



Marine Glycobiology Group
UMR8227, Station Biologique de Roscoff
Roscoff, France

Projet de thèse [2021-2024]

Intitulé du sujet de thèse :

Production et caractérisation de glycosyltransférases recombinantes impliquées dans la biosynthèse des polysaccharides de paroi chez les algues brunes

Production and characterization of recombinant glycosyltransferases involved in the biosynthesis of cell-wall polysaccharides in brown algae

Etat de l'art

Les **algues brunes** dominent les zones côtières. Les carbohydrates sont des composés majeurs de cette biomasse, notamment en provenance des matrices extracellulaires (MEC) ou parois. La composition de la MEC chez les algues brunes diffère drastiquement des autres eucaryotes. Les principaux polysaccharides sont les **alginates** et les **polysaccharides sulfatés contenant du fucose (FCSP)** dont les fucanes. Les alginates sont utilisés comme agent texturant dans l'industrie et les **FCSP** ont un potentiel avéré en applications biomédicales. Malgré leurs importances physiologiques pour l'algue et leurs intérêts appliqués en industrie, **il n'existe quasiment aucune connaissance sur les voies de biosynthèse de ces polysaccharides.**

Chez les eucaryotes, les **glycosyltransférases (GT)** sont des enzymes clés dans la synthèse des **glycanes**, pour majorité localisée dans l'appareil de Golgi et à la membrane plasmique. Pour réaliser l'élongation du polysaccharide cible, les GT transfèrent un monosaccharide issu d'un sucre activé donneur vers un oligosaccharide accepteur. Les GT sont classées en 106 familles suivant leurs similarités de séquences. Chez les algues brunes le premier génome séquencé (2010), nous a permis de construire les voies hypothétiques de biosynthèse des glycanes. Nous avons suggéré des gènes candidats codant des GT pouvant être impliquées dans la synthèse des fucanes et des alginates. Ces candidats restent spéculatifs et **aucune GT d'algues brunes n'a jusqu'à présent été exprimée de façon recombinante et caractérisée.** Nous avons cependant obtenus des résultats préliminaires au laboratoire pour explorer cette voie.

Le projet de thèse vise à caractériser pour la 1ère fois et d'un point de vue fonctionnel, des **GT d'algues brunes, en partant de l'analyse des gènes à la production des protéines et à leur caractérisation biochimique.** L'effort sera focalisé principalement sur des GT recombinantes. Ce projet représentera une avancée significative dans la compréhension de la synthèse des polysaccharides chez ces organismes.

Résultats attendus et calendrier prévisionnel

Les résultats attendus avec leur calendrier prévisionnel sont les suivants :

- 1) **Finaliser une étude comparative** sur l'expression hétérologue de GT candidats en systèmes procaryote et eucaryotes. Trois gènes candidats d'algues brunes sont déjà disponibles en vecteurs d'expression et ont fait l'objet de tests préliminaires. Des résultats positifs

d'expression ont déjà été obtenus mais ont besoin d'être optimisés pour finaliser l'étude comparative. (mois 1-6)

- 2) **Participer aux analyses bioinformatiques** des GT d'algues brunes. Ceci sera réalisé en collaboration avec les autres membres du laboratoire et le groupe de Glycogénomique à l'AFMB de Marseille. Nous utiliserons des données transcriptomiques et génomiques exhaustives d'algues brunes. Ces analyses nous permettront de définir le contenu essentiel de GT chez les algues brunes et de réaliser des analyses phylogénétiques détaillées des GT potentiellement impliquées dans la synthèse de la MEC. Ces travaux nous permettront de mieux définir les gènes candidats qui seront utilisés pour l'expression hétérologue (mois 7-9).
- 3) **Produire et purifier une ou quelques GT en utilisant le système d'expression hétérologue sélectionné.** La purification implique l'utilisation de méthodes de chromatographie, et les échantillons seront analysés par des gels électrophorèse et western-blotting (mois 10-19).
- 4) **Caractériser des nouvelles activités GT en utilisant des techniques conventionnelles.** Ceci sera réalisé en utilisant les protéines purifiées et inclus l'utilisation de techniques de gels FACE, C-PAGE et des analyses HPLC. Les oligosaccharides accepteurs sont produits et purifiés en routine au laboratoire en utilisant des enzymes spécifiques et des protocoles HPLC (mois 20-29).
- 5) **Participer à la mise au point d'une méthode innovante de détection des activités GT basée sur la technique de la chimie click.** Ceci sera réalisé en collaboration avec l'ENSCR de Rennes qui synthétise divers substrats pour nos GT (mois 20-29).
- 6) **Intégrer l'ensemble des résultats** pour mettre en évidence les 1ères caractérisations fonctionnelles de GT chez les algues brunes. Ecriture du manuscrit et soutenance (mois 30-36).

