Université Pierre et Marie Curie

Ecole doctorale 227 Sciences de la Nature et de l'Homme : évolution et écologie

UMR8227 / Equipe Physiologie des algues et environnement abiotique

Étude du métabolisme du mannitol chez l'algue brune modèle *Ectocarpus siliculosus* : caractérisation de l'enzyme clé mannitol-1-phosphate déshydrogénase.

Par Patricia Bonin

Thèse de doctorat de Biologie

Dirigée par Catherine Boyen et Thierry Tonon

Devant un jury composé de :

Prud'homme Marie-Pascale, Professeur de l'Université de Caen	Rapporteur
Lemoine Rémi, Directeur de recherche CNRS	Rapporteur
Kloareg Bernard, Professeur UPMC	Examinateur
Flament Didier, Chercheur Ifremer	Examinateur
Boyen Catherine, Directrice de recherche CNRS	Co-Directrice de thèse
Tonon Thierry, Maître de conférences UPMC	Directeur de thèse

Je dédie cette thèse à la mémoire de ma grand-mère Rose, que je n'ai jamais connue mais dont le courage et les actes ont participés à la libération de la France. J'aurais été honorée de pouvoir entendre ses récits.

Remerciements

Tout d'abord, je souhaiterais remercier Bernard Kloareg, directeur de la Station Biologique de Roscoff, d'avoir bien voulu accepter de présider à mon jury de thèse.

Je remercie l'UPMC de m'avoir accordé le financement « Emergence UPMC 2011 », qui m'a permis de mener mes recherches dans un cadre privilégié et complètement nouveau pour moi.

Je tiens à remercier mes rapporteurs et examinateurs de thèse, le Pr. Marie-Pascale Prud'homme, le Dr. Rémi Lemoine, le Pr. Bernard Kloareg et le Dr. Didier Flament d'avoir accordé de leur temps pour juger ce travail et de participer à ce jury.

Je voudrais remercier très chaleureusement Catherine Boyen pour son soutien et ses conseils toujours avisés, qu'ils soient d'ordre scientifique ou humain. Elle m'a permis de prendre le recul nécessaire dont j'avais besoin pour progresser dans ma thèse.

Thierry, tu as toujours été présent pour m'aider. Ton esprit critique et tes connaissances si vastes ont toujours fais mon admiration. Durant ces trois années, ma plus grande peur a été de te décevoir, je l'avoue. Ta patience et ton soutien dans les moments difficiles m'ont été plus que précieux, et je ne pourrais jamais assez te remercier pour la qualité de l'encadrement dont j'ai bénéficié grâce à toi.

Agnès, Sabine, je ne serais jamais arrivée au bout sans vous. Vous m'avez tout appris. Vous m'avez supportée chaque jour, chaque heure, dans les pires moments comme dans les meilleurs. Avec patience, vous avez répondu à chacune de mes questions, encore et encore, me prodiguant précieux conseils et astuces techniques. Votre soutien moral en particulier, qui m'a été si cher lorsque tout semblait s'écrouler autour de moi, ne sera jamais oublié. Les premiers sourires du matin lorsque tout semble encore dormir, les encouragements, les gaufres (encore chaudes !) trouvées sur mon bureau… Ces petits moments qui ont rendus mon expérience à la Station si agréable ! Bref, les mots me manquent et je ne saurais coucher sur le papier la reconnaissance que je vous porte.

Sylvie, tu as souvent parlé de mon sourire. Mais le tien était toujours radieux et présent, chaque fois que je te voyais. J'ai passé mes premiers moments à la Station à travailler avec toi et ce fut toujours un très grand plaisir. Merci beaucoup pour tout. Mon seul regret aura été de ne jamais avoir pu chanter avec toi.

Je remercie également tous les membres de l'unité, qui ont toujours été présents pour aider ou pour discuter. J'ai beaucoup appris auprès de vous. Je voudrais également remercier

Maryvonne pour son aide très précieuse dans les sombres démarches administratives, Brigitte dont le sourire était toujours accueillant et Martine qui se démenait toujours pour m'arranger le plus possible. Robert, tu m'as fait découvrir avec le chant une partie de moi-même que je ne connaissais pas, je t'en remercie beaucoup.

Un grand merci à tous les thésards et post-doctorants qui ont fait une partie de leur route avec moi : Maria, avec qui j'ai passé du temps à chanter avec plaisir ; Léa et Agnès, inséparables, nous nous sommes connues bien trop tard à mon grand regret, il y a encore tant de choses que nous devons faire ensembles ! Céline, Florent, Justine, Aga et tant d'autres… Comment vous remercier pour tous ces fous-rires, ces discussions animées, ces sorties ! La vie à Roscoff n'aurait pas été la même sans vous.

Noan (et Delphine bien sûr), Fred Le Panda, Aliou… Je ne sais pas comment vous exprimer ma reconnaissance. J'ai passé tant de bons moments avec vous pendant ces années ! Vous avez toujours été là. Et j'ai le sentiment que vous le serez toujours, quoi qu'il arrive. Le moment le plus difficile dans une thèse n'est pas la rédaction du manuscrit, ni la soutenance. Le moment le plus difficile est l'adieu que l'on fait petit à petit aux amis si chers que l'on s'est trouvés durant cette grande aventure qu'est la thèse. La seule chose que je souhaite c'est que nos routes se croisent à nouveau tous ensembles.

Amandine, j'ai été plus proche de toi en quelques mois que d'autres en quelques années. Ton départ a été une rude épreuve, et ta présence, ta joie de vivre, la gentillesse qui émane de toi me manque chaque jour un peu plus… Tu as traversé la France depuis la Suisse pour me soutenir lors de cette dernière épreuve, et cela me touche énormément. Je ne pourrais jamais assez te remercier pour tout ce que nous avons vécu ensembles, de la recherche de chaton aux randonnées en passant par les soirées « jeux vidéo ». Merci infiniment pour tout et n'oublie pas, ce n'est qu'un au revoir.

Moj misiek, to sie nie konczy to jest tylko poczatek. Dziekuje ci za wszystko z calego serca. Merci pour ton soutien, ta compréhension et ton aide toujours disponible, même à 1h du matin pour retourner à la Station sauver une colonne !

Enfin, j'aimerais remercier ma famille pour m'avoir toujours encouragée à poursuivre mes rêves. Vous m'avez toujours soutenue dans mes choix, poussée à aller plus loin, à donner le meilleur de moi-même -en particulier toi papa, qui m'a donné dès mon plus jeune âge le gout des sciences, la curiosité et l'envie de comprendre-. Vous m'avez appris à positiver, mais vous m'avez aussi appris à savoir apprécier une victoire. Merci d'avoir vécu cette grande aventure avec moi.

Ces trois années auront été les plus denses, les plus difficiles et les plus heureuses de ma vie. Merci infiniment à tous pour cela.

Sommaire

Liste des abréviations 12

Introduction 13

Partie 1 : Les algues brunes : habitat et origine. 15

1) La zone intertidale: à l'interface entre environnement terrestre et marin 15

1.1) Les contraintes abiotiques du milieu intertidal 15

1.2) Les algues brunes et leur réponse aux stress biotiques 19

2) Apparition et évolution des straménopiles 20

3) *Ectocarpus* : un organisme modèle pour étudier les algues brunes 24

Partie 2 : Exemples de voies métaboliques caractéristiques des algues brunes 26

1) La photosynthèse et l'appareil photosynthétique 26

2) Les polysaccharides pariétaux fucanes et alginates 27

3) Les deux formes de stockage du carbone : la laminarine et le mannitol 28

Partie 3 : Le mannitol, une molécule ubiquitaire : applications, voies métaboliques et rôles physiologiques chez différents types d'organismes. 30

1) Le mannitol : propriétés, applications, et production commerciale 30

2) Métabolisme et rôles physiologiques du mannitol chez différents types d'organismes 31

2.1) Les bactéries 31

2.2) Les plantes terrestres 34

2.3) Les champignons 38

2.4) Les Apicomplexa 41

2.5) Les algues marines 44

Partie 4 : Caractérisation fonctionnelle de gènes/protéines d'algues brunes 53

Partie 5 : Objectifs de la thèse 58

Matériels et Méthodes 59

1) Analyses bioinformatiques 61

2) Préparation d'extraits bruts d'*E. siliculosus* 61

3) Clonage de gènes d'*E. siliculosus* dans un vecteur d'expression et production d'enzymes recombinantes chez *Es. coli* 61
3.1) Clonage des gènes d'*E. siliculosus* impliqués dans le cycle du mannitol 62
3.2) Transformation bactérienne 63
3.3) Séquençage 64
3.4) Induction de la production des protéines recombinantes 65
4) Purification des protéines recombinantes 66
4.1) Purification de protéines solubles 66
4.2) Essai de purification de protéines insolubles 68
5) Mesures des activités enzymatiques 69
6) Analyse des variations d'expression des gènes par RT-PCRq 72

Résultats 77

I) Analyse des séquences de M1PDHs de différentes origines 79
1) Recherche de M1PDHs chez les algues brunes 79
2) Analyse des séquences protéiques d'EsM1PDH 81
2.1) Comparaison des extrémités N-terminales 81
2.2) Comparaison des modules M1PDHs 82
3) Analyse phylogénétique 85
II) Caractérisation des gènes M1PDH chez *E. siliculosus* 87
1) Détermination de l'activité M1PDH endogène dans des échantillons d'algues prélevés au cours du cycle diurnal 87
2) Expression hétérologue des M1PDHs d'*E. siliculosus* chez *Es. coli* 89
2.1) Détermination de l'activité M1PDH recombinante pour les trois enzymes complètes possédant un tag histidine à l'extrémité N-terminale 90
2.2) Expression de protéines EsM1PDH complètes et tronquées, et contenant au moins un tag histidine à leurs extrémités 98
3) Purification et caractérisation biochimique de la forme tronquée d'EsM1PDH1 105
3.1) Purification de la protéine EsM1PDH1 tronquée à partir de cultures d'*Es. coli*. 105
3.2) Détermination des pH et tampons optimaux pour les mesures d'activités de réduction du F6P et d'oxydation du M1P 109
3.3) Détermination de la température optimale d'activité d'EsM1PDH1 tronquée 111

3.4) Influence de la quantité de NaCl dans le milieu réactionnel sur les deux activités d'EsM1PDH1 tronquée 112
3.5) Influence de différents cofacteurs sur les activités enzymatiques 114
3.6) Etude des paramètres cinétiques d'EsM1PDH1 tronquée 115
III) Analyse de la variation de l'expression des gènes du cycle du mannitol au cours du cycle diurnal 123
1) Les gènes de synthèse du mannitol 123
2) Les gènes de recyclage du mannitol 126

Discussion 130

1. Les M1PDHs d'algues brunes: des M1PDHs pas tout à fait comme les autres 132
2. L'enzyme EsM1PDH1 tronquée recombinante : une M1PDH avec ses propres paramètres biochimiques 135
3. L'analyse de l'expression des gènes du cycle du mannitol chez les *E. siliculosus* au cours du cycle diurnal : un premier pas pour considérer le cycle du mannitol dans sa globalité 137

Conclusion et perspectives 139

Annexes 142

Références bibliographiques 152

Liste des abréviations

ADN: acide déoxyribonucléique

ADNc : AND complémentaire

ARN : acide ribonucléique

BLAST : Basic Local Alignment Search Tool

BrEt : éthidium bromide

BSA : albumin de sérum bovin

DH : déshydrogénase

DLS : diffusion dynamique de la lumière

DNase : deoxyribonuclease

dNTP : désoxyribonucléotides triphosphate

DTT : dithiothréitol

EAOs : espèces activées de l'oxygène

EDTA : ethylene diamine tetraacetic acid

EGTA : acide éthylène glycol tétracétique

Ei. tenella : *Eimeria tenella*

Es. coli : *Escherichia coli*

E. siliculosus : *Ectocarpus siliculosus*

F6P : fructose-6-phosphate

FK : fructokinase

HAD : haloacid dehalogenase domain

HK : hexokinase

IPTG : isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside

k_{cat} : constante catalytique

K_m : constante d'affinité

LB : lysogeny broth

LDH : lactate déshydrogénase

LHC : light-harvesting complex

M1P : mannitol-1-phosphate

M1Pase : mannitol-1-phosphate phosphatase

M2DH : mannitol-2-déshydrogénase

MOPS : acide 2-morpholinoéthanesulfonique

NAD : nicotinamide adénine dinucléotide

NADH : nicotinamide adénine dinucléotide réduit

NADPH : nicotinamide adenine dinucleotide phosphate

PCR : polymérase chain reaction

PSLDR : Polyol-specific long-chain dehydrogenases and reductases

PTS : système phosphonoylpyruvate/carbohydrate phosphotransferase

PVP : polyvinyl pyrrolidone

RNAi : RNA interference

RNA-seq : RNA sequencing

RT-qPCR: real time quantitative polymérase chain reaction

SDS-PAGE : sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis

SOC : Super Optimal Broth

TBS-Tween : tris-buffered saline with Tween 20

Tris : trishydroxyméthylaminométhane

UV : ultra-violet

Introduction

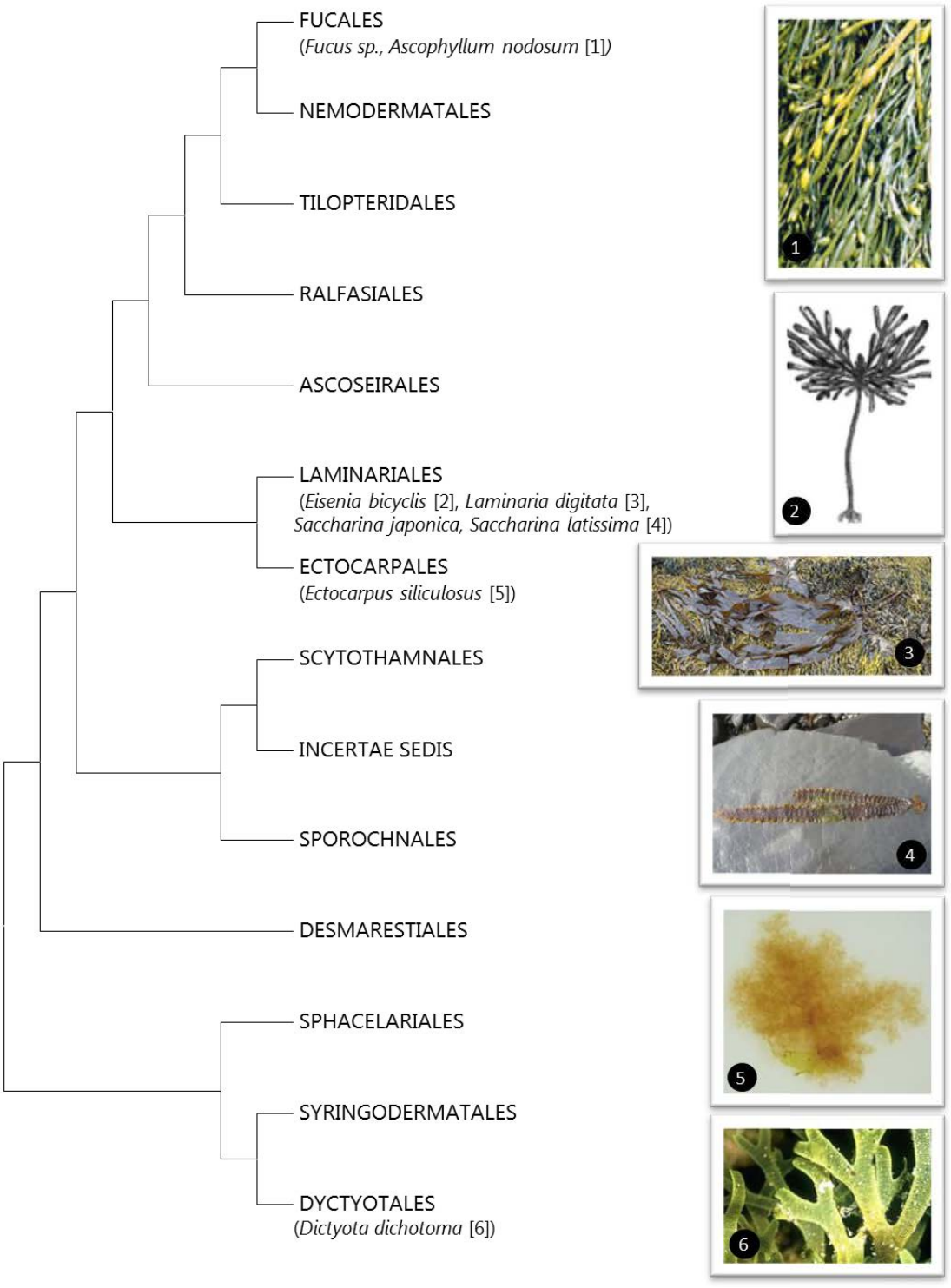


Figure 1 : **Phylogénie simplifiée des algues brunes** reconstruite à partir de Silberfeld *et al.* (2010). Les branches ne donnent pas d'indications quant aux distances évolutives. Les différents ordres sont listés, ainsi que certaines espèces mentionnées dans ce manuscrit. Les photos sont issues de l'encyclopédie libre Wikipédia.

Partie 1 : Les algues brunes : habitat et origine.

1) La zone intertidale: à l'interface entre environnement terrestre et marin

Les algues brunes (Phéophycées) sont des organismes photosynthétiques multicellulaires, majoritairement marins, que l'on retrouve principalement dans les zones côtières des régions tempérées (Mann *et al.* 1973). On les retrouve aussi, dans une moindre mesure, au niveau de sites de grandes profondeurs dans certaines régions tropicales (Graham *et al.* 2007). Au sein de ces différents types d'environnement, les algues brunes, dont celles de l'ordre des Fucales et des Laminariales (« les grandes algues » ou kelps) (**Figure 1**), ont un rôle écologique important car elles permettent de structurer des écosystèmes au sein desquels vivent des milliers d'espèces, de façon similaire au rôle des arbres et des forêts dans la végétation terrestre.

1.1) Les contraintes abiotiques du milieu intertidal

Dans les zones côtières, ou zones intertidales, qui représentent une interface entre le milieu terrestre et le milieu marin, les algues brunes sont soumises à des changements réguliers et importants de leur habitat, imposés notamment par le balancement des marées. Parmi les stress abiotiques auxquels sont exposés ces organismes, on peut distinguer l'action mécanique des vagues, la lumière (dont les ultra-violets), la dessiccation, la salinité, le pH, et la pollution (**Figure 2**). Ces paramètres sont à l'origine notamment de la distribution en étage des algues brunes au niveau de la zone intertidale (aussi appelé estran), car toutes ces algues n'ont pas les mêmes capacités pour s'adapter aux contraintes abiotiques (Davison and Pearson, 1996). Ainsi, certaines espèces sont retrouvées principalement en haut de cette zone (ex. *Ascophyllum nodosum*), au milieu (différentes espèces de Fucus), et donc très exposées aux marées, ou dans la zone infralittorale qui n'est émergée que lors des grandes marées (ex. *Laminaria digitata*).

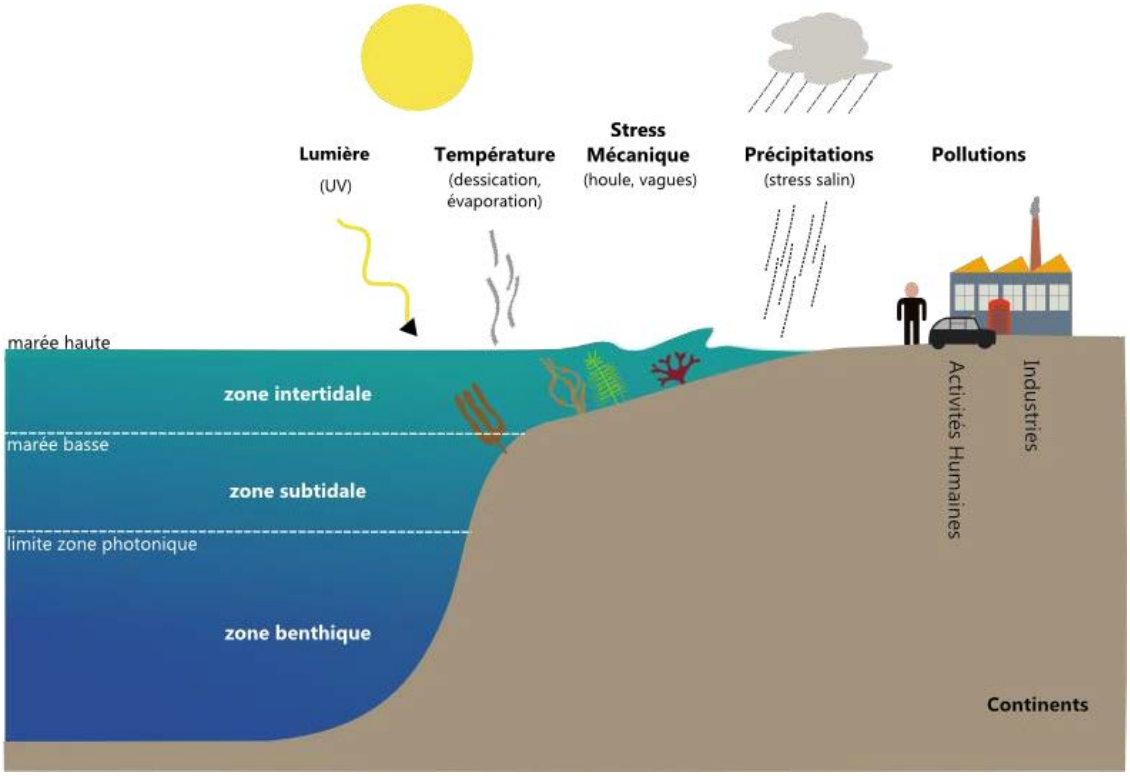


Figure 2 : **Différents stress abiotiques auxquels sont confrontés les organismes de la zone intertidale. La plupart de ces stress peut entraîner la production d'espèces activées de l'oxygène liées à un stress oxydant** (Davison and Pearson, 1996)**.**

Les stress mécaniques dus à l'action des vagues et du courant ne permettent qu'à des espèces bien adaptées de coloniser les zones les plus exposées. En effet, ces algues doivent être capables de résister aux mouvements incessants causés par les déplacements d'eau plus ou moins puissants et rapides, dont les effets peuvent se traduire par des frictions au niveau de la fronde des algues, leur détachement d'un substrat solide, l'envasement et l'ensablement, et le dépôt de fines gouttelettes d'eau très concentrées en sel.

Les rayons lumineux, notamment les UVs, sont absorbés par l'eau. C'est pourquoi d'importants changements dans l'intensité et dans la nature de la lumière à laquelle sont soumises les algues brunes ont été constatés suite à l'alternance des immersions et émersions. La lumière est nécessaire à la photosynthèse, et donc à la survie des organismes autotrophes, mais peut également causer de graves dommages cellulaires par la production de radicaux libres si elle est trop intense, ou directement dans l'ADN dans le cas des rayons UVs. Enfin, la lumière du soleil a un impact direct sur la température du milieu de vie des organismes.

Si la température de l'eau varie peu en plein océan, les changements sont plus forts le long des zones de balancement des marées. En effet, il est possible d'observer des variations allant

jusqu'à 10°C dans la même journée au niveau de la zone intertidale, selon que la marée est basse ou haute et le temps ensoleillé ou nuageux. Ces différences importantes se traduisent dans les cellules par des changements moléculaires importants. Ainsi, une hausse de température va généralement provoquer un phénomène de respiration accru, et donc une diminution du dioxygène soluble. L'environnement est alors appauvri en oxygène.

Le pH est un paramètre important pour la physiologie des organismes, et les écosystèmes marins subissent actuellement une diminution du pH, phénomène aussi appelé acidification des océans. Il s'explique notamment par l'augmentation de la quantité de CO_2 dissoute dans la mer. Ce CO_2 réagit avec des molécules d'eau pour former de l'acide carbonique (H_2CO_3), qui se dissout ensuite pour former des ions H^+ et bicarbonate (HCO_3^-). Les ions H^+ sont neutralisés par des ions carbonate (CO_3^{2-}), ce qui entraîne une production accrue de bicarbonate, et une diminution de la quantité d'ions carbonate dans l'eau de mer. En plus d'avoir un effet sur le pH, ces modifications altèrent donc la disponibilité en sources potentielles de carbone pour les macroalgues.

Les zones intertidales présentent un autre facteur de stress important: la dessiccation. En effet, à marée basse, les algues peuvent perdre, de façon réversible, jusqu'à 90% de leur quantité d'eau intracellulaire (Dring and Brown, 1982). Les conséquences physiologiques de la dessiccation sont souvent similaires à celles dues au stress hypersalin, notamment des variations d'osmolarité et une augmentation importante de la concentration intracellulaire des ions.

En lien avec le phénomène de dessiccation, les algues peuvent aussi subir de fortes variations en salinité. Il a ainsi été observé que des stress salins entraînaient des changements d'expression de gènes similaires à ceux observés dans la zone intertidale chez l'algue rouge modèle *Chondrus crispus* (Collén *et al.*, 2007). Les changements de salinité dans l'habitat des algues peuvent être dus à l'évaporation à marée basse, ce qui entraîne une hypersalinité dans l'environnement immédiat des algues, et à la pluie et l'écoulement d'eau douce, qui ont un effet inverse. Les organismes vivants dans un tel milieu doivent donc être capables de s'adapter rapidement pour tolérer des stress hypo et hypersalins de différentes intensités. Au niveau physiologique, il a par exemple été montré que ces stress altèrent les capacités photosynthétiques de l'algue brune modèle *Ectocarpus* (Dittami *et al.*, 2009). Ces observations ont été complétées par des analyses transcriptomiques utilisant des puces à ADN. Ainsi, trois conditions ont été testées, un stress hypersalin, un stress hyposalin, et une condition de stress oxydant. Il a ainsi été montré que 70% des gènes exprimés chez cette algue brune ont un patron d'expression modifié par au moins une des conditions de stress abiotique, ce qui contraste avec les observations réalisées chez des plantes terrestres

soumises à des stress similaires; en effet, ce pourcentage varie de 1 à 30% chez ces organismes. De plus, une analyse globale des résultats indique que lors d'un stress abiotique, les gènes codant pour les protéines impliquées dans des processus cellulaires tels que le métabolisme primaire et la croissance sont réprimés, alors que ceux correspondant à des protéines impliquées dans les voies d'utilisation d'énergie (comme la dégradation des lipides, l'autophagie et la dégradation de protéines par protéasome), dans la production de molécules osmoprotectantes, et le trafic cellulaire, sont activés (Dittami *et al.* 2009). Ces résultats obtenus au niveau transcriptomique ont ensuite été intégrés avec des résultats de profilage métabolique ciblé, ce qui a permis de confirmer certaines des observations décrites, notamment au niveau du métabolisme des acides aminés et des acides gras (Dittami *et al.* 2011).

