). However, for the first time, the phylogenetic analysis highlights a common ancestor between proteobacterial vHPOs and fungal vHPOs from the group 1 (Fig. 2). This result is supported by a bootstrap value of 100% which makes it more robust. Therefore, we hypothesize that lateral gene transfer has occurred leading to vHPOs acquisition from proteobacteria to fungi. However, this hypothesis would require further investigation.

Interestingly, a second vHPOs fungal group separated from the first group appears (fungi vHPOs group 2 on Fig. 2). This second group is only composed of putative vHPOs sequences. Many putative vHPOs from Basidiomycetes (*Cyclocybe aegerita*, *Tricholoma matsutake*,

*Panaeolus papilionaceus* for example) can be found in this group, which may explain the separation from the group 1 which is only composed of Ascomycetes. Contrary to fungal vHPOs in group 1, these putative vHPOs of group 2 may also have been acquired by horizontal gene transfer from bacteria. The origin of the bacterial lineage involved remains to be elucidated. This discrimination between two vHPOs groups is observed for the first time but sequences from fungi vHPOs group 2 would need to be further characterized to highlight differences between vHPOs from fungi groups 1 and 2 (Fig. 2).

An intraspecific analysis has been performed using the genomic data published by Gostinčar et al. (Gostinčar et al. 2022). This analysis shows that the presence of a gene homologous to *HwvCPO* is not always the case depending on the *H. werneckii* strain (marine or terrestrial) (Cochereau 2023). The presence of this chloroperoxidase does not therefore seem to be correlated with the high halotolerance of *H. werneckii*. The presence of this protein is not strictly marine as terrestrial strains possess homolog gene in their genome (EXF-151 or EXF-2682 strains).

### Comparing Enzymatic Parameters of *HwvCPO* with other vHPO

Some trends could be observed while comparing all the vHPOs activities reported in the literature. Specificity constant ( $k_{\text{cat}}/K_m$ ) for bromide was greater compared to chloride (8300 times greater). For *CivCPO*, specificity constant for bromide was greater too compared to chloride (950 times greater) (Table 2). Then, this ratio is close to nine times greater for *HwvCPO* compared to *CivCPO*. Moreover, *HwvCPO* was observed to be more specific for bromide than any vHPOs isolated from red algae, brown algae and bacteria ( $K_m$  in the mM range for these enzymes). Specificity constant is higher for *A. nodosum* BPO (97 times greater) and *L. digitata* BPO (30 times greater) compared to *HwvCPO*. Specificity constant for hydrogen peroxide seems to be higher for *CivCPO* (469 times greater) compared to *HwvCPO* (Table 2). Therefore, our work suggests that fungal vHPO are more specific for bromide with a  $K_m$  in the  $\mu\text{M}$  range and are able to catalyze chlorination in contrast to the algal vHPOs reported here.

Contrary to other vHPOs presented in Table 2, *HwvCPO* possess a weak turnover number ( $k_{\text{cat}}$ ). This constant may be impacted by the presence of chaperones which can form a complex with *HwvCPO*. It would be interesting to calculate the turnover number for a range of pH from 6 to 8.1 to optimize the  $k_{\text{cat}}$  value. This lower value could also be the consequence of the closing of the 2nd active site entry and the deeper active site pocket in *HwvCPO* predicted by the structural analysis of the AlphaFold2 model. In this case, fewer halogens may enter the active site and the longer distance

**Table 2** Examples of enzymatically characterized vHPO in all the kingdoms of life

Species	Clade	$K_m$ (mM)				$k_{cat}$ ( $s^{-1}$ )			Optimal pH	Reference
		I <sup>-</sup>	Br <sup>-</sup>	Cl <sup>-</sup>	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	I <sup>-</sup>	Br <sup>-</sup>	Cl <sup>-</sup>		
<i>Ascophyllum nodosum</i> (vBPO II, r)	Brown Algae	NA	0.32	NA	0.022	NA	153	NA	5.9	(Wischang et al. 2012)
<i>Corallina officinalis</i> (vBPO, r)	Red Algae	1.80	1.20	NA	0.017	NA	NA	NA	6.5	(Carter et al. 2002)
<i>Laurencia nipponica</i> (vBPO 2, r)		NA	0.35	NA	0.025	NA	NA	NA	7.0	(Kaneko et al. 2014)
<i>Alternaria didymospora</i> (vCPO, n)	Fungi	NA	0.005	1.2	0.06	NA	60	2	5.3	(Barnett et al. 1998)
<i>Xanthoria parietina</i> (vBPO, n)		NA	0.028	NA	0.87	NA	NA	NA	5.5	(Plat et al. 1987)
<i>Curvularia inaequalis</i> (vCPO, r)		NA	0.009	0.9	0.035	NA	248	26	5.0	(Hemrika et al. 1999)
<i>Hortaea werneckii</i> (vCPO, r)		NA	0.026	237	0.017	NA	0.13	0.14	6–8	This work
<i>Streptomyces</i> sp. CNQ-525 (NapH1, r)	Bacteria	NA	NA	4	0.001	NA	NA	NA	6.0	(Bernhardt et al. 2011)
<i>Acaryochloris marina</i> (vBPO, r)	Cyano-bacteria	6.40	0.40	NA	0.06	NA	8.40	NA	6.0	(Frank et al. 2016)
<i>Synechococcus</i> sp. CC9311 (vBPO, n)		0.02	1.50	NA	NA	NA	NA	NA	7.0	(Johnson et al. 2011)

NA not available, r recombinant protein, n native protein

to reach the vanadate cofactor could result in a reduction in the maximum number of chemical conversions of substrate molecules per second.

Any previously described vCPO seem to possess better affinity for bromide compared to chloride. The higher specificity for bromination over chlorination in fungi (even for terrestrial-derived strains) might be explained by the scarcity of bromine compared to chlorine in both terrestrial and marine environments. Indeed, higher specificity for bromide can be explained because bromine is rarer than chlorine in both terrestrial ([Cl]: 320 mg/kg; [Br]: 3 mg/kg) and marine environments ([Cl]: 19,000 mg/kg; [Br]: 65 mg/kg) (Gribble 2010). The CivCPO from terrestrial origin seems to be more impacted by pH changes compared to HwvCPO. Indeed, the affinity of CivCPO for bromide at pH 7 remains in the same range but the catalytic constant is significantly reduced ( $K_m$ : 10  $\mu$ M but the  $k_{cat}$  decreases by up to 40 times from 248 to 6  $s^{-1}$ ). CivCPO has optimal activity at acidic pH ranging from 4.2 to 6.3 (Hemrika et al. 1999). Contrary to CivCPO, HwvCPO described here, has an optimal pH value in a neutral pH range (pH 6–8.1, Fig. 6).

Some limitations in the comparison of enzymatic activities can be here discussed and acknowledged. Strict comparison appears difficult since the enzymatic activity of HwvCPO was purified as a recombinant protein from *E. coli*, potentially impacting its activity, while the other described vHPOs have been directly purified from their natural producers. For example, chaperone proteins were used to enhance HwvCPO folding and these proteins remained linked to the recombinant HwvCPO and were still detected after purification. Therefore, we cannot exclude the possibility that these chaperone proteins might skew the enzymatic activity measured. It would thus be interesting in future investigations (i) to compare this recombinant enzyme with the native HwvCPO purified directly from *H. werneckii*, and/or (ii) to overexpress the other described vHPOs using the same approach as for *H. werneckii*.

### HwvCPO Organic Solvent Tolerance

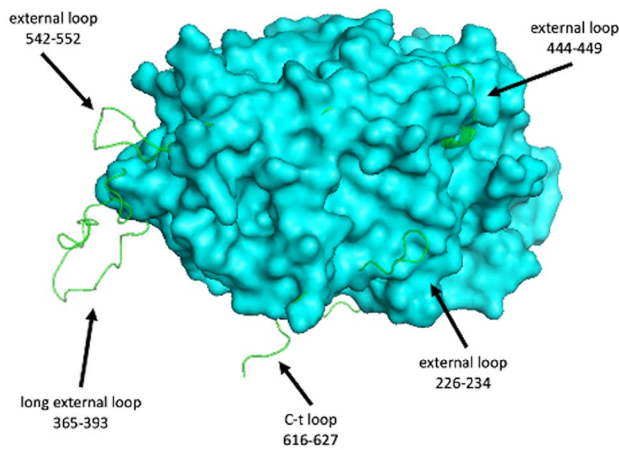
According to the results presented in Fig. 8, HwvCPO remains active in different organic solvents without losing too much activity comparing to its activity in water DMF and DMSO tolerance appear interesting for further investigations because these solvents are frequently used in fine chemical industries (Roy 2000; Lynch 2003). The wide range solvent tolerance observed is also of interest in terms of potential applications in biocatalysis because it allows the solubilization of different compounds which cannot be dissolved in water. Early assays were carried out using H<sub>2</sub>O/ACN (50:50 v/v) or H<sub>2</sub>O/EtOH (50:50 v/v) and enzymatic bromination, di-bromination, or tri-bromination of different compounds (thymol, phloroglucinol) were successfully obtained (data not shown).

### Structural Analysis of the AlphaFold2 Model Obtained for HwvCPO

Based on our predicted model, new structural elements were found in the HwvCPO enzyme compared to CivCPO, notably five additional loops at the surface of the enzyme. Four of these loops are localized far from the active site entrance (Figs. 10 and 11). The potential role(s) of these supplementary domains, particularly the longer external loop 365–393 (Fig. 10), remains to be determined.

Another difference between the two proteins concerns the accessibility of the active site of the enzyme. In CivCPO, there are 2 potential active site gate entries for the halogen ion while in HwvCPO, only one entry leads to the vanadate cofactor (Fig. 11A and B). This difference can be explained by a modification in a loop close to the active site. The equivalent loop 389–396 of CivCPO in HwvCPO exhibits a shift that triggers the entire covering of the entrance site 2.





**Fig. 10** The overall 3D structure of *CivCPO* is represented by a surface view (cyan color). The 4 additional loops of *HwvCPO* (green color) are modelled by overlay showing external extensions outside the *CivCPO* structure

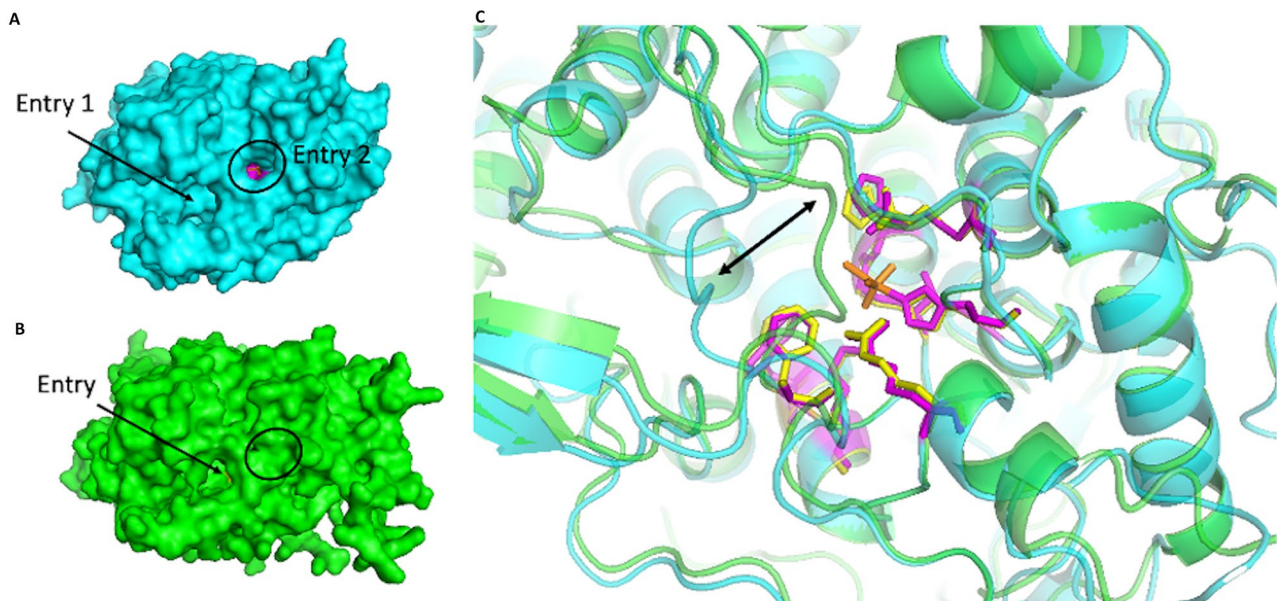
The “NRIPFKPA” sequence present in the *HwvCPO* loop is replaced by “NDIPFKPP” in *CivCPO* and it contains 2 prolines instead of 3 in the second case. Consequently, it modifies in *HwvCPO* the angle of the loop inclination that results in entrance obstruction that provokes the entry closing (Fig. 11C).

Further analysis of the electrostatic charge around the entry site revealed that three basic (H33, H211, and K417) and one acid (D287) residues are found at the surface in the most

internal active site entrance. An equivalent distribution and nature of charged residues (H38, H222, K394, and D292) are present in *CivCPO* (Fig. 12). Nevertheless, K417 is part of the shifted loop in *HwvCPO* resulting in a more distant position of this amino acid from the entrance compared to *CivCPO* (K394, Fig. 12). D185 is near K417 and could also reduce the global electrostatic charge around the cavity entry in *HwvCPO*. This difference could also affect the halogen specificity of the two enzymes (Fig. 12). The electrostatic charge of the second entrance of *CivCPO*, is shown below: three positive charges (R360, K394, and R490) and one negative charge (D292). Thus, in each case, the electrostatic charge of the entry site is favorable for halide attraction. The difference in the number of site entries between the two enzymes may explain some differences observed in the substrate selection and affinity.

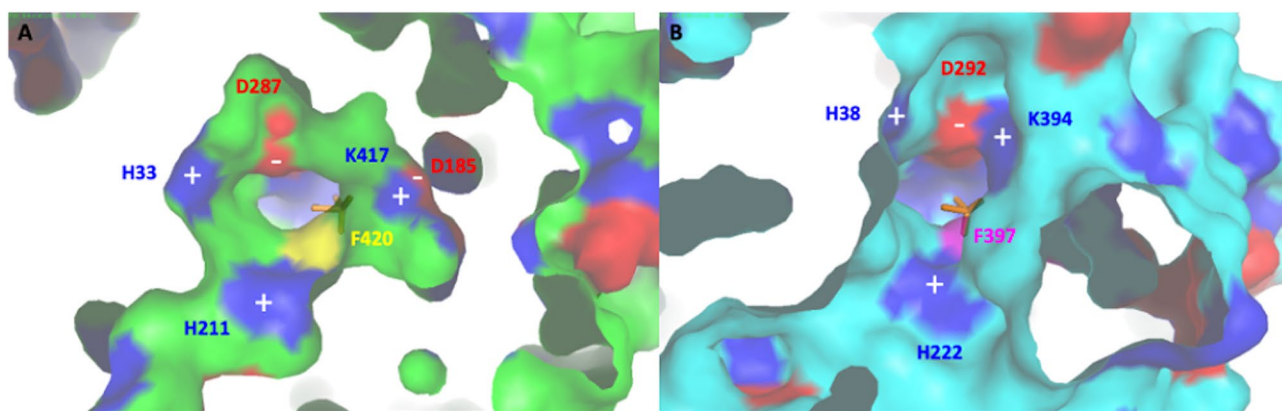
The global disposition and number of charges around the surface near the active site access are also slightly different between the 2 enzymes. The *HwvCPO* entry site is surrounded by potential positive charges mediated by 6 basic amino acids and the potential negative charges of 6 acidic residues form a second circle around the positive charges. In *CivCPO*, there is also a potential positive halo around the active site entry composed of 6 basic acidic amino acids, but it appears to cover a more extended surface and includes one central negative charge absent in *HwvCPO*. This may be the consequence of the presence of two entries to the active site in *CivCPO* (Supplementary data, Fig. S8).

The number of site entries is not the only difference between the two active site pockets. Indeed, in all the



**Fig. 11** Global view of the second active site entry of *CivCPO* (A) masked in *HwvCPO* (B). (C) Global structures are showed in cartoon representation where *HwvCPO* is green and *CivCPO* is cyan colored.