Compétences et expérience requises

- **Compétences robustes en production de protéines recombinantes** (clonage, PCR, transformation en systèmes procaryote et eucaryotes).
- **Compétences en culture cellulaire** (labo L2)
- **Compétences en biochimie des protéines** (méthodes de purification, tests enzymatiques)
- **Connaissance des outils de bioinformatique pour l'analyse de séquences** (structure de gènes, alignements, phylogénie)
- **Bon niveau rédactionnel et bon niveau d'anglais**
- Des connaissances sur la biochimie des polysaccharides seraient un plus
- Les candidats devront avoir obtenu leur master au plus tard au 1er juillet 2021

Encadrement et financement

La thèse sera supervisée par Cécile Hervé et Mirjam Czjzek (HdR) du groupe de Glycobiologie Marine, UMR8227 à Roscoff, France. **La thèse bénéficie d'un financement ANR (obtenu) et devra démarrer au plus tard au 1er septembre 2021.**

Contact: cherve@sb-roscoff.fr ; czjzek@sb-roscoff.fr Les candidatures devront être envoyées par email jusqu'au 7 juin 2021, en incluant le CV, une lettre de motivation, les notes de M1 et M2 et des lettres de référence. Les candidatures devront également être déposées sur le portail du CNRS <https://emploi.cnrs.fr/> sous l'offre correspondante. Les candidats retenus après pré-sélection des dossiers seront auditionnés lors d'entretiens qui auront lieu entre le 14 et 25 juin.

State of the art

Brown algae are the largest biomass producers in coastal regions. This biomass is dominated by polysaccharides, notably from the extracellular matrix (ECM), also called cell-wall. This ECM features a unique biochemistry among eukaryotes. The two main polysaccharides are the **alginates** and the **fucose-containing sulfated polysaccharides (FCSPs)**, which include fucans. Alginate is used as a texturing agent in the food industry. The FCSP have extensive interest in biomedical applications, due to their ability to mimic sulfated glycosaminoglycan structures from mammalian cells. Altogether brown algal biomass is abundant, essentially different from plant biomass and displays a huge chemical diversity with bioactive potential. Despite these fundamental and practical importance, **nothing is known about the biosynthesis of the glycans of the ECM.**

The most important group of enzymes involved in glycan biosynthesis is the glycosyltransferases (GTs). A GT enzyme transfers a sugar residue from an activated nucleotide sugar to an acceptor molecule. In eukaryotes most of the GTs are localized in the Golgi apparatus with some others located in the plasma membrane. Glycosyltransferases are classified into 106 families based on amino acid sequence similarities. The release of the first genome sequences for brown algae allowed us to predict specific GT families to be involved in the synthesis of alginates and fucans. **Yet none of those proteins have been expressed in heterologous systems and characterised to date in brown algae.** However, preliminary results have been obtained in the lab for this purpose

The PhD project aims to provide a better understanding of the biosynthesis of the ECM in brown algae by examining corresponding GTs, from gene identification to protein expression, purification and biochemical characterization. The main focus will be made on recombinant GTs. This project will allow the characterisation of enzymes involved in the biosynthesis of unique carbohydrate structures.