Enfin, l'activité humaine (qu'elle soit localisée au niveau côtier ou non) n'est pas sans conséquence sur le milieu marin, et en particulier le milieu intertidal, où l'on retrouve de nombreux polluants. Qu'il s'agisse de métaux lourds, des hydrocarbures, des produits phytosanitaires ou différents types de déchets, ces molécules d'origine anthropogénique représentent de nouveaux facteurs de stress auxquels les organismes marins, dont les algues brunes, doivent faire face. De nombreux travaux ont été réalisés chez ces organismes pour étudier leur réponse aux stress par les métaux lourds, en particulier le cuivre. Il a ainsi été observé chez plusieurs algues brunes que ce métal induisait une accumulation intracellulaire d'espèces activées de l'oxygène (EAOs) (Mithöfer *et al.*, 2004), et avait un impact sur la physiologie des algues, en particulier sur leur appareil photosynthétique (Ritter *et al.*, 2008). De plus, des expériences réalisées chez *L. digitata* ont permis d'observer l'induction d'un certain nombre de gènes de stress en présence de 300 µg/L de $CuCl_2$ après 6h, 24h, 48h et 72h d'incubation (Ritter *et al.*, 2008), ainsi que la production d'oxylipines (dérivés oxygénés des acides gras) à 18 atomes de carbone (type plante) et à 20 atomes de carbones (type animal). Ces deux types d'oxylipines ont aussi été identifiés chez *E. siliculosus* soumis à un stress cuivrique de quelques heures, et ces résultats ont été complétés par des expériences de profilage transcriptomique par puces à ADN (Ritter *et al.*, 2014). Ainsi, il a été observé l'induction de gènes codant pour des transporteurs ABC, connus pour être impliqués dans la résistance à plusieurs drogues chez différents organismes, pour des ATPases de type P_{1B}, et pour une bromoperoxydase à vanadium, cette enzyme étant impliquée dans le métabolisme des halogénures qui correspond à un des systèmes de détoxification des EAOs chez les algues brunes. Ces résultats très récents chez *E. siliculosus*, obtenus après un stress court, complètent des données qui ont été obtenues chez cette algue pour des stress plus longs (plusieurs jours) et par une

approche méthodologique différente, basée sur la mise en œuvre d'expériences de protéomique différentielle (Ritter *et al.*, 2010).

1.2) Les algues brunes et leur réponse aux stress biotiques

Jusqu'à présent, la majorité des travaux pour étudier au niveau moléculaire les réponses aux stress biotiques chez les algues brunes ont été réalisés chez *L. digitata*. Dans la plupart des expériences, les stress n'ont pas été appliqués par incubation directe avec des agents pathogènes, mais en mimant ce type de conditions grâce à des éliciteurs. Ainsi, chez *L. digitata*, il a été montré que les oligoguluronates, qui correspondent à une fraction bien particulière de la paroi des algues brunes, induisent un burst oxydatif (Küpper *et al.*, 2001). Ceci correspond à la production rapide, massive et transitoire de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), et ce phénomène n'a pas lieu si les algues sont traitées avec du DPI (diodorium diphénylène), un inhibiteur des NADPH oxidases de mammifères, avant de faire l'élicitation. Un burst oxydatif a aussi été détecté après application de LPS (lipopolysaccharides) provenant de la bactérie *Salmonella arbotus equi* (Küpper *et al.* 2006), comme cela est aussi le cas chez les plantes terrestres.

L'émission des EAO est l'une des premières réponses de l'algue face à l'attaque d'un pathogène, mais ce n'est pas la seule. Un autre système de défense rapide est l'émission de composés organiques halogénés volatiles dans l'environnement marin (VHOC). En effet, chez *L. digitata*, les jeunes algues peuvent concentrer des quantités très importantes d'iode (jusqu'à 4,7% de leur poids sec) (Küpper *et al.*, 1998). Cette concentration de composés halogénés est catalysée par les haloperoxydases à vanadium (vHPO). Ces enzymes jouent un rôle important dans l'apport en iode et la production de composés carbonés halogénés (Leblanc *et al.*, 2006). Elles permettent aussi de détoxifier rapidement le peroxyde d'hydrogène produit par le burst oxydatif. Enfin, elles interfèreraient dans le système de signalisation bactérien pour la dispersion de biofilms.

Un autre mécanisme impliqué dans les réactions de défense des algues face à l'attaque d'un pathogène est l'oxygénation (enzymatique ou non-enzymatique) d'acides gras qui aboutit à la production de dérivés oxygénés appelés oxylipines. Ces molécules sont connues pour être impliquées notamment dans des voies de signalisation chez les plantes terrestres et les animaux. La synthèse des oxylipines est initiée par des phospholipases et des galactolipases qui libèrent des acides gras à partir des lipides membranaires. Chez les algues, les oxylipines sont de la famille des octadécanoïdes et des eicosanoïdes (prostaglandines et leucotriènes) (Potin *et al.*, 2002). Ce

phénomène a été étudié chez *L. digitata*: suite à l'élicitation par des LPS, et il a été observé une accumulation de dérivés oxydés des acides linolénique et eicosapentaénoïque, en même temps qu'un relargage d'acides gras libres (Küpper *et al.*, 2006). Il est intéressant de signaler que cette production d'oxylipines n'a pas lieu qu'en condition de stress biotique puisque ce phénomène a aussi été observé chez les algues brunes lors de stress cuivrique, comme indiqué dans le dernier paragraphe de la partie 1.1. Les algues brunes sont aussi capables de produire d'autres types de composés, notamment lors d'attaques par des organismes brouteurs. Ces organismes induisent en effet la production de composés tels que des terpènes, comme le pachydictol A et le dictyol B acétate chez *Dictyota menstrualis* (aussi appelée *Dictyota dichotoma* var. *menstrualis*), ou des phlorotannins chez les fucales (Cosse *et al.*, 2008).

L'influence de l'élicitation par des oligoguluronates a aussi été montrée au niveau transcriptomique chez *L. digitata*. L'approche macroarray utilisée, complétée par de la PCR quantitative, a permis de mettre en évidence l'induction de gènes impliqués dans la réponse au stress oxydatif, la production de métabolites secondaires antimicrobiens, dans le renforcement de la paroi, et l'induction d'une nouvelle halopéroxidase dépendante du vanadium (Cosse *et al.*, 2009). Ces résultats ont été combinés avec une analyse pharmacologique et ont permis d'émettre un certain nombre d'hypothèses quant à la réponse transcriptionnelle précoce de défense chez *L. digitata*, avec des similarités par rapport à ce qui a été identifié chez les plantes, mais aussi des originalités, notamment avec l'implication du métabolisme de l'iode.

Récemment, deux mécanismes importants liés à la dissémination de signaux impliqués dans les mécanismes de défense ont été mis en évidence chez *L. digitata*. Ainsi, un mécanisme similaire au « priming » chez les plantes terrestres y a été découvert. En effet, il a été montré que l'incubation d'une algue élicitée par des oligoguluronates avec une autre algue non élicitée permet d'induire chez cette dernière une réponse de défense plus rapide et plus efficace en cas d'attaque par un pathogène (Thomas *et al.*, 2011). De plus, des expériences basées sur l'élicitation de certaines zones de la lame de *L. digitata*, et des tests pour mettre en évidence des réactions de défense dans des parties non élicitées de la même algue ont permis de montrer l'existence d'une réponse systémique médiée notamment par la libération d'acides gras polydésaturés qui aboutit à la mise en place de réactions de défense pour conférer une résistance au broutage (Thomas *et al.*, 2014).

2) Apparition et évolution des straménopiles

Au sein des eucaryotes, les algues brunes font partie du groupe des straménopiles ou hétérochontes (**Figure 3**). Celui-ci regroupe notamment les oomycètes, les diatomées, et les phéophycées. Les straménopiles sont caractérisés entre autre par la présence de deux flagelles, l'un plumeux avec des mastigonèmes tubulaires tripartites, l'autre lisse. Il s'agit d'un groupe très diversifié, contenant aussi bien des organismes unicellulaires (bicosoécides, pseudociliés) que des algues géantes multicellulaires (phéophytes). De plus, il comporte des organismes hétérotrophes comme les oomycètes, ou photosynthétiques, ces derniers étant regroupés sous le nom d'ochrophytes et correspondent notamment aux diatomées et aux algues brunes. En fait, les ochrophytes contiennent une grande diversité d'algues, appartenant à différentes classes, dont les Aurearenophycées, les Bacillariophycées (les diatomées), les Eustigmatophycées, les Dictyochophycées, les Synchromophycées, les Chrysophycées, les Chrysomerophycées, les Bolidophycées, les Xanthophycées, les Synurophycées, les Schizocladiophycées, les Phéophycées (algues brunes), les Raphidophycées, les Pinguiophycées, les Phaeothamniophycées, les Picophages et les Pelagophycées (Baldauf, 2008; Brown and Sorhannus, 2010).

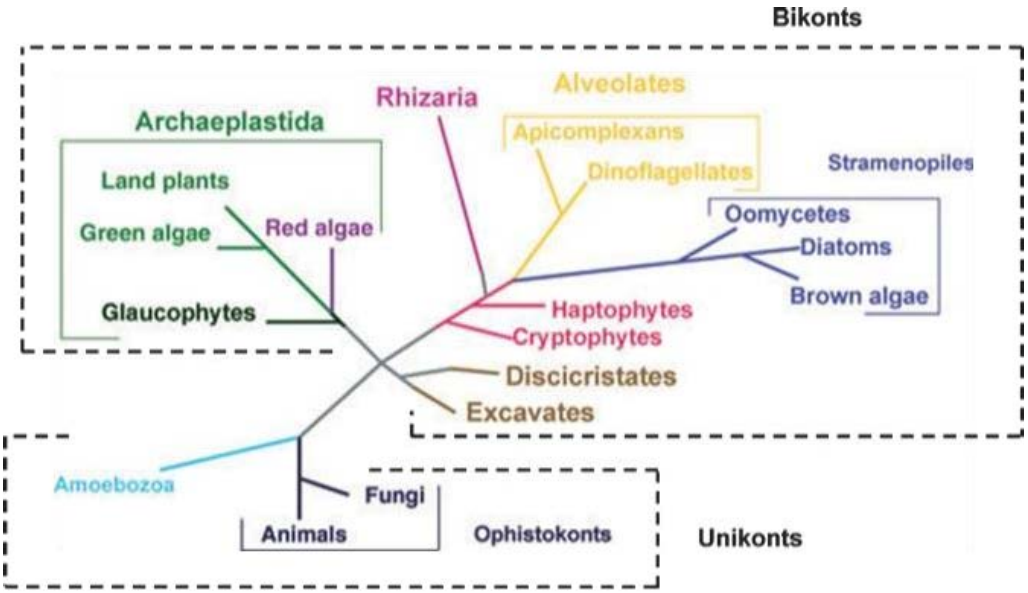


Figure 3 : Phylogénie simplifiée des eucaryotes, adaptée de Baldauf 2008 (Michel *et al.*, 2010a).

Le plus vieux fossile d'ochrophyte retrouvé (*Palaeovaucheria*) suggère leur apparition il y a environ 1 milliard d'années (Brown and Sorhannus, 2010). Cependant, de nombreuses

contradictions quant à la datation de leur apparition ont entraîné des analyses plus poussées, utilisant des marqueurs moléculaires, pour déterminer leur origine. Ainsi, d'après ces études, les algues hétérochontes seraient apparues il y a environ 500-600 millions d'années, entre le paléozoïque et le milieu du mésozoïque (Brown and Sorhannus, 2010), et le groupe des algues brunes serait apparu il y a environ 200 millions d'années, c'est-à-dire pendant le Jurassique (Silberfeld *et al.*, 2010). Les différences entre les résultats provenant de datations réalisées à partir des fossiles et ceux obtenus par analyse de marqueurs moléculaires remettent en cause la validité taxonomique des fossiles considérés comme des ochrophytes. Avant l'utilisation de marqueurs moléculaires pour les analyses phylogénétiques, il était difficile de discriminer et classer certains organismes photosynthétiques parmi les ochrophytes à partir d'analyses ultrastructurales. En effet, quand des similarités étaient observées au niveau des plastes, elles étaient souvent accompagnées de divergences au niveau cytoplasmique ou au niveau de la structure des flagelles. De plus, la difficulté des analyses morphologiques et ultrastructurales pour la classification et la taxonomie au sein des ochrophytes est compliquée par l'histoire évolutive de ces organismes, qui sont issus d'une endosymbiose secondaire accompagnée par de nombreux transferts latéraux de gènes.

L'endosymbiose primaire est l'incorporation d'une cyanobactérie par un organisme eucaryote hétérotrophe (**Figure 4A et B**), et a permis l'apparition des organismes de la lignée rouge (les algues rouges), de la lignée verte (les algues vertes et les plantes terrestres), et des glaucophytes. Ainsi, les plastes résultant de ce type d'évènement ont deux membranes qui correspondent aux membranes interne et externe de la cyanobactérie. De plus, on observe des pertes importantes d'information génomique et le transfert massif de gènes originaires du génome cyanobactérien dans le noyau de l'hôte. Les protéines codées par ces gènes continuent à fonctionner dans le plaste et y sont adressées grâce à un peptide signal retrouvé dans l'extrémité N-terminale de ces protéines et permettant le passage à travers les deux membranes chloroplastiques.

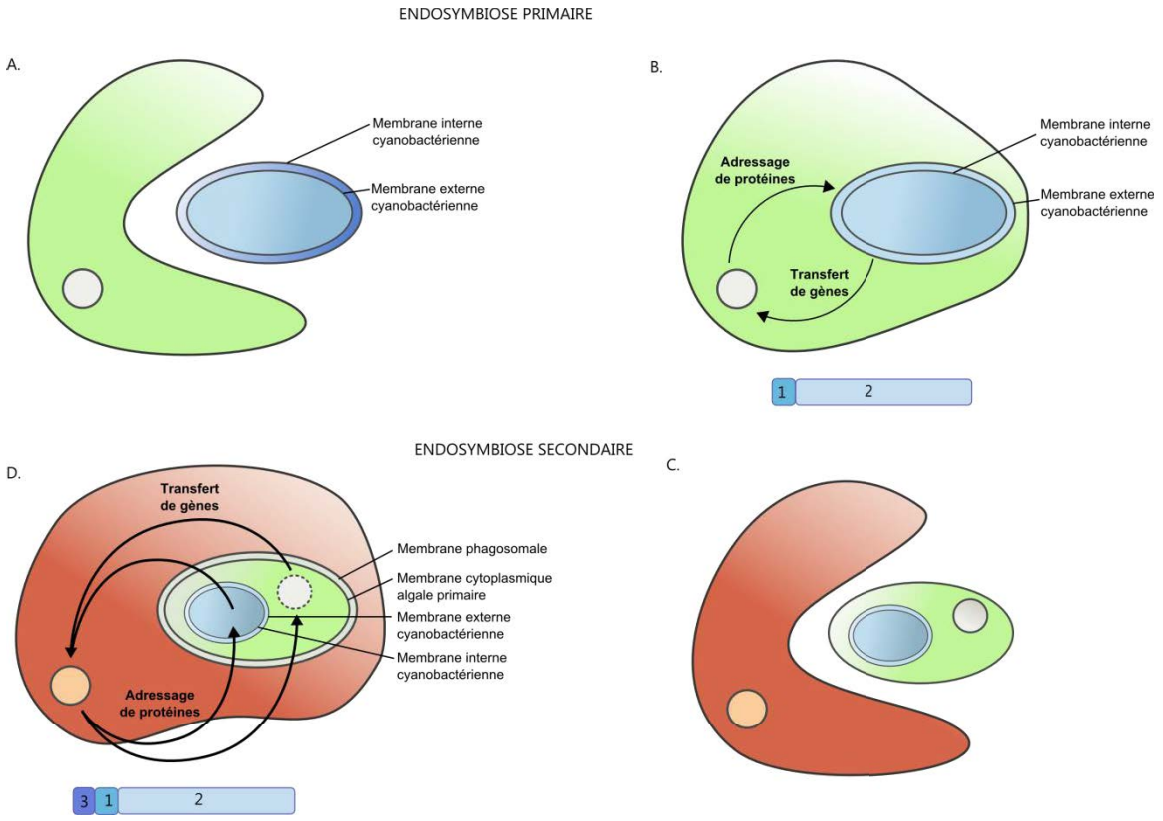


Figure 4 : Schématisation de l'endosymbiose primaire et secondaire (adapté de Keeling, 2004). Les panels A et B représentent l'endosymbiose primaire. (A) Une cyanobactérie Gram-négative est internalisée par un organisme eucaryote hétérotrophe. (B) Un nombre important de gènes du cyanobionte est transféré dans le génome de l'hôte, conduisant à la production de protéines (2) présentant des peptides de transit (1) ; le plaste est entouré de deux membranes, dérivées de la membrane interne et externe de la cyanobactérie. C et D représentent l'endosymbiose secondaire ayant permis entre autre l'apparition des straménopiles et de certaines dinoflagellées (C). Une algue rouge est internalisée par un organisme eucaryote hétérotrophe différent de celui impliqué dans l'endosymbiose primaire. (D) Certains gènes de l'algue rouge sont transférés dans le génome de l'hôte, ce qui conduit à des protéines (2) ayant un peptide de transit (1) et un peptide signal (3). Les plastes résultant de la seconde endosymbiose sont à l'origine entourés de 4 membranes (chez les algues brunes par exemple), mais, chez certains organismes, il y a eu une perte de la membrane cytosolique de l'algue rouge et les plastes résultant ne sont donc entourés que de 3 membranes (certaines dinoflagellées).

L'endosymbiose secondaire, quant à elle, est l'incorporation d'une algue (rouge ou verte) par des eucaryotes hétérotrophes différents de celui impliqué dans l'endosymbiose primaire (**Figure 4C et D**). L'endosymbiose secondaire d'une algue verte est à l'origine de trois types d'organismes, les Euglénophytes, les Chlorarachniophytes (Rhizaria), et certaines dinoflagellés, alors que celle impliquant une algue rouge a permis l'apparition des cryptophytes, des haptophytes, de certaines autres dinoflagellés, et des straménopiles, donc des algues brunes

(Keeling 2004; Falkowski *et al.* 2004). Les organismes issus d'une endosymbiose secondaire contiennent des plastes ayant trois ou quatre membranes. Les deux membranes internes correspondent aux deux membranes du plaste primaire (donc de la cyanobactérie de l'endosymbiose primaire), la troisième membrane correspond à celle de l'algue endosymbiotique et enfin la quatrième est dérivée de la vacuole phagocytaire de l'hôte. Chez les straménopiles comme chez les haptophytes, les plastes dérivés de l'algue rouge possèdent quatre membranes, et la plus externe est continue au réticulum endoplasmique et à l'enveloppe nucléaire (Keeling, 2004). Le noyau de l'algue incorporée est fortement réduit et la majorité des gènes codant les protéines adressées au plaste dans cette algue primaire est transférée dans le noyau de l'hôte secondaire. Le peptide d'adressage est dans ce cas bipartite: un premier peptide signal permet l'adressage de la protéine au système endomembranaire et la traversée des membranes les plus externes du chloroplaste, et un second peptide permet le passage de la protéine à travers les membranes les plus internes (Keeling, 2004).

3) ***Ectocarpus* : un organisme modèle pour étudier les algues brunes**

En 2004, l'organisme *E. siliculosus* a été proposé comme organisme modèle pour l'étude des algues brunes (Peters *et al.*, 2004) du fait de son génome plus petit que celui des laminariales ou des fucales, un cycle de vie court (3 mois), une fertilité importante, la possibilité de faire des cultures axéniques, et son potentiel pour les études génétiques. Son génome a été publié en 2010 (Cock *et al.*, 2010), et son étude a permis l'émergence de nouvelles recherches de type génomique (Billoud *et al.*, 2014) et génétique (Heesch *et al.*, 2010), avec notamment la création d'une carte génétique. Dans le cadre de l'émergence d'*E. siliculosus* comme organisme modèle, d'autres méthodologies ont été développées, notamment pour réaliser des expériences à haut débit et à l'échelle du génome. Il s'agit d'approches de type transcriptomique comme la PCRq (Le Bail *et al.* 2008) ou les puces à ADN (Dittami *et al.* 2009), protéomique basée sur de l'électrophorèse bi-dimensionnelle (Ritter *et al.* 2010), de profilage métabolique (Gravot *et al.* 2010), et plus récemment la construction d'un modèle métabolique (Prigent *et al.*, 2014). Cependant, un certain nombre d'outils de génomique fonctionnelle disponibles chez d'autres types d'organismes ne le sont pas encore pour *E. siliculosus*, notamment la transformation et le RNAi ; l'application de cette dernière technique a quand même été démontrée récemment chez *Fucus* (Farnham *et al.*, 2013),

mais est pour l'instant difficilement transférable à *E. siliculosus,* principalement à cause de la petite taille du zygote d'*E. siliculosus* par rapport à celle du zygote de *Fucus* pour l'injection d'ARN double brin.

Ces différentes approches ont été considérées pour étudier plusieurs aspects de la biologie des algues brunes, notamment leur développement et leur cycle de vie (Coelho *et al.*, 2011; Le Bail *et al.*, 2011), l'évolution au sein du genre *Ectocarpus* (Peters et al., 2010; Dittami et al., 2011c), le métabolisme (Gravot *et al.* 2010; Michel *et al.* 2010a; Meslet-Cladière *et al.* 2013; Prigent *et al.* 2014), ainsi que l'adaptation et l'acclimatation à des changements environnementaux (Dittami *et al.* 2009, 2011, 2012; Ritter *et al.* 2010, 2014). L'analyse des bases moléculaires de certaines voies métaboliques et de la réponse aux stress abiotiques chez *E. siliculosus* a suggéré que le métabolisme des algues brunes reflète une structure chimérique due aux endosymbioses primaire et secondaire, ainsi qu'aux transferts latéraux de gènes.

Partie 2 : Exemples de voies métaboliques caractéristiques des algues brunes

1) La photosynthèse et l'appareil photosynthétique

Lorsqu'elles sont immergées, les algues brunes ne reçoivent qu'un spectre de lumière réduit, dû à l'absorption d'une partie des rayons lumineux par l'eau. En effet, la lumière rouge (650 nm) est absorbée en grande partie dès 10 m de profondeur, alors que les lumières verte (500 nm) et bleue (450 nm) ne le sont pas de manière significative. Ces différences d'exposition à différents types de lumière sont à rapprocher avec des changements au niveau de la composition en pigments dans les antennes lumineuses chez les algues brunes par rapport à ce qui est connu chez les plantes terrestres. En effet, les centres réactionnels des phéophycées sont majoritairement composés de chlorophylle a et c, et de fucoxanthine (qui est un caroténoïde); de plus, ceux associés au photosystème I sont enrichis en violaxanthine (Charrier *et al.*, 2008). *E. siliculosus* possède dans son génome les gènes correspondant aux enzymes des voies de biosynthèse du MEP (methyl erytritol phosphate) et du MVA (mevalonate cytosolique), permettant ainsi la synthèse d'isoprènes et la formation du β-carotène. Celui-ci pourra être transformé en zéaxanthine grâce à deux enzymes de type cytochrome P450. De plus, la violaxanthine est le précurseur de la fucoxanthine, molécule permettant d'utiliser plus efficacement la lumière bleue et qui est aussi responsable de la couleur brune des phéophycées (Cock *et al.*, 2010).

Les pigments accessoires, chlorophylle c et fucoxanthine, différents de ceux présents chez les plantes terrestres, ont chez les algues brunes le même rôle que ces plantes car ils participent au transfert d'énergie vers les centres réactionnels. La violaxanthine, quant à elle, n'est pas impliquée dans la concentration de l'énergie lumineuse mais dans la photoprotection. L'analyse du génome d'*E. siliculosus* a révélé une forte abondance de gènes codant pour des protéines impliquées dans la formation du complexe LHC (light-harvesting complex), qui pourrait s'expliquer par le caractère très changeant des conditions physico-chimiques au niveau de l'environnement intertidal, ce qui nécessiterait un contrôle important de l'efficacité de la photosynthèse (Cock *et al.*, 2010). Ces LHC peuvent être de type I et de type II chez les organismes photosynthériques, sachant que les plus abondants dans les membranes des thylakoïdes sont les LHC de type II. Différents types de

protéines constituent ces LHC, notamment des protéines de liaison à la chlorophylle a/b (les CBPs pour chlorophyll binding proteins), à la fucoxanthine, et des protéines induites en cas de stress lumineux. Une des particularités chez *E. siliculosus* est la présence d'un nombre élevé de gènes codant pour des protéines de type LI818 induits en conditions de stress abiotiques, comme cela a été aussi observé chez certains organismes, dont l'algue verte *Chlamydomonas* et les diatomés (Dittami *et al.* 2010), mais qui sont absents chez *Arabidospis*. Ces différences s'expliquent par la présence chez ces organismes de mécanismes distincts pour gérer le surplus de lumière en conditions de stress altérant la croissance.

2) Les polysaccharides pariétaux fucanes et alginates

Comme les plantes, les algues brunes possèdent une paroi autour de leurs cellules. Elle leur confère résistance et forme. Cependant, la nature des polysaccharides constituant la paroi et leur organisation est en partie différente entre ces organismes. En effet, on retrouve chez les premières de la cellulose, de l'hémicellulose et des pectines. Chez les phéophycées par contre, la proportion de cellulose est moins importante et l'on retrouve de l'hémicellulose mais surtout des alginates et des fucanes (Popper *et al.*, 2011). La phase squelettique, composée de cellulose, est la plus importante chez les plantes terrestres alors que chez les algues brunes c'est la phase matricielle constituée par l'hémicellulose, les alginates et les fucanes qui est dominante. Le composé majoritaire est l'alginate, qui est un polysaccharide anionique contenant les monomères acide mannuronique et acide guluronique. La rigidité de la paroi dépend notamment des proportions entres ces deux monomères : plus la quantité d'acide guluronique est élevée, plus la paroi est rigide. Les alginates sont utilisés dans différents types d'industrie, notamment en agroalimentaire comme agents texturants. Les fucanes sont quant à eux des polysaccharides sulfatés, absents chez les plantes terrestres. La capacité des algues brunes à synthétiser l'alginate a été conférée par transfert latéral de gènes issus d'Actinobactéries après l'apparition des ochrophytes (Michel *et al.*, 2010b; Deniaud-Bouët *et al.*, 2014). Une enzyme impliquée dans cette voie de biosynthèse chez *E. siliculosus*, la GDP-mannose déshydrogénase, a été surexprimée chez *Es. coli* et sa forme recombinante caractérisée (Tenhaken *et al.*, 2011). De plus, des gènes de C-5-épimérase, enzymes responsable de la dernière étape de la synthèse des alginates qui correspond à l'épimérisation de l'acide mannuronique en acide guluronique, ont été caractérisés chez *L. digitata* (Nyvall *et al.*, 2003). Des études ultérieures ont montré que certains gènes de C5-epimerase sont activés

spécifiquement en condition de stress biotique, pouvant ainsi conduire à des modifications de la paroi en réponse à différents stress environnementaux (Tonon *et al.*, 2008).