The 9 residues of the active site are respectively represented in yellow and magenta for *HwvCPO* and *CivCPO*. Vanadate ion is represented in orange. The shift zone is indicated by a black double arrow



**Fig. 12** Comparison of the active site entries of *HwvCPO* (A) and *CivCPO* (B). Vanadate cofactor, added by overlay of *CivCPO* structure (1VN1), is colored in orange and visible by transparency in the catalytic pocket. Deep view of the enzyme is represented by surface appearance of the amino acids. Basic and acidic amino acid residues

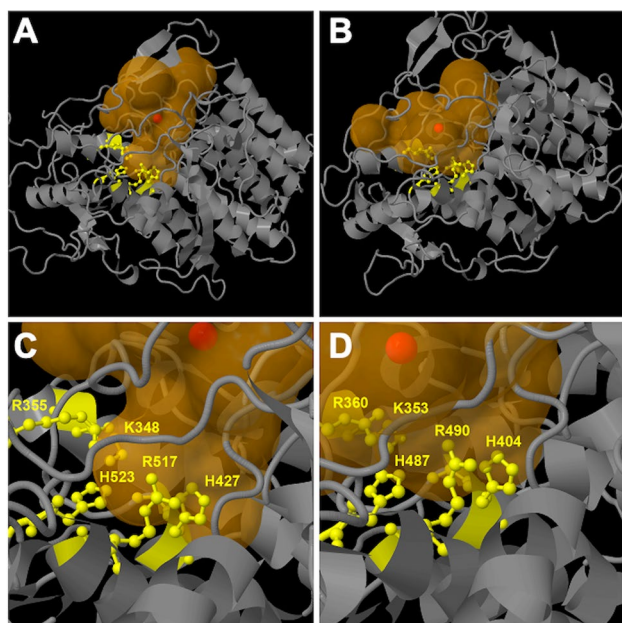
are respectively colored in blue and red. Neutral residues are in green (A) and cyan (B). Phenylalanine residue suspected to be the acceptor amino acid for binding of  $X^-$  ( $Cl^-$  or  $Br^-$ ) is colored in yellow (F420, A) or magenta (F397, B) (Messerschmidt and Wever 1996)

models predicted by AlphaFold 2, the catalytic pocket volume is more important in *HwvCPO* (mean for model 3: 2295 Å<sup>3</sup>) comparing to *CivCPO* (mean: 1774 Å<sup>3</sup>) (supplementary data, Table S2). The overall shape of the pocket for *HwvCPO* is more elongated compared to the pocket of *CivCPO* and its catalytic part containing vanadate and key histidine residues is located deeper inside the core of the protein. Therefore, the halogen

atom therefore has more distance to cover to reach the vanadate cofactor (Fig. 13).

As previously discussed, the first sphere of coordination around the vanadate cofactor is 100% identical between *HwvCPO* and *CivCPO*. Fine displacements can induce some modifications in affinity and/or catalytic constants.

In summary, structural analysis revealed some differences between *HwvCPO* and *CivCPO* in the number of entrances toward to the active site and the electrostatic potential surrounding the entrance. The residues positioned at the entrance itself allow the same electrostatic potential to attract halogen ions. However, in *HwvCPO* the partial positive charge seems to be lower compared to *CivCPO* because K417 is more distant from the entrance. In addition, the catalytic pocket of the two proteins seems different. The *HwvCPO* catalytic pocket volume is greater than *CivCPO* and the catalytic residues are found deeper in the model of *HwvCPO*.



**Fig. 13** Representation of the catalytic pocket cavities predicted by Caver v1.2 for the overall *HwvCPO* (A) and *CivCPO* (B) enzymes. Zoom of the catalytic residues regions for *HwvCPO* (C) and *CivCPO* (D). Protein backbones are shown in grey and cavities are colored in light brown. Catalytic amino acids are in yellow and the cavity centers are shown as red balls

## Conclusion

We have overexpressed and biochemically described a new vanadium-dependent chloroperoxidase from the deep-sea marine fungus *H. werneckii* UBOCC-A-208029. This enzyme was described as a vanadium-dependent chloroperoxidase which can oxidize chloride, bromide, and iodide. This protein is being investigated for the development of greener halogenating chemistry tools and has potentially broader applications based on its activity in the presence of different organic solvents. This characteristic is useful for halogenating a wide range of hydrophobic substrates. In terms of perspective, future analyses, including the crystallization of the recombinant protein and the production of enzyme mutants will be conducted to better understand

the role of associated chaperones in the macromolecular structure and the molecular bases of halogen specificity of *HwvCPO*. Moreover, the implication of *HwvCPO* in halogenated metabolite production has not been depicted and the *in vivo* function of this enzyme remains to be elucidated.

**Supplementary Information** The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1007/s10126-023-10222-7>.

**Acknowledgements** The authors thank the UBOCC strain collection (<https://www.univ-brest.fr/ubocc>, Plouzané, France) for providing *H. werneckii* strain Mo34 (UBOCC-A-208029) isolate. The authors would like to thank Dr. Rachel Exley for taking the time to proofread this manuscript.

**Author Contribution** Conceptualization, Catherine Roullier and Laurence Meslet-Cladière; methodology, Bastien Cochereau, Cécile Hervé, Ludovic Delage, Audrey Pawtowski, Nathalie Demont-Caulet, Catherine Roullier and Laurence Meslet-Cladière; software, Bastien Cochereau, Ludovic Delage, Catherine Roullier and Laurence Meslet-Cladière; validation, Catherine Roullier, Laurence Meslet-Cladière and Yves François Pouchus; investigation, Bastien Cochereau, Yoran Le Strat, Qioalin Ji, Lisa Mazéas, Ludovic Delage; resources, Gaëtan Burgaud, Amélie Weill, Nina Gunde-Cimerman, and Cécile Hervé; project administration, Catherine Roullier, Laurence Meslet-Cladière and Yves François Pouchus; funding acquisition, Catherine Roullier and Laurence Meslet-Cladière; writing—original draft preparation, Bastien Cochereau; writing—review and editing, Bastien Cochereau, Catherine Roullier, Laurence Meslet-Cladière, Gaëtan Burgaud, Nina Gunde-Cimerman and Ludovic Delage; supervision, Catherine Roullier, Laurence Meslet-Cladière and Yves François Pouchus. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding** This study received grants from the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (Paris, France) and IBSAM (Institut Brestois Santé Agro Matière) and EU project MaCuMBA (Marine Microorganisms: Cultivation Methods for Improving Their Biotechnological Applications, FP7, grant agreement 311975, Brussels, Belgium). This work has been supported by the National Research Agency (ANR) and through the JCJC funding instrument for the “HALO-CAT” project with the reference number ANR-21-CE44-0003–01.

**Availability of Data and Materials** The datasets used in the present study are available from the corresponding author on reasonable request. *Hortaea werneckii* (UBOCC-208029) strain is available in the UBO Culture Collection (<https://www.univ-brest.fr/ubocc/fr>). The nucleotide sequence for the *H. werneckii* vCPO is available on GenBank database (*HwvCPO*, OP555106).

## Declarations

**Conflict of Interest** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

**Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in

the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

## References

- Agarwal V, Miles ZD, Winter JM et al (2017) Enzymatic halogenation and dehalogenation reactions: pervasive and mechanistically diverse. *Chem Rev* 117:5619–5674
- Almeida M, Filipe S, Humanes M et al (2001) Vanadium haloperoxidases from brown algae of the Laminariaceae family. *Phytochemistry* 57:633–642
- Almeida MG, Humanes M, Melo R et al (2000) Purification and characterization of vanadium haloperoxidases from the brown alga *Pelvetia canaliculata*. *Phytochemistry* 54:5–11
- Baharum H, Chu W-C, Teo S-S et al (2013) Molecular cloning, homology modeling and site-directed mutagenesis of vanadium-dependent bromoperoxidase (GcVBPO1) from *Gracilaria changii* (Rhodophyta). *Phytochemistry* 92:49–59
- Bar-Even A, Noor E, Savir Y et al (2011) The moderately efficient enzyme: evolutionary and physicochemical trends shaping enzyme parameters. *Biochemistry* 50:4402–4410
- Barnett P, Hemrika W, Dekker HL et al (1998) Isolation, characterization, and primary structure of the vanadium chloroperoxidase from the fungus *Embellisia didymospora*. *J Biol Chem* 273:23381–23387
- Bernhardt P, Okino T, Winter JM et al (2011) A stereoselective vanadium-dependent chloroperoxidase in bacterial antibiotic biosynthesis. *J Am Chem Soc* 133:4268–4270
- Burgaud G, Arzur D, Durand L et al (2010) Marine culturable yeasts in deep-sea hydrothermal vents: species richness and association with fauna. *FEMS Microbiol Ecol* 73:121–133
- Butler A, Sandy M (2009) Mechanistic considerations of halogenating enzymes. *Nature* 460:848–854
- Carter JN, Beatty KE, Simpson MT, Butler A (2002) Reactivity of recombinant and mutant vanadium bromoperoxidase from the red alga *Corallina officinalis*. *J Inorg Biochem* 91:59–69
- Chen PY-T, Adak S, Chekan JR et al (2022) Structural basis of stereospecific vanadium-dependent haloperoxidase family enzymes in napyradiomycin biosynthesis. *Biochemistry* 61:1844–1852
- Cochereau B (2023) Study of vanadium haloperoxidases from fungal marine derived species. Nantes Université
- Cochereau B, Meslet-Cladière L, Pouchus YF et al (2022) Halogenation in fungi: what do we know and what remains to be discovered? *Molecules* 27:3157. <https://doi.org/10.3390/molecules27103157>
- Colin C, Leblanc C, Michel G et al (2005) Vanadium-dependent iodoperoxidases in *Laminaria digitata*, a novel biochemical function diverging from brown algal bromoperoxidases. *J Biol Inorg Chem* 10:156–166
- de Hoog G, Guého E (2010) White Piedra, Black Piedra, and Tinea Nigra. In: John Wiley & Sons (ed) *Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections*, 9th edn 100–112
- Dickson AG, Goyet C (1994) Handbook of methods for the analysis of the various parameters of the carbon dioxide system in sea water. Version 2. In: Dickson AG, Goyet C (eds) *DOE*. Oak Ridge National Laboratory, Oak Ridge, TN 1–187
- Fournier JB, Rebuffet E, Delage L et al (2014) The vanadium iodoperoxidase from the marine Flavobacteriaceae species *Zobellia galactanivorans* reveals novel molecular and evolutionary features of halide specificity in the vanadium haloperoxidase enzyme family. *Appl Environ Microbiol* 80:7561–7573

- Frank A, Seel CJ, Groll M, Gulder T (2016) Characterization of a cyanobacterial haloperoxidase and evaluation of its biocatalytic halogenation potential. *ChemBioChem* 17:2028–2032
- Gillot G, Jany JL, Dominguez-Santos R et al (2017) Genetic basis for mycophenolic acid production and strain-dependent production variability in *Penicillium roqueforti*. *Food Microbiol* 62:239–250
- Gostinčar C, Sun X, Černoša A et al (2022) Clonality, inbreeding, and hybridization in two extremotolerant black yeasts. *Gigascience* 11. <https://doi.org/10.1093/gigascience/giac095>
- Gribble GW (2010) Naturally occurring organohalogen compounds - a comprehensive update. Springer, Vienna
- Gunde-Cimerman N, Ramos J, Plemenitaš A (2009) Halotolerant and halophilic fungi. *Mycol Res* 113:1231–1241
- Hartung J, Brücher O, Hach D et al (2008) Bromoperoxidase activity and vanadium level of the brown alga *Ascophyllum nodosum*. *Phytochemistry* 69:2826–2830
- Hemrika W, Renirie R, Macedo-Ribeiro S et al (1999) Heterologous expression of the vanadium-containing chloroperoxidase from *Curvularia inaequalis* in *Saccharomyces cerevisiae* and site-directed mutagenesis of the active site residues His496, Lys353, Arg360, and Arg490. *J Biol Chem* 274:23820–23827
- Höfler GT, But A, Hollmann F (2019) Haloperoxidases as catalysts in organic synthesis. *Org Biomol Chem* 17:9267–9274
- Johnson TL, Palenik B, Brahmshah B (2011) Characterization of a functional vanadium-dependent bromoperoxidase in the marine cyanobacterium *Synechococcus* SP. CC93111. *J Phycol* 47:792–801
- Jordan P, Vilter H (1990) Native bromoperoxidases do not bind to nitrocellulose: use of DEAE-cellulose as an alternative in blotting. *Electrophoresis* 11:653–655
- Jumper J, Evans R, Pritzel A et al (2021) Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature* 596:583–589
- Kaneko K, Washio K, Umezawa T et al (2014) cDNA cloning and characterization of vanadium-dependent bromoperoxidases from the red alga *Laurencia nipponica*. *Biosci Biotechnol Biochem* 78:1310–1319
- Kogej T, Stein M, Volkmann M et al (2007) Osmotic adaptation of the halophilic fungus *Hortaea werneckii*: role of osmolytes and melanization. *Microbiology (n y)* 153:4261–4273
- Krenn BE, Plat H, Wever R (1987) The bromoperoxidase from the red alga *Ceramium rubrum* also contains vanadium as a prosthetic group. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* 912:287–291. [https://doi.org/10.1016/0167-4838\(87\)90100-2](https://doi.org/10.1016/0167-4838(87)90100-2)
- Leblanc C, Vilter H, Fournier JB et al (2015) Vanadium haloperoxidases: from the discovery 30 years ago to X-ray crystallographic and V K-edge absorption spectroscopic studies. *Coord Chem Rev* 301–302:134–146
- Lenassi M, Gostinčar C, Jackman S et al (2013) Whole genome duplication and enrichment of metal cation transporters revealed by de novo genome sequencing of extremely halotolerant black yeast *Hortaea werneckii*. *PLoS One* 8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0071328>
- Lynch DW (2003) Thirteen-week inhalation toxicity of N, N-dimethylformamide in F344/N rats and B6C3F1 mice. *Toxicol Sci* 72:347–358
- Marasović M, Marasović T, Miloš M (2017) Robust nonlinear regression in enzyme kinetic parameters estimation. *J Chem* 2017:1–12
- Mariani V, Biasini M, Barbato A, Schwede T (2013) IDDT: a local superposition-free score for comparing protein structures and models using distance difference tests. *Bioinformatics* 29:2722–2728
- Mckinnie SMK, Miles ZD, Moore BS (2018) Characterization and biochemical assays of streptomyces vanadiumdependent chloroperoxidases. *Methods Enzymol* 604:405–424
- Messerschmidt A, Wever R (1996) X-ray structure of a vanadium-containing enzyme: chloroperoxidase from the fungus *Curvularia inaequalis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:392–396
- Nishihara K, Kanemori M, Kitagawa M et al (1998) Chaperone co-expression plasmids: differential and synergistic roles of DnaK-DnaJ-GrpE and GroEL-GroES in assisting folding of an allergen of Japanese cedar pollen, Cryj2, in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* 64:1694–1699
- Nishihara K, Kanemori M, Yanagi H, Yura T (2000) Overexpression of trigger factor prevents aggregation of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* 66:884–889
- Ohshiro T, Littlechild J, Garcia-Rodriguez E et al (2004) Modification of halogen specificity of a vanadium-dependent bromoperoxidase. *Protein Sci* 13:1566–1571
- Paysan-Lafosse T, Blum M, Chuguransky S et al (2023) InterPro in 2022. *Nucleic Acids Res* 51:D418–D427
- Plat H, Krenn BE, Wever R (1987) The bromoperoxidase from the lichen *Xanthoria parietina* is a novel vanadium enzyme. *Biochem J* 248:277–279
- Romeo O, Marchetta A, Giosa D et al (2020) Whole genome sequencing and comparative genome analysis of the halotolerant deep sea black yeast *Hortaea werneckii*. *Life* 10:229. <https://doi.org/10.3390/life10100229>
- Roullier C, Guitton Y, Valery M et al (2016) Automated detection of natural halogenated compounds from LC-MS profiles-application to the isolation of bioactive chlorinated compounds from marine-derived fungi. *Anal Chem* 88:9143–9150
- Roy K-M (2000) Sulfones and Sulfoxides. In: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA (ed) *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany 705–717
- Schijndel JWPM, Barnett P, Roelse J et al (1994) The stability and steady-state kinetics of vanadium chloroperoxidase from the fungus *curvularia inaequalis*. *Eur J Biochem* 225:151–157
- Stourac J, Vavra O, Kokkonen P et al (2019) Caver Web 1.0: identification of tunnels and channels in proteins and analysis of ligand transport. *Nucleic Acids Res* 47:W414–W422
- Varadi M, Anyango S, Deshpande M et al (2022) AlphaFold protein structure database: massively expanding the structural coverage of protein-sequence space with high-accuracy models. *Nucleic Acids Res* 50:D439–D444
- Verhaeghe E, Buisson D, Zekri E et al (2008) A colorimetric assay for steady-state analyses of iodo- and bromoperoxidase activities. *Anal Biochem* 379:60–65
- Vilter H (1984) Peroxidases from phaeophyceae: a vanadium(V)-dependent peroxidase from *Ascophyllum nodosum*. *Phytochemistry* 23:1387–1390
- Wever R, Krenn BE, Renirie R (2018) Marine vanadium-dependent haloperoxidases, their isolation, characterization, and application. In: *methods in enzymology*, 1st edn. Elsevier Inc/ 141–201
- Wischang D, Radlow M, Schulz H et al (2012) Molecular cloning, structure, and reactivity of the second bromoperoxidase from *Ascophyllum nodosum*. *Bioorg Chem* 44:25–34
- Younes SHH, Tieves F, Lan D et al (2019) Chemoenzymatic halocyclization of  $\gamma$ ,  $\delta$ -unsaturated carboxylic acids and alcohols. *Chemsuschem* 12:1–6
- Zalar P, Zupančič J, Gostinčar C et al (2019) The extremely halotolerant black yeast *Hortaea werneckii* - a model for intraspecific hybridization in clonal fungi. *IMA Fungus* 10:10. <https://doi.org/10.1186/s43008-019-0007-5>