Expected results and anticipated calendar

The expected results within a tentative calendar are:

- 1) **Finalise a comparative study** on prokaryote and eukaryote systems for the heterologous expression of candidate GTs. Three candidate genes are already available in the lab to assay their expression rates in three distinct systems. Positive results have already been obtained but need to be optimised and finalised. (months 1-6)
- 2) **Participate to the bioinformatics analyses** of GTs from brown algae. This will be made in collaboration with lab members and the Glycogenomics group at AFMB in Marseille. We will use exhaustive transcriptomic and genomic data from brown algae. We will define the core GT gene content in brown algae and perform phylogenetic analyses for candidate GTs. This analysis will help to refine the genes to be used for heterologous expression. (months 7-9)
- 3) **Produce and purify candidate GTs in the selected system for heterologous expression.** The purification implies chromatography, gels and western blotting analyses. (months 10-19)
- 4) **Characterize novel GT activities using conventional techniques.** This will be made using the purified proteins produced and includes FACE and C-PAGE gels and HPLC analyses. Oligosaccharides to be used as substrates will also be generated and purified using in-house enzymes and HPLC techniques. (months 20-29)
- 5) **Implement a novel innovating method for the detection of GT activities based on the use of the click-chemistry technique.** This will be made in collaboration with the ENSCR in Rennes who synthesise a variety of candidate substrates for our GTs. (months 20-29)
- 6) **Integrate all results** to provide the first evidence of GT functional characterisation in brown algae. Writing up and defense. (months 30-36)

Required skills and experience

- **Advanced skills in the production of recombinant proteins** (cloning, PCR, transformation in prokaryotic and eukaryotic systems)
- **Skills in cell culture** (L2 lab)
- **Skills in biochemistry of proteins** (purification methods, enzymatic assays)
- **Knowledge on bioinformatics tools for sequence analyses** (gene structure, alignments, phylogeny)
- **Good writing skills and good English level**
- Knowledge on the biochemistry of carbohydrates would be a benefit
- Foreign candidates should be fluent in French and/or English
- Candidate should have a Master diploma (or equivalent diploma), on 1st of July 2021 the latest.

Supervision and funding

The PhD will be supervised by Cécile Hervé and Mirjam Czjzek from the Marine Glycobiology group, UMR8227 at Station Biologique de Roscoff, Roscoff, France. **The PhD will be funded by an ANR funding (obtained) and should start on 1st of September 2021 the latest.**

Contact: cherve@sb-roscoff.fr ; czjzek@sb-roscoff.fr Applications can be sent by email until the 7th June 2021 and should include a CV, a cover letter, the master grades and some reference letters. The candidatures are also to be deposited on the CNRS portal <https://emploi.cnrs.fr/> under the corresponding advertisement. Interviews for the pre-selected candidates will be hold between the 14th and 25th of June.

Publications

Deniaud-Bouët et al. (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 [DOI](#)

Amos and Mohnen (2019) Critical Review of Plant Cell Wall Matrix Polysaccharide Glycosyltransferase Activities Verified by Heterologous Protein Expression. *Frontiers in Plant Science* 10, 915-915 [DOI](#)

Michel et al. (2010) The cell wall polysaccharide metabolism of the brown alga *Ectocarpus siliculosus*. Insights into the evolution of extracellular matrix polysaccharides in Eukaryotes. *New Phytol* 188, 82-97 [DOI](#)

Lombard et al. (2014) The carbohydrate-active enzymes database (CAZY) in 2013. *Nucleic Acids Research* 42, D490-D495 [DOI](#)

Moremen et al. (2018) Expression system for structural and functional studies of human glycosylation enzymes. *Nature chemical biology* 14, 156-162 [DOI](#)

Popper et al. (2011) Evolution and diversity of plant cell walls: from algae to flowering plants. *Annual Review of Plant Biology* 62, 567-590 [DOI](#)

Cock et al. (2010) The *Ectocarpus* genome and the independent evolution of multicellularity in brown algae. *Nature* 465, 617-621 [DOI](#)

Fischl et al. (2016) The cell-wall active mannuronan C5-epimerases in the model brown alga *Ectocarpus*: From gene context to recombinant protein. *Glycobiology* 26, 973-983 [DOI](#)