En plus de son utilisation dans différentes industries, l'alginate des algues brunes représente une source potentielle de polysaccharides pour la production de molécules telles que des acides dicarboxyliques furanes qui peuvent être utilisés pour produire des polyesters, et du bioéthanol. Ces macroalgues représentent en effet une biomasse intéressante dont le potentiel pour développer un processus de bioraffinerie a été considéré par différents travaux de recherche, (notamment van Hal *et al.*, 2014). Ces auteurs décrivent un système basé sur la kelp *Saccharina latissima*, à partir de laquelle différentes fractions peuvent être exploitées, dont les alginates pour la production de polyesters. Concernant la biosynthèse de bioéthanol, différents types de glucides présents chez les algues brunes peuvent être considérés. Une fois récoltées, les algues subissent un prétraitement pour enlever les débris et autres corps étrangers. Une hydrolyse est ensuite effectuée pour libérer les monomères de sucres (Wei *et al.*, 2013). Leur conversion en bioéthanol se fait ensuite par fermentation. Il est possible pour cela d'utiliser des souches non modifiées de *Saccharomyces cerevisiae* par exemple, mais le rendement final obtenu ne dépasse pas les 40% du rendement théorique maximal. De plus, cette technique ne permet pas de fermenter le mannitol. Seuls quelques microorganismes ont cette capacité, comme *Zymobacter palmae* ou *Pichia angophorae*. Pour améliorer ces rendements, de l'ingénierie métabolique a été mise en œuvre pour obtenir des souches d'*Es. coli* et de *S. cerevisiae* capables de co-métaboliser l'alginate, le glucose et le mannitol. Dans le cas d'*Es. coli*, un fragment d'ADN de *Vibrio splendidus* a été cloné pour permettre la dégradation, le transport, et le catabolisme des alginates, en plus de l'optimisation de la production d'éthanol (Wargacki *et al.*, 2012). Ainsi, un rendement de plus de 80% du rendement maximal théorique a été obtenu, sans prétraitement chimique ou enzymatique des algues. Une approche similaire a été mise en place chez la levure en insérant en plus un gène de transport des alginates, ce qui a permis d'observer un rendement final allant jusqu'à 83% du rendement maximal théorique (Enquist-Newman *et al.*, 2014).

3) Les deux formes de stockage du carbone : la laminarine et le mannitol

Chez les algues brunes, comme chez les plantes terrestres, la fixation du carbone est permise grâce à l'action de la Rubisco qui produit deux molécules de glycerate-3-phosphate (Michel *et al.*,

2010a). Celles-ci sont ensuite converties en fructose-6-phosphate (F6P). Mais contrairement aux plantes, le F6P n'est pas transformé en amidon, en saccharose ou en fructane (van Arkel et al., 2013), mais en laminarine et en D-mannitol pour stocker le carbone issu de la photosynthèse.

La laminarine est un polysaccharide constitué d'une chaîne de 16 à 31 unités de D-glucose, reliées entre elles par des liaisons β-1,3, et localisé dans la vacuole. La laminarine peut également comporter des branchements en β-1,6. Ce polysaccharide peut représenter jusqu'à 35 % du poids sec de l'algue (O'Sullivan *et al.*, 2010). Il existe deux types différents de laminarine : le type M, qui contient une molécule de mannitol à son extrémité réductrice, et le type G qui ne contient pas de mannitol. Cependant, certaines algues brunes comme *Eisenia bicyclis* ou *Ishige okamurai* contiennent de la laminarine sans branchement et sans mannitol (Craigie *et al.* 1974), ou avec quelques chaînes se terminant par une molécule de N-acetylhexosamine (Chizhov *et al.*, 1998). Il est intéressant de noter que la solubilité de la laminarine dépend de la proportion entre les types G et M et du nombre de branchements. La voie de synthèse de la laminarine est quasiment inconnue, même si plusieurs gènes codant pour des protéines potentiellement impliquées dans celle-ci ont été identifiés lors de l'analyse du génome d'*E. siliculosus* (Michel *et al.* 2010).

On retrouve de la laminarine chez d'autres straménopiles, les diatomées et les oomycètes, appelée respectivement chrysolaminarine et mycolaminarine, et ces formes de laminarine ne contiennent pas de résidus mannitol.

Le mannitol est un polyalcool/sucre-alcool acyclique à six atomes de carbone, et peut représenter jusqu'à 20 à 30% du poids sec chez les algues brunes (Reed *et al.*, 1985). Le métabolisme du mannitol étant le sujet principal de cette thèse, différents aspects liés à cette molécule vont être développés dans la partie ci-dessous.

Partie 3 : Le mannitol, une molécule ubiquitaire : applications, voies métaboliques et rôles physiologiques chez différents types d'organismes.

1) Le mannitol : propriétés, applications, et production commerciale

Le mannitol est très utilisé dans les industries chimique, agroalimentaire et médicale. Par exemple, ce polyalcool est considéré pour ses propriétés texturantes et son pouvoir édulcorant; il sert aussi de substitut ou d'additif alimentaire permettant d'augmenter la valeur nutritionnelle des aliments sans induction d'hyperglycémie, ce qui est intéressant pour les personnes en surpoids d'une part, et les diabétiques d'autre part. De plus, il aurait des propriétés anticariogéniques (Ladero *et al.*, 2007). Il est également utilisé dans les traitements contre certaines maladies comme le cancer du côlon, le glaucome, l'œdème cérébral ou le dérèglement rénal (Bhatt *et al.*, 2013). Récemment, il a été observé que le mannitol aurait un rôle neuroprotecteur contre la maladie de Parkinson, en limitant l'agrégation d'α-synucléines et en augmentant la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique grâce à ses propriétés hyperosmotiques (Shaltiel-Karyo *et al.*, 2013). De plus, le mannitol est employé pour la fabrication industrielle de polyuréthane, comme intermédiaire dans la production de détergents, et comme isomannide, un isomère d'isosorbide (isohexides interconvertibles) qui a de nombreuses applications comme la fabrication de polymères, d'additifs de carburants et de plastiques (van Hal *et al.*, 2014).

La demande en mannitol est en augmentation constante, à cause de ses différentes applications dans l'industrie. Ainsi, il est estimé que le marché mondial du mannitol représente environ 100 millions de dollars US, avec une augmentation constante ces dernières années (5 % par an pendant les années 2005-2009) (Bhatt *et al.*, 2013). La majeure partie du mannitol commercialisée est produite par différents procédés basés sur l'hydrogénation chimique du fructose (Ghoreishi and Shahrestani, 2009; Saha and Racine, 2011; Bhatt et al., 2013). Cependant, en Chine, il existe une activité de production industrielle de mannitol à faible échelle basée sur l'extraction de cette molécule à partir d'algues brunes cultivées.

Dans le contexte actuel des problèmes associés aux procédés de production chimiques, et de recherche et d'utilisation de produits d'origine naturelle, des travaux sont en cours depuis

quelques années pour développer des procédés d'extraction du mannitol à partir de ressources naturelles (Ghoreishi and Shahrestani, 2009), et pour la bioproduction de mannitol par des systèmes microbiens (Akinterinwa *et al.*, 2008; Saha and Racine, 2011; Bhatt *et al.*, 2013). Dans cette optique, deux voies ont été explorées. La première est basée sur la comparaison des rendements de production de mannitol par des microorganismes produisant naturellement cette molécule en fonction de diverses conditions de culture. Cet aspect concerne notamment différentes espèces de bactéries lactiques homo- et hétérofermentaires (Ghoreishi and Shahrestani, 2009). La seconde repose sur des travaux d'ingénierie métabolique, basés sur de l'expression hétérologue de gènes impliqués dans la synthèse de mannitol issus de différents types d'organismes chez différents systèmes microbiens comme : *Es. coli* (Bhatt *et al.* 2013), *Lactococcus lactis* (bactérie homofermentaire; (Wisselink *et al.*, 2005)), et plus récemment *Synechococcus* (cyanobactérie ; Jacobsen and Frigaard, 2014).

2) Métabolisme et rôles physiologiques du mannitol chez différents types d'organismes

Le mannitol est un des polyalcools les plus abondants dans la nature. Il est produit par de nombreux procaryotes et eucaryotes, notamment des organismes photosynthétiques. Le mannitol a divers rôles physiologiques : stockage du carbone issu de la photosynthèse, soluté compatible pour maintenir la turgescence dans les cellules lors d'un stress salin par exemple, et composé antioxydant pour prévenir les dommages oxydatifs dus aux EAOs (Iwamoto and Shiraiwa, 2005).

2.1) Les bactéries

Il existe deux voies principales pour le métabolisme du mannitol chez les bactéries. Une première est basée sur la présence d'un système phosphoenoylpyruvate/carbohydrate phosphotransferase (PTS) qui permet le transport du mannitol à travers la membrane interne des cellules. Ce système est constitué de protéines de transport sucre-dépendantes et de mécanismes de phosphorylation permettant l'utilisation de sucres spécifiques (Watanabe *et al.*, 2003). Au cours de ce transport, le mannitol est phosphorylé pour donner du mannitol-1-phosphate (M1P). Le M1P est ensuite oxydé en fructose-6-phosphate (F6P) par une déshydrogénase (DH) spécifique (M1PDH; EC 1.1.1.17), codé par le gène *mtlD*. Cette voie est illustrée **Figure 5**. Elle a été très étudiée

chez *Es. coli* (Novotny *et al.*, 1984; Postma *et al.*, 1993; Chaturvedi *et al.*, 1997) et d'autres bactéries dont *Bacillus subtilis* (Akagawa *et al.*, 1995; Watanabe *et al.*, 2003), *Bacillus stearothermophilus* (Henstra *et al.*, 2000), *Clostridium acetobutylicum* (Behrens *et al.*, 2001), et *Streptococcus mutans* (Honeyman and Curtiss, 1992). Chez ces microorganismes, le catabolisme du mannitol est régulé par deux mécanismes : une répression catabolique par le glucose, et une activation de la transcription contrôlée par le produit du gène *mtlR* et induite par la présence de mannitol (Watanabe *et al.*, 2003).

Cette voie basée sur l'activité d'un PTS et d'une M1PDH a aussi été mise en évidence chez les bactéries lactiques homofermentaires (ou homolactiques) (Wisselink *et al.*, 2002) (**Figure 5A**). Ces bactéries utilisent la voie de la glycolyse pour fermenter les hexoses qui sont transportés et phosphorylés dans les cellules par un PTS spécifique de chaque hexose. Lorsqu'elles sont cultivées en présence de glucose, le pyruvate est réduit en acide lactique par une lactate déshydrogénase NAD^+-dépendante (LDH). Le lactate est le produit majeur de cette homofermentation. Dans ces conditions, les bactéries homofermentaires ne produisent que de faibles quantités de mannitol : par exemple, *Streptococcus mutans* produit entre 0,1 et 0,3 mg de mannitol. La quantité de mannitol synthétisée est cependant augmentée lorsque les souches ont une voie de biosynthèse du lactate altérée. Ainsi, un mutant de *Lactobacillus plantarum* ayant une LDH déficiente produit 7 mM de mannitol à partir de 50 mM de glucose, alors que la souche sauvage n'en produit pas du tout. Un cas similaire est observé chez *Lactococcus lactis*.

Récemment, un modèle pour le métabolisme central de *L. lactis* a été amélioré en incorporant le métabolisme du mannitol (Costa *et al.*, 2014). Il a été mis en évidence, chez des *L. lactis* muté pour leur activité LDH, que la production de mannitol était possible en présence de fructose dans le milieu de culture (Gaspar et al., 2004). Cette production fait intervenir la M1PDH dans le sens réduction du F6P, et une activité M1Pase. Cependant, aucune phosphatase n'a été isolée chez ces bactéries homolactiques à ce jour. Néanmoins, une phosphatase spécifique du M1P (M1Pase, EC 3.1.3.22) a été récemment identifiée chez la bactérie du sol *Acinetobacter baylyi* (Sand *et al.*, 2014). Cette activité enzymatique est particulière car elle est catalysée par une protéine bi-fonctionnelle, dont le domaine N-terminal catalyse l'activité M1Pase, et le domaine C-terminal l'activité M1PDH (Sand *et al.*, 2013).

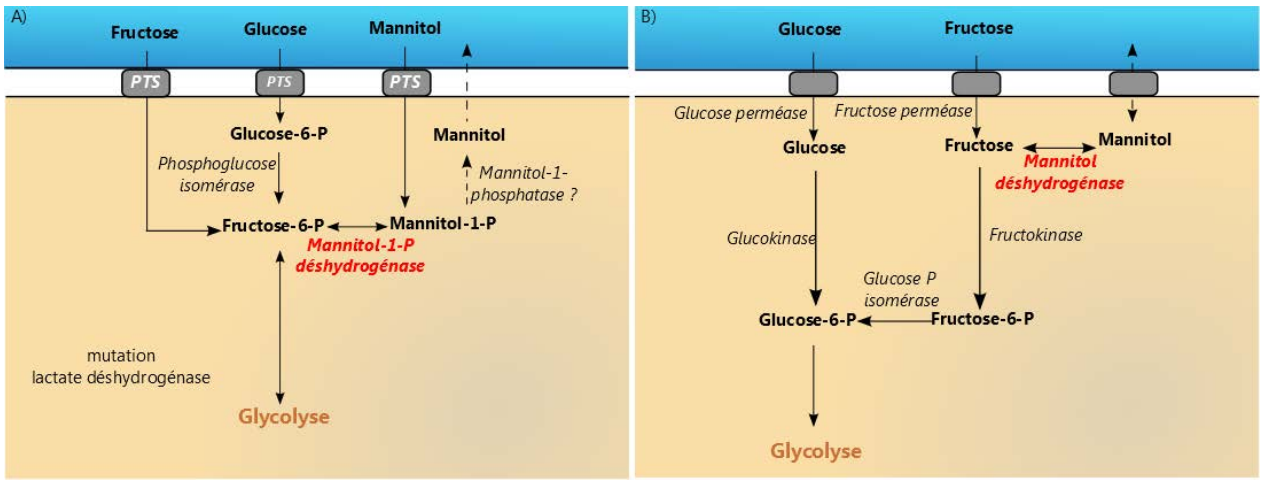


Figure 5 : Le métabolisme du mannitol chez *Escherichia coli* et les bactéries lactiques homofermentaires (A), et chez les bactéries hétérofermentaires (B).

Chez *V. cholerae*, le transport du mannitol se fait également via un transporteur mannitol-spécifique, EII^{Mtl} (Ymele-Leki *et al.*, 2013). Celui-ci n'est exprimé qu'en présence de mannitol. Chez cet organisme, le mannitol entraîne l'activation de la formation de biofilm, ainsi que la transcription des gènes impliqués dans la synthèse d'exopolysaccharides constituant la matrice du biofilm. Cependant, l'accumulation de biofilm est tout de même possible en l'absence de mannitol, en condition d'expression ectopique de la sous unité β d'EII^{Mtl}.

Le second type de métabolisme du mannitol chez les bactéries fait intervenir une mannitol-2-déshydrogénase (M2DH), et une fructokinase (FK) (**Figure 5B**). La première étape, réversible, correspond à des réactions d'oxydo-réduction entre le mannitol et le fructose. Il existe deux types de M2DH, qui se distinguent en fonction du cofacteur préférentiellement utilisé : le NAD(H) pour les enzymes dont le numéro EC est 1.1.1.67, et le NADP(H) pour celles dont l'EC est 1.1.1.138. Le fructose produit par oxydation du mannitol est phosphorylé par une FK (EC 2.7.1.4), et le F6P produit rentre ensuite dans le métabolisme central via la glycolyse. Ce type de métabolisme a été très étudié chez *Pseudomonas fluorescens* (Brünker *et al.*, 1997, 1998), où le mannitol est transporté à l'intérieur des cellules par un transporteur de type ABC (ATP binding cassette). Chez cet organisme, les gènes codant pour la M2DH, la FK, et les sous-unités du transporteur ABC sont organisés sous forme d'un opéron. La production de mannitol via les enzymes M2DH et FK a aussi été mise en évidence chez les bactéries lactiques hétérofermentaires (Wisselink *et al.*, 2002) (**Figure 5B**). Ainsi, la bactérie du vin *Oenococcus oeni* produit de l'acide lactique, de l'éthanol, et du CO_2 en présence de fructose comme substrat et de pyruvate comme accepteur d'électrons dans le milieu de culture. Lorsque du fructose est fermenté en présence de glucose, le fructose sert d'accepteur

d'électrons pour la re-oxydation du NAD(P)H provenant du métabolisme du glucose, ce qui entraîne la production de mannitol (Richter *et al.*, 2003).

2.2) Les plantes terrestres

En 1996, Stoop *et al.* (Stoop *et al.*, 1996) rapportent que plus de 110 espèces de plantes terrestres sont capables de produire du mannitol, en quantités variables. Certaines de ces espèces appartiennent aux familles de plantes listées dans la **Table 1**.

Famille	Activité M1Pase
Apiaceae	+ (céleri)
Arecaceae	
Brassicaceae	
Bromeliaceae	
Buxaceae	
Cactacae	
Combretaceae	
Cucurbitaceae	
Euphorbiaceae	
Fabaceae	+ (*Vigna mungo*)
Gnetaceae	
Poaceae	+ (riz)
Liliaceae	
Oleaceae	
Plaranaceae	
Rosaceae	+ (pomme)
Rubiaceae	
Scrophulariaceae	

Table 1 : Liste des familles de plantes pour lesquelles la synthèse de mannitol a été identifiée, et pour lesquelles l'activité M1Pase a été mise en évidence.

La production du mannitol comme photoassimilat est réalisée en parallèle à celle du saccharose chez le céleri ou à celle du raffinose chez l'olivier. Elle a lieu dans les tissus sources photosynthétiques, dont les feuilles, et plus particulièrement dans le cytosol (Pharr *et al.*, 1995). Après isomérisation du F6P en mannose-6-phosphate, une mannose-6-phosphate réductase NADPH-dépendante (EC 1.1.1.224) produit du mannitol-1-phosphate, qui est ensuite

déphosphorylé par une mannitol-1-phosphate phosphatase (M1Pase) pour donner du mannitol (**Figure 6**). Aucun gène codant pour une M1Pase de plantes n'a été identifié pour le moment, même si cette activité a été mesurée chez plusieurs plantes connues pour accumuler du mannitol, notamment chez le céleri, le seigle, le soja noir, et la pomme (Grant and Rees, 1981; Rumpho *et al.*, 1983) (**Table 1**). Le mannitol produit est ensuite transporté via le phloème vers des tissus non photosynthétiques, où il est stocké majoritairement dans les vacuoles (80%), mais aussi dans le cytosol (20%). C'est dans les cellules du phloème du céleri qu'ont été identifiés les transporteurs de mannitol AgMaT1 (Noiraud *et al.*, 2001) et AgMAT2 (Juchaux-Cachau *et al.*, 2007). Il a été déterminé que le stockage du carbone sous forme de mannitol présente un meilleur rendement net en molécules d'ATP, ainsi qu'une assimilation du carbone plus efficace, en comparaison avec la production de saccharose (Stoop *et al.*, 1996). L'enzyme clé du catabolisme du mannitol chez les plantes est la mannitol-1-déshydrogénase NAD-dépendante (M1DH, EC1.1.1.255) ; dans le cytosol, elle oxyde le mannitol en mannose, qui est ensuite phosphorylé par une hexokinase. Le mannose-6-phosphate est isomérisé en F6P qui rentre dans le métabolisme cellulaire général.

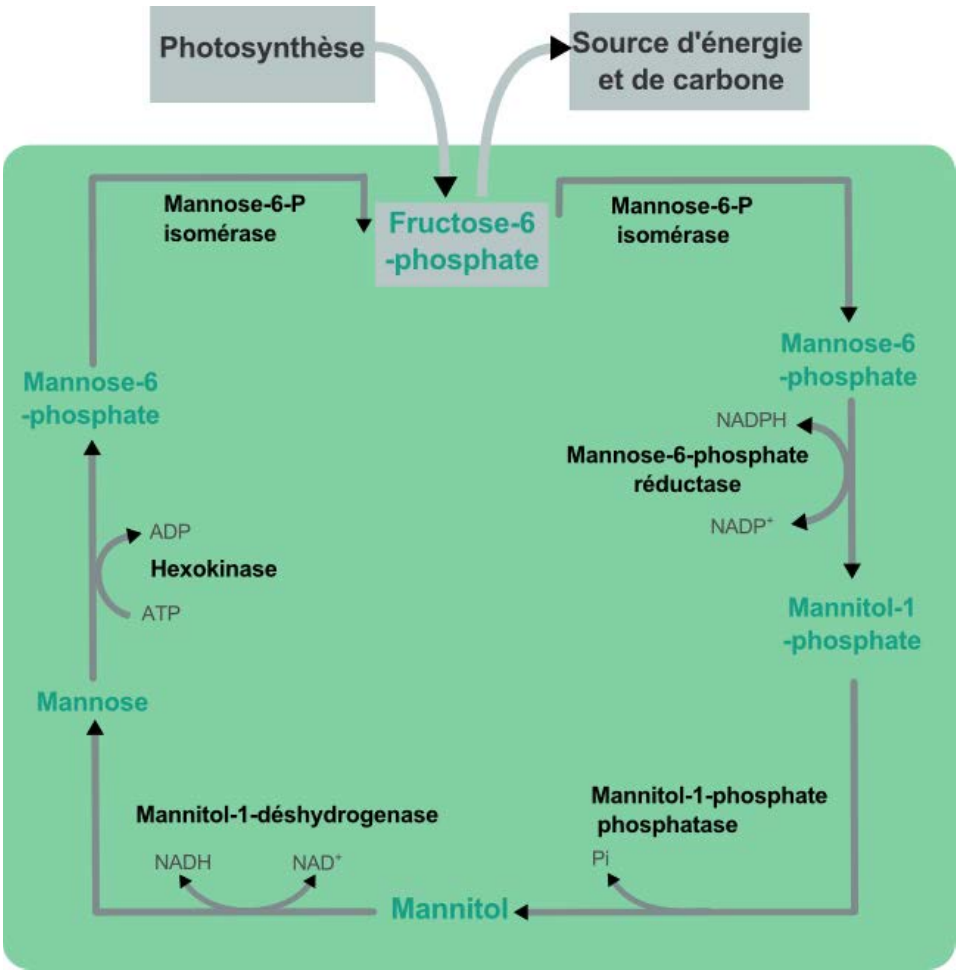


Figure 6 : Métabolisme du mannitol chez les plantes terrestres.

En plus de son importance en tant que photoassimilat chez certaines plantes, le mannitol a également un rôle très important au cours de la réponse aux stress biotiques et abiotiques. Ces aspects physiologiques ont été particulièrement étudiés chez plusieurs plantes. Chez le céleri, plusieurs travaux ont montré une augmentation de la quantité en mannitol en condition de stress salins, et il a été mis en évidence que cette concentration accrue n'était pas due à une augmentation de la biosynthèse mais à une diminution de l'activité de la M1DH (Stoop and Pharr, 1994). Le mannitol joue le rôle de soluté compatible car il permet de protéger des composants cellulaires sans interférer avec le métabolisme. D'autres composés de ce type sont connus chez les plantes, notamment d'autres sucres/polyalcools (arabitol, glycérol, hexitol), mais aussi des molécules contenant un ammonium quaternaire (comme la glycine bétaïne) et des acides aminés tels que la proline (Parida and Das, 2005). Une des hypothèses émises pour le rôle osmoprotectant du mannitol au cours de la réponse au stress salin est l'utilisation de ses groupements hydroxyles pour mimer la structure des molécules d'eau, et maintenir une sphère artificielle protectrice autour

des macromolécules (Stoop *et al.*, 1996). Le mannitol a également un rôle de suppresseur de radicaux libres d'oxygène comme l'a montré l'étude de Shen *et al.* 1997, empêchant ainsi les dommages cellulaires liés à la peroxydation des lipides. De plus, des analyses chez le céleri ont montré que le gène codant pour la M1DH correspondait à un gène impliqué dans la pathogénicité, activé par des éliciteurs lors d'attaques de pathogènes, et décrits chez de nombreuses espèces de plantes (Williamson *et al.*, 1995).

Chez l'olivier (*Olea europaea*), il a été montré que le glucose, le fructose, le galactose, et le mannitol sont les principaux sucres et polyalcool solubles présents chez cette plante (Cataldi *et al.*, 2000; Marsilio *et al.*, 2000). Le mannitol représente chez cet organisme une source de carbone et d'énergie, et est aussi impliqué dans la réponse au stress salin. Ce polyalcool est transporté par la protéine codée par le gène OeMaT1, et ce transporteur joue un rôle important au cours de la maturation des olives et lors de la réponse au stress salin (Conde et al., 2007b, 2007a). Les paramètres cinétiques de l'enzyme M1DH (OeMTD1), impliquée dans l'utilisation du mannitol, ont ensuite été étudiés dans des extraits d'*O. europaea*, et il a été observé que cette activité enzymatique était coordonnée avec le mécanisme de transport du mannitol en conditions de stress salin et hydrique (Conde *et al.*, 2011).

En parallèle à ces travaux, diverses expériences de transgénèse ont été menées pour observer si le fait d'augmenter la quantité de mannitol par incorporation de gènes exogènes pouvait améliorer la réponse des plantes aux stress abiotiques. Pour ce faire, deux types de stratégie ont été considérés: (1) le gène *mtlD* d'*Es. coli* a été exprimé chez le tabac (Tarczynski *et al.*, 1992; Shen *et al.*, 1997; Karakas and Collins, 1997), *Arabidopsis* (Thomas *et al.*, 1995), et le peuplier (Hu *et al.*, 2005); (2) transformation du tabac (Jennings *et al.*, 2002) et d'*Arabidopsis* avec le gène de mannose-6-phosphate déshydrogénase isolé de céleri (Zhifang and Loescher, 2003; Chan *et al.*, 2011). Il a ainsi été montré que la présence du gène bactérien augmente la quantité de mannitol dans les plantes transgéniques, et leur confère une meilleure tolérance au stress salin et/ou oxydant. Par contre, les résultats sont plus nuancés après transformation d'*Arabidopsis* avec le gène du céleri. En effet, les quantités de mannitol produites sont faibles, et sans doute pas suffisantes pour que le mannitol puisse exercer un rôle osmoprotecteur. Des travaux plus récents (Chan *et al.*, 2011), quant à eux, suggèrent que l'effet positif du mannitol sur la résistance au stress salin serait dû à des modifications de l'expression de gènes connus pour être induits en condition de stress, notamment certains liés à la voie de l'acide abscissique.