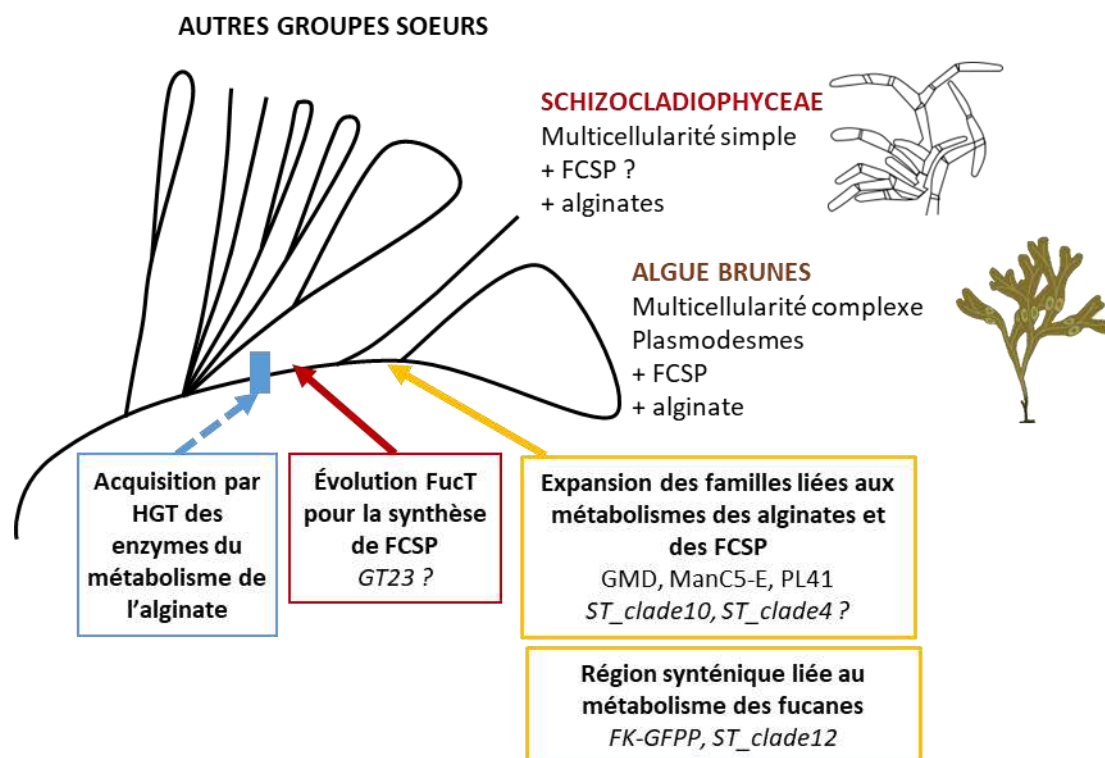
**Publisher's Note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

## **Chapitre VI : Discussion générale et perspectives**

### 1) Sur les traces de l'origine des polysaccharides de la MEC des algues brunes

Dans le chapitre II, nous avons pu retracer l'histoire évolutive associée aux polysaccharides majoritaires de la MEC, essentiellement au sein des Straménopiles. Afin de résumer ces résultats, je propose ici un schéma récapitulatif des différents évènements mis en avant au niveau des génomes d'algues brunes et de leur groupe sœur le plus proche (Figure VI.1). Tout d'abord, nous avons pu montrer au niveau génomique que l'acquisition des voies de biosynthèse et de dégradation de l'alginate seraient apparues avant l'émergence des algues brunes. En effet, les gènes impliqués dans la synthèse et la dégradation de ces enzymes ont pu être mis évidence dans le génome du groupe sœur des Schizocladiphyceae. D'autre part, nous avons pu faire des hypothèses concernant la synthèse des fucanes appuyé par des données *in silico* et de protéomique quant à l'implication de la famille GT23, qui semble présenter un sous clade spécifique aux algues brunes et aussi retrouvé uniquement chez le groupe sœur des Schizocladiphyceae. En revanche, des données de structure chimique des composés de la MEC du groupe sœur des Schizocladiphyceae, notamment de type fucanes, sont manquantes pour pouvoir faire une corrélation entre l'évolution de cette famille et la production de FCSP.

L'expansion du nombre de gènes de certaines familles associées au métabolisme de l'alginate ont été observés chez les algues brunes (GMD, ManC5-E, PL41) par rapport à ce qui est retrouvé notamment dans le génome du groupe sœur des Schizocladiphyceae. Également, nous avons pu mettre en évidence que la région synténique pouvant être impliquée dans la synthèse des FCSP, précédemment identifiée chez les Ectocarpales (Nishitsuji et al., 2019), était présente dans plusieurs ordres des algues brunes. Aussi, nous avons pu constater que l'expansion chez les algues brunes de certains clades de sulfotransférases (ST\_clade4, ST\_clade10), pouvant être impliquées dans la sulfatation des FCSP. L'expansion de ces familles de sulfotransférases refléterait la diversité des monosaccharides à sulfater retrouvés chez les FCSP d'algues brunes. Ainsi, l'évolution des familles liées aux métabolismes des alginates et FCSP serait corrélée avec la mise en place d'une MEC complexe et l'établissement de plasmodesmes, assurant le lien entre les cellules d'un organisme à multicellularité complexe.



**Figure VI. 1. Scénario proposé pour l'évolution de la MEC chez les algues brunes et leurs groupes sœurs.**

## 2) Approches combinées pour l'étude du métabolisme de polysaccharides de la MEC chez les algues brunes

Durant cette thèse, j'ai travaillé à différentes échelles sur l'étude du métabolisme des polysaccharides de la MEC des algues brunes, avec d'une part une étude au niveau génomique (Chapitre II) et d'autre part, sur un enrichissement en appareil de Golgi couplé à des identifications en analyses protéomiques (Chapitre IV). Je propose ici de confronter l'ensemble des données obtenues.

### 2.1) Voie de biosynthèse des FCSP

Je propose de discuter la voie de biosynthèse des fucanes pour laquelle nous avons établi des gènes candidats en prenant en compte les données de protéomiques. Certaines enzymes prédites pour la biosynthèse du GDP-fucose (synthèse *de novo* et voie de sauvetage), sont présentes parmi les protéines identifiées dans mes fractions (GM46D, GFS, FK/GFPP) (Figure VI.1). À noter que les enzymes de synthèse des précurseurs sont également identifiées (MPI, PMM/PMG). Ces enzymes ne sont pas attendues dans les enrichissements menés, en effet, elles sont attendues dans le cytoplasme, elles seraient donc des protéines contaminantes de ces fractions. Ensuite, chez les autres eucaryotes, le transfert de ce GDP-fucose du cytoplasme vers la lumière de l'appareil de Golgi est réalisé par un

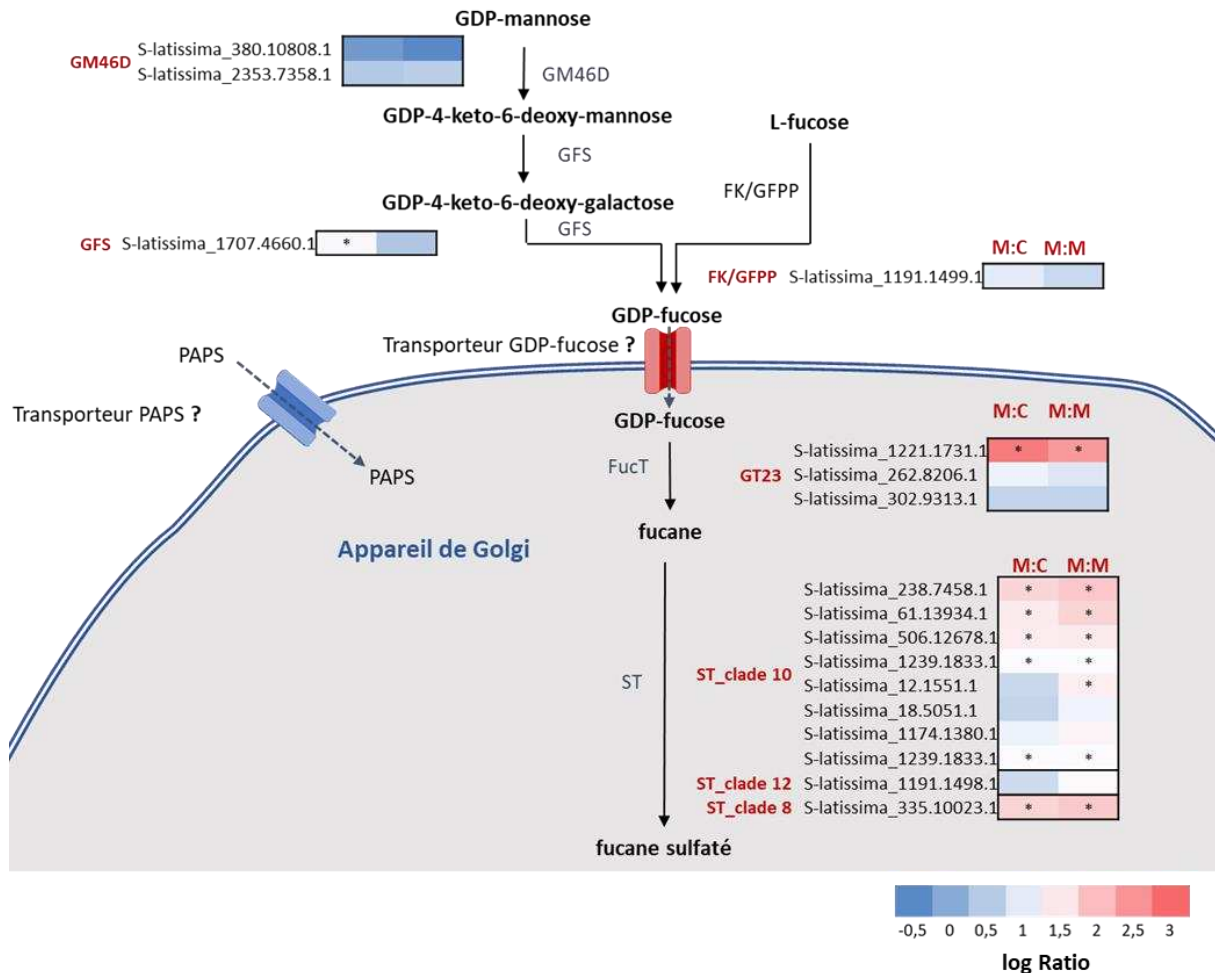
transporteur de GDP-fucose. Dans ce jeu de données, nous ne détectons pas de transporteur de GDP-fucose, tout du moins basé sur l'homologue caractérisé chez la diatomée *P. tricornutum* (Zhang et al., 2019). Une étude plus approfondie menant à l'annotation des transporteurs au niveau des génomes, permettrait de mieux pouvoir établir leur présence parmi les protéines identifiées en analyse protéomique.

Dans le chapitre II, nous avons discuté de différentes familles candidates pour la synthèse des fucanes ce sont les FucT des familles GT74, GT41, GT10 et GT23. En particulier, les GT23 forment une famille candidate forte, c'est une famille multigénique chez les algues brunes et qui présente une homologie modérée par rapport aux séquences caractérisées ( $\alpha$ -(1-6) FucT) (entre 22 % et 35 % d'identité) avec tout de même une conservation du site catalytique lié au donneur (GDP-fucose) et dont les gènes présentent une surexpression qui est corrélée à la mise en place des fucanes au cours de l'embryogénèse chez *Fucus*. Parmi les FucT candidates, les GT23 sont les seules à être retrouvées dans les analyses protéomiques. En effet, trois protéines de cette famille ont été identifiées dans la fraction 'microsomes', dont une (S-latissima\_1221.1731.1) est significativement enrichie dans cette fraction par rapport aux autres (Figure VI.1). Nous avons vu, dans le Chapitre IV, qu'il y avait une tendance d'enrichissement des protéines associées au compartiment Golgien dans la fraction 'microsomes'. L'identification de cette famille dans la fraction microsomale, suggère sa localisation au niveau de l'appareil de Golgi, comme c'est le cas pour des enzymes de cette famille chez d'autres eucaryotes (Kawamoto et al., 2011). De plus, étant donné que la synthèse des fucanes est attendue au niveau de l'appareil de Golgi, la détection prononcée de GT23 au niveau de l'appareil de Golgi, renforce l'hypothèse de leurs implications dans la biosynthèse des fucanes ou plus largement des FCSP chez les algues brunes. Les données de protéomique sont donc cohérentes avec l'hypothèse faite à partir des données génomiques et transcriptomiques (Chapitre II).

Une autre étape importante dans la synthèse des fucanes chez les algues brunes est leur sulfatation. Cette étape nécessite le transport de sulfates au sein du compartiment Golgien sous forme de donneur de sulfate (3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate, PAPS) à l'aide d'un transporteur, une telle protéine n'a pas été identifiée dans notre jeu de données. Par ailleurs, nous avons précédemment établi des enzymes candidates pour la sulfatation des FCSP chez les algues brunes en se basant sur leur histoire évolutive, localisation génomique (région synténique) ou données transcriptomiques (chapitre II). Bien que nous n'excluons pas que d'autres clades de sulfotransférases puissent être impliqués dans la synthèse des fucanes/FCSP, les clades retenus comme candidats les plus favorables, sont les clades 10, 8, et 12. Dans la fraction microsomale, j'ai pu identifier 7 membres du clade 10, 2 membres du clade 8 et un membre du clade 12. Parmi les protéines identifiées, 5 séquences du clade 10 et 2



séquences du clade 8 sont significativement plus abondantes dans la fraction 'microsomes' par rapport aux fractions 'chloroplastes' et 'mitochondries' (Figure VI.1). Ce résultat renforce l'hypothèse que ces enzymes seraient localisées aux niveaux de l'appareil de Golgi et qu'elles pourraient être impliquées dans la sulfatation des FSCP.



**Figure VI. 2. Représentation putative au niveau subcellulaire de la voie de biosynthèse des fucanes sulfatés.** Les données d'enrichissement affichées sont obtenues en comparant les fractions 'microsomes/appareil de Golgi' par rapport aux fractions 'chloroplastes' (M:C) et 'microsomes/appareil de Golgi' par rapport aux fractions 'mitochondries' (M:M). Les \* correspondent à une P-valeur < 0,05 indiquant un enrichissement ou une diminution significative dans la fraction microsomale par rapport aux autres fractions. PAPS, Adénosine 3'-phosphate 5'-phosphosulfate.

## 2.2) Voie de biosynthèse des alginate

Contrairement aux FCSP, les alginate n'ont pas été détectés au niveau de l'appareil de Golgi. En dehors de la MEC, ils ont été détectés au niveau de vésicules osmiophiles proches de la membrane plasmique (Nagasato et al., 2010). Le rôle de ces vésicules n'est pas clairement établi. Une hypothèse est que la synthèse de l'alginate pourrait avoir lieu dans ces vésicules avant leur transport et externalisation au niveau de la membrane plasmique, puis intégration de l'alginate dans la MEC.

Elles pourraient ainsi héberger les premières étapes de synthèse sous forme de mannuronane, suivi d'un remodelage de cet alginat par des ManC5-E de la MEC. L'autre hypothèse est que la synthèse de l'alginat se déroulerait à la membrane plasmique et serait directement intégré à la MEC.

Au vu de ces hypothèses, les enzymes liées au métabolisme des alginates ne sont pas prédites pour être localisées au niveau de l'appareil de Golgi et donc ne sont pas attendues dans la fraction 'microsomes', analysées en protéomique (Chapitre IV). Malgré tout, dans notre jeu de données, nous avons pu identifier des GT2 pouvant hypothétiquement être impliquées dans la synthèse de l'alginat, et ceci de manière plus abondante dans la fraction 'microsomes' que par rapport aux fractions 'chloroplastes' et 'mitochondries'. L'alginat est un polymère très abondant chez les laminaires, qui peut nécessiter le recrutement d'un nombre important d'enzymes de synthèse. On ne peut donc pas exclure la contamination de nos fractions par de telles enzymes. Également, il est possible que ces enzymes soient présentes de manière transitoire dans le système sécrétoire/appareil de Golgi avant d'être conduites à la membrane plasmique, ce qui pourrait expliquer leurs présences dans le jeu de données. Aussi, la présence de vésicules osmiophiles est possible dans cette fraction d'appareil de Golgi non purifié. Par ailleurs, une contamination de la fraction 'microsomes' avec de la membrane plasmique n'est pas exclue.

Après leur synthèse, les alginates peuvent être remodelés par des ManC5-E au niveau de la MEC. De plus, nous avons vu que les algues brunes possèdent aussi une voie de dégradation de l'alginat avec l'action de PL41, DEHU-réductase et potentiellement l'implication de GH88. Au-delà de leur activité d'alginat lyases, les PL41 n'ont pas de rôle clairement établi au sein des algues brunes. Elles pourraient éventuellement cliver les alginates pour permettre l'accroissement pariétal lors de la croissance cellulaire. Elles pourraient également influencer sur les propriétés rhéologiques des alginates de la MEC par clivage des polysaccharides, en collaboration avec l'activité d'épimérisation des ManC5-E. Tout comme les ManC5-E, de par leurs rôles prédits et leur signal d'adressage, les PL41 sont probablement localisées au niveau de la MEC. Dans le jeu de données de protéomique, 8 séquences de ManC5-E ont été identifiées dont une seule (S-latissima\_650.14283.1) semble être plus abondante dans la fraction 'microsomes' par rapport aux autres fractions. Quatre séquences de PL41 dont 3 (S-latissima\_302.9312.1, S-latissima\_540.13141.1, S-latissima\_195.5676.1) apparaissent plus abondantes dans la fraction 'microsomes' par rapport aux autres fractions. Parmi les enzymes du métabolisme de l'alginat, une séquence de GH88 a été détectée, contrairement à la séquence identifiée comme DEHU-réductase. La présence de ces protéines liées au remodelage et à la dégradation de l'alginat dans la fraction 'microsomes' est possiblement due à une contamination des enzymes de la MEC en lien avec la part importante d'alginat chez les laminaires. L'identification des

protéines spécifiquement associées à la MEC et à la membrane plasmique pourraient permettre de croiser ces résultats. Pour conclure, il est difficile d'aller plus loin dans l'établissement de la localisation et de l'implication précise de ces enzymes dans la synthèse de l'alginate.

### 3) Perspectives pour l'étude du métabolisme des alginates et des FCSP

L'approche intégrée avec d'une part l'étude des génomes, et l'analyse protéomique d'autre part, a pu permettre d'établir des candidats pour la synthèse des FCSP. En particulier, nous avons fait des propositions pour des activités FucT, or parmi les FCSP, les fucoïdanes contiennent une diversité de monosaccharides. Des études phylogénétiques et d'études des sites catalytiques pourraient être menées pour d'autres familles candidates en priorisant les familles pour lesquelles nous avons pu identifier des candidats dans les données de protéomiques, par exemple les GT47 qui pourraient avoir des activités galactosyltransférase, xylosyltransférase ou glucuronyltransférases pour la synthèse de FCSP.

La caractérisation biochimique des candidats permettra de valider ces hypothèses. Nous avons pu voir que la production de GT recombinantes (Chapitre V) était un challenge. L'expression de ces protéines et la caractérisation nécessite de mettre en œuvre des moyens conséquents (tests de plusieurs systèmes d'expression, banque d'accepteurs, etc.). Une difficulté supplémentaire s'ajoute lors ce qu'il s'agit d'exprimer de manière recombinante des GT entièrement membranaires, comme c'est le cas pour les enzymes candidates pour la synthèse des alginates. De plus, les protéines algales peuvent aussi être difficiles à exprimer de manière active (Graisillier et al., 2010). En parallèle, il convient d'envisager d'autres approches pour l'étude des enzymes du métabolisme des alginates et de FCSP. Cela pourrait être le cas avec la récente mise au point de l'outil CRISPR-Cas9 chez les algues brunes *Ectocarpus* (Badis et al., 2021) et *Saccharina japonica* (Shen et al., 2023), qui pourrait permettre de réaliser des études fonctionnelles.

L'identification d'activités biochimiques associées aux enzymes, constitue une base pour la compréhension des mécanismes de biosynthèse/dégradation des composés glycosylés. Cependant, l'organisation de ces mécanismes de biosynthèse/dégradation peut être complexe et nécessiter l'action de plusieurs enzymes de façon séquentielle ou simultanée (Atmodjo et al., 2013 ; Hoffmann et al., 2021). Au vu de la diversité des polysaccharides synthétisés chez les algues brunes, on peut s'attendre à une organisation sophistiquée des mécanismes de synthèse et de régulation de celle-ci. L'étude de ces mécanismes constitue des perspectives à long terme pour la compréhension globale de la dynamique et l'organisation du métabolisme impliqué dans la biosynthèse des polysaccharides de la MEC des algues brunes. Ceci permettra d'aborder des études fonctionnelles du rôle de la MEC dans

les mécanismes développementaux. Par ailleurs, les alginates et les FCSP présentent des intérêts en dehors de la biologie des algues, par exemple les FCSP ont des propriétés biomédicales (Deniaud-Bouët et al., 2017). Cela implique l'intérêt d'aller vers des études pour la caractérisation fine des structures chimiques d'une part, et vers la compréhension de leurs mécanismes de biosynthèse.

Les résultats obtenus au cours de cette thèse ont permis de progresser dans la connaissance des voies métaboliques des polysaccharides de la MEC chez les algues brunes. Ils constituent une base solide pour les futures recherches de validations fonctionnelles des enzymes associées, et à plus long terme vers la compréhension du métabolisme des polysaccharides de la MEC chez les algues brunes et de sa régulation.

## **Bibliographie**

- Akiva, İ., & Birgül İyison, N. (2018). Identification of IFITM3 and MGAT1 as novel interaction partners of BRI3 by yeast two-hybrid screening. *Turkish Journal of Biology = Turk Biyoloji Dergisi*, 42(6), 463-470.
- Ali, M. F., Chachadi, V. B., Petrosyan, A., & Cheng, P.-W. (2012). Golgi Phosphoprotein 3 Determines Cell Binding Properties under Dynamic Flow by Controlling Golgi Localization of Core 2 N-Acetylglucosaminyltransferase 1 \*. *Journal of Biological Chemistry*, 287(47), 39564-39577.
- Almeida, A. M., Santos, M., Villalobos, E., Araújo, S. S., van Dijck, P., Leyman, B., Cardoso, L. A., Santos, D., Fevereiro, P. S., & Torné, J. M. (2007). Immunogold localization of trehalose-6-phosphate synthase in leaf segments of wild-type and transgenic tobacco plants expressing the AtTPS1 gene from *Arabidopsis thaliana*. *Protoplasma*, 230(1-2), 41-49.
- Amos, R. A., & Mohnen, D. (2019). Critical Review of Plant Cell Wall Matrix Polysaccharide Glycosyltransferase Activities Verified by Heterologous Protein Expression. *Frontiers in Plant Science*, 10.
- Amos, R. A., Pattathil, S., Yang, J.-Y., Atmodjo, M. A., Urbanowicz, B. R., Moremen, K. W., & Mohnen, D. (2018). A two-phase model for the non-processive biosynthesis of homogalacturonan polysaccharides by the GAUT1:GAUT7 complex. *The Journal of Biological Chemistry*, 293(49), 19047-19063.
- Andrade, L. R., Leal, R. N., Nosedá, M., Duarte, M. E. R., Pereira, M. S., Mourão, P. A. S., Farina, M., & 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.
- Atmodjo, M. A., Hao, Z., & Mohnen, D. (2013). Evolving views of pectin biosynthesis. *Annual Review of Plant Biology*, 64, 747-779.
- Awai, K., Maréchal, E., Block, M. A., Brun, D., Masuda, T., Shimada, H., Takamiya, K., Ohta, H., & Joyard, J. (2001). Two types of MGDG synthase genes, found widely in both 16:3 and 18:3 plants, differentially mediate galactolipid syntheses in photosynthetic and nonphotosynthetic tissues in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(19), 10960-10965.
- Badis, Y., Scornet, D., Harada, M., Caillard, C., Godfroy, O., Raphalen, M., Gachon, C. M. M., Coelho, S. M., Motomura, T., Nagasato, C., & Cock, J. M. (2021). Targeted CRISPR-Cas9-based gene knockouts in the model brown alga *Ectocarpus*. *New Phytologist*, 231(5), 2077-2091.
- Baladrón, V., Ufano, S., Dueñas, E., Martín-Cuadrado, A. B., del Rey, F., & Vázquez de Aldana, C. R. (2002). Eng1p, an Endo-1,3-β-Glucanase Localized at the Daughter Side of the Septum, Is Involved in Cell Separation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryotic Cell*, 1(5), 774-786.
- Barbeyron, T., Brillet-Guéguen, L., Carré, W., Carrière, C., Caron, C., Czjzek, M., Hoebeke, M., & Michel, G. (2016). Matching the Diversity of Sulfated Biomolecules : Creation of a Classification Database for Sulfatases Reflecting Their Substrate Specificity. *PLoS One*, 11(10), e0164846.
- Basu, D., Liang, Y., Liu, X., Himmeldirk, K., Faik, A., Kieliszewski, M., Held, M., & Showalter, A. M. (2013). Functional identification of a hydroxyproline-o-galactosyltransferase specific for arabinogalactan protein biosynthesis in *Arabidopsis*. *The Journal of Biological Chemistry*, 288(14), 10132-10143.
- Berger, F., Taylor, A., & Brownlee, C. (1994). Cell Fate Determination by the Cell Wall in Early Fucus Development. *Science*, 263(5152), 1421-1423.

- Bernaerts, T. M. M., Gheysen, L., Kyomugasho, C., Jamsazzadeh Kermani, Z., Vandionant, S., Foubert, I., Hendrickx, M. E., & Van Loey, A. M. (2018). Comparison of microalgal biomasses as functional food ingredients : Focus on the composition of cell wall related polysaccharides. *Algal Research*, *32*, 150-161.
- Besson, V., Neuburger, M., Rebeille, F., & Douce, R. (1995). Evidence for three serine hydroxymethyltransferases in green leaf cells. Purification and characterization of the mitochondrial and chloroplastic isoforms. *Plant Physiology and Biochemistry*, *33*(6), 665-673.
- Bethke, G., Grundman, R. E., Sreekanta, S., Truman, W., Katagiri, F., & Glazebrook, J. (2014). *Arabidopsis* PECTIN METHYLESTERASEs contribute to immunity against *Pseudomonas syringae*. *Plant Physiology*, *164*(2), 1093-1107.
- Birkemeyer, C., Lemesheva, V., Billig, S., & Tarakhovskaya, E. (2020). Composition of Intracellular and Cell Wall-Bound Phlorotannin Fractions in Furoid Algae Indicates Specific Functions of These Metabolites Dependent on the Chemical Structure. *Metabolites*, *10*(9), Article 9.
- Bisgrove, S. R., & Kropf, D. L. (2001). Cell wall deposition during morphogenesis in furoid algae. *Planta*, *212*(5-6), 648-658.
- Bloemendal, S., & Kück, U. (2013). Cell-to-cell communication in plants, animals, and fungi : A comparative review. *Die Naturwissenschaften*, *100*(1), 3-19.
- Bodył, A., Stiller, J. W., & Mackiewicz, P. (2009). Chromalveolate plastids : Direct descent or multiple endosymbioses? *Trends in Ecology & Evolution*, *24*(3), 119-121.
- Boevink, P., Oparka, K., Cruz, S. S., Martin, B., Betteridge, A., & Hawes, C. (1998). Stacks on tracks : The plant Golgi apparatus traffics on an actin/ER network†. *The Plant Journal*, *15*(3), 441-447.
- Boruah, B. M., Kadirvelraj, R., Liu, L., Ramiah, A., Li, C., Zong, G., Bosman, G. P., Yang, J.-Y., Wang, L.-X., Boons, G.-J., Wood, Z. A., & Moremen, K. W. (2020). Characterizing human  $\alpha$ -1,6-fucosyltransferase (FUT8) substrate specificity and structural similarities with related fucosyltransferases. *Journal of Biological Chemistry*, *295*(50), 17027-17045.
- Both, P., Sobczak, L., Breton, C., Hann, S., Nöbauer, K., Paschinger, K., Kozmon, S., Mucha, J., & Wilson, I. (2011). Distantly related plant and nematode core 1,3-fucosyltransferases display similar trends in structure-function relationships. *Glycobiology*, *21*, 1401-1415.
- Bouyssié, D., Hesse, A.-M., Mouton-Barbosa, E., Rompais, M., Macron, C., Carapito, C., Gonzalez de Peredo, A., Couté, Y., Dupierris, V., Burel, A., Menetrey, J.-P., Kalaitzakis, A., Poisat, J., Romdhani, A., Burlet-Schiltz, O., Cianférani, S., Garin, J., & Bruley, C. (2020). Proline : An efficient and user-friendly software suite for large-scale proteomics. *Bioinformatics (Oxford, England)*, *36*(10), 3148-3155.
- Brawley, S. H., & Quatrano, R. S. (1979). Sulfation of fucoidin in *Fucus* embryos. IV. Autoradiographic investigations of fucoidin sulfation and secretion during differentiation and the effect of cytochalasin treatment. *Developmental Biology*, *73*(2), 193-205.
- Breton, C., Oriol, R., & Imberty, A. (1998). Conserved structural features in eukaryotic and prokaryotic fucosyltransferases. *Glycobiology*, *8*(1), 87-94.
- Bringloe, T. T., Starko, S., Wade, R. M., Vieira, C., Kawai, H., de Clerck, O., Cock, J. M., Coelho, S. M., Destombe, C., Valero, M., Neiva, J., Pearson, G. A., Faugeron, S., Serrão, E. A., & Verbruggen, H. (2020). Phylogeny and Evolution of the Brown Algae. *Critical Reviews in Plant Sciences*, *39*, 281-321.

- Brockington, M., Torelli, S., Prandini, P., Boito, C., Dolatshad, N. F., Longman, C., Brown, S. C., & Muntoni, F. (2005). Localization and functional analysis of the LARGE family of glycosyltransferases : Significance for muscular dystrophy. *Human Molecular Genetics*, *14*(5), 657-665.
- Bruhn, A., Janicek, T., Manns, D., Nielsen, M. M., Balsby, T. J. S., Meyer, A. S., Rasmussen, M. B., Hou, X., Saake, B., Göke, C., & Bjerre, A. B. (2017). Crude fucoidan content in two North Atlantic kelp species, *Saccharina latissima* and *Laminaria digitata*—Seasonal variation and impact of environmental factors. *Journal of Applied Phycology*, *29*(6), 3121-3137.
- Bruinsma, J. (1963). The quantitative analysis of chlorophylls a and b in plant extracts. *Photochemistry and Photobiology*, *2*(2), 241-249.
- Burki, F., Kaplan, M., Tikhonenkov, D. V., Zlatogursky, V., Minh, B. Q., Radaykina, L. V., Smirnov, A., Mylnikov, A. P., & Keeling, P. J. (2016). Untangling the early diversification of eukaryotes : A phylogenomic study of the evolutionary origins of Centrohelida, Haptophyta and Cryptista. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, *283*(1823), 20152802.
- Callow, M. E., Coughlan, S. J., & Evans, L. V. (1978). The role of Golgi bodies in polysaccharide sulphation in *Fucus zygotes*. *Journal of Cell Science*, *32*, 337-356.
- Cappellaro, C., Mrsa, V., & Tanner, W. (1998). New Potential Cell Wall Glucanases of *Saccharomyces cerevisiae* and Their Involvement in Mating. *Journal of Bacteriology*, *180*(19), 5030-5037.
- Cardelli, J. A., Golumbeski, G. S., & Dimond, R. L. (1986). Lysosomal enzymes in Dictyostelium discoideum are transported to lysosomes at distinctly different rates. *The Journal of Cell Biology*, *102*(4), 1264-1270.
- Charrier, B., Coelho, S. M., Le Bail, A., Tonon, T., Michel, G., Potin, P., Kloareg, B., Boyen, C., Peters, A. F., & Cock, J. M. (2008). Development and physiology of the brown alga *Ectocarpus siliculosus*: Two centuries of research. *New Phytologist*, *177*(2), 319-332.
- Chen, G., Shen, J., Zhang, Y., Shi, F., Mei, X., Xue, C., & Chang, Y. (2023). Sulfated fucan could serve as a species marker of sea cucumber with endo-1,3-fucanase as the essential tool. *Carbohydrate Polymers*, *312*, 120817.
- Chen, Y. J., Wing, D. R., Guile, G. R., Dwek, R. A., Harvey, D. J., & Zamze, S. (1998). Neutral N-glycans in adult rat brain tissue—Complete characterisation reveals fucosylated hybrid and complex structures. *European Journal of Biochemistry*, *251*(3), 691-703.
- Chi, E.-S., Henry, E. C., Kawai, H., & Okuda, K. (1999). Immunogold-labeling analysis of alginate distributions in the cell walls of chromophyte algae. *Phycological Research*, *47*(1), 53-60.
- Chi, S., Liu, T., Wang, X., Wang, R., Wang, S., Wang, G., Shan, G., & Liu, C. (2018). Functional genomics analysis reveals the biosynthesis pathways of important cellular components (alginate and fucoidan) of *Saccharina*. *Current Genetics*, *64*(1), 259-273.
- Cicéron, F., Rocha, J., Kousar, S., Hansen, S. F., Chazalet, V., Gillon, E., Breton, C., & Lerouxel, O. (2016). Expression, purification and biochemical characterization of AtFUT1, a xyloglucan-specific fucosyltransferase from *Arabidopsis thaliana*. *Biochimie*, *128-129*, 183-192.
- Cipollo, J. F., Trimble, R. B., Chi, J. H., Yan, Q., & Dean, N. (2001). The yeast ALG11 gene specifies addition of the terminal alpha 1,2-Man to the Man5GlcNAc2-PP-dolichol N-glycosylation intermediate formed on the cytosolic side of the endoplasmic reticulum. *The Journal of Biological Chemistry*, *276*(24), 21828-21840.