2.3) Les champignons

Parmi les mycètes, le mannitol a été trouvé chez presque toutes les grandes familles telles que les ascomycètes, les basidiomycètes, les zygomycètes et les champignons imparfaits (deutéromycètes). Il peut représenter jusqu'à 20% du poids sec du mycélium et 50 % du poids frais des fructifications, comme c'est le cas chez *Agaricus bisporus* (Hörer *et al.*, 2001)).

Pendant longtemps, il a été suggéré que le métabolisme du mannitol chez les champignons se faisait par le cycle du mannitol. Ce cycle fait intervenir quatre enzymes (**Figure 7**) : une M1PDH (EC 1.1.1.17) va tout d'abord réduire le fructose-6-phosphate en mannitol-1-phosphate, puis celui-ci sera déphosphorylé en mannitol par la mannitol-1-phosphate phosphatase (EC 3.1.3.22). Ces deux premières étapes constituent la synthèse du mannitol. Les deux étapes suivantes permettent le recyclage du mannitol : l'oxydation du mannitol par une M2DH (EC 1.1.1.138), et la phosphorylation du fructose formé au cours de l'étape précédente par une hexokinase (EC 2.7.1.1) (Hult and Gatenbeck, 1979).

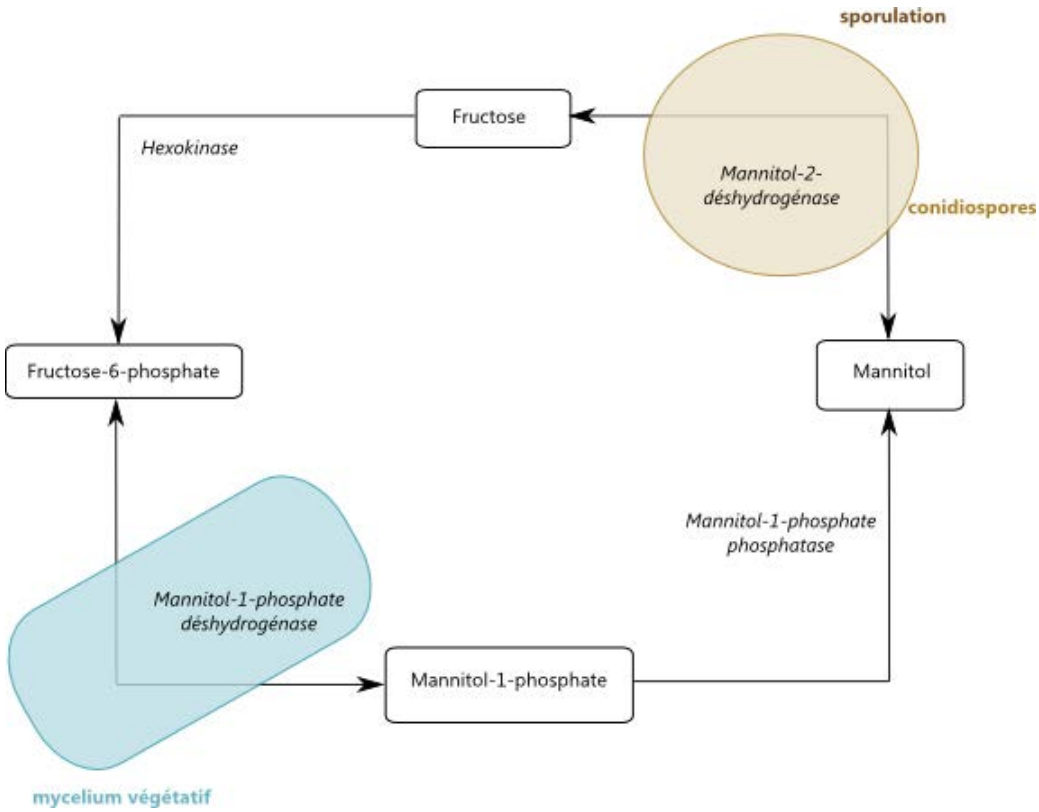


Figure 7 : Métabolisme du mannitol chez les mycètes.

Les quatre activités enzymatiques ont été mises en évidence chez plusieurs champignons, comme chez *Aspergillus niger* (Ruijter *et al.*, 2003), *Gibberella zeae* (Trail and Xu, 2002), ou *Alternaria alternata* (Vélëz *et al.*, 2007). Ces résultats ont été complétés par des études de mutagénèse dirigée, et la caractérisation enzymatique de protéines natives et recombinantes. Les enzymes étudiées ont été principalement la M1PDH et la M2DH. Ainsi, les gènes de M1PDH et M2DH ont été interrompus afin de créer des mutants déficients pour ces deux activités chez *Alternaria alternata* (Vélëz *et al.*, 2007), chez *Alternaria brassicicola* (Calmes *et al.*, 2013), chez *Botrytis cinerea* (Dulermo *et al.*, 2010), et le gène codant pour la M1PDH seul chez *Stagonospora nodorum* (Solomon *et al.*, 2005). La M2DH native a été étudiée chez *Tuber borchii* (Ceccaroli *et al.*, 2007), et des protéines recombinantes M1PDH chez *Cryptococcus neoformans* (Suvarna *et al.*, 2000) et M2DH chez *Agaricus bisporus* et *Uromyces fabae* (Hörer *et al.*, 2001; Voegele *et al.*, 2005) ont également été caractérisées.

La M1PDH issue de *Cryptococcus neoformans* est intéressante car outre sa petite taille (36 kDa), elle a une spécificité de substrat dans les deux sens qui est plus large que ce qui a été observé pour les autres M1PDH de champignons. En effet, on retrouve généralement une forte spécificité pour le F6P dans le sens réduction et pour le M1P dans le sens oxydation, alors que la M1PDH de *Cryptococcus* peut réduire le F6P, l'acétaldéhyde et le glucose-6-phosphate, tout comme elle peut oxyder le M1P, l'éthanol et le sorbitol-6-phosphate (Suvarna *et al.*, 2000). Elle reste néanmoins strictement dépendante du cofacteur NAD(H).

Une caractérisation biochimique poussée a été réalisée à partir d'enzymes M1PDH et M2DH recombinantes chez *Aspergillus fumigatus* (Krahulec *et al.*, 2008, 2009, 2011). Ainsi, les gènes correspondant aux deux enzymes, auxquels des étiquettes histidines ont été ajoutées, ont été clonés dans des vecteurs pour l'expression chez *Es. coli*. Les protéines recombinantes ont été purifiées par chromatographie d'affinité. Pour AfM1PDH, le K_m obtenu pour le M1P est de 0,23 mM, celui pour le F6P est de 2,1 mM. Pour l'enzyme AfM2DH, les activités mesurées ont été plus élevées en utilisant le couple NADP/NADPH comme cofacteurs plutôt que le couple NAD/NADH. Le K_m obtenu pour le mannitol est 82 mM et pour 159 mM pour le fructose (Krahulec *et al.*, 2009).

Cependant, aucune M1Pase n'a été caractérisée chez les champignons à ce jour. De plus, il a été observé que certains de ces organismes produisaient le mannitol directement à partir du fructose, via l'action de la M2DH (par exemple chez *Tuber borchii*; Ceccaroli *et al.* 2007). En parallèle, d'autres activités enzymatiques ont été suggérées pour intervenir dans ce métabolisme, dont une mannitol kinase (Ueng *et al.*, 1976) et/ou une mannitol acétyl-phosphate phosphotransférase (Lee,

1967). Chez certains champignons, par exemple *Micromonospora isolates,* les d'activités M1PDH ou M2DH n'ont pas été détectées (Mehta *et al.*, 1977). Chez *Cryptococcus neoformans*, il a été montré que des atomes de carbone marqués provenant du glucose-6-phopshate ont été retrouvés dans le mannitol néosynthétisé (Niehaus and Flynn, 1994).

Le fonctionnement du métabolisme du mannitol comme un cycle a cependant été remise en cause par plusieurs auteurs, et ce malgré la présence détectée des différentes enzymes de synthèse et recyclage du mannitol. En effet, chez *Stagonospora nodorum* par exemple, l'inactivation par génétique inverse de la M2DH n'empêche pas l'utilisation du mannitol comme source de carbone, suggérant ainsi un mécanisme de catabolisme encore inconnu (Solomon *et al.*, 2006). Chez *Aspergillus niger*, par contre, le concept de cycle du mannitol est remis en cause car l'expression des gènes, tout comme l'activité des enzymes M1PDH et M2DH, n'a pas lieu dans les mêmes tissus (Aguilar-Osorio *et al.*, 2010). Ainsi, on retrouve l'activité M1PDH principalement dans le mycélium en sporulation, alors que l'activité M2DH est mesurée plutôt dans les conidiospores matures (**Figure 7**). De plus, ces résultats d'activités enzymatiques sont corrélés avec ceux obtenus par analyse de l'expression des gènes correspondants.

Il semble donc que la présence ou non d'un cycle du mannitol chez les champignons dépende de la définition que l'on donne au mot « cycle ». Si l'on se base sur la mise en évidence de la présence et de l'activité des quatre enzymes, alors il est possible de parler de « cycle du mannitol ». Cependant, il faut garder à l'esprit que les réactions enzymatiques impliquées dans la synthèse et la dégradation du mannitol peuvent se produire à différents stades du cycle de vie chez certains champignons. Chez ces organismes, ce polyalcool peut aussi avoir différents rôles physiologiques.

Un des rôles principaux est la protection contre les EAOs, notamment durant la phase d'infection de l'hôte, chez des champignons pathogènes. En effet, il a été démontré dans plusieurs études que le mannitol avait un impact important sur la virulence (Jennings *et al.*, 1998; Niehaus and Flynn, 1994; Voegele *et al.*, 2005). Par exemple, une diminution de la teneur en mannitol chez *Alternaria alternata* entraîne une diminution du pouvoir pathogène et une sensibilité accrue aux EAOs produits par la plante hôte. Les souches d'*Alternaria* ne contenant pas de mannitol ne sont pas pathogènes (Vélëz *et al.*, 2008). Plus récemment, Calmes *et al.* (2013) ont mis en évidence l'importance du métabolisme du mannitol dans les différentes étapes du cycle de pathogénicité d'*Alternaria brassicola*. Il a également été montré que le mannitol était nécessaire pour l'étape de sporulation asexuée du champignon (Solomon *et al.*, 2006), ainsi que pour le bon déroulement de la morphogénèse chez les basidiomycètes (Stoop and Mooibroek, 1998). Il peut également avoir

un rôle de protection en cas de stress salin, notamment chez *Agaricus bisporus* (Stoop and Mooibroek, 1998), mais cette action n'est pas systématique chez tous les champignons. En effet, certains utilisent le glycérol et l'érythrol comme osmoprotectant lors de ce genre de stress abiotique (Solomon *et al.*, 2007). Enfin, le mannitol pourrait être impliqué dans le stockage du carbone, mais ce n'est pas le mode de stockage essentiel, ce polyalcool étant surtout utilisé lors de la germination des spores (Ruijter *et al.*, 2003; Vélëz *et al.*, 2007).

2.4) Les Apicomplexa

Le métabolisme du mannitol est présent chez des sporozoaires tels qu'*Ei. tenella* qui est un parasite responsable de la coccidiose, une maladie intestinale qui affecte de nombreux animaux domestiques et sauvages. L'influence économique de ce type de parasitose est importante, notamment dans les élevages et l'industrie de la volaille, car le parasite a un fort pouvoir de dispersion et provoque des taux de mortalité élevés.

Le cycle de vie d'*Ei. tenella* chez le poulet fait intervenir plusieurs étapes associées à trois phases, une en dehors de l'hôte, et deux (une non-sexuée et une sexuée) dans l'hôte infecté (Schmatz *et al.*, 1989) (**Figure 8**). L'infection débute lors de l'ingestion par les animaux d'oocystes sporulés présents par exemple dans la litière. La paroi de l'oocyste est alors dégradée par action mécanique dans le gésier, libérant quatre sporocystes qui chacun contiennent deux sporozoïtes. Ces sporozoïtes émergent des sporocystes pendant la migration dans l'intestin de l'hôte et grâce à l'action d'enzymes protéolytiques et des sels biliaires. Les sporozoïtes pénètrent alors dans les cellules épithéliales des poches caecales, où ils vont se multiplier et former une centaine de mérozoïtes par cellule infectée. Cette première génération de mérozoïtes va infecter de nouvelles cellules et produire une deuxième génération de mérozoïtes. Ces nouveaux mérozoïtes vont initier le cycle sexuel du parasite. En effet, ils vont produire soit des microgamètes qui vont sortir des cellules hôtes, soit des macrogamètes qui vont rester dans les cellules hôtes. Les microgamètes libérés vont pénétrer dans des cellules contenant des macrogamètes, ce qui va déclencher la fertilisation. Les zygotes ainsi formés vont maturer et former des oocystes non-sporulés, qui sont libérés dans les fèces des animaux contaminés. Lorsque ces oocystes se retrouvent dans le milieu extérieur, ils vont sporuler et pourront amorcer un nouveau cycle de vie après ingestion par de nouveaux hôtes. Ces oocystes sont entièrement dépendants des ressources énergétiques endogènes pour être capables d'accomplir la sporulation. Il a été observé que la teneur en glucose

reste stable durant la sporulation, donc un autre composé doit servir de source de carbone. Il a été montré en 1989 par Schmatz et collaborateurs qu'il s'agissait du mannitol (Schmatz *et al.* 1988). De plus, des mesures d'activités enzymatiques dans des extraits d'oocystes ont montré que le métabolisme du mannitol chez *Ei. tenella* faisait intervenir les quatre réactions enzymatiques identifiées dans le cycle du mannitol des champignons (**Figure 7**) (Schmatz *et al.*, 1989), et que ce cycle est relié à la glycolyse par l'intermédiaire du fructose-6-phosphate (Schmatz, 1997). Parmi les quatre enzymes du cycle, les deux impliquées dans la production du mannitol ont été les plus étudiées. La M1PDH native a été purifiée (Allocco, 1999; Allocco *et al.*, 2001), et un gène codant pour cette enzyme est disponible dans les bases de données (numéro d'accession UniProtKB O96437), mais la caractérisation biochimique de la protéine recombinante correspondante n'a jamais été publiée, mais est mentionnée dans un résumé de conférence (Liberator *et al.* 1997). Des informations ont aussi été trouvées dans un brevet (US 2004/0018581 A1, 2004), et indiquent que l'expression fonctionnelle de ce gène a été rendue difficile par le fait que la protéine M1PDH recombinante forme des hétérodimères avec des protéines chaperonnes de la famille des 14-3-3 lors de l'expression chez *Es. coli*. En fait, il a été montré que la M1PDH de parasite est négativement régulée dans les oocystes non-sporulés par formation d'un hétérodimère avec une protéine 14-3-3 de 35 kDa, empêchant ainsi l'utilisation du mannitol au cours de ce stade du cycle de vie (Schmatz, 1997). Il est connu que les isoformes de ces protéines chaperonnes ont un rôle dans la transduction de signal, la régulation de la transcription, et le cycle cellulaire (Aitken, 1996). Le gène M1PDH d'*Ei. tenella* a cependant été utilisé avec succès pour faire de la complémentation de levure mutée pour la production de glycérol, leur principal osmolyte en condition de stress hypersalin. En effet, il a été observé que la production de mannitol grâce au gène d'*Ei. tenella* pouvait compenser l'absence de glycérol au cours de traitements hypersalins. Ces expériences ont permis de tester un certain nombre de molécules potentiellement actives pour inhiber l'action de la M1PDH, et qui pourraient être utilisées comme traitements anti-parasitaires (brevet US 2004/0018581 A1, 2004). De plus, il a été montré que l'enzyme M1PDH a un résidu cystéine réactif (thiol) dans ou près du site actif (Allocco *et al.*, 2001). En effet, des composés se fixant aux résidus thiols, tels que le N-éthylmaléimide et le 5,5'-dithiobis (acide 2-nitrobenzoïque) inhibent l'activité de l'enzyme.

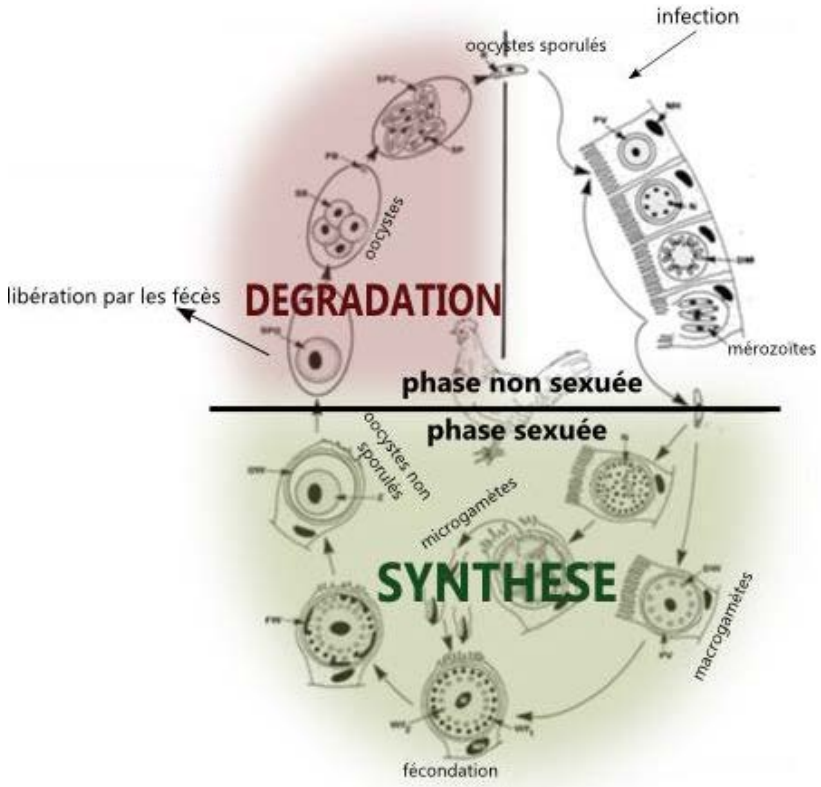


Figure 8 : Cycle du mannitol chez *Ei. tenella* dans le poulet. Adapté de « Parasitologie BAC 3 Année académique 2010-2011 Parasitologie – Bac 3. », http://slideplayer.fr/slide/1478272/. La partie verte indique les stades du cycle de vie du parasite au cours desquels le mannitol est synthétisé, alors que la partie rouge indique ceux au cours desquels le mannitol est utilisé.

Parallèlement au travail sur la M1PDH, l'enzyme M1Pase, catalysant la production de mannitol à partir du M1P, a aussi été étudiée. La forme native a été purifiée, ce qui a permis d'isoler le gène correspondant, puis de caractériser la protéine recombinante après surexpression chez *Es. coli* (Liberator *et al.*, 1998). La M1Pase d'*Ei. tenella* est spécifique du M1P et les valeurs déterminées pour les paramètres cinétiques de l'enzyme recombinante (K_m = 67.4 µM, V_m = 738 µmol mg^{-1} min^{-1}, k_{cat} = 430 s^{-1} et pH optimum = 6) sont très similaires à celles obtenues pour l'enzyme native. L'analyse de la séquence en acides aminés de cette protéine indique qu'elle constitue un nouveau membre de la famille des phosphohistidines phosphotransférases, et a permis d'identifier le motif RHG au niveau du résidu histidine du site actif. De plus, une expérience de « phosphoenzyme trapping » a montré que ce résidu histidine est phosphorylé au cours de la réaction catalysée par l'EtM1Pase. L'importance de ce site pour la réaction a aussi été confirmée par le fait que le DEPC (diethylpyrocarbonate; réactif entraînant l'acylation spécifique de résidus histidine) inhibe l'activité M1Pase.

Au cours du cycle de vie du parasite, la concentration en mannitol et la quantité de protéine M1PDH augmentent significativement pendant la phase sexuelle, et le mannitol atteint une concentration de 300 mM chez les oocystes non sporulés soit 25% de leur masse (Allocco, 1999) (**Figure 8**). La synthèse du mannitol est accompagnée d'une diminution de la concentration d'amylopectine et de glucose. Puis 90% du mannitol sont consommés lors des quinze premières heures de la sporulation. En 2001, Allocco et collaborateurs (Allocco *et al.*, 2001) ont observé que le 3-nitrophényl disulfide (nitrophénide ou Megasul^{TM}) bloquait le développement d'*Ei. tenella* par inhibition de l'activité M1PDH, ou altérait celui du peu d'oocystes encore capables de sporuler. Ainsi, le mannitol a un rôle essentiel dans l'oogenèse et la sporulation. La reproduction asexuée du parasite ne semble pas être affectée par le nitrophénide, ce qui suggère une spécificité d'action du composé lors des étapes de la reproduction sexuée. En plus de représenter une source d'énergie important pour la sporulation, le mannitol serait aussi un composant de la paroi des oocystes (Allocco, 1999). Ce polyol est donc essentiel pour le développement du parasite hors de l'hôte.

2.5) Les algues marines

La présence de mannitol a été mise en évidence chez plusieurs grands groupes d'algues, dont les algues vertes, rouges, et les straménopiles.

Chez les algues vertes, le métabolisme du mannitol n'a été étudié que chez la microalgue prasinophyte *Platymonas subcordiformis* maintenant appelée *Tetraselmis subcordiformis*, que l'on retrouve principalement dans les zones côtières. Ces organismes devant faire face à des différences importantes de salinité dans leur milieu de vie, ils utilisent le mannitol comme osmolyte, ce composé représentant aussi le principal produit de la photosynthèse chez ces organismes (Kirst, 1975). Le mannitol y est produit par une M1PDH et recyclé par une M2DH (Richter and Kirst, 1987), suggérant la présence du cycle du mannitol identifié chez les champignons et les sporozoaires. L'influence du NaCl sur l'activité de ces deux enzymes a aussi été étudiée, sur des extraits bruts d'algue. Ainsi, l'ajout de quantités croissantes de NaCl dans le milieu réactionnel induit une augmentation de l'activité de la M1PDH, et au contraire une diminution de l'activité de la M2DH. Il a été suggéré qu'*in vivo*, l'activation de la M1PDH résulte d'une augmentation de la concentration en solutés dans la cellule due à une diminution de la surface cytoplasmique provoquée par la pression osmotique externe. A l'inverse, une faible concentration saline externe

va augmenter l'entrée d'eau dans la cellule et diluer les solutés intracellulaires, diminuant l'activité de la M1PDH et augmentant celle de la M2DH.

Chez les rhodophycées, le mannitol a été mis en évidence aussi bien chez des micro- que chez des macroalgues, mais il est présent uniquement chez un nombre restreint de ces algues. En effet, la majorité des algues rouges accumulent des hétérosides, notamment le floridosides chez les Florideophycidae, et le digeneaside chez les Ceramiales, pour le stockage de carbone issu de la photosynthèse. Le métabolisme du mannitol chez les algues rouges a été principalement étudié chez la microalgue *Dixoniella grisea*, et chez des macroalgues du genre *Caloglossa* qui sont associées la plupart du temps à la végétation des mangroves.

Les quatre activités associées au cycle du mannitol d'*Ei. tenella*, c'est-à-dire M1PDH, M1Pase, HK et M2DH, ont été mesurées dans des extraits acellulaires de *Dixoniella grisea* (Eggert *et al.*, 2006). Les paramètres cinétiques de ces enzymes ont aussi été déterminés à partir de ces mêmes extraits, et comparés à ceux d'enzymes présentes chez d'autres organismes, sans que des différences notables aient été observées. *D. grisea* est un organisme euryhalin car retrouvé aussi bien en eau douce qu'en milieu marin. L'écophysiologie de cette algue a été étudiée en conditions de stress abiotiques tels que la salinité, l'irradiance et la température, appliqués individuellement ou simultanément afin de simuler au mieux *in vitro* les conditions retrouvées *in vivo* (Eggert *et al.*, 2007). Ainsi, l'accumulation de mannitol en réponse à ces stress a été observée chez *Dixoniella*, et s'accompagne d'une diminution de la croissance de l'algue.

Chez *Caloglossa*, le mannitol a un rôle dans la protection en cas de stress abiotique (notamment la salinité), en plus de son rôle de source de carbone issu de la photosynthèse (Karsten et al., 1997b, 1992). Cette protection est primordiale pour ces organismes vivant en zone littorale, dans les estuaires ou les mangroves, où de fortes fluctuations en salinité sont observées. Les activités M1PDH, M1Pase et M2DH ont été mesurées chez *Caloglossa leprieuri* (Karsten et al., 1997a), y suggérant, comme chez *Tetraselmis*, la présence des enzymes du cycle du mannitol. Les enzymes M1Pase (Iwamoto *et al.*, 2001) et M1PDH (Iwamoto *et al.*, 2003) natives ont ensuite été purifiées à partir de l'algue *Caloglossa continua*. Parmi les résultats obtenus au cours de la détermination des paramètres cinétiques pour ces deux enzymes, il a été observé que le NaCl augmentait l'activité de la M1PDH, mais inhibait celle de la M1Pase. Ces travaux de biochimie et de physiologie chez différentes algues rouges n'ont pas été complétés par l'identification des gènes codant pour les protéines catalysant les activités M1PDH, M1Pase, et M2DH. Qui plus est,

le séquençage de plusieurs génomes de micro-et macroalgues rouges (*Cyanidioschyzon merolae*, *Galdieria sulphuraria*, *Porphyridium purpureum*, *Chondrus crispus*, *Pyropia yezoensis*) n'a pas permis d'identifier ces gènes car aucune de ces algues ne produit de mannitol.

Chez l'algue haptophyte *Emiliania huxleyi*, une étude récente a permis de montrer que le mannitol était le polyalcool principal impliqué dans le stockage du carbone issu de la photosynthèse (Obata *et al.*, 2013). La reconstitution d'une partie du métabolisme carboné chez cet organisme, issu d'une endosymbiose secondaire, et la recherche, dans son génome, de gènes potentiellement impliqués dans le métabolisme du mannitol (Read *et al.*, 2013), suggèrent la présence des étapes M1PDH et M1Pase pour la synthèse du mannitol, comme chez les autres algues décrites ci-dessus (**Figure 9**). De plus, les auteurs décrivent une autre voie potentielle pour la synthèse et la dégradation du mannitol, à savoir celle impliquant le mannose-6-phosphate et le mannose, avec les enzymes M1DH et phosphomannose isomérase, qui a été décrite jusqu'à présent chez les plantes terrestres. Ces hypothèses doivent maintenant être testées expérimentalement.

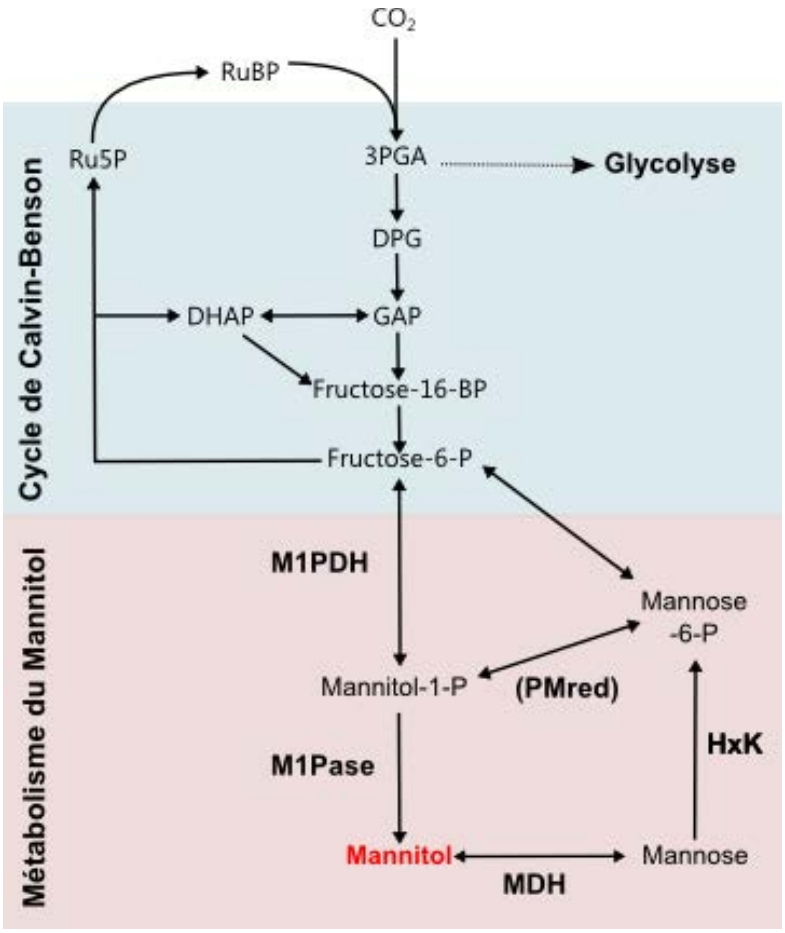


Figure 9 : Métabolisme du mannitol chez l'algue haptophyte *Emiliania huxleyi*. Adapté de Obata *et al.* 2014. Ru5P : riburose-5-phosphate ; RuBP : riburose biphosphate ; 3PGA : 3-phosphoglycérate ; DGP : 1,3-diphosphoglycérate ; GAP : glycéraldéhyde-3-phosphate ; DHAP : dihydroxyacétone phosphate ; F16BP : fructose-1,6-biphosphate ; Pyr : pyruvate ; OAA : oxaloacétate ; BCAA : acides aminés branchés ; PYC : pyruvate carboxylase ; PMI : phosphomannose isomérase ; PMred : phosphomannose réductase.

Quant aux straménopiles, le métabolisme du mannitol est absent chez les oomycètes et les diatomées car aucune production de mannitol n'a été mise en évidence chez ces organismes, et les gènes correspondant n'ont pas été repérés dans les différents génomes séquencés. Par contre, ce métabolisme existe chez d'autres types d'ochrophytes (Dittami et al., 2011a). Chez *Pseudochattonella farcimen*, la production du mannitol a été quantifiée et les gènes codant pour les activités M1PDH, M1Pase et M2DH ont été identifiés (Dittami *et al.*, 2012). Chez l'espèce d'Eustigmatophycées *Nannochloropsis oceanica*, le mannitol est le principal polyalcool mesuré (Pal *et al.*, 2013). Ces observations renseignent sur l'évolution du cycle de mannitol chez les straménopiles. En effet, les gènes codant notamment pour la M1PDH et la M1Pase ont sans doute été acquis par un ancêtre commun après le split avec les diatomées, et ces gènes ont été conservés

dans certaines familles d'ochrophytes dérivant de cet ancêtre commun (Dittami, Aas, *et al.* 2011). Des analyses phylogénétiques basées sur les gènes M1PDH et M1Pase identifiés chez *P. farcimen* et *E. siliculosus* (Michel *et al.*, 2010a; Dittami *et al.*, 2012) suggèrent que l'acquisition de ces gènes s'est faite par transfert latéral impliquant une bactérie Gram positif, sans doute une Actinobactérie.

Enfin, les phéophycées sont connues depuis plusieurs décennies pour leur capacité à accumuler du mannitol, le seul polyalcool détecté en grande quantité chez ces organismes. Par exemple, ce composé peut représenter jusqu'à 1730 mmol par kg de poids sec chez *Laminaria hyperborea*, soit 30% du poids sec de cette algue (Reed *et al.*, 1985). Ces observations ont suggéré que le mannitol pouvait être utilisé comme composé de stockage du carbone issu de la photosynthèse et était transporté dans différentes parties des algues brunes, notamment chez les Laminaires (Bartsch et al., 2008). Cette hypothèse a été en partie vérifiée chez *E. siliculosus* par profilage métabolique ciblé, ces expériences ayant montré des variations des quantités de mannitol produites en fonction du cycle diurnal, avec une augmentation au cours de la phase lumineuse, un pic au moment de la transition jour/nuit, et une diminution au cours de la phase obscure (Gravot *et al.*, 2010). Il est connu aussi que le mannitol a un rôle osmotique chez les algues brunes au cours des stress salins. En effet, il a été observé par Reed *et al.* (1985) que la concentration intracellulaire de mannitol chez six algues brunes incubées en condition de stress hypo- ou hypersalins variait en fonction de la salinité, notamment avec une augmentation de la concentration de ce polyalcool au cours d'un traitement hypersalin. Plus récemment, ce type d'observation a été répété chez *E. siliculosus* (Dittami *et al.*, 2011). En effet, la quantité de mannitol diminue en condition de stress hyposalin (correspondant à une concentration en NaCl huit fois inférieure à celle de l'eau de mer normale), et augmente en cas de stress hypersalin (condition pour laquelle la concentration en NaCl est à peu près quatre fois supérieure à celle de l'eau de mer normale). Cependant, la concentration finale de mannitol observée dans cette dernière condition était trop faible pour que le mannitol ait un rôle osmorégulateur au niveau des cellules entières, par conséquent il a été suggéré que ce composé agissait plutôt comme un osmolyte local et/ou comme osmoprotectant. Il est également intéressant de noter que chez une souche isolée d'eau douce, mais capable de croître aussi en eau de mer normale, appartenant à l'espèce *E. subulatus* très proche d'*E. siliculosus*, les quantités de mannitol mesurées après culture en eau de mer normale étaient deux fois moins élevées que chez la souche d'*E. siliculosus* de référence. Des expériences ont montré que cette diminution de la quantité en mannitol était concomitante avec

une activité M1PDH endogène cinq fois plus faible chez la souche d'eau douce d'*E. subulatus* par rapport à la souche d'*E. siliculosus* (Dittami et al., 2012a).

Les enzymes responsables de la biosynthèse du mannitol chez les algues brunes ont été étudiées dès la fin des années soixante, et c'est ainsi que les activités M1PDH et M1Pase ont été mises en évidence chez ces organismes (Yamaguchi *et al.* 1969; Ikawa *et al.* 1972). Les enzymes impliquées dans le recyclage du mannitol, quant à elles, ont été décrites plus tardivement (Iwamoto and Shiraiwa, 2005). Ainsi, le cycle du mannitol et ses quatre enzymes (M1PDH, M1Pase, M2DH et hexokinase) semblent beaucoup ressembler à celui d'*Ei. tenella* et des champignons (**Figure 10**).

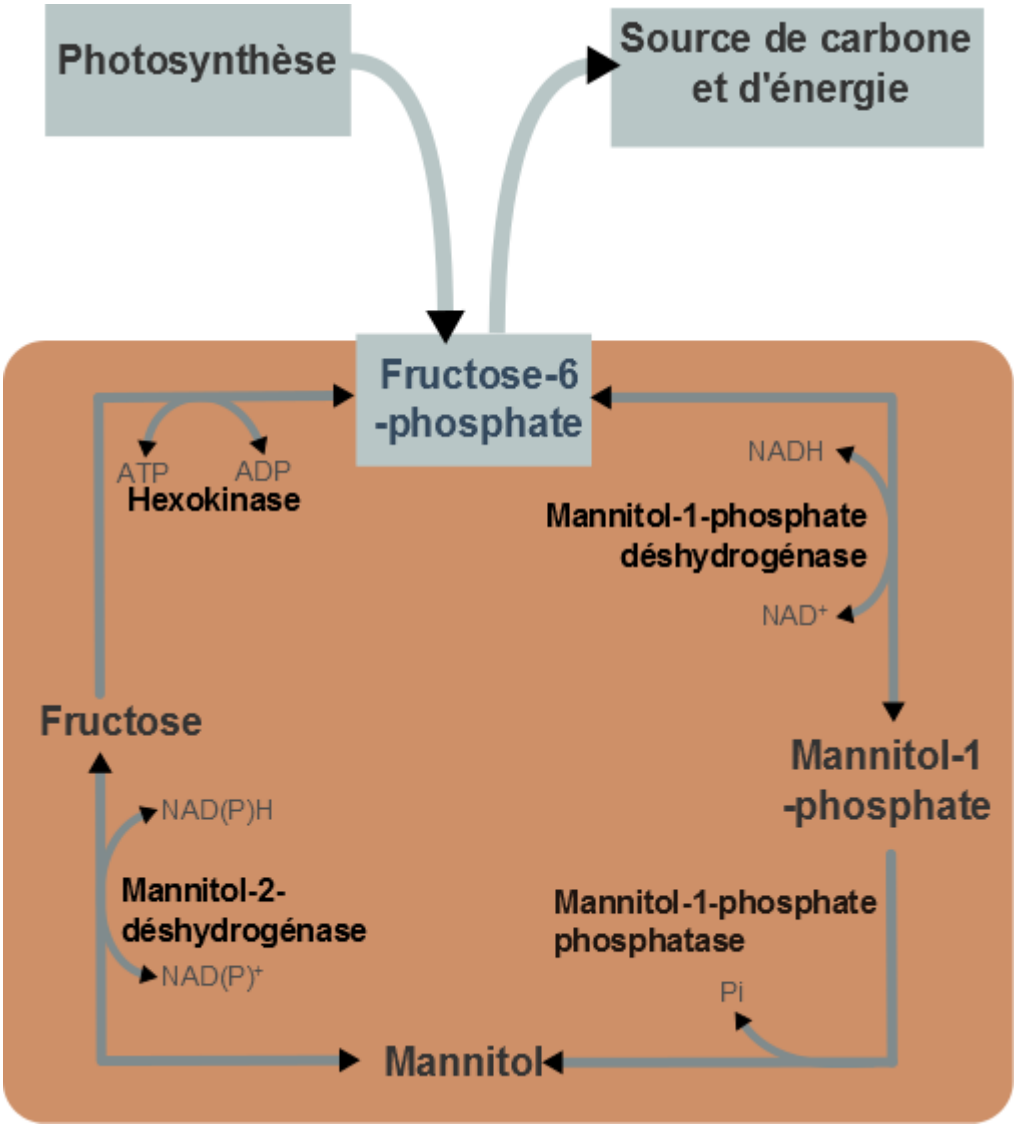


Figure 10 : Cycle du mannitol chez les algues brunes.

Plus récemment, grâce au séquençage du génome d'*E. siliculosus* (Cock *et al.*, 2010), des gènes putatifs correspondant à ces enzymes ont pu être identifiés (Michel *et al.*, 2010a; Rousvoal *et al.*, 2011) (**Table 2**).

Nom commun	EsM1PDH1	EsM1PDH2	EsM1PDH3	EsM1Pase1	EsM1Pase2	EsM2DH	EsHK
Locus génomique	Esi0017_0062	Esi0020_0181	Esi0080_0017	Esi0080_0016	Esi0100_0020	Esi0135_0010	Esi0139_0025
Taille des CDS (nt)	1578	1662	1293	1213	984	2001	1122
Nombre d'introns	14	13	9	5	6	16	7
Nombre d'ESTs	36	4	0	11	33	5	1
Taille des protéines (aa)	525	553	430	405	327	666	373
Poids moléculaire (kDa)	58	60	47	44	35	73,8	38,7
Point isoélectrique	5,93	6,94	5,19	5,11	4,81	5,18	4,51

Table 2 : Caractéristiques des différents gènes correspondant aux enzymes du cycle du mannitol chez *E. siliculosus*.

L'identification de ces gènes a permis d'initier la caractérisation biochimique des protéines correspondantes. Les travaux initiaux ont porté sur l'étude de la première étape du cycle. Pour cela, l'activité M1PDH endogène d'*E. siliculosus* a été recherchée dans des extrait d'algues récoltées pendant la phase lumineuse du cycle diurnal (Rousvoal *et al.*, 2011). Alors qu'une activité de réduction du fructose-6-P (F6P) a été mesurée, ça n'a pas été le cas pour la réaction inverse, à savoir l'oxydation du mannitol-1-P (M1P). De plus, l'activité mesurée est sensible à la présence de sel dans le volume réactionnel, car 400 mM de NaCl multiplie par cinq cette activité endogène. Ces résultats physiologiques ont été complétés par l'étude de l'expression des gènes EsM1PDH1

et 2 au cours du cycle diurnal, et après divers stress abiotiques. Ces expériences ont montré que le gène EsM1PDH1 était le plus exprimé quelles que soient les conditions testées, et que les deux gènes testés étaient régulés au cours du cycle diurnal et par des stress salins. Cependant, seul le gène EsM1PDH1 est régulé en condition de stress oxydant mimé par une incubation en présence de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Afin de caractériser l'activité enzymatique M1PDH, le gène EsM1PDH1 natif a été cloné dans le plasmide pFO4 couramment utilisé au laboratoire, et le plasmide recombinant pFEsM1PDH1 a été transformé dans des cellules d'*Es. coli* BL21(DE3). En dépit de différents tests de conditions d'induction, aucune surexpression de la protéine d'intérêt n'a pu être observée. Par conséquent, des tests biochimiques ont été réalisés en comparant les résultats obtenus entre des extraits bactériens produits à partir d'*Es. coli* contenant le plasmide pFEsM1PDH1 et des bactéries contenant le plasmide pFO4 vide. Ainsi, pour le sens réduction du F6P, l'activité la plus élevée a été mesurée avec 100 mM de NaCl dans les extraits bactériens contenant le plasmide pFEsM1PDH1. Une activité faible (12 % de l'activité la plus élevée) a également pu être détectée en utilisant le NADPH comme cofacteur, les tests précédents ayant tous été réalisés avec du NADH. L'enzyme n'utilise pas le glucose-1-phosphate ou le fructose comme substrat car aucune activité enzymatique n'a pu être détectée avec ces molécules. Enfin, l'ajout de 0,5 mM de pHMB entraîne une inhibition de 12 % de l'activité de l'enzyme par rapport à celle mesurée en conditions optimales. Dans le sens inverse de la réaction, l'activité enzymatique décroît lors de l'ajout de NaCl (l'activité maximale ayant été mesurée sans NaCl). Une très faible activité a pu être mesurée avec le cofacteur $NADP^+$ (6 % de l'activité la plus forte) ainsi qu'avec le mannitol comme substrat (2 % de l'activité la plus forte). Cependant, l'inhibiteur pHMB semble avoir un effet beaucoup plus drastique dans ce sens de la réaction car en ajoutant la même quantité que lors des tests dans le sens réduction du F6P, l'activité des extraits ne représente que 8 % de celle mesurée en l'absence de ce composé.

Une approche similaire à celle mise en œuvre pour étudier l'étape M1PDH a été développée pour l'activité M1Pase (Groisillier *et al.*, 2014). En effet, l'activité endogène de la M1Pase a d'abord été mesurée dans les mêmes extraits que ceux décrits ci-dessus. Une activité enzymatique a bien été déterminée en présence de mannitol-1-phosphate comme substrat, ainsi qu'une activité plus faible avec du fructose-1-phosphate. L'expression au cours du cycle diurnal des deux gènes potentiels codants pour des enzymes M1Pase a aussi été étudiée, et les résultats obtenus indiquent que ces gènes présentent des niveaux d'expression différents au cours des phases lumineuses et des phases obscures. Afin de caractériser l'activité enzymatique M1Pase, les gènes EsM1Pase 1 et

2 natifs ont été clonés dans le plasmide pFO4, et les vecteurs recombinants ont été transformés dans des cellules d'*Es. coli* BL21(DE3). Seule la protéine EsM1Pase2 a pu être surexprimée soluble. Cette enzyme recombinante a donc pu être purifiée sur colonne de nickel et caractérisée au niveau biochimique. Elle est spécifique du M1P. Le K_m M1P obtenu pour cette enzyme est de 0,67 mM, avec une V_m de 25,25 nmol min^{-1} $protéine^{-1}$. De plus, cette enzyme recombinante est sensible au NaCl : en effet, 100 mM de NaCl dans le milieu réactionnel suffisent à diminuer l'activité M1Pase, et à 400 mM, il ne reste plus que 44 % de l'activité initiale. Enfin, l'étude de la séquence en acides aminés et des analyses par modélisation de structure tri-dimensionnelle par homologie ont permis de montrer qu'EsM1Pase 2 constitue un nouveau type de phosphatase au sein de la superfamille des protéines HaloAcide Déshalogénase (HAD).

Enfin, très récemment, la caractérisation moléculaire d'une M2DH d'algue brune, identifiée chez *Saccharina japonica*, a été entreprise par une équipe chinoise (Shao *et al.*, 2014). L'analyse des variations de l'expression du gène *SjM2DH* montre notamment une diminution de la quantité de transcrits en conditions de stress hypersalins, et une induction de l'expression en condition d'hyposalinité. Une augmentation de l'expression a aussi été observée en condition de stress oxydatif, avec un pic à 0,8 mM de H_2O_2, et de dessiccation, en particulier après 2 h de ce traitement. De plus, La protéine SjM2DH a été exprimée soluble chez *Es. coli* après clonage du gène natif. Aucune activité enzymatique n'a pu être déterminée à partir de la protéine recombinante purifiée, et ces caractéristiques enzymatiques ont été étudiées à partir d'extraits acellulaires bactériens contenant la protéine d'intérêt, une approche similaire à celle décrite ci-dessus pour la M1PDH1 d'*E. siliculosus*.

Partie 4 : Caractérisation fonctionnelle de gènes/protéines d'algues brunes

Plusieurs méthodologies sont applicables pour tenter de caractériser un gène et sa protéine correspondante, tout en considérant le contexte biologique dans lequel ces acteurs moléculaires agissent. Une première approche consiste à produire des mutants aléatoires par mutagénèse chimique ou aux UV, et de cribler ces mutants pour un phénotype particulier. Ceci implique la mise au point d'un crible facile à mettre en œuvre et suffisamment discriminant pour identifier les individus mutés. Ce type d'approche a déjà été considéré chez *E. siliculosus*, notamment pour étudier son développement et son cycle de vie (Coelho *et al.*, 2011; Le Bail *et al.*, 2010). Elle a permis d'identifier des gènes potentiellement impliquées dans ces processus, mais aucun n'a été validé à ce jour. En effet, il n'existe pas à l'heure actuelle de protocole établi pour la transformation ou la mutagénèse dirigée chez *E. siliculosus*, même si des expériences de mise au point sont en cours, notamment pour pouvoir appliquer une approche de tilling. De plus, dans le contexte de la production de mannitol chez *E. siliculosus*, il existe trois gènes codant pour l'activité M1PDH, ce qui complique la mise en place d'un crible basé par exemple sur une détermination rapide de variations de quantités de mannitol chez des mutants. En effet, l'altération d'un gène peut être compensée par des modifications d'expression et/ou d'activité des deux autres gènes/protéines. Un autre type de crible pourrait être basé sur la résistance au stress salin, mais il existe chez les algues brunes de nombreux mécanismes impliqués dans la réponse à ce type de stress, ce qui diminue les chances de sélectionner des mutants altérés dans la production de mannitol.

Une autre approche est une diminution transitoire de l'expression d'un gène d'intérêt, notamment par des techniques utilisant le principe du RNAi (RNA interférence). Cependant, bien qu'un protocole pour mener ce type d'expérience ait été récemment mis au point chez l'algue brune *Fucus* (Farnham *et al.*, 2013), celui-ci n'a pas encore été transposé chez *E. siliculosus*. De plus, la caractérisation phénotypique des algues ainsi obtenues serait compliquée compte tenu des paramètres indiqués ci-dessus.

Qui plus est, ces différentes approches ne permettent pas d'étudier les propriétés enzymatiques des protéines d'intérêts. Pour cela, la purification d'enzyme native est longtemps restée la seule approche pour mener à bien ce type de caractérisation biochimique. Quelques

exemples existent chez les algues brunes, notamment pour l'étude des halopéroxidases à vanadium impliquées dans le métabolisme des composés halogénés chez *Laminaria digitata* (Colin *et al.*, 2003). Cependant, à notre connaissance, aucune protéine native d'*Ectocarpus* n'été purifiée à homogénéité à ce jour. Cette approche est quand même envisageable pour cet organisme, notamment depuis que le cycle de vie est maîtrisé en laboratoire, ce qui permettrait de produire suffisamment de biomasse. Il existe toujours le risque de purifier un mélange de protéines catalysant la même réaction enzymatique, notamment pour les M1PDHs. Même si on pouvait envisager de compléter une purification d'enzymes natives par une séparation des protéines par électrophorèse bidimensionnelle, ce type d'approche reste assez lourd à mettre en œuvre, et ne permet d'étudier, théoriquement, qu'une seule protéine à la fois.

Une alternative à l'obtention d'enzymes natives est la purification d'enzymes recombinantes après expression de gènes d'intérêt dans un hôte hétérologue, notamment *Es. coli*. Un des avantages de cette approche est de permettre d'étudier plusieurs constructions plasmidiques en parallèle, et de produire rapidement de la biomasse bactérienne susceptible de contenir les protéines d'intérêt. De plus, il existe une large gamme de plasmides pour cloner les gènes, de souches d'*Es. coli* hôtes, de protocoles pour induire la production des protéines cibles, et de systèmes pour purifier les protéines recombinantes. Cependant, les résultats obtenus pour la caractérisation des enzymes du cycle du mannitol chez les algues brunes suggèrent que l'expression hétérologue de protéines issues de ces organismes est une approche aléatoire dans le sens où la possibilité d'obtenir de la surexpression de la protéine d'intérêt n'est pas garantie. Afin d'avoir un peu plus de recul par rapport à cette approche, une liste exhaustive des gènes d'algues brunes exprimés en système hétérologue a été établie (**Table 3**).

	Protéine cible	Nom des protéines et numéro d'accession	Organisme	Hôte	Références
1	Cytochrome c6	(AB105058)	*Hizikia fusiformis*	*Es. coli*	Akazaki *et al.* 2008
2	Glutathione S-transferase (cytosolic)	LdGST3 (EF422838)	*Laminaria digitata*	*Es. coli*	Hervé *et al.* 2008

3	Glutathione S-transferase(microsomal)	mEsGST1 (FP089517) mEsGST2 (FP089516)	*E. siliculosus*	*yeast*	Franco *et al.* 2009
4	Mannitol-1-phosphate dehydrogenase	EsM1PDH1 (CBJ25895)	*E. siliculosus*	*Es. coli*	Rousvoal *et al.* 2011
5	GDP-mannose dehydrogenase	EsGMD1 (CBJ29903)	*E. siliculosus*	*Es. coli*	Tenhaken *et al.* 2011
6	Type III Polyketide Synthase	SbPKS (HM245964)	*Sargassum binderi*	*Es. coli*	Baharum *et al.* 2011
7	PI.LSU/2 Intron-encoded Protein (IEP)	PI.LSU/2 group II intron (Z48620)	*Pylaiella littoralis*	*Es. coli*, yeast, human cell lines	Zerbato *et al.* 2013
8	Type III Polyketide Synthase	EsiPKS1 (CBN76919)	*E. siliculosus*	*Es. coli*	Meslet-Cladière *et al.* 2013
9	Full-length and truncated VHA-A = sub-unit A of the vacuolar-ATPase multi-subunit complex (V-ATPase A)	Full-length fVHA-A (KC515393) and truncated variant tVHA-A (KC515394)	*Fucus vesiculosus*	*Es. coli*	Morris *et al.* 2014
10	Mannitol-1-phosphatase	EsM1Pase2 (CBN78126)	*E. siliculosus*	*Es. coli*	Groisillier *et al.* 2014
11	Phytochrome – photosensory core module	EsilPHL1 (KF894955)	*E. siliculosus*	*Es. coli*	Rockwell *et al.* 2014
12	α-type carbonic anhydrase	SjCA (JF827608)	*Saccharina japonica*	*Es. coli*	Ye *et al.* 2013
13	Mannitol-2-dehydrogenase	SjM2DH (KC193778)	*Saccharina japonica*	*Es. coli*	Shao *et al.* 2014
14	HELMCHROME, Candidate Novel Blue Light Receptor for Phototaxis	HELMCHROME (CBJ26132.1)	*E. siliculosus*	*Es. coli*	Fu *et al.* 2014

Table 3 : Gènes d'algues brunes ayant été exprimés en système hétérologue et pour lesquels la production de protéines recombinantes a pu être mise en évidence par purification et/ou mesure d'activités enzymatiques.

A partir des informations décrites dans la liste ci-dessus, il apparaît que l'algue brune la plus considérée est *E. siliculosus*, ce qui n'est pas surprenant car c'est l'organisme modèle pour ces algues, et son génome est séquencé, ce qui donne accès aux gènes d'intérêt. On remarque également que le système d'expression le plus utilisé est *Es. coli*, la purification étant le plus souvent réalisée par chromatographie d'affinité. J'aimerais également attirer l'attention sur le fait que ce travail est en plein essor, la moitié des exemples datant des années 2013-2014. Ainsi, lorsque j'ai débuté ma thèse en 2011, très peu de gènes d'algues brunes étaient exprimés dans des systèmes hétérologues. Dans la liste, il y a plusieurs exemples pour lesquels la production de protéines recombinantes a été mise en évidence, mais sans surexpression, ce qui rend la purification impossible (protéines n°3 et 4 du tableau). Dans d'autres cas, l'obtention de protéine

recombinante a permis soit de produire des anticorps, comme c'est le cas pour les protéines n°9, 12, soit de réaliser la caractérisation biochimique de l'enzyme avec notamment la détermination des paramètres cinétiques (protéines n°2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10 et 11). Il est aussi intéressant de noter l'utilisation de gènes de synthèse dont les codons ont été optimisés pour l'expression chez *Es. coli* par Rockwell *et al.* (2014). Enfin, parmi toutes les protéines citées, la détermination de la structure tridimensionnelle n'a pu être réalisée que pour deux d'entre elles (protéines n° 1 et 8).