- Cochereau, B., Le Strat, Y., Ji, Q., Pawtowski, A., Delage, L., Weill, A., Mazéas, L., Hervé, C., Burgaud, G., Gunde-Cimerman, N., Pouchus, Y. F., Demont-Caulet, N., Roullier, C., & Meslet-Cladiere, L. (2023). Heterologous Expression and Biochemical Characterization of a New Chloroperoxidase Isolated from the Deep-Sea Hydrothermal Vent Black Yeast *Hortaea werneckii* UBOCC-A-208029. *Marine Biotechnology*, 25(4), 519-536.
- Cock, J. M., & Collén, J. (2015). Independent Emergence of Complex Multicellularity in the Brown and Red Algae. In I. Ruiz-Trillo & A. M. Nedelcu (Éds.), *Evolutionary Transitions to Multicellular Life : Principles and mechanisms* (p. 335-361). Springer Netherlands.
- Cock, J. M., Sterck, L., Rouzé, P., Scornet, D., Allen, A. E., Amoutzias, G., Anthouard, V., Artiguenave, F., Aury, J.-M., Badger, J. H., Beszteri, B., Billiau, K., Bonnet, E., Bothwell, J. H., Bowler, C., Boyen, C., Brownlee, C., Carrano, C. J., Charrier, B., ... Wincker, P. (2010). The *Ectocarpus* genome and the independent evolution of multicellularity in brown algae. *Nature*, 465(7298), 617-621.
- Coelho, S. M., Peters, A. F., Müller, D., & Cock, J. M. (2020). *Ectocarpus* : An evo-devo model for the brown algae. *EvoDevo*, 11(1), 19.
- Colley, K. J., Varki, A., Haltiwanger, R. S., & Kinoshita, T. (2022). Cellular Organization of Glycosylation. In A. Varki, R. D. Cummings, J. D. Esko, P. Stanley, G. W. Hart, M. Aebi, D. Mohnen, T. Kinoshita, N. H. Packer, J. H. Prestegard, R. L. Schnaar, & P. H. Seeberger (Éds.), *Essentials of Glycobiology* (4th éd.). Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Crowell, E., Gonneau, M., Stierhof, Y.-D., Höfte, H., & Vernhettes, S. (2010). Regulated trafficking of cellulose synthases. *Current Opinion in Plant Biology*, 13(6), 700-705.
- Dalton, A. J., & Felix, M. D. (1954). Cytologic and cytochemical characteristics of the Golgi substance of epithelial cells of the epididymis—in situ, in homogenates and after isolation. *American Journal of Anatomy*, 94(2), 171-207.
- Davis, D., Wilkop, T. E., & Drakakaki, G. (2016). The Golgi apparatus. In W. V. Dashek & G. S. Miglani (Éds.), *Plant Cells and their Organelles* (p. 61-87). John Wiley & Sons, Ltd.
- 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., & 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(6), 1203-1216.
- Derelle, R., López-García, P., Timpano, H., & Moreira, D. (2016). A Phylogenomic Framework to Study the Diversity and Evolution of Stramenopiles (=Heterokonts). *Molecular Biology and Evolution*, 33(11), 2890-2898.
- Donaldson, J. G., & Honda, A. (2005). Localization and function of Arf family GTPases. *Biochemical Society Transactions*, 33(Pt 4), 639-642.
- Dörmann, P., Balbo, I., & Benning, C. (1999). Arabidopsis galactolipid biosynthesis and lipid trafficking mediated by DGD1. *Science (New York, N.Y.)*, 284(5423), 2181-2184.
- Driouich, A., Follet-Gueye, M.-L., Bernard, S., Kousar, S., Chevalier, L., Vicré, M., & Lerouxel, O. (2012). Golgi-Mediated Synthesis and Secretion of Matrix Polysaccharides of the Primary Cell Wall of Higher Plants. *Frontiers in Plant Science*, 3.
- Dröscher, A. (1998). Camillo Golgi and the discovery of the Golgi apparatus. *Histochemistry and Cell Biology*, 109(5), 425-430.

- Drula, E., Garron, M.-L., Dogan, S., Lombard, V., Henrissat, B., & Terrapon, N. (2022). The carbohydrate-active enzyme database : Functions and literature. *Nucleic Acids Research*, *50*(D1), D571-D577.
- Dupuy, F., Petit, J. M., Mollicone, R., Oriol, R., Julien, R., & Maftah, A. (1999). A single amino acid in the hypervariable stem domain of vertebrate alpha1,3/1,4-fucosyltransferases determines the type 1/type 2 transfer. Characterization of acceptor substrate specificity of the lewis enzyme by site-directed mutagenesis. *The Journal of Biological Chemistry*, *274*(18), 12257-12262.
- Echard, A., Jollivet, F., Martinez, O., Lacapère, J.-J., Rousselet, A., Janoueix-Lerosey, I., & Goud, B. (1998). Interaction of a Golgi-Associated Kinesin-Like Protein with Rab6. *Science*, *279*(5350), 580-585.
- Egertson, J. D., Kuehn, A., Merrihew, G. E., Bateman, N. W., MacLean, B. X., Ting, Y. S., Canterbury, J. D., Marsh, D. M., Kellmann, M., Zabrouskov, V., Wu, C. C., & MacCoss, M. J. (2013). Multiplexed MS/MS for improved data-independent acquisition. *Nature Methods*, *10*(8), 744-746.
- Evans, L. V., & Callow, M. E. (1974). Polysaccharide sulphation in *Laminaria*. *Planta*, *117*(1), 93-95.
- Evans, L. V., & Coughlan, S. (1978). Isolation and Characterization of Golgi Bodies from Vegetative Tissue of the Brown Alga *Fucus serratus*. *Journal of Experimental Botany*, *29*(108), 55-68.
- Evans, L. V., Simpson, M., & Callow, M. E. (1973). Sulphated polysaccharide synthesis in brown algae. *Planta*, *110*(3), 237-252.
- Fang, L., Ishikawa, T., Rennie, E. A., Murawska, G. M., Lao, J., Yan, J., Tsai, A. Y.-L., Baidoo, E. E. K., Xu, J., Keasling, J. D., Demura, T., Kawai-Yamada, M., Scheller, H. V., & Mortimer, J. C. (2016). Loss of Inositol Phosphorylceramide Sphingolipid Mannosylation Induces Plant Immune Responses and Reduces Cellulose Content in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, *28*(12), 2991-3004.
- Fermin, D., Basrur, V., Yocum, A. K., & Nesvizhskii, A. I. (2011). Abacus : A computational tool for extracting and pre-processing spectral count data for label-free quantitative proteomic analysis. *Proteomics*, *11*(7), 1340-1345.
- Fischl, R., Bertelsen, K., Gaillard, F., Coelho, S., Michel, G., Klinger, M., Boyen, C., Czjzek, M., & Hervé, C. (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.
- Fletcher, H. R., Biller, P., Ross, A. B., & Adams, J. M. M. (2017). The seasonal variation of fucoidan within three species of brown macroalgae. *Algal Research*, *22*, 79-86.
- Forsmark, A., Rossi, G., Wadskog, I., Brennwald, P., Warringer, J., & Adler, L. (2011). Quantitative Proteomics of Yeast Post-Golgi Vesicles Reveals a Discriminating Role for Sro7p in Protein Secretion. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, *12*(6), 740-753.
- Frank, C. G., Eyaid, W., Berger, E. G., Aebi, M., Grubenmann, C. E., & Hennet, T. (2004). Identification and Functional Analysis of a Defect in the Human ALG9 Gene : Definition of Congenital Disorder of Glycosylation Type IL. *The American Journal of Human Genetics*, *75*(1), 146-150.
- Freeze, H. H., Chong, J. X., Bamshad, M. J., & Ng, B. G. (2014). Solving glycosylation disorders : Fundamental approaches reveal complicated pathways. *American Journal of Human Genetics*, *94*(2), 161-175.
- Frison, M., Parrou, J. L., Guillaumot, D., Masquelier, D., François, J., Chaumont, F., & Batoko, H. (2007). The *Arabidopsis thaliana* trehalase is a plasma membrane-bound enzyme with extracellular activity. *FEBS Letters*, *581*(21), 4010-4016.

- García-García, A., Ceballos-Laita, L., Serna, S., Artschwager, R., Reichardt, N. C., Corzana, F., & Hurtado-Guerrero, R. (2020). Structural basis for substrate specificity and catalysis of  $\alpha$ 1,6-fucosyltransferase. *Nature Communications*, *11*(1), Article 1.
- García-Ríos, V., Ríos-Leal, E., Robledo, D., & Freile-Pelegrin, Y. (2012). Polysaccharides composition from tropical brown seaweeds. *Phycological Research*, *60*(4), 305-315.
- Geshi, N., Johansen, J. N., Dilokpimol, A., Rolland, A., Belcram, K., Verger, S., Kotake, T., Tsumuraya, Y., Kaneko, S., Tryfona, T., Dupree, P., Scheller, H. V., Höfte, H., & Mouille, G. (2013). A galactosyltransferase acting on arabinogalactan protein glycans is essential for embryo development in *Arabidopsis*. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, *76*(1), 128-137.
- Gheorghita, A. A., Wolfram, F., Whitfield, G. B., Jacobs, H. M., Pfoh, R., Wong, S. S. Y., Guitor, A. K., Goodyear, M. C., Berezuk, A. M., Khursigara, C. M., Parsek, M. R., & Howell, P. L. (2022). The *Pseudomonas aeruginosa* homeostasis enzyme AlgL clears the periplasmic space of accumulated alginate during polymer biosynthesis. *Journal of Biological Chemistry*, *298*(2).
- Gilchrist, A., Au, C. E., Hiding, J., Bell, A. W., Fernandez-Rodriguez, J., Lesimple, S., Nagaya, H., Roy, L., Gosline, S. J. C., Hallett, M., Paiement, J., Kearney, R. E., Nilsson, T., & Bergeron, J. J. M. (2006). Quantitative Proteomics Analysis of the Secretory Pathway. *Cell*, *127*(6), 1265-1281.
- Gillott, M. A., Triemer, R. E., & Vasconcelos, A. C. (1980). Isolation of dictyosomes from *Euglena gracilis*. *Protoplasma*, *105*(1), 45-51.
- Gow, N. A. R., Latge, J.-P., & Munro, C. A. (2017). The Fungal Cell Wall : Structure, Biosynthesis, and Function. *Microbiology Spectrum*, *5*(3).
- Grandjean, C. (2022). Signaling oligogalacturonides and transduction signal in cell adhesion [These de doctorat, Amiens]. <https://www.theses.fr/2022AMIE0032>
- Groisillier, A., Hervé, C., Jeudy, A., Rebuffet, E., Pluchon, P. F., Chevlot, Y., Flament, D., Geslin, C., Morgado, I. M., Power, D., Branno, M., Moreau, H., Michel, G., Boyen, C., & Czjzek, M. (2010). MARINE-EXPRESS : Taking advantage of high throughput cloning and expression strategies for the post-genomic analysis of marine organisms. *Microbial Cell Factories*, *9*(1), 45.
- Gschloessl, B., Guermeur, Y., & Cock, J. M. (2008). HECTAR : A method to predict subcellular targeting in heterokonts. *BMC Bioinformatics*, *9*(1), 393.
- Guiry, M. D., & Guiry, G. M. (2020). *Algaebase* ([http://www. Algaebase. Org](http://www.Algaebase.Org)), *World-wide electronic publication, National University of Ireland. Galway*.
- Harholt, J., Jensen, J. K., Verhertbruggen, Y., Sjøgaard, C., Bernard, S., Nafisi, M., Poulsen, C. P., Geshi, N., Sakuragi, Y., Driouch, A., Knox, J. P., & Scheller, H. V. (2012). ARAD proteins associated with pectic Arabinan biosynthesis form complexes when transiently overexpressed in planta. *Planta*, *236*(1), 115-128.
- Hashimoto, W., Kobayashi, E., Nankai, H., Sato, N., Miya, T., Kawai, S., & Murata, K. (1999). Unsaturated Glucuronyl Hydrolase of *Bacillus* sp. GL1 : Novel Enzyme Prerequisite for Metabolism of Unsaturated Oligosaccharides Produced by Polysaccharide Lyases. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *368*(2), 367-374.
- Hassinen, A., Rivinoja, A., Kauppila, A., & Kellokumpu, S. (2010). Golgi N-Glycosyltransferases Form Both Homo- and Heterodimeric Enzyme Complexes in Live Cells. *The Journal of Biological Chemistry*, *285*(23), 17771-17777.
- Haug, A., Larsen, B., & Smidsrød, O. (1974). Uronic acid sequence in alginate from different sources. *Carbohydrate Research*, *32*(2), 217-225.

- Heesen, S., Lehle, L., Weissmann, A., & Aebi, M. (1994). Isolation of the ALG5 locus encoding the UDP-glucose:dolichyl-phosphate glucosyltransferase from *Saccharomyces cerevisiae*. *European Journal of Biochemistry*, 224(1), 71-79.
- Hervé, C., Siméon, A., Jam, M., Cassin, A., Johnson, K. L., Salmeán, A. A., Willats, W. G. T., Doblin, M. S., 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(4), 1428-1441.
- Hobbs, E. E. M., Gloster, T. M., & Pritchard, L. (2022). cazy\_webcrawler : Local compilation and interrogation of comprehensive CAZyme datasets (p. 2022.12.02.518825). bioRxiv.
- Hoffmann, N., King, S., Samuels, A. L., & McFarlane, H. E. (2021). Subcellular coordination of plant cell wall synthesis. *Developmental Cell*, 56(7), 933-948.
- Huang, Y., Li, C. Y., Qi, Y., Park, S., & Gibson, S. I. (2014). SIS8, a putative mitogen-activated protein kinase kinase kinase, regulates sugar-resistant seedling development in *Arabidopsis*. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, 77(4), 577-588.
- Huerta-Cepas, J., Szklarczyk, D., Heller, D., Hernández-Plaza, A., Forslund, S. K., Cook, H., Mende, D. R., Letunic, I., Rattei, T., Jensen, L. J., von Mering, C., & Bork, P. (2019). eggNOG 5.0 : A hierarchical, functionally and phylogenetically annotated orthology resource based on 5090 organisms and 2502 viruses. *Nucleic Acids Research*, 47(D1), D309-D314.
- Huh, W.-K., Falvo, J. V., Gerke, L. C., Carroll, A. S., Howson, R. W., Weissman, J. S., & O'Shea, E. K. (2003). Global analysis of protein localization in budding yeast. *Nature*, 425(6959), Article 6959.
- Huo, S., Wang, H., Chen, J., Hu, X., Zan, X., Zhang, C., Qian, J., Zhu, F., Ma, H., & Elshobary, M. (2022). A preliminary study on polysaccharide extraction, purification, and antioxidant properties of sugar-rich filamentous microalgae *Tribonema minus*. *Journal of Applied Phycology*, 34.
- Inoue, A., Mashino, C., Uji, T., Saga, N., Mikami, K., & Ojima, T. (2015). Characterization of an Eukaryotic PL-7 Alginate Lyase in the Marine Red Alga *Pyropia yezoensis*. *Current Biotechnology*, 4(3), 240-248.
- Inoue, A., Nishiyama, R., & Ojima, T. (2019). Production of value-added materials from alginate using alginate lyases and 4-deoxy-l-erythro-5-hexoseulose uronic acid–metabolic enzymes from alginolytic bacteria and marine gastropods. In *Enzymatic Technologies for Marine Polysaccharides*. CRC Press.
- Inoue, A., & Ojima, T. (2019). Functional identification of alginate lyase from the brown alga *Saccharina japonica*. *Scientific Reports*, 9(1), Article 1.
- Inoue, A., & Ojima, T. (2021). Functional identification of the 4-deoxy-L-erythro-5-hexoseulose uronate reductase from a brown alga, *Saccharina japonica*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 545, 112-118.
- 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.
- Ishikawa, T., Fang, L., Rennie, E. A., Sechet, J., Yan, J., Jing, B., Moore, W., Cahoon, E. B., Scheller, H. V., Kawai-Yamada, M., & Mortimer, J. C. (2018). GLUCOSAMINE INOSITOLPHOSPHORYLCERAMIDE TRANSFERASE1 (GINT1) Is a GlcNAc-Containing Glycosylinositol Phosphorylceramide Glycosyltransferase1. *Plant Physiology*, 177(3), 938-952.

- Ito, Y., Uemura, T., & Nakano, A. (2014). Chapter Six—Formation and Maintenance of the Golgi Apparatus in Plant Cells. In K. W. Jeon (Éd.), *International Review of Cell and Molecular Biology* (Vol. 310, p. 221-287). Academic Press.
- Johansen, J. N., Chow, C.-M., Moore, I., & Hawes, C. (2009). AtRAB-H1b and AtRAB-H1c GTPases, homologues of the yeast Ypt6, target reporter proteins to the Golgi when expressed in *Nicotiana tabacum* and *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany*, *60*(11), 3179-3193.
- Jones, C. G., Lawton, J. H., & Shachak, M. (1994). Organisms as Ecosystem Engineers. *Oikos*, *69*(3), 373-386.
- Jones, M. Z., & Dawson, G. (1981). Caprine beta-mannosidosis. Inherited deficiency of beta-D-mannosidase. *The Journal of Biological Chemistry*, *256*(10), 5185-5188.
- Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A., Green, T., Figurnov, M., Ronneberger, O., Tunyasuvunakool, K., Bates, R., Žídek, A., Potapenko, A., Bridgland, A., Meyer, C., Kohl, S. A. A., Ballard, A. J., Cowie, A., Romera-Paredes, B., Nikolov, S., Jain, R., Adler, J., ... Hassabis, D. (2021). Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature*, *596*(7873), Article 7873.
- Karamanos, N. K., Theocharis, A. D., Piperigkou, Z., Manou, D., Passi, A., Skandalis, S. S., Vynios, D. H., Orian-Rousseau, V., Ricard-Blum, S., Schmelzer, C. E. H., Duca, L., Durbeej, M., Afratis, N. A., Troeberg, L., Franchi, M., Masola, V., & Onisto, M. (2021). A guide to the composition and functions of the extracellular matrix. *The FEBS Journal*, *288*(24), 6850-6912.
- Kawai, H., Hanyuda, T., Draisma, S. G. A., Wilce, R. T., & Andersen, R. A. (2015). Molecular phylogeny of two unusual brown algae, *Phaeostrophion irregulare* and *Platysiphon glacialis*, proposal of the Stschapoviales ord. Nov. And Platysiphonaceae fam. Nov., and a re-examination of divergence times for brown algal orders. *Journal of Phycology*, *51*(5), 918-928.
- Kawai, H., Maeba, S., Sasaki, H., Okuda, K., & Henry, E. C. (2003). *Schizocladia ischiensis*: A New Filamentous Marine Chromophyte Belonging to a New Class, Schizocladiphyceae. *Protist*, *154*(2), 211-228.
- Kawamoto, S., Moriwaki, K., Nakagawa, T., Terao, M., Shinzaki, S., Yamane-Ohnuki, N., Satoh, M., Mehta, A. S., Block, T. M., & Miyoshi, E. (2011). Overexpression of  $\alpha$ 1,6-fucosyltransferase in hepatoma enhances expression of Golgi phosphoprotein 2 in a fucosylation-independent manner. *International Journal of Oncology*, *39*(1), 203-208.
- Keeling, P. J. (2004). Diversity and evolutionary history of plastids and their hosts. *American Journal of Botany*, *91*(10), 1481-1493.
- Keeling, P. J. (2013). The number, speed, and impact of plastid endosymbioses in eukaryotic evolution. *Annual Review of Plant Biology*, *64*, 583-607.
- Kelleher, D. J., Karaoglu, D., Mandon, E. C., & Gilmore, R. (2003). Oligosaccharyltransferase isoforms that contain different catalytic STT3 subunits have distinct enzymatic properties. *Molecular Cell*, *12*(1), 101-111.
- Kelly, A. A., Froehlich, J. E., & Dörmann, P. (2003). Disruption of the Two Digalactosyldiacylglycerol Synthase Genes DGD1 and DGD2 in *Arabidopsis* Reveals the Existence of an Additional Enzyme of Galactolipid Synthesis. *The Plant Cell*, *15*(11), 2694-2706.
- Kitagawa, H., Shimakawa, H., & Sugahara, K. (1999). The tumor suppressor EXT-like gene EXTL2 encodes an  $\alpha$ 1, 4-N-acetylhexosaminyltransferase that transfers N-acetylgalactosamine and N-acetylglucosamine to the common glycosaminoglycan-protein linkage region. The key

- enzyme for the chain initiation of heparan sulfate. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(20), 13933-13937.
- Kloareg, B., Badis, Y., Cock, J. M., & Michel, G. (2021). Role and Evolution of the Extracellular Matrix in the Acquisition of Complex Multicellularity in Eukaryotes : A Macroalgal Perspective. *Genes*, 12(7), Article 7.
- Kloareg, B., Demarty, M., & Mabeau, S. (1987). Ion-Exchange Properties of Isolated Cell Walls of Brown Algae : The Interstitial Solution. *Journal of Experimental Botany*, 38(10), 1652-1662.
- Kloareg, B., & Quatrano, R. S. (1988). Structure of the cell walls of marine algae and ecophysiological functions of the matrix polysaccharides. *Structure of the cell walls of marine algae and ecophysiological functions of the matrix polysaccharides*, 26, 259-315.
- Klute, M. J., Melançon, P., & Dacks, J. B. (2011). Evolution and Diversity of the Golgi. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(8), a007849.
- Knoch, E., Dilokpimol, A., Tryfona, T., Poulsen, C. P., Xiong, G., Harholt, J., Petersen, B. L., Ulvskov, P., Hadi, M. Z., Kotake, T., Tsumuraya, Y., Pauly, M., Dupree, P., & Geshi, N. (2013). A  $\beta$ -glucuronosyltransferase from *Arabidopsis thaliana* involved in biosynthesis of type II arabinogalactan has a role in cell elongation during seedling growth. *The Plant Journal*, 76(6), 1016-1029.
- Knox, J. P., & Benitez-Alfonso, Y. (2014). Roles and regulation of plant cell walls surrounding plasmodesmata. *Current Opinion in Plant Biology*, 22, 93-100.
- Kobayashi, S., Morimoto, K., Shimizu, T., Takahashi, M., Kurosawa, H., & Shirasawa, T. (2000). Association of EXT1 and EXT2, hereditary multiple exostoses gene products, in Golgi apparatus. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 268(3), 860-867.
- Krause, G. H., & Weis, E. (1991). Chlorophyll Fluorescence and Photosynthesis : The Basics. *Annual review of plant biology*, 42(1), 313-349.
- Kuhn, J., Götting, C., Schnölzer, M., Kempf, T., Brinkmann, T., & Kleesiek, K. (2001). First isolation of human UDP-D-xylose : Proteoglycan core protein beta-D-xylosyltransferase secreted from cultured JAR choriocarcinoma cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(7), 4940-4947.
- Kumagai, Y., & Ojima, T. (2009). Enzymatic properties and the primary structure of a beta-1,3-glucanase from the digestive fluid of the Pacific abalone *Haliotis discus hannai*. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B, Biochemistry & Molecular Biology*, 154(1), 113-120.
- Kumar, M., Wightman, R., Atanassov, I., Gupta, A., Hurst, C. H., Hemsley, P. A., & Turner, S. (2016). S-Acylation of the cellulose synthase complex is essential for its plasma membrane localization. *Science (New York, N.Y.)*, 353(6295), 166-169.
- Kumar, S., Wang, Y., Zhou, Y., Dillard, L., Li, F.-W., Sciandra, C. A., Sui, N., Zentella, R., Zahn, E., Shabanowitz, J., Hunt, D. F., Borgnia, M. J., Bartesaghi, A., Sun, T., & Zhou, P. (2023). Structure and dynamics of the *Arabidopsis* O-fucosyltransferase SPINDLY. *Nature Communications*, 14, 1538.
- 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.
- Labourel, A., Jam, M., Legentil, L., Sylla, B., Hehemann, J. H., Ferrières, V., Czjzek, M., & Michel, G. (2015). Structural and biochemical characterization of the laminarinase ZgLamCGH16 from *Zobellia galactanivorans* suggests preferred recognition of branched laminarin. *Acta Crystallographica. Section D, Biological Crystallography*, 71(Pt 2), 173-184.

- Laurens, L. M. L., Lane, M., & Nelson, R. S. (2020). Sustainable Seaweed Biotechnology Solutions for Carbon Capture, Composition, and Deconstruction. *Trends in Biotechnology*, 38(11), 1232-1244.
- Le Bail, A., Billoud, B., Le Panse, S., Chenivesse, S., & Charrier, B. (2011). ETOILE Regulates Developmental Patterning in the Filamentous Brown Alga *Ectocarpus siliculosus*. *The Plant Cell*, 23(4), 1666-1678.
- Le Costaouëc, T., Unamunzaga, C., Mantecon, L., & Helbert, W. (2017). New structural insights into the cell-wall polysaccharide of the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Algal Research*, 26, 172-179.
- Leboeuf, E., Immerzeel, P., Gibon, Y., Steup, M., & Pauly, M. (2008). High-throughput functional assessment of polysaccharide-active enzymes using matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight mass spectrometry as exemplified on plant cell wall polysaccharides. *Analytical Biochemistry*, 373(1), 9-17.
- Lee, J.-Y. (2014). New and old roles of plasmodesmata in immunity and parallels to tunneling nanotubes. *Plant Science*, 221-222, 13-20.
- Li, Y., Kelly, W. G., Logsdon, J. M., Schurko, A. M., Harfe, B. D., Hill-Harfe, K. L., & Kahn, R. A. (2004). Functional genomic analysis of the ADP-ribosylation factor family of GTPases: Phylogeny among diverse eukaryotes and function in *C. elegans*. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 18(15), 1834-1850.
- Li, Z. P., Paterlini, A., Glavier, M., & Bayer, E. M. (2021). Intercellular trafficking via plasmodesmata: Molecular layers of complexity. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 78(3), 799-816.
- Lieberman, R. L., Wustman, B. A., Huertas, P., Powe, A. C., Pine, C. W., Khanna, R., Schlossmacher, M. G., Ringe, D., & Petsko, G. A. (2007). Structure of acid beta-glucosidase with pharmacological chaperone provides insight into Gaucher disease. *Nature Chemical Biology*, 3(2), 101-107.
- Lin, T.-Y., & Hassid, W. Z. (1966). Pathway of Alginic Acid Synthesis in the Marine Brown Alga, *Fucus gardneri* Silva. *Journal of Biological Chemistry*, 241(22), 5284-5297.
- Linardić, M., Cokus, S. J., Pellegrini, M., & Braybrook, S. A. (2020). Growth of the *Fucus* embryo: Insights into wall-mediated cell expansion through mechanics and transcriptomics [Preprint]. *Developmental Biology*.
- Liu, S., & Storrie, B. (2012). Are Rab proteins the link between Golgi organization and membrane trafficking? *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 69(24), 4093-4106.
- Liu, T., Wang, X., Wang, G., Jia, S., Liu, G., Shan, G., Chi, S., Zhang, J., Yu, Y., Xue, T., & Yu, J. (2019). Evolution of Complex Thallus Alga: Genome Sequencing of *Saccharina japonica*. *Frontiers in Genetics*, 10.
- Mak, W., Hamid, N., Liu, T., Lu, J., & White, W. L. (2013). Fucoidan from New Zealand *Undaria pinnatifida*: Monthly variations and determination of antioxidant activities. *Carbohydrate Polymers*, 95(1), 606-614.
- Martin, S. L., Edbrooke, M. R., Hodgman, T. C., van den Eijnden, D. H., & Bird, M. I. (1997). Lewis X biosynthesis in *Helicobacter pylori*. Molecular cloning of an alpha(1,3)-fucosyltransferase gene. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(34), 21349-21356.
- Martins, I., Hartmann, D. O., Alves, P. C., Martins, C., Garcia, H., Leclercq, C. C., Ferreira, R., He, J., Renaut, J., Becker, J. D., & Silva Pereira, C. (2014). Elucidating how the saprophytic fungus

- Aspergillus nidulans* uses the plant polyester suberin as carbon source. *BMC Genomics*, 15(1), 613.
- Mazéas, L., Yonamine, R., Barbeyron, T., Henrissat, B., Drula, E., Terrapon, N., Nagasato, C., & Hervé, C. (2023). Assembly and synthesis of the extracellular matrix in brown algae. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 134, 112-124.
- Mazur, P., Morin, N., Baginsky, W., el-Sherbeini, M., Clemas, J. A., Nielsen, J. B., & Foor, F. (1995). Differential expression and function of two homologous subunits of yeast 1,3-beta-D-glucan synthase. *Molecular and Cellular Biology*, 15(10), 5671-5681.
- McCarthy, T. W., Der, J. P., Honaas, L. A., dePamphilis, C. W., & Anderson, C. T. (2014). Phylogenetic analysis of pectin-related gene families in *Physcomitrella patens* and nine other plant species yields evolutionary insights into cell walls. *BMC Plant Biology*, 14(1), 79.
- Michel, G., Tonon, T., Scornet, D., Cock, J. M., & Kloareg, B. (2010a). 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(1), 67-81.
- Michel, G., Tonon, T., Scornet, D., Cock, J. M., & Kloareg, B. (2010b). 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.
- Micheli, F. (2001). Pectin methylesterases : Cell wall enzymes with important roles in plant physiology. *Trends in Plant Science*, 6(9), 414-419.
- Mineur, F., Arenas, F., Assis, J., Davies, A. J., Engelen, A. H., Fernandes, F., Malta, E., Thibaut, T., Van Nguyen, T., Vaz-Pinto, F., Vranken, S., Serrão, E. A., & De Clerck, O. (2015). European seaweeds under pressure : Consequences for communities and ecosystem functioning. *Journal of Sea Research*, 98, 91-108.
- Miras, M., Pottier, M., Schladt, T. M., Ejike, J. O., Redzich, L., Frommer, W. B., & Kim, J.-Y. (2022). Plasmodesmata and their role in assimilate translocation. *Journal of Plant Physiology*, 270, 153633.
- Monteiro, C., Heinrich, S., Bartsch, I., Valentin, K., Corre, E., Collén, J., Harms, L., Glöckner, G., & Bischof, K. (2019). Temperature Modulates Sex-Biased Gene Expression in the Gametophytes of the Kelp *Saccharina latissima*. *Frontiers in Marine Science*, 6.
- Moremen, K. W., Ramiah, A., Stuart, M., Steel, J., Meng, L., Forouhar, F., Moniz, H. A., Gahlay, G., Gao, Z., Chapla, D., Wang, S., Yang, J.-Y., Prabhakar, P. K., Johnson, R., Rosa, M. D., Geisler, C., Nairn, A. V., Seetharaman, J., Wu, S.-C., ... Jarvis, D. L. (2018). Expression system for structural and functional studies of human glycosylation enzymes. *Nature Chemical Biology*, 14(2), 156-162.
- Morré, D. J., & Mollenhauer, H. H. (1964). Isolation of the Golgi Apparatus from Plant Cells. *The Journal of Cell Biology*, 23(2), 295-305.
- Morre, D. J., Mollenhauer, H. H., & Chambers, J. E. (1965). GLUTARALDEHYDE STABILIZATION AS AN AID TO GOLGI APPARATUS ISOLATION. *Experimental Cell Research*, 38, 672-675.
- Mortimer, J. C., Miles, G. P., Brown, D. M., Zhang, Z., Segura, M. P., Weimar, T., Yu, X., Seffen, K. A., Stephens, E., Turner, S. R., & Dupree, P. (2010). Absence of branches from xylan in *Arabidopsis* gux mutants reveals potential for simplification of lignocellulosic biomass. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(40), 17409-17414.
- Münster, J., Ziegelmüller, P., Spillner, E., & Bredehorst, R. (2006). High level expression of monomeric and dimeric human alpha1,3-fucosyltransferase V. *Journal of Biotechnology*, 121(4), 448-457.



- Nadanaka, S., Zhou, S., Kagiya, S., Shoji, N., Sugahara, K., Sugihara, K., Asano, M., & Kitagawa, H. (2013). EXTL2, a Member of the EXT Family of Tumor Suppressors, Controls Glycosaminoglycan Biosynthesis in a Xylose Kinase-dependent Manner. *The Journal of Biological Chemistry*, *288*(13), 9321-9333.
- 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*(2), 287-298.
- Narciso, J. O., Zeng, W., Ford, K., Lampugnani, E. R., Humphries, J., Austarheim, I., van de Meene, A., Bacic, A., & Doblin, M. S. (2021). Biochemical and Functional Characterization of GALT8, an Arabidopsis GT31  $\beta$ -(1,3)-Galactosyltransferase That Influences Seedling Development. *Frontiers in Plant Science*, *12*.
- Nishitsuji, K., Arimoto, A., Higa, Y., Mekaru, M., Kawamitsu, M., Satoh, N., & Shoguchi, E. (2019). Draft genome of the brown alga, *Nemacystus decipiens*, Onna-1 strain : Fusion of genes involved in the sulfated fucan biosynthesis pathway. *Scientific Reports*, *9*(1), Article 1.
- O'Connor, T., Ireland, L. S., Harrison, D. J., & Hayes, J. D. (1999). Major differences exist in the function and tissue-specific expression of human aflatoxin B1 aldehyde reductase and the principal human aldo-keto reductase AKR1 family members. *The Biochemical Journal*, *343 Pt 2*(Pt 2), 487-504.
- Ogasawara, K., Yamada, K., Christeller, J. T., Kondo, M., Hatsugai, N., Hara-Nishimura, I., & Nishimura, M. (2009). Constitutive and inducible ER bodies of *Arabidopsis thaliana* accumulate distinct beta-glucosidases. *Plant & Cell Physiology*, *50*(3), 480-488.
- Oikawa, A., Lund, C. H., Sakuragi, Y., & Scheller, H. V. (2013). Golgi-localized enzyme complexes for plant cell wall biosynthesis. *Trends in Plant Science*, *18*(1), 49-58.
- Okekeogbu, I. O., Pattathil, S., Fernández-Niño, S. M. G., Aryal, U. K., Penning, B. W., Lao, J., Heazlewood, J. L., Hahn, M. G., McCann, M. C., & Carpita, N. C. (2019). Glycome and Proteome Components of Golgi Membranes Are Common between Two Angiosperms with Distinct Cell-Wall Structures. *The Plant Cell*, *31*(5), 1094-1112.
- Oku, M., Warnecke, D., Noda, T., Müller, F., Heinz, E., Mukaiyama, H., Kato, N., & Sakai, Y. (2003). Peroxisome degradation requires catalytically active sterol glucosyltransferase with a GRAM domain. *The EMBO Journal*, *22*(13), 3231-3241.
- Oliveira, L., & Bisalputra, T. (1977). Ultrastructural Studies in the Brown Alga *Ectocarpus* in Culture : Autolysis. *The New Phytologist*, *78*(1), 139-145.
- Oriol, R., Mollicone, R., Cailleau, A., Balanzino, L., & Breton, C. (1999). Divergent evolution of fucosyltransferase genes from vertebrates, invertebrates, and bacteria. *Glycobiology*, *9*(4), 323-334.
- Ostergaard, L., Petersen, M., Mattsson, O., & Mundy, J. (2002). An *Arabidopsis* callose synthase. *Plant Molecular Biology*, *49*(6), 559-566.
- Panzer, P., Preuss, U., Joberty, G., & Naim, H. Y. (1998). Protein Domains Implicated in Intracellular Transport and Sorting of Lactase-Phlorizin Hydrolase\*. *Journal of Biological Chemistry*, *273*(22), 13861-13869.
- Parsons, H. T., Christiansen, K., Knierim, B., Carroll, A., Ito, J., Batth, T. S., Smith-Moritz, A. M., Morrison, S., McInerney, P., Hadi, M. Z., Auer, M., Mukhopadhyay, A., Petzold, C. J., Scheller, H. V., Loqué, D., & Heazlewood, J. L. (2012). Isolation and Proteomic Characterization of the *Arabidopsis*