Comme nous venons de le voir, l'obtention d'une protéine recombinante d'algue brune soluble n'est pas chose facile. Un Service de Production de Protéines Recombinantes a été mis en place au sein de l'UMR 8227 à la Station Biologique de Roscoff depuis 2006. L'objectif de ce service est de surmonter le problème de l'expression soluble de protéines provenant d'organismes marins. Pour cela, une stratégie à moyen débit adaptée à ces organismes a été mise en place et validée par un projet pilote intitulé « Marine-express » financé par le réseau d'excellence « Marine Genomics Europe » (2006-2008) (Groisillier *et al.*, 2010). Contrairement à une approche classique d'expression des protéines au cas par cas utilisée généralement par les laboratoires, il a été mis en œuvre une stratégie originale qui est l'approche en parallèle pour le clonage et la transformation d'*Es. coli*. Elle repose sur la manipulation des gènes en microplaques 96 puits et sur un protocole unique prédéfini pour tous les gènes étudiés. De plus, deux vecteurs d'expression, permettant d'obtenir des protéines recombinantes contenant à leur extrémité N-terminale des étiquettes de marquage His-tag ou GST-tag, sont utilisés afin d'augmenter les chances d'obtenir une protéine soluble. Après huit ans d'existence, 480 cibles/protéines issues d'organismes marins ont été étudiées. Parmi ces cibles, 34 % proviennent d'algues, deux-tiers algues brunes et un tiers d'algue rouge (**Figure 11**). Si on s'intéresse au nombre de protéines recombinantes solubles obtenues (**Figure 12**), la répartition entre protéines d'algues brunes et d'algues rouges reste la même (2/3, 1/3), mais seulement 19 protéines sur les 164 d'algues (soit 11 %) ont été obtenues solubles. Ce bilan reflète bien la difficulté à exprimer un gène provenant d'une macroalgue rouge ou brune dans un système d'expression bactérien.

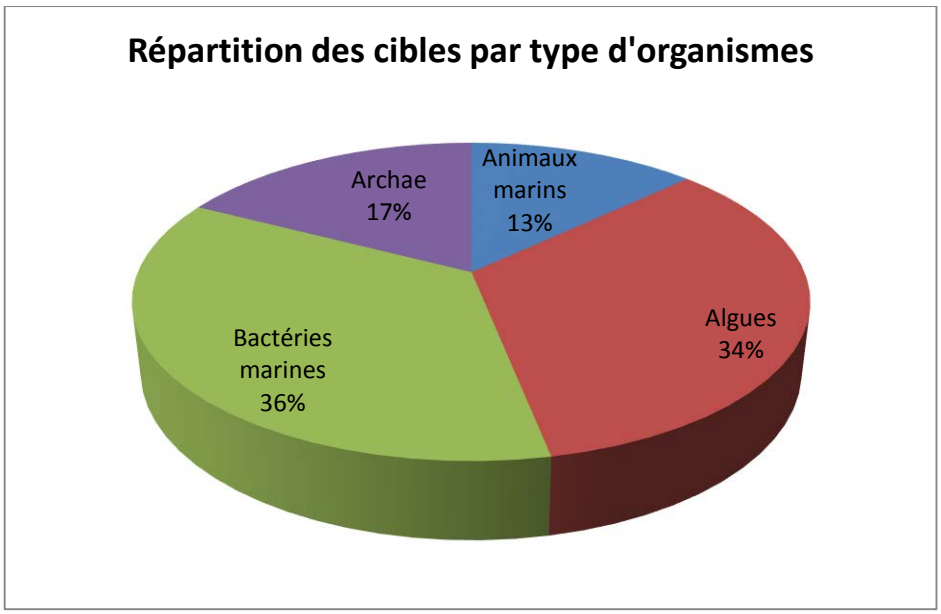


Figure 11 : Bilan de la répartition des cibles étudiées dans le Service de Production de Protéines Recombinantes de l'UMR8227. 480 protéines ont été considérées au total.

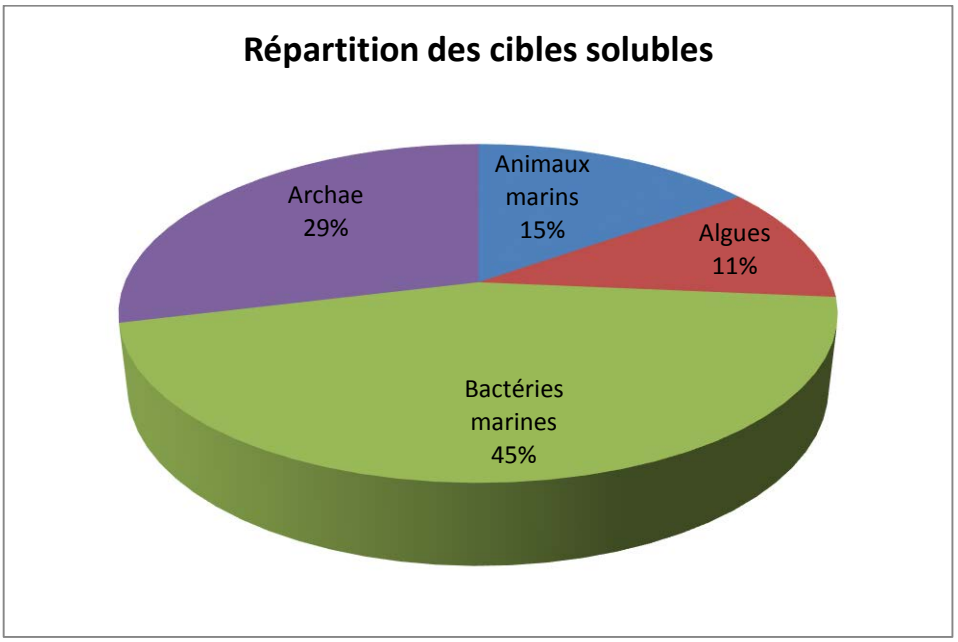


Figure 12 : Bilan de la répartition des cibles solubles obtenues dans le Service de Production de Protéines Recombinantes de l'UMR8227. Les pourcentages sont calculés à partir du nombre de protéines considéré pour chaque type d'organismes.

Partie 5 : Objectifs de la thèse

Lorsque j'ai commencé ma thèse, l'étude des étapes M1PDH et M1Pase chez *E. siliculosus* avait déjà été amorcée dans l'équipe Physiologie des Algues et Environnement Abiotique. Dans ce contexte, l'objectif premier était de travailler sur les enzymes M2DH et HK afin de compléter la caractérisation des enzymes impliquées dans le cycle du mannitol. Nous souhaitions notamment étudier leurs conditions optimales d'activité, leurs paramètres cinétiques, et l'influence de différents produits chimiques sur les réactions qu'elles catalysent. L'expérience au sein du laboratoire concernant l'expression hétérologue chez *Es. coli* et la possibilité de pouvoir tester plusieurs constructions en parallèle nous ont décidé à privilégier l'approche par expression hétérologue chez *Es. coli* plutôt que la caractérisation d'enzyme native. Cependant, malgré de nombreux essais pour exprimer les deux gènes d'*Ectocarpus* chez *Es. coli*, aucune protéine recombinante n'a pu être exprimée en phase soluble, ce qui limitait fortement les possibilités pour caractériser biochimiquement ces deux enzymes. Par conséquent, il a été décidé, en seconde moitié de thèse, de réorienter le travail vers la caractérisation de M1PDH recombinantes, et ce sont ces résultats qui sont décrits dans ce manuscrit. D'autre part, un second objectif portait sur l'analyse transcriptomique des différents gènes codant pour les enzymes potentiellement impliquées dans le cycle du mannitol d'*E. siliculosus*. Enfin, nous souhaitions comparer le cycle du mannitol chez différents type d'organismes tels les champignons, les sporozoaires et les algues brunes.

Matériels et Méthodes

1) Analyses bioinformatiques

Les séquences protéiques EsM1PDH1, EsM1PDH2 et EsM1PDH3 ont été utilisées pour réaliser des analyses par BLAST afin de retrouver des homologues chez d'autres organismes. Les alignements de séquences protéiques ont ensuite été réalisés avec le programme MEGA5.1 (Tamura *et al.*, 2011). Le programme ESPript 3 (Robert et Gouet, 2014) a été utilisé pour mettre en évidence les acides aminés conservés entre les différentes séquences. Une prédiction des structures tridimensionnelles (3D) a été réalisée afin de compléter cette analyse, grâce à de la modélisation par homologie de structure en utilisant le programme PHYRE2 (Kelley et Sternberg, 2009). Enfin, une analyse phylogénétique a été réalisée avec le programme MEGA5.1 (Tamura *et al.*, 2011).

2) Préparation d'extraits bruts d'*E. siliculosus*

La souche d'*E. siliculosus* (Dillwyn) Lyngbye 32 est cultivée dans des flasques en plastique de 10 L à 14°C, avec de l'eau de mer filtrée, autoclavée et enrichie en nutriments par addition de milieu de Provasoli, durant une photopériode 12h/12h. Les algues sont ensuite prélevées et broyées dans un mortier en présence d'azote liquide. Les poudres ainsi obtenues sont solubilisées dans un tampon d'extraction contenant 25 mM de MOPS à pH 7,2, 15 mM d'EGTA, 15 mM de $MgCl_2$, 2 mM de DTT, 0,5% de PVP, et une tablette d'inhibiteur de protéases (Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablets, Roche, Meylan, France). Environ quatre volumes de tampon sont utilisés pour un volume de poudre. Les extraits sont ensuite passés dans un broyeur de type Wheaton (une dizaine d'allers-retours successifs), puis incubés à 4°C pendant 30 minutes. Après six cycles de 10 sec sonication / 10 sec dans la glace, les échantillons sont centrifugés à 14000 rpm pendant 30 minutes et les surnageants sont récupérés et stockés à 4°C. La quantification des protéines est réalisée par mesure de l'absorbance à 280 nm au Nanodrop 2000 (Thermo Scientific).

3) Clonage de gènes d'*E. siliculosus* dans un vecteur d'expression et production d'enzymes recombinantes chez *Es. coli*

3.1) Clonage des gènes d'*E. siliculosus* impliqués dans le cycle du mannitol

Afin de favoriser la production de protéines d'*E. siliculosus* chez *Es. coli*, les gènes codant pour les protéines EsM1PDH1, EsM1PDH2, et EsM1PDH3 ont été synthétisés pour optimiser la traduction chez *Es. coli*. Ces gènes de synthèse, produits par la société GeneArt, sont ensuite amplifiés pour être incorporés dans un plasmide d'expression. Pour cela, une polymérase classique (GoTaq® DNA Polymerase, Promega) est utilisée afin, tout d'abord, de vérifier le bon fonctionnement des amorces (**Table 4**). Ces amorces contiennent des sites de restriction pour le clonage des gènes dans le plasmide d'expression. Le milieu réactionnel (pour un puits, soit 25 µL) contient du tampon de réaction 5X Flexi Buffer Promega (5 µL), des dNTPs (0,5 µL à 10 mM), du $MgCl_2$ (1,5 µL à 25 mM), de la polymérase (0,2 µL à 5u/µL) ainsi que la combinaison des deux amorces correspondantes au gène d'intérêt (1 µL à 5 µM de chaque amorce). Le programme utilisé est le suivant : 94°C pendant 5 min, 35 cycles de 30 sec à 94°C, 30 sec à 50°C, 2 min à 72°C et pour finir 10 min à 72°C.

Gène	Oligonucléotide forward 5' -> 3'	Oligonucléotide reverse 5' -> 3'
EsM1PDH1	GGGGGG*GGATCC*ATTGATATTAGCCTGGCA	CCCCCC**GAATTC**TTACGGCTGGCTAACCG
EsM1PDH2	GGGGGG*GGATCC*AGTGATGCAGTTAGCCG	CCCCCC**GAATTC**TTAAACATCACCAACTTTGG
EsM1PDH3	GGGGGG*GGATCC*TTTAGCCCGAGTCCGCG	CCCCCC**GAATTC**TTAATGTGCTTTACGGCTG

Table 4 : Oligonucléotides utilisés pour le clonage des gènes *EsM1PDHs*. Le site de restriction est en italique pour *Bam*HI et en gras pour *Eco*RI.

Après migration sur gel pour vérifier que les bandes obtenues avaient la taille attendue pour chacun des gènes d'intérêt, une nouvelle PCR est réalisée, mais avec une polymérase « haute-fidélité » (Expand High Fidelity PCR System, Roche) afin de minimiser le risque d'erreurs lors de l'amplification. La composition du milieu réactionnel est la même que celle décrite ci-dessus, sauf que le tampon utilisé est spécifique de la polymérase Expand ; de plus, le programme de PCR est identique à celui mentionné plus haut. Après purification des produits de PCR avec le kit NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up de Macherey-Nagel, les fragments d'intérêt sont digérés par les enzymes de restriction *Bam*HI et *Eco*RI (Biolabs), à 37°C pendant 2h30. D'autre part, une

restriction avec les mêmes enzymes est réalisée pour le plasmide d'expression pFO4 (**Figure 13**). Le clonage *Bam*HI-*Eco*RI dans le vecteur d'expression pFO4 permet d'ajouter une étiquette histidine à l'extrémité N-terminale des protéines d'intérêt. Ce tag histidine sera exploité pour détecter et purifier les protéines recombinantes lors des étapes suivantes. Un aliquote des fragments des différents gènes digérés (7 µL) et 1 µL de plasmide pFO4 restreint sont ensuite ligués pendant une nuit à 4°C, avec 1µL de ligase classique (T4 DNA Ligase, Promega) et 1 µL de tampon de ligase fourni avec l'enzyme.

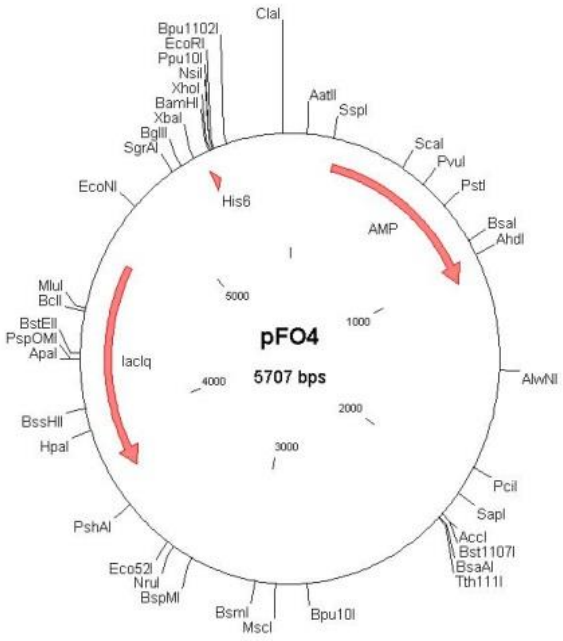


Figure 13 : Carte du plasmide pFO4 contenant, dans son multi-site de clonage, les sites de restriction *Bam*HI et *Eco*RI. Juste en amont du site de restriction *Bam*HI, six codons histidine permettent d'obtenir une protéine recombinante en fusion avec une étiquette histidine à l'extrémité N-terminale. La sélection des bactéries transformées avec le vecteur se fait grâce au gène de résistance à l'ampicilline. Le promoteur en amont du gène est le promoteur T7, et il est donc nécessaire de transformer ce vecteur dans une souche d'*Es. coli* BL21(DE3) qui contient le gène de la T7 ARN polymérase. L'induction de la transcription du gène d'intérêt est réalisée en présence d'IPTG ou de lactose.

3.2) Transformation bactérienne

Les produits de ligature sont ensuite transformés dans la souche DH5α d'*Es. coli* pour obtenir des quantités élevées de plasmides recombinants. Dans ce but, 50 µL de cellules compétentes

DH5α, auxquelles est ajouté le mélange de ligature (5 µl), sont placés dans de la glace pendant 30 min et mélangés doucement de temps en temps. Après un choc thermique de 45 sec à 42°C, les cellules sont replacées dans la glace pendant 5 min. Après addition de 70 µL de milieu SOC (milieu de régénération, Novagen), puis incubation à 37°C pendant 45 min et agitation à 200 rpm, 100 µL de cellules sont étalés sur boîte LB agar contenant de l'ampicilline (concentration finale : 100 µg/mL) et incubés une nuit à 37°C.

Pour vérifier la présence du plasmide dans les bactéries transformées, des PCR sur colonies sont réalisées. Pour cela, un mélange de réaction Master Mix (Promega, USA) est préparé. Il contient des amorces déterminées de part et d'autre du multi-site de clonage du plasmide pFO4 (amorce sens : GCAGCAGCCACCATCACCATCACC et antisens : CCTTTCGGGCTTTGTTAGCAGCCGG) et une fraction de colonie isolée. Le programme utilisé est le même que précédemment (paragraphe 3.1). Puis le kit « Miniprep » Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega) est utilisé pour extraire les plasmides, qui ont ensuite servi pour transformer différentes souches d'expression d'*Es. coli* : BL21(DE3), BL21(DE3)codon+, origami(DE3), C41(DE3), C43(DE3). Pour les bactéries « codon+ », la différence par rapport au protocole de transformation précédent est que l'on ajoute 2 µL (1,42 M) de β mercaptoéthanol au tube de cellules compétentes, avant incubation 30 min dans la glace et choc thermique à 42 °C pendant 20 sec et non 45 sec comme décrit plus haut. Les bactéries ont alors été étalées sur boîtes de Petri contenant de l'ampicilline à 100 µg/mL et incubées une nuit à 37°C. Les bactéries recombinantes sont de nouveau testées par PCR sur colonies afin d'éviter les faux positifs.

3.3) Séquençage

La séquence des gènes clonés dans le plasmide de surexpression est vérifiée par du séquençage basé sur la méthode de Sanger, à la plateforme Genomer de la Station Biologique de Roscoff. Pour cela, une réaction de séquence est réalisée en utilisant des dNTPs couplés à des fluorochromes différents, permettant ainsi la séparation et la détection des fragments synthétisés en électrophorèse capillaire, et donc la détermination de l'enchaînement des nucléotides composant la séquence d'ADN. Le milieu réactionnel est composé, pour chaque puits, de 0,5 µL de kit BigDye Terminator V3.1 (Applied Biosystems, USA); 0,75 µL de tampon 5X; 1 µL de chaque amorce; 1,75 µL d'eau et 1 µL d'ADN. Le programme du thermocycleur utilisé est le suivant:

-dénaturation 1 : 96°C pendant 5 min

-dénaturation 2 : 96°C pendant 10 sec

-hybridation : 50°C pendant 5 sec

-élongation : 72°C pendant 4 min

Le cycle « dénaturation 2-hybridation-élongation » est répété 25 fois. Les amorces utilisées sont positionnées de part et d'autre du multi-site de clonage du pFO4 (amorce sens : GAGCGGATAACAATTCCC et amorce anti-sens : CAAGACCCGTTTAGAGGC).

3.4) Induction de la production des protéines recombinantes

Afin d'induire une production de protéines recombinantes d'*E. siliculosus*, les bactéries sont mises en culture dans un milieu auto-inductible ZYP5052 (Studier, 2005). Pour se faire, une préculture de 10 mL est d'abord réalisée sur la nuit à 37°C dans du milieu LB contenant 10 µL d'ampicilline (1 mg/ml) sous agitation (180 rpm). Le lendemain, 1 L de milieu auto-inductible ZYP5052 avec ampicilline est ensemencé avec la préculture dans un Erlenmeyer de 5 L, et incubé 3 jours à 20 °C sous agitation.

Afin d'augmenter le rendement en protéines recombinantes solubles, d'autres conditions de culture ont été testées. Des cultures ont été réalisées à différentes températures (15, 20, 25 et 30°C), dans différents volumes (chaque température a été testée avec un volume de 100 ou 200 mL final), et pour différents temps de culture (24h, 28h, 32h et 48h de culture). Outre le milieu ZYP5052, les bactéries ont également été mises en culture dans du milieu LB pour une double induction. Dix mL d'une préculture en milieu LB sont incubés en présence de 500 mL de milieu LB contenant 0,5% de glucose (concentration finale, stock à 10%), 300 µL d'ampicilline (concentration finale 1 mg/mL), et à 37°C dans un erlenmeyer d'une contenance de 5 L, avec agitation à 200 rpm jusqu'à l'obtention d'une DO_{600} de 1,2-1,5. L'induction se fait ensuite par ajout de 500 mL de milieu LB froid contenant du lactose à une concentration finale de 0,6% (stock à 12%), de l'HEPES à 20 mM et de l'IPTG à 1 mM (concentrations finales). On laisse alors la culture à 20°C, 200 rpm pendant 18h (DO_{600} = 5-8).

Les cultures sont ensuite centrifugées pendant 30 min à 5000 rpm. Les culots de bactéries sont remis en suspension avec 7 mL du tampon qui sera utilisé lors de la première étape de purification des protéines et dont la composition est la suivante: Tris-HCl 25 mM, NaCl 200 mM, imidazole 5

mM, pH 7.5, des anti-protéases (Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablets, Roche, Meylan, France), et 50 µL de DNase I (concentration : 500U/µL) de pancréas de bœuf (Sigma Aldrich). Les cellules sont lysées mécaniquement grâce à une French-Press. Les lysats obtenus sont ensuite centrifugés pendant 1h à 14000 rpm. Les surnageants sont ensuite utilisés pour mesurer directement les activités enzymatiques sur ces extraits acellulaires d'*Es. coli*, et/ou filtrés sur des membranes de 0,20 µm avant d'être chargés sur les colonnes de purification de protéines.

4) Purification des protéines recombinantes

4.1) Purification de protéines solubles

Les protéines recombinantes d'*E. siliculosus* (5 mL de lysat filtrés) sont purifiées par chromatographie d'affinité sur une colonne HisPrep™ FF 16/10 (GE Healthcare, USA) intégrée dans un appareil de chromatographie en phase liquide Akta Avant (GE Healthcare, USA). Les protéines d'intérêt sont retenues grâce aux interactions entre les ions nickel de la colonne et l'étiquette histidine des protéines. Elles sont ensuite éluées par un gradient croissant (0 à 100%) d'imidazole (Tris-HCl 25 mM pH 7,6, NaCl 200 mM et imidazole 500 mM) et collectées dans des plaques « deepwell » 96 puits. Les fractions ayant une absorbance élevée à 280 nm sont déposées sur gel SDS-PAGE à 12% et la taille des protéines présentes est analysée par comparaison avec le marqueur de taille « Precision plus protein unstained standards » (Biorad, USA). La quantité de protéines présente est déterminée avec le Nanodrop 2000 (Thermo Scientific, USA) à 280 nm, ou par test de Bradford. Celui-ci est réalisé grâce au kit Bradford Protein Assay (Biorad, USA) et est basé sur la réalisation d'une gamme étalon de protéine BSA (Bovine Serum Albumin) allant de 0,55 mg/mL à 5,5 mg/mL et dont chaque point est testé en triplicat technique (**Figure 14**). La concentration en protéines dans l'échantillon est déterminée grâce à la droite obtenue avec la gamme étalon de BSA.

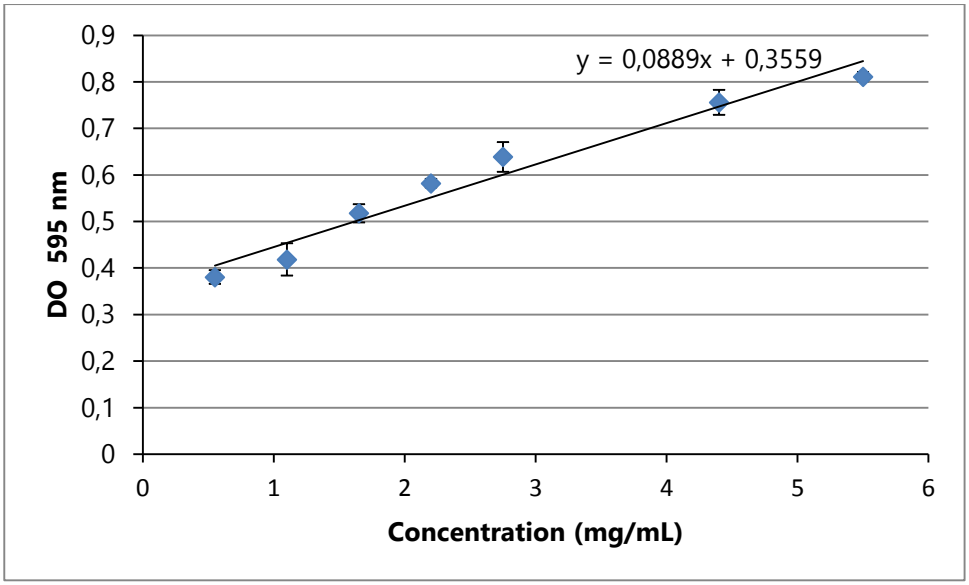


Figure 14 : Exemple de gamme étalon obtenue pour la protéine BSA en test de Bradford et utilisée pour la détermination de la concentration en protéines recombinante.

Lors des essais d'optimisation de la purification, des étapes de chromatographie échangeuses d'anions ont été ajoutées, soit en amont de la chromatographie d'affinité, soit en aval. Les colonnes HiTrap Q Sepharose FF (17-5053-01 GE Healthcare) et HiTrap Q HP (17-1153-01 GE Healthcare) sont équilibrées avec un tampon Tris HCl 25 mM à pH 7,6 et les protéines éluées avec un gradient de Tris-HCl 25 mM pH 7.6, NaCl 1 M de 0 à 100% en 14 CV (volume de colonne) dans des plaques « deepwell » de 96 puits.

En fonction des résultats obtenus lors de l'étape de purification par chromatographie d'affinité ou par chromatographie échangeuse d'anions, certains échantillons contenant la protéine d'intérêt sont ensuite purifiés par chromatographie d'exclusion de taille sur une colonne Superdex 200 16/60 (GE Healthcare), préalablement équilibrée dans le tampon Tris-HCl pH 7.6 100 mM, NaCl 200 mM, et à un débit maximal de 1 $mL.min^{-1}$. Cette étape de filtration sur gel permet de séparer les protéines en fonction de leur poids moléculaire, et aussi de déterminer la structure quaternaire des protéines d'intérêt. Pour ce faire, la colonne utilisée a été calibrée à l'aide du kit Molecular Weight Markers pour filtration sur gel (Sigma Aldrich, USA).

Les mêmes conditions ont été utilisées lors des essais avec la colonne Sephacryl S-200 (1.6 x 93 cm).

Si la concentration de l'échantillon obtenu après chromatographie d'exclusion de taille est supérieure ou égale à 1 mg/mL, une DLS (Diffusion dynamique de la lumière, Dynamic Light Scattering) est réalisée afin d'analyser l'homogénéité de l'échantillon. Cinquante microlitres

d'échantillon sont analysés dans une cuve en quartz avec un appareil ZetaSizer Nano-S (Malverne Instruments, UK) possédant comme source un laser vert (excitation à 532 nm). Cette technique permet de déterminer un profil de distribution de la taille des particules en suspension dans la solution testée, et donc de savoir si les échantillons testés contiennent une ou plusieurs protéines.

Les fractions obtenues par chromatographie d'exclusion de taille présentant un intérêt sont déposées sur gel dénaturant SDS-PAGE afin d'en déterminer la pureté. Un gel supplémentaire est réalisé pour vérifier la présence de la protéine recombinante par Western blot. Les protéines présentes dans le gel sont alors transférées sur une membrane de nitrocellulose 0,2 µm grâce au Trans-Blot Turbo de Biorad à l'aide du Transfert Pack (Biorad, USA). Cette membrane est incubée avec du tampon TBS-Tween contenant du lait durant une nuit à 4°C. Le lendemain, elle est d'abord rincée durant 15 min avec le tampon TBS-Tween seul, puis incubée 1h à température ambiante avec du TBS-Tween contenant des anticorps @histag dilués au 10000^{ième} et couplés à l'enzyme Horseradish Peroxidase (HRP). Après un second rinçage, la fixation des anticorps est mise en évidence par le Clarity Western ECL Substrate de Biorad (USA) : ce test est basé sur la réaction de l'HRP avec un substrat chemoluminescent tel que l'ECL, et permet de révéler la présence de protéines sur la membrane de nitrocellulose. Les bandes d'intérêt présentes sur gel SDS-PAGE ont été découpées, stockées dans des tubes contenant de l'acide acétique à 1%, puis données à la plateforme de spectrométrie de masse pour leur séquençage par MALDI-TOF avec un appareil de type Voyager DE STR (Applied Biosystems).

4.2) Essai de purification de protéines insolubles

Pour les tests de solubilisation des protéines contenues dans les corps d'inclusions (fraction insoluble), les culots obtenus après lyse par French-Press sont repris dans de l'urée 6 M, et les corps d'inclusions cassés au Potter. Après une nouvelle étape de centrifugation de 35 min à 20000 rpm, une partie du surnageant est dialysé sur la nuit à 4°C dans un tampon Tris HCl 50 mM et NaCl 100 mM (pH 7,6). Une autre partie du lysat obtenu après dénaturation à l'urée est passée sur colonne hisprep. L'échantillon dialysé est ensuite considéré pour tester 96 tampons afin de déterminer des conditions optimales de renaturation des protéines. Ces 96 conditions sont définies selon un plan factoriel faisant varier les paramètres décrits **Table 5**, et incluent 16 tampons du screen FoldIt de Hampton. Chaque puits contient 95 µL de tampon de criblage et 5 µL de protéine (à une concentration au moins égale à 4 mg/mL). Bien qu'un grand nombre de conditions

n'entraîne ni la formation de précipités, ni celle d'agrégats (déterminé par mesure à DO 340 nm) immédiatement après le mélange, et 2h après ou le lendemain du début de l'expérience, aucune activité enzymatique n'a été détectée après ce criblage.

pH	Précipitants	Réducteurs	NDSB (non detergent sulfobetaine)	Additifs
Sodium Acétate 50 mM pH4 MES 50 mM pH 5 Tris 50 mM pH 7 et 8 CHES 50 mM pH 9	Glycérol 20% NaCl 100 mM et 200 mM KCl 100 mM EDTA 1 mM PEG 4000 0,05% PEG 400 0,05%	B-mercaptoéthanol 10 mM	NDSB 195 100 mM NDSB 201 100 mM NDSB 256 100 mM	Arginine 800 mM Glucose 500 mM Cocktail (NADH, Thiamine, Biotine, $CaCl_2$, $MgCl_2$, $CuSO_4$, $ZnCl_2$, $CoSO_4$, ADP, $NiCl_2$ à 50 µM)

Table 5 : Tampons et solutions utilisées pour le criblage des conditions de renaturation de protéines insolubles.

5) Mesures des activités enzymatiques

Les activités enzymatiques M1PDH sont mesurées dans les deux sens de la réaction, c'est-à-dire dans le sens réduction du fructose-6 phosphate (F6P) qui produit du mannitol-1-phosphate (M1P), ainsi que dans le sens oxydation du M1P qui produit du F6P. Les mesures sont basées sur des changements d'absorbance à 340 nm, dus à l'apparition ou la disparition du NAD^+ (**Figure 15**). Le même protocole est utilisé lors des tests réalisés avec les extraits d'*E. siliculosus*, avec ceux d'*Es. coli,* ou en présence de protéine recombinante purifiée.

Les activités spécifiques calculées à partir des extraits acellulaires d'*Es. coli* pour les protéines EsM1PDHs correspondent aux différences entre des activités M1PDH mesurées dans des extraits bactériens préparés à partir de bactéries transformées avec un plasmide contenant un des gènes *EsM1PDH* et celles calculées dans des bactéries transformées avec un plasmide ne contenant pas de gène d'algue.

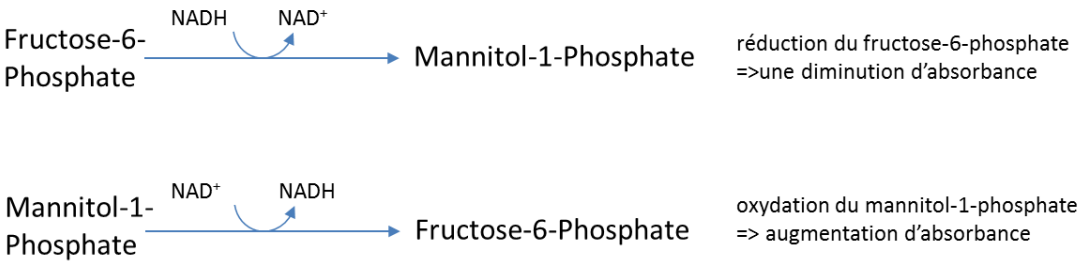


Figure 15 : Principe de la mesure d'activité enzymatique par diminution ou augmentation d'absorbance à 340 nm.

Les mesures d'activité sont réalisées à l'aide d'un spectrophotomètre lecteur de microplaque Safire 2 (Tecan, Männedorf, Suisse) dans des plaques UV-star de 96 puits (Greiner bio-one, Allemagne). Pour déterminer l'activité enzymatique dans le sens réduction du F6P, le milieu réactionnel, dont le volume final est de 100 µL, est composé de tampon 50 mM Tris-HCl à pH 7, 0,2 mM de NADH, et de 1-3 mM de F6P. Pour le sens inverse de la réaction, le milieu réactionnel est composé de tampon Tris HCl pH 9 à 50 mM, de 0,5 mM de NAD^+ et de 0,5 mM de M1P. Les réactions sont démarrées par addition d'extraits protéiques ou de protéines recombinantes, et les quantités sont données ci-dessous en fonction des différents tests réalisés (**Table 6**). Les tests sont effectués à 25°C pendant 21 min.

	Sens réduction du F6P	**Sens oxydation du M1P**	**Témoin négatif**
Extraits d'*E. siliculosus*	3 à 6 µg	3 à 6 µg	Pas d'ajout de substrat
Extraits d'*Es. coli*	30 µg environ	30 µg environ	Extrait de bactéries contenant le plasmide pFO4 sans insert
Enzyme recombinante purifiée	2 µg en moyenne	2 µg en moyenne	Pas d'ajout de substrat

Table 6 : Quantité d'extraits protéiques utilisée pour les tests d'activité enzymatique.

Le pH d'activité optimum a été déterminé en testant une gamme de tampons (**Table 7**) à 50 mM (concentration finale).

Tampon	pH testés
MES	5,5 ; 6 ; 7
Tris acétate	6 ; 6,5 ; 7
Tris-HCl	6,5 ; 7 ; 7,5 ; 8 ; 8,5 ; 9
Bis-Tris	8,5 ; 9 ; 9,5
Hepes-KOH	7 ; 7,5 ; 8,5 ; 9
Glycine	8,5 ; 9 ; 9,5 ; 10 ; 10,5
CAPS	9,5 ; 10 ; 11

Table 7 : Conditions testées pour déterminer le pH optimum d'activité de l'enzyme EsM1PDH1.

Pour l'étude de la température optimale d'activité, les tests ont été réalisés dans une cuve en quartz au spectrophotomètre UV-240 1PC (SHIMADZU, Japon), équipé d'un régulateur de température. Le volume réactionnel a été augmenté de 100 µL à 500 µL final, et le volume des différents réactifs augmenté en conséquence. Les températures testées ont été: 5, 10 15, 20, 30, 40 et 50°C. Une incubation de 15 min avant l'ajout d'enzyme a été effectuée afin de stabiliser le mélange réactionnel à bonne température.

L'influence du NaCl sur l'activité de l'enzyme EsM1PDH1 a été mesurée à partir d'un extrait de protéine recombinante purifiée au préalable dessalée par PD-10 Desalting Column (GE Healthcare, USA). Du NaCl en quantité croissante a ensuite été ajouté au milieu réactionnel, à des concentrations finales de 50, 100, 200, 300, 400, 500 mM et 1 M.

Afin d'évaluer la spécificité de l'enzyme, différents substrats ont été testés, aux concentrations de 50 et 100 mM: glucose-6-phosphate, mannose-6-phosphate, mannose-1-phosphate, fructose-1-phosphate et glucose-1-phosphate.

Lors des tests réalisés pour la détermination des paramètres cinétiques de l'enzyme EsM1PDH1 recombinante, des concentrations croissantes allant de 0,05 à 20 mM pour le F6P (0,05 ; 0,1 ; 0,125 ; 0,25 ; 0,5 ; 1 ; 2 ; 4 ; 10 ; 20 mM) et de 0,005 à 10 mM pour le M1P (0,005 ; 0,01 ; 0,05 ; 0,25 ; 0,5 ; 1 ; 2 ; 5 ; 10 mM) ont été testées à 25°C pendant 21 min avec 0,2 µg d'enzyme par puits.

Pour les cofacteurs, les paramètres cinétiques du NADH ont été déterminés en présence des concentrations suivantes: 0,005 ; 0,01 ; 0,05 ; 0,125 ; 0,25 ; 0,5 ; 1 ; 2 ; 5 mM. Pour le NAD^+, les concentrations sont: 0,005 ; 0,01 ; 0,05 ; 0,125 ; 0,25 ; 0,5 mM.

6) Analyse des variations d'expression des gènes par RT-PCRq

Les échantillons d'algues considérés correspondent à ceux utilisés pour mesurer les variations de concentration en mannitol au cours du cycle diurnal (Gravot *et al.*, 2010). Le cycle diurnal est composé d'une phase lumineuse de 10h suivie d'une phase obscure de 14h. Les échantillons représentent des algues prélevées toutes les 3h pendant 24h (le premier jour de l'expérience), et toutes les 6h les 24h suivantes (deuxième jour). Ainsi, les échantillons 12 h, 15h, 18 h, 21 h, 36 h, et 42 h sont prélevés pendant la phase obscure. Les ARN totaux ont été extraits à partir de tous ces échantillons, et nous avons des triplicats biologiques pour le premier jour, et des duplicats pour le second jour (Gravot *et al.*, 2010).

Après avoir vérifié la concentration au Nanodrop des ARN totaux, le kit Impro II (Promega) est utilisé pour synthétiser les ADNc. La quantité d'ARN utilisée pour la transcription inverse est de 500 ng par échantillon, dans un volume final de 20 µL par réaction. De plus, des amorces spécifiquement dessinées pour la PCR quantitative (**Table 8**) sont déterminées grâce au logiciel Primer Express® (Life Technologies, USA). Pour les gènes appartenant à des familles multigéniques (le cas pour les gènes codant pour les protéines M1PDHs et M1Pases), les amorces sont sélectionnées après alignement des séquences pour identifier des zones de faible similarité afin de diminuer les risques d'amplification non-spécifique (**Figure 16 et 17**).

Gènes	Amorce Forward (5'-3')	Amorce Reverse (5'-3')
M1PDH1	CTGGGCTGTGGCTCGCCTTTTGC	GTGCGTGCCGGATGATCT
M1PDH2	ATGCCGTACCCTGCTGAGAT	TGTCTTCGACCCCACTGAATC
M1PDH3	AGTGTCGAGACGGAGGAAGAG	GAGAACCGGTCGAGAGTTTG
M1Pase1	ACCTCATCCCCCTTGTGGA	AGGCAGAAGTCCTCGCCC
M1Pase2	TCGGACTGACGGTGGGATAC	GGCATGCGTGTCCTTTTTGT
M2DH	CCCAAGCCCGAGAAGTACATT	GAAGCCTTCCAGTTCAACGATCT
HK	AGCTCTTGTCTTCGGAGAAAGC	CGCTCTCCCCCCAATACC
EF1α	GCAAGGGCCTCAGCTCTG	ACAAGCCGTCTGGGTATATGTTAGC

Table 8 : Séquences nucléotidiques des amorces utilisées pour les expériences de RT-PCRq.

Les amplifiats obtenus en utilisant ces amorces sont de 65 nt pour le gène M1PDH1, 62 nt pour M1PDH2, 71 nt pour M1PDH3, 61 nt pour M1Pase1, 65 nt pour M1Pase 2, 63 nt pour M2DH, 65 nt pour HK, et 160 nt pour EFα.

```
M1PDH3 882   CACGGCATCGCCGGAGATCCAGGAGGAGCTGTGGGCGTGGATCGTGGTCCGGTGCCTCGA
M1PDH1 746   GGATGCCCCGCAAGACGTACAGGACTCTATTTGGCACTGGGCTGTGGCTCGCCTTTTGCT
M1PDH2 780   CACCGCCACGGAACAGGAGAACGCCTTGGTGTGGAGGTGGGCGGTGGCGCGGGTGATGTA
                 **  **    *     * *      * ***   ***   ****  **     *

M1PDH3       CCTGCTCGACCGCTTCGGGGTAGAGATGCTCAAGAATGCGCACAGTGTCGAGACGGAGGA
M1PDH1       GATTTTGTGGGAACACGACCACGAGATCATCCGGCACGCACACGGCTTGACCACGGATGA
M1PDH2       CGTCATGTGGGAGCATGAGCCGGACATCATCAAGGCGGCTCATAACATCAACACGGATGA
               *  *          *     ** **  **  *   ** **     *    ***** **

M1PDH3       AGAGGTGTTCGAGGTGCTTCTTGACTACGGCCGACAAACTCTCGACCGGTTCTCGAGCGT
M1PDH1       TGAGGTGTGTGAGAAGCTCATCGCGTACGCGCGCAGCTCGTTGAAACGTTTCGACACGGT
M1PDH2       AGAGTTATGCCGTACCCTGCTGAGATACGCCAAGACCACCCTGGGGAGATTCAGTGGGGT
              *** * *        **  *    ****         *  *     * ***      **

M1PDH3       CGTCGACTCCACCAGCAGAGTGTTGGGCGGGGGGCTTGGAAACCGTTTGGTGACTCGGCT
M1PDH1       GGAAGACACGACCGGAAGGGTGCTCGCCGGGGGAGTGGCCAACCGCTGGAACACTCGCCT
M1PDH2       CGAAGACAAGGCCGGGAGGGTGCTAGGCGGAGGCGTGGCCAACCGTTTCGAGGGAAGGCT
              *  ***    ** * ** *** * * *** **  * *  ***** *         * **

M1PDH3       CCAACCGATGGCCATCTTCATGGGCAACAACAAGTTTGCCGGCACCGGGAGGCCCGAGGA
M1PDH1       GAAGGTGGCTCTAAACTACCTGGACAGCCAGCCGAGGCCGG---GCCAGATGGA---GGC
M1PDH2       CAACATGATTAAGTCGTTCTTGGAGAACGAACCGCCCATGCGAACAGGTCTCCG---CGC
               *   *         * * ***  * * *   *                       *

M1PDH3       ACGCTTCTTGAAGCACGCCGGCGTAGACGAGACGTTCGCTAGGCAGGC---AAGTACCTT
M1PDH1       TCGCCTCCTCAAGATGTCTGGCGTCAAGTACACGGATGTGGTGAGCAGCGTCAAGACCCT
M1PDH2       CAAGCTCTTGAAGCTCGCCGGGGTGAAGGAGTCGGACATGAGGGAGGCGGTAAGGTCGCT
                  ** * ***    * ** **  *  *  **        *         *   *  *

M1PDH3       CGTCTATGCATGTATAGTGCGCATTTCGTTGGATTCCTCG-------------CGGAAGG
M1PDH1       CGTCGAAGAC-----AGCCACCGCTTCGTCGGGACCGCTCCCGTGTCACAGCCCTGA---
M1PDH2       GGTCGAGCAG-----AGCTCCCGGTTCGTAGGAGTGAAGGTCAACAAGCCGGCCGCCAAG
              *** *         **    *  ***** **                    *

M1PDH3       CTCATTAG-------
M1PDH1       ---------------
M1PDH2       GTCGTCGTGACGTGA
```

Figure 16 : Alignement des parties 3'-terminales des cadres ouverts de lecture correspondant aux gènes codant pour les EsM1PDHs, avec les zones d'hybridation des amorces de PCR quantitative en couleur. Les chiffres après le nom des gènes et à la fin des séquences indiquent la partie de chaque gène considérée pour l'alignement.

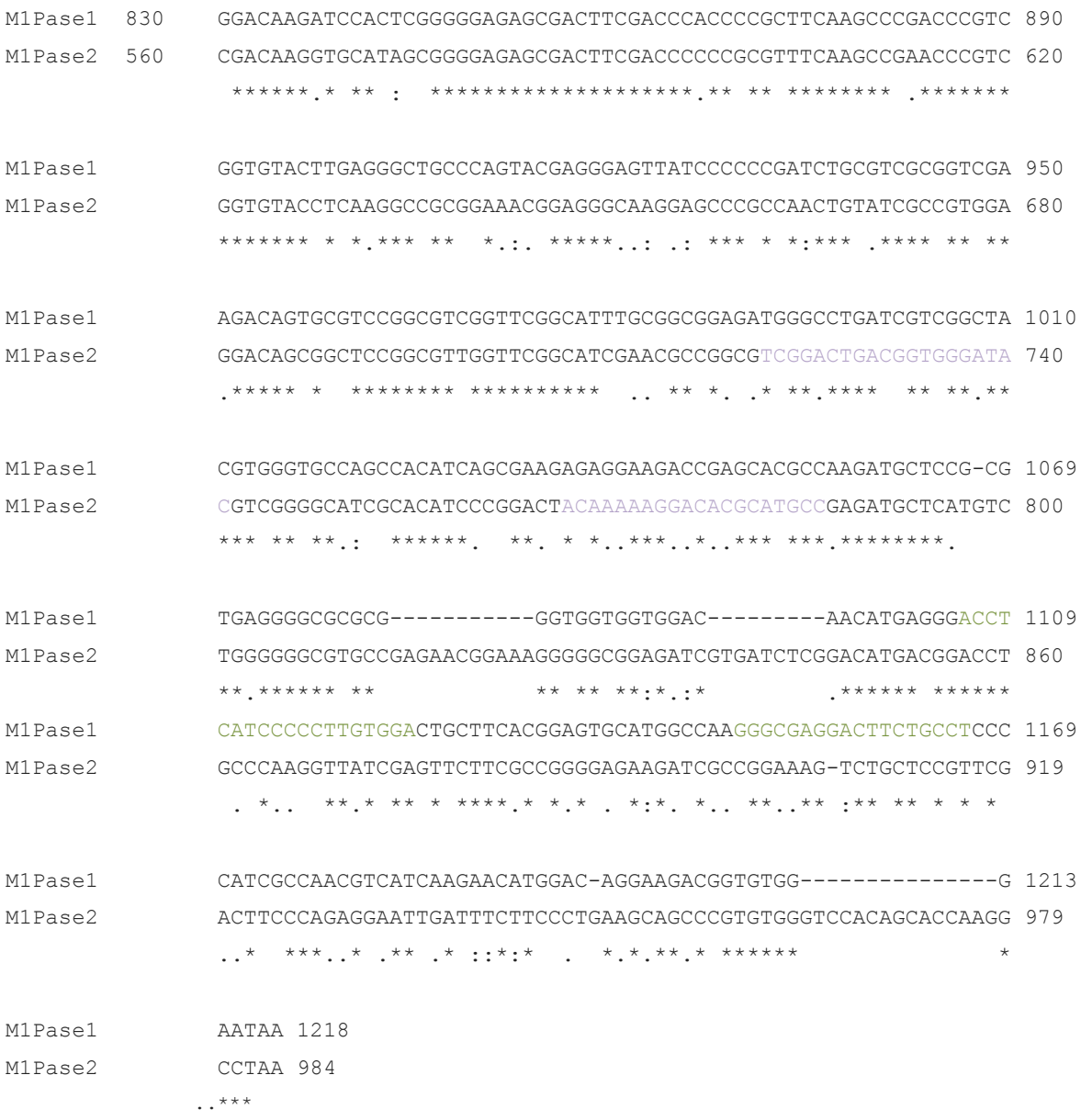


Figure 17 : Alignement des parties 3'-terminales des cadres ouverts de lecture correspondant aux gènes codant pour les EsM1Pases, avec les zones d'hybridation des amorces de PCR quantitative en couleur. Les chiffres après le nom des gènes et à la fin des séquences indiquent la partie de chaque gène considérée pour l'alignement.

Les ADNc sont dilués afin d'être tous à la même concentration de 0,5 ng/µL. Chaque plaque de 96 puits a été dédiée à un seul gène. Les échantillons sont testés en triplicats techniques. De plus, chaque plaque contient une gamme de dilution d'ADN génomique d'*E. siliculosus* correspondant à des dilutions sérielles au 6ème, représentant une quantité d'ADN allant de 5 à

0,000643 ng (soit 66533 à 8,55 copies de génome haploïde). Chaque point de la gamme a été testé en duplicats techniques, et la gamme a été utilisée pour pouvoir quantifier le nombre de copies d'ADNc correspondant à chacun des gènes d'intérêt. Enfin, les résultats obtenus pour l'expression des gènes du cycle du mannitol sont normalisés par les résultats d'expression d'un gène de référence sélectionné pour son expression constitutive. Dans notre cas, le gène EF1α a été considéré (Le Bail *et al.*, 2008). Voici un plan de plaque «type» :

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	T0 a	T0 a	T0 a	T0 b	T0 b	T0 b	T0 c	T0 c	T0 c	T3 a	T3 a	T3 a
B	T3 b	T3 b	T3 b	T3 c	T3 c	T3 c	T6 a	T6 a	T6 a	T6 b	T6 b	T6 b
C	T6 c	T6 c	T6 c	T9 a	T9 a	T9 a	T9 b	T9 b	T9 b	T9 c	T9 c	T9 c
D	T12 a	T12 a	T12 a	T12 b	T12 b	T12 b	T12 c	T12 c	T12 c	T15 a	T15 a	T15 a
E	T15 b	T15 b	T15 b	T15 c	T15 c	T15 c	T18 a	T18 a	T18 a	T18 b	T18 b	T18 b
F	T18 c	T18 c	T18 c	T21 a	T21 a	T21 a	T21 b	T21 b	T21 b	T24 a	T24 a	T24 a
G	T24 b	T24 b	T24 b	T24 c	T24 c	T24 c		NTC	NTC			
H	5	5	0,83	0,83	0,138	0,138	0,0231	0,0231	0,003858	0,003858	0,000643	0,000643

Table 9 : Plan de plaque correspondant à une expérience de RT-PCRq sur des échantillons récoltés toutes les 3h sur 24h. Ligne « H » : gamme de dilution d'ADN génomique, en ng.

Le LightCycler 480 de Roche est utilisé pour réaliser les expériences. La composition du volume réactionnel final, soit 10 µL, est donné dans la **table 10**.

Réactifs	Quantités
2xSyBR green	5 µL (Roche)
Amorce Forward	0,5 µL (10 µM final)
Amorce Reverse	0,5 µL (10 µM final)
Eau (qsp 10 µL)	1,5 µL
ADNc (0,5 ng/µL)	2,5 µL

Table 10 : Composition des mélanges réactionnels de PCRq.

Les résultats sont analysés à l'aide du logiciel LightCycler 480 SW1.5, par quantification absolue afin de vérifier la qualité des données, puis par quantification relative pour normaliser les quantités d'ADNc avec le gène EF1α, et déterminer les niveaux d'expression des gènes d'intérêt pour chaque point testé.

Résultats

I) Analyse des séquences de M1PDHs de différentes origines

1) Recherche de M1PDHs chez les algues brunes

Le séquençage du génome d'*E. siliculosus* (Cock *et al.* 2010) a permis l'identification par homologie de séquence, notamment à partir de la séquence provenant d'*Ei. tenella* (numéro d'accession UniProtKB O96437), de trois gènes potentiels codant pour des M1PDH (**Table 2** de l'introduction). Comme montré dans la **Figure 18**, les protéines EsM1PDH1 et 2 présentent un domaine de fonction inconnue à l'extrémité N-terminale. Les deux séquences sont très similaires (41% d'identité et 68% de similarité), et de taille semblable (525 et 553 acides aminés, respectivement). La protéine EsM1PDH3, quant à elle, est plus petite (seulement 430 acides aminés) et présente 33% d'identité (61% de similarité) avec EsM1PDH1 et 36% d'identité (61% de similarité) avec EsM1PDH2. Aucun peptide signal, ni séquence de localisation subcellulaire ou transmembranaire, n'a été prédit dans ces trois séquences, suggérant une localisation de ces protéines dans le cytosol.

Des analyses par BLAST ont révélé la présence de protéines M1PDH très semblables chez deux espèces de *Micromonas* (Michel et al, 2010, n°accession : MICPUC_47598 et MICPUN_101665, **Figure 19**). Cependant, ces séquences présentent un domaine supplémentaire en C-terminal, présentant de fortes homologies avec des protéines correspondant à une activité M1Pase (domaine HAD, haloacid dehalogenase), suggérant une fusion de protéines M1PDH et M1Pase chez ces microalgues vertes. Une protéine modulaire avec ces deux types d'activités a également été trouvée chez la bactérie *Acinetobacter baylyi* (Sand et al, 2013 et 2014, n°accession : YP_046339). Cependant, contrairement aux séquences de *Micromonas*, le domaine HAD responsable de l'activité M1Pase n'est pas situé à l'extrémité C-terminale mais à l'extrémité N-terminale de la protéine fusion.