- Golgi Defines Functional and Novel Components Involved in Plant Cell Wall Biosynthesis1. *Plant Physiology*, 159(1), 12-26.
- Parsons, H. T., Stevens, T. J., McFarlane, H. E., Vidal-Melgosa, S., Griss, J., Lawrence, N., Butler, R., Sousa, M. M. L., Salemi, M., Willats, W. G. T., Petzold, C. J., Heazlewood, J. L., & Lilley, K. S. (2019). Separating Golgi Proteins from Cis to Trans Reveals Underlying Properties of Cisternal Localization. *The Plant Cell*, 31(9), 2010-2034.
- Pengyan, Z., Chang, L., Zhanru, S., Fuli, L., Jianting, Y., & Delin, D. (2021). Genome-wide transcriptome profiling and characterization of mannuronan C5-epimerases in *Saccharina japonica*. *Algal Research*, 60, 102491.
- Petersen, B. L., Egelund, J., Damager, I., Faber, K., Krüger Jensen, J., Yang, Z., Bennett, E. P., Scheller, H. V., & Ulvskov, P. (2009). Assay and heterologous expression in *Pichia pastoris* of plant cell wall type-II membrane anchored glycosyltransferases. *Glycoconjugate Journal*, 26(9), 1235-1246.
- Petersen, J., Ludewig, A.-K., Michael, V., Bunk, B., Jarek, M., Baurain, D., & Brinkmann, H. (2014). Chromera velia, endosymbioses and the rhodoplex hypothesis—Plastid evolution in cryptophytes, alveolates, stramenopiles, and haptophytes (CASH lineages). *Genome Biology and Evolution*, 6(3), 666-684.
- Phillips, N., Braun, E. L., Boore, J., Cheda, B., Salomon, M. P., Kawai, H., & Yamagishi, T. (2020). *Schizocladia ischiensis* organellar genomes: Estimating the origin of multicellularity in heterokonts and the emergence of shallow ocean ecosystems [Preprint]. In Review.
- Pimpl, P., Movafeghi, A., Coughlan, S., Denecke, J., Hillmer, S., & Robinson, D. G. (2000). In situ localization and in vitro induction of plant COPI-coated vesicles. *The Plant Cell*, 12(11), 2219-2236.
- Pomin, V. H., & Mourão, P. A. S. (2008). Structure, biology, evolution, and medical importance of sulfated fucans and galactans. *Glycobiology*, 18(12), 1016-1027.
- Ponce, N. M. A., & Stortz, C. A. (2020). A Comprehensive and Comparative Analysis of the Fucoidan Compositional Data Across the Phaeophyceae. *Frontiers in Plant Science*, 11.
- Popper, Z. A., Michel, G., Hervé, C., Domozych, D. S., Willats, W. G. T., Tuohy, M. G., Kloareg, B., & Stengel, D. B. (2011). Evolution and diversity of plant cell walls: From algae to flowering plants. *Annual Review of Plant Biology*, 62, 567-590.
- Preiss, J., & Ashwell, G. (1962). Alginic Acid Metabolism in Bacteria: II. THE ENZYMATIC REDUCTION OF 4-DEOXY-L-ERYTHRO-5-HEXOSEULOSE URONIC ACID TO 2-KETO-3-DEOXY-D-GLUCONIC ACID. *Journal of Biological Chemistry*, 237(2), 317-321.
- Prokofjeva, M. M., Imbs, T. I., Shevchenko, N. M., Spirin, P. V., Horn, S., Fehse, B., Zvyagintseva, T. N., & Prassolov, V. S. (2013). Fucoidans as Potential Inhibitors of HIV-1. *Marine Drugs*, 11(8), 3000-3014.
- Qiao, Z., Lampugnani, E. R., Yan, X.-F., Khan, G. A., Saw, W. G., Hannah, P., Qian, F., Calabria, J., Miao, Y., Grüber, G., Persson, S., & Gao, Y.-G. (2021). Structure of *Arabidopsis* CESA3 catalytic domain with its substrate UDP-glucose provides insight into the mechanism of cellulose synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 118(11), e2024015118.
- 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.

- Quesada-Vincens, D., Fellay, R., Nasim, T., Viprey, V., Burger, U., Prome, J. C., Broughton, W. J., & Jabbouri, S. (1997). *Rhizobium* sp. Strain NGR234 NodZ protein is a fucosyltransferase. *Journal of Bacteriology*, 179(16), 5087-5093.
- Quinto, C., Wijffjes, A. H., Bloemberg, G. V., Blok-Tip, L., López-Lara, I. M., Lugtenberg, B. J., Thomas-Oates, J. E., & Spaink, H. P. (1997). Bacterial nodulation protein NodZ is a chitin oligosaccharide fucosyltransferase which can also recognize related substrates of animal origin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(9), 4336-4341.
- Ray, P. M., Shininger, T. L., & Ray, M. M. (1969). ISOLATION OF  $\beta$ -GLUCAN SYNTHETASE PARTICLES FROM PLANT CELLS AND IDENTIFICATION WITH GOLGI MEMBRANES\*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 64(2), 605-612.
- Reisky, L., Stanetty, C., Mihovilovic, M. D., Schweder, T., Hehemann, J.-H., & Bornscheuer, U. T. (2018). Biochemical characterization of an ulvan lyase from the marine flavobacterium *Formosa agariphila* KMM 3901T. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(16), 6987-6996.
- Remminghorst, U., & Rehm, B. H. A. (2006). In vitro alginate polymerization and the functional role of Alg8 in alginate production by *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(1), 298-305.
- Rini, J. M., Moremen, K. W., Davis, B. G., & Esko, J. D. (2022). Glycosyltransferases and Glycan-Processing Enzymes. In A. Varki, R. D. Cummings, J. D. Esko, P. Stanley, G. W. Hart, M. Aebi, D. Mohnen, T. Kinoshita, N. H. Packer, J. H. Prestegard, R. L. Schnaar, & P. H. Seeberger (Éds.), *Essentials of Glycobiology* (4th éd.). Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Robert, X., & Gouet, P. (2014). Deciphering key features in protein structures with the new ENDscript server. *Nucleic Acids Research*, 42(Web Server issue), W320-324.
- Robinson, D. G., Scheuring, D., Naramoto, S., & Friml, J. (2011). ARF1 Localizes to the Golgi and the Trans-Golgi Network. *The Plant Cell*, 23(3), 846-849.
- Saint-Jore-Dupas, C., Nebenführ, A., Boulaflous, A., Follet-Gueye, M.-L., Plasson, C., Hawes, C., Driouich, A., Faye, L., & Gomord, V. (2006). Plant N-Glycan Processing Enzymes Employ Different Targeting Mechanisms for Their Spatial Arrangement along the Secretory Pathway. *The Plant Cell*, 18(11), 3182-3200.
- Saito, F., Suyama, A., Oka, T., Yoko-o, T., Matsuoka, K., Jigami, Y., & Shimma, Y. (2014). Identification of Novel Peptidyl Serine  $\alpha$ -Galactosyltransferase Gene Family in Plants\*♦. *Journal of Biological Chemistry*, 289(30), 20405-20420.
- Salgado, L. T., Cinelli, L. P., Viana, N. B., Tomazetto de Carvalho, R., De Souza Mourão, P. A., Teixeira, V. L., Farina, M., & Filho, A. G. M. A. (2009). A VANADIUM BROMOPEROXIDASE CATALYZES THE FORMATION OF HIGH-MOLECULAR-WEIGHT COMPLEXES BETWEEN BROWN ALGAL PHENOLIC SUBSTANCES AND ALGINATES(1). *Journal of Phycology*, 45(1), 193-202.
- Salmeán, A. A., Duffieux, D., Harholt, J., Qin, F., Michel, G., Czjzek, M., Willats, W. G. T., & Hervé, C. (2017). Insoluble (1  $\rightarrow$  3), (1  $\rightarrow$  4)- $\beta$ -D-glucan is a component of cell walls in brown algae (Phaeophyceae) and is masked by alginates in tissues. *Scientific Reports*, 7(1), Article 1.
- Samokyszyn, V. M., Gall, W. E., Zawada, G., Freyaldenhoven, M. A., Chen, G., Mackenzie, P. I., Tephly, T. R., & Radomska-Pandya, A. (2000). 4-Hydroxyretinoic Acid, a Novel Substrate for Human Liver Microsomal UDP-glucuronosyltransferase(s) and Recombinant UGT2B7 \*. *Journal of Biological Chemistry*, 275(10), 6908-6914.

- Sato, T., Sato, M., Kiyohara, K., Sogabe, M., Shikanai, T., Kikuchi, N., Togayachi, A., Ishida, H., Ito, H., Kameyama, A., Gotoh, M., & Narimatsu, H. (2006). Molecular cloning and characterization of a novel human  $\beta$ 1,3-glucosyltransferase, which is localized at the endoplasmic reticulum and glucosylates O-linked fucosylglycan on thrombospondin type 1 repeat domain. *Glycobiology*, *16*(12), 1194-1206.
- Schiener, P., Black, K., Stanley, M., & Green, D. (2015). The seasonal variation in the chemical composition of the kelp species *Laminaria digitata*, *Laminaria hyperborea*, *Saccharina latissima* and *Alaria esculenta*. *Journal of Applied Phycology*, *27*, 363-373.
- Schreml, J., Durmaz, B., Cogulu, O., Keupp, K., Beleggia, F., Pohl, E., Milz, E., Coker, M., Ucar, S. K., Nürnberg, G., Nürnberg, P., Kuhn, J., & Ozkinay, F. (2014). The missing « link » : An autosomal recessive short stature syndrome caused by a hypofunctional XYLT1 mutation. *Human Genetics*, *133*(1), 29-39.
- Schrödinger, & DeLano. (2020). PyMOL. Retrieved from <http://www.pymol.org/pymol>.
- Sethi, M. K., Buettner, F. F. R., Ashikov, A., Krylov, V. B., Takeuchi, H., Nifantiev, N. E., Haltiwanger, R. S., Gerardy-Schahn, R., & Bakker, H. (2012). Molecular Cloning of a Xylosyltransferase That Transfers the Second Xylose to O-Glucosylated Epidermal Growth Factor Repeats of Notch \*. *Journal of Biological Chemistry*, *287*(4), 2739-2748.
- Shen, Y., Motomura, T., Ichihara, K., Matsuda, Y., Yoshimura, K., Kosugi, C., & Nagasato, C. (2023). Application of CRISPR-Cas9 genome editing by microinjection of gametophytes of *Saccharina japonica* (Laminariales, Phaeophyceae). *Journal of Applied Phycology*, *35*(3), 1431-1441.
- Shevchenko, N. M., Usol'tseva (Men'shova), R. V., Ishina, I. A., Tinh, P. D., Ly, B. M., & Ermakova, S. P. (2017). Structural Characteristics and in vitro Antitumor Activity of Water-Soluble Polysaccharides from Brown Algae of the Russian Far East and Vietnam. *Chemistry of Natural Compounds*, *53*(1), 1-5.
- Siegrist, H. P., Burkart, T., Wiesmann, U. N., Herschkowitz, N. N., & Spycher, M. A. (1979). Ceramide-Galactosyltransferase and Cerebroside-Sulphotransferase Localisation in Golgi Membranes Isolated by a Continuous Sucrose Gradient of Mouse Brain Microsomes. *Journal of Neurochemistry*, *33*(2), 497-504.
- Siméon, A., Kridi, S., Kloareg, B., & Hervé, C. (2020). Presence of Exogenous Sulfate Is Mandatory for Tip Growth in the Brown Alga *Ectocarpus subulatus*. *Frontiers in Plant Science*, *11*.
- Spinazzi, M., Casarin, A., Pertegato, V., Salviati, L., & Angelini, C. (2012). Assessment of mitochondrial respiratory chain enzymatic activities on tissues and cultured cells. *Nature Protocols*, *7*(6), 1235-1246.
- Stam, M., Lelièvre, P., Hoebeke, M., Corre, E., Barbeyron, T., & Michel, G. (2023). SulfAtlas, the sulfatase database : State of the art and new developments. *Nucleic Acids Research*, *51*(D1), D647-D653.
- Sterling, J. D., Quigley, H. F., Orellana, A., & Mohnen, D. (2001). The Catalytic Site of the Pectin Biosynthetic Enzyme  $\alpha$ -1,4-Galacturonosyltransferase Is Located in the Lumen of the Golgi. *Plant Physiology*, *127*(1), 360-371.
- Stiller, J. W., Schreiber, J., Yue, J., Guo, H., Ding, Q., & Huang, J. (2014). The evolution of photosynthesis in chromist algae through serial endosymbioses. *Nature Communications*, *5*(1), Article 1.

- Stone, B. A., Jacobs, A. K., Hrmova, M., Burton, R. A., & Fincher, G. B. (2010). Biosynthesis of Plant Cell Wall and Related Polysaccharides by Enzymes of the GT2 and GT48 Families. In *Annual Plant Reviews* (p. 109-165). John Wiley & Sons, Ltd.
- Strahl-Bolsinger, S., & Scheinost, A. (1999). Transmembrane topology of pmt1p, a member of an evolutionarily conserved family of protein O-mannosyltransferases. *The Journal of Biological Chemistry*, *274*(13), 9068-9075.
- Strasser, R., Schoberer, J., Jin, C., Glössl, J., Mach, L., & Steinkellner, H. (2006). Molecular cloning and characterization of *Arabidopsis thaliana* Golgi alpha-mannosidase II, a key enzyme in the formation of complex N-glycans in plants. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, *45*(5), 789-803.
- Strasser, J. F. H., Irisarri, I., Williams, T. A., & Burki, F. (2021). A molecular timescale for eukaryote evolution with implications for the origin of red algal-derived plastids. *Nature Communications*, *12*(1), Article 1.
- Strbac, D., Rodrigues, M. A., dos Santos, C. P., & Hall, D. O. (1994). Chloroplast isolation from *Laminaria digitata* (Phaeophyceae): A reproducible methodology yielding photosynthetically active chloroplasts. *Planta*, *195*(1), 138-141.
- Suda, Y., Kurokawa, K., Hirata, R., & Nakano, A. (2013). Rab GAP cascade regulates dynamics of Ypt6 in the Golgi traffic. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *110*(47), 18976-18981.
- Sugahara, K., & Kitagawa, H. (2002). Heparin and heparan sulfate biosynthesis. *IUBMB Life*, *54*(4), 163-175.
- Sun, H.-Y., Lin, S.-W., Ko, T.-P., Pan, J.-F., Liu, C.-L., Lin, C.-N., Wang, A. H.-J., & Lin, C.-H. (2007). Structure and mechanism of *Helicobacter pylori* fucosyltransferase. A basis for lipopolysaccharide variation and inhibitor design. *The Journal of Biological Chemistry*, *282*(13), 9973-9982.
- Sundin, B. A., Chiu, C.-H., Riffle, M., Davis, T. N., & Muller, E. G. D. (2004). Localization of proteins that are coordinately expressed with Cln2 during the cell cycle. *Yeast (Chichester, England)*, *21*(9), 793-800.
- Szpryngiel, S., Ge, C., Iakovleva, I., Georgiev, A., Lind, J., Wieslander, Å., & Mäler, L. (2011). Lipid Interacting Regions in Phosphate Stress Glycosyltransferase atDGD2 from *Arabidopsis thaliana*. *Biochemistry*, *50*(21), 4451-4466.
- Takada, G., Kawaguchi, T., Kaga, T., Sumitani, J., & Arai, M. (1999). Cloning and sequencing of beta-mannosidase gene from *Aspergillus aculeatus* no. F-50. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, *63*(1), 206-209.
- Takano, S., Matsuda, S., Funabiki, A., Furukawa, J., Yamauchi, T., Tokuji, Y., Nakazono, M., Shinohara, Y., Takamura, I., & Kato, K. (2015). The rice RCN11 gene encodes  $\beta$ 1,2-xylosyltransferase and is required for plant responses to abiotic stresses and phytohormones. *Plant Science: An International Journal of Experimental Plant Biology*, *236*, 75-88.
- Tamura, K., Shimada, T., Kondo, M., Nishimura, M., & Hara-Nishimura, I. (2005). KATAMARI1/MURUS3 Is a Novel Golgi Membrane Protein That Is Required for Endomembrane Organization in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, *17*(6), 1764-1776.
- Tang, H., Bowers, J. E., Wang, X., Ming, R., Alam, M., & Paterson, A. H. (2008). Synteny and collinearity in plant genomes. *Science (New York, N.Y.)*, *320*(5875), 486-488.

- Taylor, R. S., Jones, S. M., Dahl, R. H., Nordeen, M. H., & Howell, K. E. (1997). Characterization of the Golgi Complex Cleared of Proteins in Transit and Examination of Calcium Uptake Activities. *Molecular Biology of the Cell*, 8(10), 1911-1931.
- Teagle, H., Hawkins, S., Moore, P., & Smale, D. (2017). The role of kelp species as biogenic habitat formers in coastal marine ecosystems. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 492.
- Teng-umnuay, P., Morris, H. R., Dell, A., Panico, M., Paxton, T., & West, C. M. (1998). The cytoplasmic F-box binding protein SKP1 contains a novel pentasaccharide linked to hydroxyproline in *Dictyostelium*. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(29), 18242-18249.
- 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. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(19), 16707-16715.
- Terauchi, M., Nagasato, C., Kajimura, N., Mineyuki, Y., Okuda, K., Katsaros, C., & Motomura, T. (2012). Ultrastructural study of plasmodesmata in the brown alga *Dictyota dichotoma* (Dictyotales, Phaeophyceae). *Planta*, 236(4), 1013-1026.
- Thomas, F., Lundqvist, L. C. E., 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. *The Journal of Biological Chemistry*, 288(32), 23021-23037.
- Tomida, S., Takata, M., Hirata, T., Nagae, M., Nakano, M., & Kizuka, Y. (2020). The SH3 domain in the fucosyltransferase FUT8 controls FUT8 activity and localization and is essential for core fucosylation. *The Journal of Biological Chemistry*, 295(23), 7992-8004.
- Tonon, T., Rousvoal, S., Roeder, V., & Boyen, C. (2008). EXPRESSION PROFILING OF THE MANNURONAN C5-EPIMERASE MULTIGENIC FAMILY IN THE BROWN ALGA *LAMINARIA DIGITATA* (PHAEOPHYCEAE) UNDER BIOTIC STRESS CONDITIONS(1). *Journal of Phycology*, 44(5), 1250-1256.
- Torode, T. A., Marcus, S. E., Jam, M., Tonon, T., Blackburn, R. S., Hervé, C., & 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., Le Moigne, M.-A., Duffieux, D., Knox, J. P., & Hervé, C. (2016). Dynamics of cell wall assembly during early embryogenesis in the brown alga *Fucus*. *Journal of Experimental Botany*, 67(21), 6089-6100.
- Tsirigoti, A., Beakes, G. W., Hervé, C., Gachon, C. M. 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.
- Urbanowicz, B. R., Bharadwaj, V. S., Alahuhta, M., Peña, M. J., Lunin, V. V., Bomble, Y. J., Wang, S., Yang, J., Tuomivaara, S. T., Himmel, M. E., Moremen, K. W., York, W. S., & Crowley, M. F. (2017). Structural, mutagenic and *in silico* studies of xyloglucan fucosylation in *Arabidopsis thaliana* suggest a water-mediated mechanism. *The Plant Journal*, 91(6), 931-949.
- van Der Wel, H., Morris, H. R., Panico, M., Paxton, T., North, S. J., Dell, A., Thomson, J. M., & West, C. M. (2001). A non-Golgi alpha 1,2-fucosyltransferase that modifies Skp1 in the cytoplasm of *Dictyostelium*. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(36), 33952-33963.
- Varki, A. (2017). Biological roles of glycans. *Glycobiology*, 27(1), 3-49.

- Varki, A., Cummings, R. D., Esko, J. D., Stanley, P., Hart, G. W., Aebi, M., Mohnen, D., Kinoshita, T., Packer, N. H., Prestegard, J. H., Schnaar, R. L., & Seeberger, P. H. (Éds.). (2022). *Essentials of Glycobiology* (4th éd.). Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Verhaeghe, E. F., Fraysse, A., Guerquin-Kern, J.-L., Wu, T.-D., Devès, G., Mioskowski, C., Leblanc, C., Ortega, R., Ambroise, Y., & Potin, P. (2008). Microchemical imaging of iodine distribution in the brown alga *Laminaria digitata* suggests a new mechanism for its accumulation. *Journal of Biological Inorganic Chemistry: JBIC: A Publication of the Society of Biological Inorganic Chemistry*, *13*(2), 257-269.
- Vidal-Melgosa, S., Sichert, A., Francis, T. B., Bartosik, D., Niggemann, J., Wichels, A., Willats, W. G. T., Fuchs, B. M., Teeling, H., Becher, D., Schweder, T., Amann, R., & Hehemann, J.-H. (2021). Diatom fucan polysaccharide precipitates carbon during algal blooms. *Nature Communications*, *12*(1), Article 1.
- Wang, D., Yeats, T. H., Uluisik, S., Rose, J. K. C., & Seymour, G. B. (2018). Fruit Softening : Revisiting the Role of Pectin. *Trends in Plant Science*, *23*(4), 302-310.
- Wang, T., Tao, Y., Lai, C., Huang, C., Ling, Z., & Yong, Q. (2022). Influence of glycosyl composition on the immunological activity of pectin and pectin-derived oligosaccharide. *International Journal of Biological Macromolecules*, *222*, 671-679.
- Watanabe, Y., Meents, M. J., McDonnell, L. M., Barkwill, S., Sampathkumar, A., Cartwright, H. N., Demura, T., Ehrhardt, D. W., Samuels, A. L., & Mansfield, S. D. (2015). Visualization of cellulose synthases in *Arabidopsis* secondary cell walls. *Science*, *350*(6257), 198-203.
- Welner, D. H., Shin, D., Tomaleri, G. P., DeGiovanni, A. M., Tsai, A. Y.-L., Tran, H. M., Hansen, S. F., Green, D. T., Scheller, H. V., & Adams, P. D. (2017). Plant cell wall glycosyltransferases : High-throughput recombinant expression screening and general requirements for these challenging enzymes. *PLOS ONE*, *12*(6), e0177591.
- Wetherbee, R., Jackson, C. J., Repetti, S. I., Clementson, L. A., Costa, J. F., van de Meene, A., Crawford, S., & Verbruggen, H. (2019). The golden paradox – a new heterokont lineage with chloroplasts surrounded by two membranes. *Journal of Phycology*, *55*(2), 257-278.
- Wilkinson, B. M., Purswani, J., & Stirling, C. J. (2006). Yeast GTB1 encodes a subunit of glucosidase II required for glycoprotein processing in the endoplasmic reticulum. *The Journal of Biological Chemistry*, *281*(10), 6325-6333.
- Wilson, I. B., Rendić, D., Freilinger, A., Dumić, J., Altmann, F., Mucha, J., Müller, S., & Hauser, M. T. (2001). Cloning and expression of cDNAs encoding alpha1,3-fucosyltransferase homologues from *Arabidopsis thaliana*. *Biochimica Et Biophysica Acta*, *1527*(1-2), 88-96.
- Wolfram, F., Kitova, E. N., Robinson, H., Walvoort, M. T. C., Codée, J. D. C., Klassen, J. S., & Howell, P. L. (2014). Catalytic Mechanism and Mode of Action of the Periplasmic Alginate Epimerase AlgG. *The Journal of Biological Chemistry*, *289*(9), 6006-6019.
- Xiao, Z., Sun, M., Li, T., Zhao, M., & Yin, H. (2023). Mannuronan C-5 Epimerases : Review of Activity Assays, Enzyme Characteristics, Structure, and Mechanism. *Catalysts*, *13*(1), Article 1.
- Xiong, H., Kobayashi, K., Tachikawa, M., Manya, H., Takeda, S., Chiyonobu, T., Fujikake, N., Wang, F., Nishimoto, A., Morris, G. E., Nagai, Y., Kanagawa, M., Endo, T., & Toda, T. (2006). Molecular interaction between fukutin and POMGnT1 in the glycosylation pathway of alpha-dystroglycan. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *350*(4), 935-941.

- Y, M., U, S., Y, H., Y, T., Y, M., & T, K. (2005). The initial enzyme for glycosylphosphatidylinositol biosynthesis requires PIG-Y, a seventh component. *Molecular Biology of the Cell*, 16(11).
- Yamagishi, T., Müller, D. G., & Kawai, H. (2014). Comparative transcriptome analysis of *Discosporangium mesarthrocarpum* (Phaeophyceae), *Schizocladia ischiensis* (Schizocladiphyceae), and *Phaeothamnion confervicola* (Phaeothamniophyceae), with special reference to cell wall-related genes. *Journal of Phycology*, 50(3), 543-551.
- Yanagidani, S., Uozumi, N., Ihara, Y., Miyoshi, E., Yamaguchi, N., & Taniguchi, N. (1997). Purification and cDNA cloning of GDP-L-Fuc:N-acetyl-beta-D-glucosaminide:alpha1-6 fucosyltransferase (alpha1-6 FucT) from human gastric cancer MKN45 cells. *Journal of Biochemistry*, 121(3), 626-632.
- Yoshida-Moriguchi, T., Willer, T., Anderson, M. E., Venzke, D., Whyte, T., Muntoni, F., Lee, H., Nelson, S. F., Yu, L., & Campbell, K. P. (2013). SGK196 is a glycosylation-specific O-mannose kinase required for dystroglycan function. *Science (New York, N.Y.)*, 341(6148), 896-899.
- Young, R. E., McFarlane, H. E., Hahn, M. G., Western, T. L., Haughn, G. W., & Samuels, A. L. (2008). Analysis of the Golgi Apparatus in Arabidopsis Seed Coat Cells during Polarized Secretion of Pectin-Rich Mucilage. *The Plant Cell*, 20(6), 1623-1638.
- Yu, L., Xue, C., Chang, Y., Hu, Y., Xu, X., Ge, L., & Liu, G. (2015). Structure and rheological characteristics of fucoidan from sea cucumber *Apostichopus japonicus*. *Food Chemistry*, 180, 71-76.
- Zeng, W., Ebert, B., Parsons, H. T., Rautengarten, C., Bacic, A., & Heazlewood, J. L. (2017). Enrichment of Golgi Membranes from *Triticum aestivum* (Wheat) Seedlings. In N. L. Taylor & A. H. Millar (Éds.), *Isolation of Plant Organelles and Structures : Methods and Protocols* (p. 131-150). Springer.
- Zhang, B., Gao, Y., Zhang, L., & Zhou, Y. (2021). The plant cell wall : Biosynthesis, construction, and functions. *Journal of Integrative Plant Biology*, 63(1), 251-272.
- Zhang, L., Prabhakar, P. K., Bharadwaj, V. S., Bomble, Y. J., Peña, M. J., & Urbanowicz, B. R. (2023). Glycosyltransferase family 47 (GT47) proteins in plants and animals. *Essays in Biochemistry*, 67(3), 639-652.
- Zhang, M., Henquet, M., Chen, Z., Zhang, H., Zhang, Y., Ren, X., van der Krol, S., Gonneau, M., Bosch, D., & Gong, Z. (2009). LEW3, encoding a putative alpha-1,2-mannosyltransferase (ALG11) in N-linked glycoprotein, plays vital roles in cell-wall biosynthesis and the abiotic stress response in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, 60(6), 983-999.
- Zhang, P., Burel, C., Plasson, C., Kiefer-Meyer, M.-C., Ovide, C., Gügi, B., Wan, C., Teo, G., Mak, A., Song, Z., Driouch, A., Lerouge, P., & Bardor, M. (2019). Characterization of a GDP-Fucose Transporter and a Fucosyltransferase Involved in the Fucosylation of Glycoproteins in the Diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Frontiers in Plant Science*, 10.
- Zhang, P., Shao, Z., Jin, W., & Duan, D. (2016). Comparative characterization of two GDP-mannose dehydrogenase genes from *Saccharina japonica* (Laminariales, Phaeophyceae). *BMC Plant Biology*, 16(1), 62.
- Zhang, P., Shao, Z., Li, L., Liu, S., Yao, J., & Duan, D. (2018). Molecular characterisation and biochemical properties of phosphomannomutase/phosphoglucomutase (PMM/PGM) in the brown seaweed *Saccharina japonica*. *Journal of Applied Phycology*, 30, 1-10.



- Zhang, X., & Thomsen, M. (2019). Biomolecular Composition and Revenue Explained by Interactions between Extrinsic Factors and Endogenous Rhythms of *Saccharina latissima*. *Marine Drugs*, 17(2), Article 2.
- Zheng, Y., Anderson, S., Zhang, Y., & Garavito, R. M. (2011). The Structure of Sucrose Synthase-1 from *Arabidopsis thaliana* and Its Functional Implications \*. *Journal of Biological Chemistry*, 286(41), 36108-36118.



## Résumé

### **Métabolisme des polysaccharides de la matrice extracellulaire chez les algues brunes : histoires évolutives et approches protéomiques**

Les algues brunes appartiennent à la lignée des Straménopiles, qui regroupe également divers protistes, diatomées et oomycètes. Elles sont les seules à avoir développées une multicellularité complexe dans cette lignée, et ceci indépendamment d'autres lignées, comme celles comprenant les plantes et les animaux. L'acquisition convergente de la multicellularité s'est accompagnée du développement d'une matrice extracellulaire (MEC), qui grâce à ses propriétés adhésives, a joué un rôle dans cette transition. La MEC est impliquée dans de nombreux rôles biologiques, tels que le maintien de l'intégrité cellulaire, le développement ou les réponses de défenses. Ces fonctions sont intimement liées à la composition chimique de la MEC, essentiellement constituée de polysaccharides chez les algues brunes. Les principaux polysaccharides sont les alginates et les polysaccharides sulfatés contenant du fucose (FCSP), ces derniers regroupant fucanes et fucoïdanes. La biosynthèse de ces composés doit être finement orchestrée pour permettre l'agencement de la MEC, mais à ce jour il existe très peu de données sur leur métabolisme chez les algues brunes. L'analyse du 1<sup>er</sup> génome d'algue brune en 2010 avait permis de retracer les voies de synthèses des alginates et des fucanes, néanmoins une vue plus exhaustive à l'échelle des différents groupes d'algues brunes manquait pour affiner les prédictions. De même, la localisation subcellulaire des lieux de synthèse restait peu explorée. Dans le cadre de cette thèse, j'ai abordé plusieurs approches pour étudier les enzymes impliquées dans le métabolisme des alginates et des FCSP chez les algues brunes. Tout d'abord, j'ai pu bénéficier de l'accès à un grand nombre de génomes d'algues brunes (40) récemment séquencés et accessibles au laboratoire. Par des approches *in silico*, j'ai pu annoter les enzymes impliquées dans le métabolisme des polysaccharides de la MEC, dont les Carbohydrate Active enZymes (CAZymes). Ceci m'a permis de mettre en lumière l'originalité du contenu en CAZymes chez les algues brunes, d'affiner les prédictions de gènes candidats dans la synthèse des fucanes (fucosyltransférases, sulfotransférases), tout en retraçant l'histoire évolutive de l'alginate au sein des Straménopiles. Dans une seconde approche, j'ai travaillé à la mise en place d'un protocole pour l'isolement de l'appareil de Golgi chez les algues brunes, afin d'identifier des enzymes potentiellement impliquées dans la synthèse des FCSP. Cette tâche s'est révélée particulièrement difficile, mais un fractionnement partiel a pu être validé. Les analyses protéomiques de ces fractions, confrontées aux analyses moléculaires, m'ont permis d'affiner nos candidats cibles dans la synthèse des fucanes, pour lesquels j'ai initié un travail d'expression hétérologue. Ces recherches nous ont permis de progresser dans la connaissance des voies métaboliques des polysaccharides de la MEC chez les algues brunes, et constituent une assise solide pour les futures recherches de validations fonctionnelles dans ce domaine.

**Mots-clés** : Matrice extracellulaire, Algues brunes, Polysaccharides, Glycosyltransférases, Fractionnement subcellulaire, Sulfotransférases

## Abstract

### **Metabolism of polysaccharides from the extracellular matrix of brown algae: evolutionary history and proteomic analysis**

Brown algae belong to the Stramenopiles lineage, which also includes various protists, diatoms and oomycetes. They are the only algae in this lineage to have developed complex multicellularity, independently of other lineages, such as those containing plants and animals. The convergent acquisition of multicellularity was accompanied by the development of an extracellular matrix (ECM), whose adhesive properties played a role in this transition. The ECM is involved in many biological functions, such as the maintenance of cellular integrity, development and defense responses. These functions are closely linked to the chemical composition of the ECM, which in brown algae is mainly composed of polysaccharides. The main polysaccharides are alginates and fucose-containing sulphated polysaccharides (FCSPs), the latter including fucans and fucoïdanes. The biosynthesis of these compounds must be finely orchestrated to enable the organisation of the ECM, but to date there is very little data on their metabolism in brown algae. The analysis of the first brown algal genome in 2010 allowed to trace the synthesis pathways of alginates and fucans, but we still lacked a more exhaustive overview of different groups of brown algae to refine the predictions. Similarly, the subcellular location of the synthesis sites had not been fully explored. In this thesis, I used several approaches to study the enzymes involved in alginate and FCSP metabolism in brown algae. Firstly, I benefited from access to a large number of recently sequenced brown algal genomes (40) available in the laboratory. Using *in silico* approaches, I was able to annotate the enzymes involved in the metabolism of ECM polysaccharides, including Carbohydrate Active enZymes (CAZymes). This allowed me to highlight the originality of the CAZyme content in brown algae, to refine the predictions of candidate genes involved in fucan synthesis (fucosyltransferases, sulfotransferases), and to trace the evolutionary history of alginate in Stramenopiles. In a second approach, I worked on establishing a protocol to isolate the Golgi apparatus in brown algae, in order to identify enzymes potentially involved in the synthesis of FCSPs. This was a particularly difficult task, but validation of partial fractionation was possible. Proteomic analyses of these fractions, combined with molecular analyses, allowed me to refine our target candidates for fucan synthesis, for which I initiated heterologous expression work. This research has enabled advance our understanding of the metabolic pathways of ECM polysaccharides in brown algae, and provides a solid foundation for future functional validation research.

**Key words:** Extracellular matrix, Brown algae, Polysaccharides, Glycosyltransferases, Subcellular fractionation, Sulfotransferases