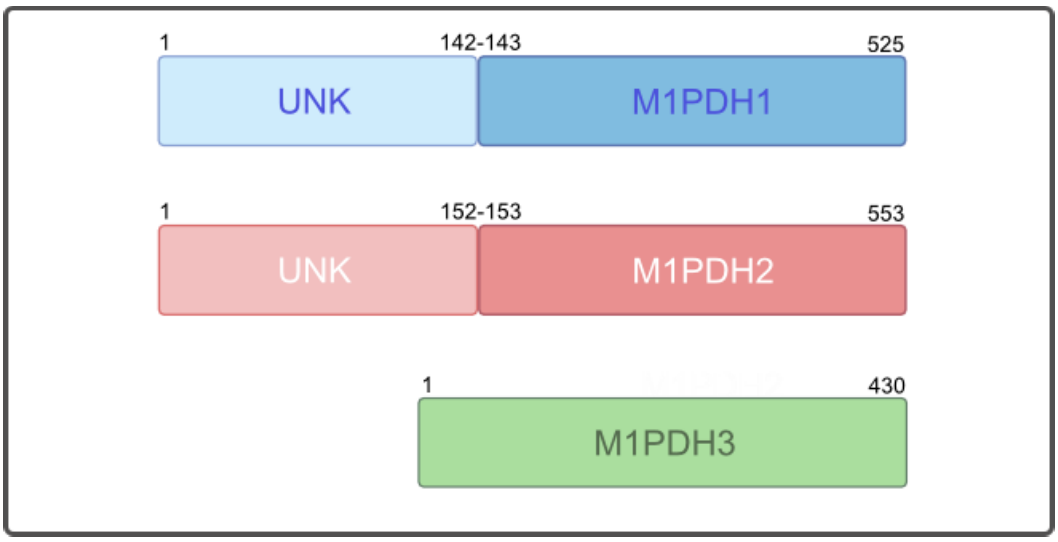


Figure 18 : Structure des protéines EsM1PDH1, EsM1PDH2 et EsM1PDH3. UNK : domaine de fonction inconnue.

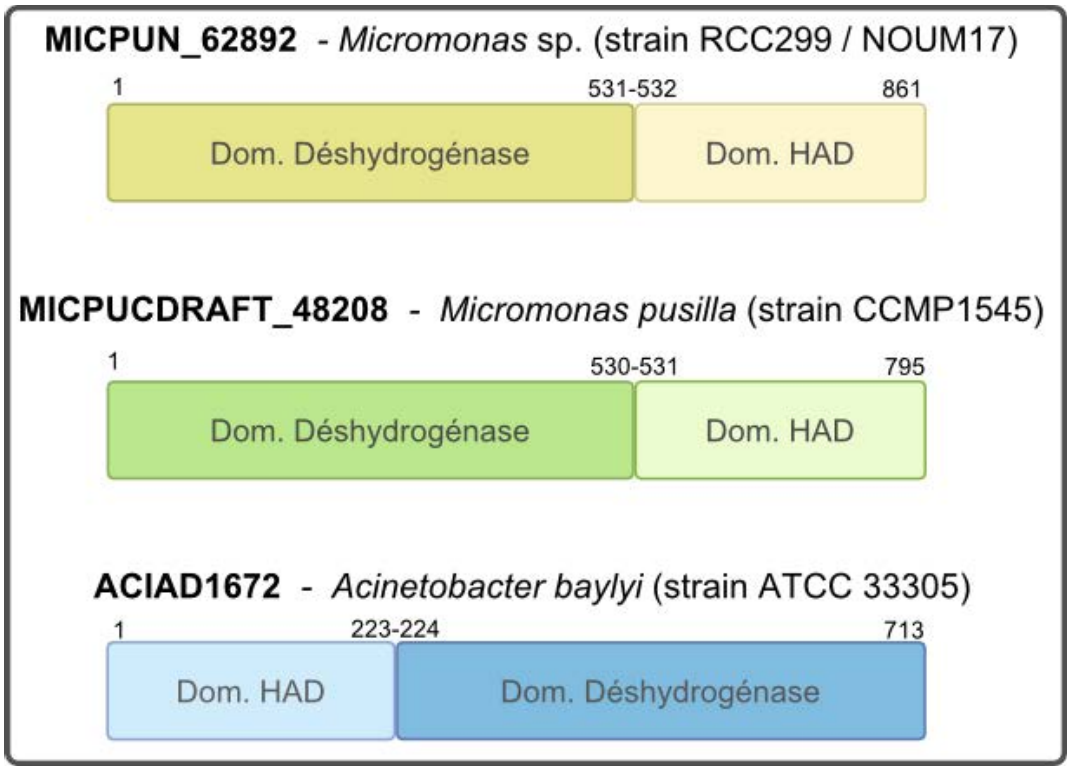


Figure 19 : Structure des protéines M1PDH de *Micromonas* et *Acinetobacter*.

Des fragments de gènes correspondant à des M1PDH ont été retrouvés dans différentes ressources génomiques d'algues brunes accessibles via une page de BLAST dont l'accès est restreint aux chercheurs de la Station Biologique de Roscoff. Cependant, aucun gène complet n'a pu être retrouvé, même si pour *S. japonica*, algue pour laquelle des données de RNA-seq ont été produites après incubation des algues à différents types de lumière (Deng et al, 2012), il ne semble manquer que quelques nucléotides à l'extrémité 5'. Le gène trouvé chez *S. japonica* code pour une protéine présentant 88% d'identité avec EsM1PDH1. L'absence de gènes complets dans la majorité des ressources génomiques d'algues brunes s'explique notamment par le fait que ces données correspondent soit à des résultats de RNA-seq (*S. japonica*, *S. latissima*, *Fucus*, *Lessonia, Macrocystis*) pour lesquels l'assemblage n'a pas permis d'avoir des gènes pleine longueur, soit à du séquençage de banques ADNc (*L. digitata, Fucus, Sargassum*) pour lesquels les inserts sont incomplets.

2) Analyse des séquences protéiques d'EsM1PDH

2.1) Comparaison des extrémités N-terminales

Les extrémités N-terminales des EsM1PDH1 et 2, de la M1PDH de *S. japonica* quasi complète, et de la séquence d'*Eimeria* ont été alignées avec le programme MEGA5.1 (Tamura et al, 2011, **Figure 20**). D'après l'alignement obtenu, ces quatre séquences présentent des identités comprises entre 25 et 35% (similarité entre 51 et 60%), à l'exception d'EsM1PDH1 et la protéine de *S. japonica* qui sont identiques à 88%.

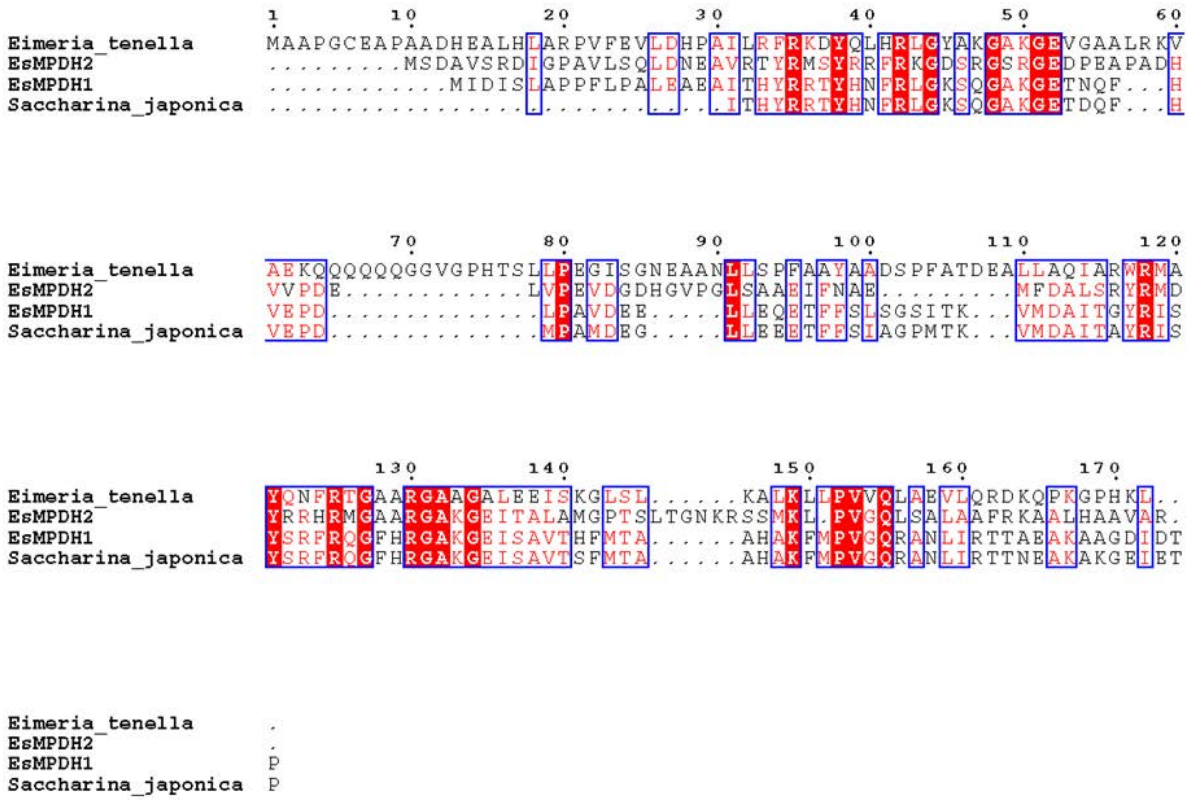


Figure 20 : Alignement des séquences N-terminales de quatre M1PDHs réalisé avec le programme MEGA5.1 (Tamura *et al.*, 2011)**.** Numéros d'accession des séquences : *Ei. tenella*, O96437 ; EsMPDH2, CBN74440; EsMPDH1, CBJ25895; *Saccharina japonica*, (Deng et al, 2012). Le programme ESPript 3 (Robert et Gouet, 2014) a été utilisé pour mettre en évidence les acides aminés conservés dans les quatre séquences (blanc sur fond rouge). Les acides aminés indiqués en rouge correspondent à ceux qui sont similaires dans les séquences considérées.

2.2) Comparaison des modules M1PDHs

Un alignement des séquences M1PDHs provenant d'algues brunes et de différents organismes a été réalisé avec le programme MEGA5.1 (Tamura *et al.*, 2011), notamment des protéines pour lesquelles l'activité M1PDH a été démontrée. Celles-ci ont été identifiées dans la base de données BRENDA (http://www.brenda-enzymes.org). Pour simplifier l'alignement, les extrémités N-terminales montrées **Figure 20**, spécifiques d'*Eimeria* et des algues brunes, ont été omises, ainsi que les 72 premiers acides aminés de la séquence EsM1PDH3. L'alignement présenté **Figure 21** permet de repérer le domaine de fixation du cofacteur (I) (G-X-G-X-X-G) (Lesk 1995), le domaine correspondant à signature de l'activité mannitol déshydrogénase (II) (motif PROSITE PS00974, [LIVMY]-x-[FS]-xx-[STAGCV]-x-V-D-R-[IV]-x-[PS]), ainsi que le motif consensus des PSLDRs (Polyol-specific long-chain dehydrogenases and reductases) (III).

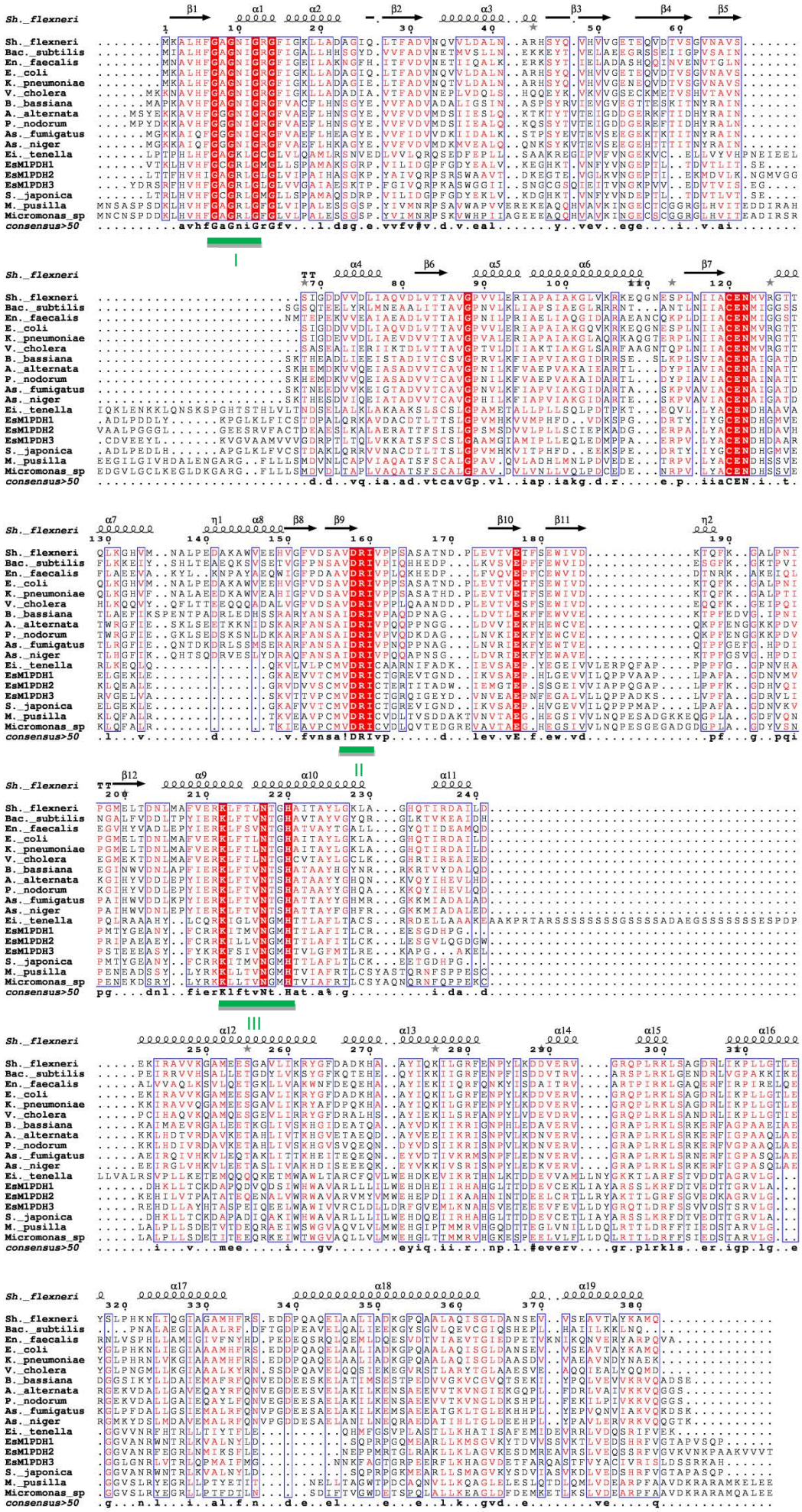


Figure 21 : Alignement de différents modules M1PDH réalisé avec le programme MEGA5.1 (Tamura *et al.*, 2011)**.** Pour les séquences d'*Ei. tenella*, de *Saccharina japonica* et pour EsM1PDH1 et EsM1PDH2, la partie N-terminale a été enlevée. Le nom des espèces et le numéro d'accession de la séquence correspondante sont, de haut en bas : *Shigella flexneri* KFZ96362 ; *Bacillus subtilis* subsp. subtilis str. 168, CAB12207; *Enterococcus faecalis* V583, NP_814201 ; *Es. coli* str. K-12 substr. MG1655, NP_418057 ; *Klebsiella pneumoniae*, AAD45386 ; *Vibrio cholerae* O395, YP_001215036 ; *Beauveria bassiana*, ACU32784 ; *Altenaria alternata*, AAQ63948 ; *Phaeosphaeria nodorum* SN15, Q0U6E8 ; *Aspergillus fumigatus* Af293, XP_755399 ; *Aspergillus niger*, AAL89587 ; *Ei. tenella*, O96437 ; EsMPDH1, CBJ25895 ; EsMPDH2, CBN74440 ; EsMPDH3, CBJ27644 ; *Saccharina japonica*, (Deng et al, 2012) ; *Micromonas pusilla*, XP_003061626 and *Micromonas sp*, XP_002509132. Le programme ESPript 3 (Robert et Gouet, 2014) a été utilisé pour mettre en évidence les acides aminés conservés (blanc sur fond rouge) et la structure secondaire prédite en comparaison avec la séquence de *Shigella flexneri* KFZ96362 dont la structure 3D a été réalisée (PDB: 3H2Z). Les acides aminés indiqués en rouge correspondent à ceux qui sont similaires dans les séquences considérées. Les chiffres romains correspondent aux domaines conservés discutés dans le texte.

Pour compléter cette analyse, une modélisation des structures 3D des protéines M1PDHs d'*Ectocarpus* et de la protéine M1PDH d'*Eimeria* (sans le domaine N-terminal) par homologie de séquence a été réalisée en utilisant le programme PHYRE2 (Kelley et Sternberg, 2009). Une seule structure tridimensionnelle de M1PDH est présente dans la base de données PDB, avec la référence 3H2Z, et a été obtenue à partir d'une protéine de la bactérie *Shigella flexneri* (données non publiées). Cette séquence est très proche de celle caractérisée chez *Es. coli* (Chase, 1986). Les résultats sont résumés **Table 11**. Les valeurs de confiance indiquent que le corps (« le fold ») des protéines testées doit être très similaire de celle de *Shigella*. Par contre, les faibles identités observées entre les protéines d'*Ectocarpus* et d'*Eimeria* avec celle de la bactérie laissent penser que certaines parties de la structure montrent de fortes disparités. De plus, si on arrivait à obtenir des cristaux de M1PDH d'*Ectocarpus*, des expériences de remplacement moléculaire pourraient être tentées en utilisant la protéine de *Shigella*, mais la probabilité de réussite serait assez faible.

Protéine	% de confiance	Couverture	% d'identité

M1PDH d'*Eimeria*	98,9	59%	25
EsM1PDH1	100	83%	21
EsM1PDH2	100	85%	19
EsM1PDH3	98,5	55%	23

Table 11 : Résultats des prédictions de structure 3D par comparaison avec la structure cristallisée de l'enzyme M1PDH de *Shigella flexneri*, réalisées avec le logiciel PHYRE2.

3) Analyse phylogénétique

Des analyses phylogénétiques de M1PDHs ont déjà été publiées dans Michel *et al.*, 2010 et Dittami *et al.*, 2012, et n'intègrent qu'un nombre limité de séquences caractérisées au niveau biochimique. Nous avons donc axé notre analyse, comme dans la partie 2.2, sur des enzymes pour lesquelles l'activité M1PDH a été démontrée expérimentalement. Ainsi, à partir de l'alignement (**Figure 21**), plusieurs groupes de M1PDH ont pu être mis en évidence : un contenant des séquences de bactéries, un autre avec des protéines de mycètes et un troisième correspondant aux algues brunes et à *Eimeria* (**Figure 22**). Les séquences d'*Agrobacterium* et d'*Acinetobacter* ne sont pas incluses dans ces groupes. Enfin, la protéine de *Cryptoccocus* est très éloignée des autres. La majorité des M1PDHs considérées font partie des Polyol-specific long-chain dehydrogenases and reductases (PSLDRs) (Kavanagh *et al.* 2003). Ces PSLDRs sont des enzymes ne nécessitant pas de cofacteur métallique, sont le plus souvent actives sous forme monomérique, et ont une spécificité de substrat très étroite. Leur taille varie entre 380 et 550 résidus. Par contre, La M1PDH de *Cryptococcus* appartient à la famille des zinc-containing long-chain alcohol/polyol dehydrogenases, est capable de réduire et d'oxyder une gamme plus large de substrats, et est active sous forme d'un homotétramère (Suvarna et al, 2000). Par conséquent, il n'est pas surprenant que cette enzyme soit éloignée au niveau phylogénétique des M1PDHs appartenant à la famille des PSLDRs.

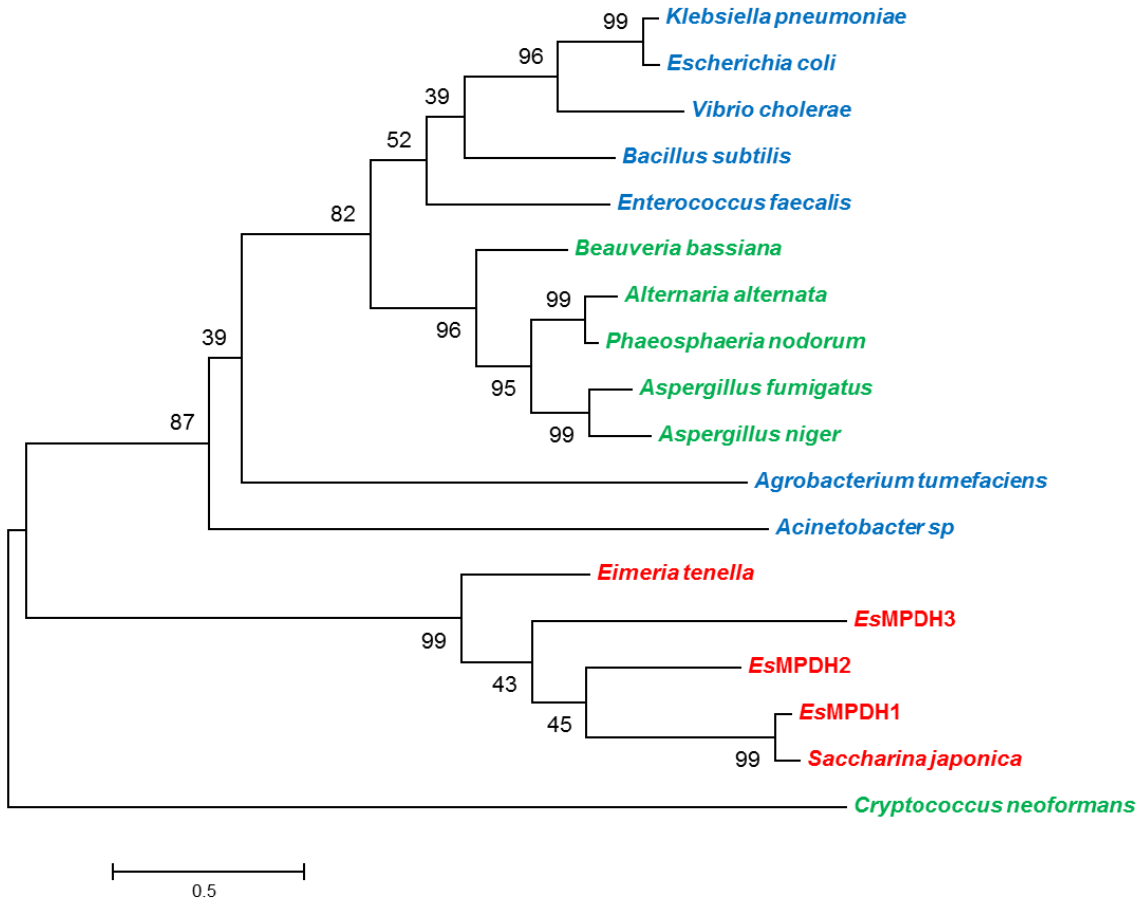


Figure 22 : Arbre obtenu par analyse de maximum de vraisemblance (le nombre de Bootstrap étant de 500) réalisé avec le programme MEGA5.1 (Tamura *et al.*, 2011) **à partir des séquences protéiques M1PDHs**. Les numéros d'accession sont donnés **Figure 20**. En vert, les mycètes et la levure *Cryptococcus*, en bleu les bactéries, et en rouge les apicomplexa et les algues brunes.

II) Caractérisation des gènes M1PDH chez *E. siliculosus*

1) Détermination de l'activité M1PDH endogène dans des échantillons d'algues prélevés au cours du cycle diurnal

Les variations de la quantité de mannitol au cours du cycle diurnal chez *E. siliculosus* ont été décrites par Gravot et al en 2010 (**Figure 23A**). On peut constater une augmentation du contenu en mannitol lors de la phase lumineuse, et au contraire une diminution de la quantité de ce polyalcool lors de la phase obscure, considérant que ces changements sont observés au cours des deux jours d'expérimentation.

En parallèle à ce travail, des premières mesures d'activité endogène M1PDH ont été effectuées dans des extraits acellulaires d'*E. siliculosus*, à partir d'algues prélevées au cours de la phase lumineuse du cycle diurnal. Ces résultats ont été publiés par Rousvoal et al en 2011. Dans le sens réduction du F6P, l'activité mesurée était de 9.4 ± 6.22 nmol min^{-1}mg $protéines^{-1}$ (0.16 ± 0.10 nkat mg $protéines^{-1}$). Aucune activité enzymatique n'a été détectée dans le sens inverse de la réaction. Afin de compléter ces résultats au cours de la thèse, l'activité M1PDH a été mesurée à différents temps du cycle diurnal, en considérant des échantillons identiques à ceux utilisés pour le profilage métabolique décrit ci-dessus. L'activité quantifiée dans les quatre échantillons testés est comprise entre 3,09 ± 0,29 et 4,83 ± 0,86 nmol min^{-1}mg $protéines^{-1}$ (soit 0,05 ± 0,01 et 0,08 ± 0,01 nkat mg $protéines^{-1}$), et présente une faible augmentation au temps 21 h (fin de phase obscure) (**Figure 23B**). Cependant, une analyse de variance à mesures répétées donne une valeur P = 0,16, suggérant que les changements observés dans les échantillons au cours du temps ne sont pas supportés au niveau statistique. L'oxydation du M1P en F6P a été mesurée sur les échantillons 3 h et 6 h, mais aucune activité n'a été détectée.

Pour compléter ces observations, les résultats obtenus pour l'activité M1PDH ont été comparés à ceux obtenus pour l'activité M1Pase, sur les mêmes échantillons (Groisillier *et al.* 2014). Cette activité est comprise entre 7,16 ± 2,42 et 16,58 ± 5,38 nmoles min^{-1} mg $protéines^{-1}$ (0,12 ± 0,04 et 0,28 ± 0,09 nkat mg $protéines^{-1}$), et suit un profil similaire à celui de l'activité M1PDH

(**Figure 23C**). De même, une analyse de variance à mesures répétées donne une valeur P = 0,11, indiquant que ces changements ne sont pas supportés au niveau statistique.

Lorsque l'on compare ces données d'activités enzymatiques avec la variation du contenu en mannitol, on peut constater qu'il n'y a pas de corrélation directe entre ces paramètres ; en effet, après 21h, la quantité de mannitol décroît dans les algues alors que les activités semblent augmenter. Cependant, même si les observations n'ont pas de support statistique, il peut être suggéré que la possible augmentation des activités M1PDH et M1Pase en fin de phase obscure précède l'augmentation du contenu en mannitol en début de phase lumineuse au cours du deuxième jour d'expérimentation.

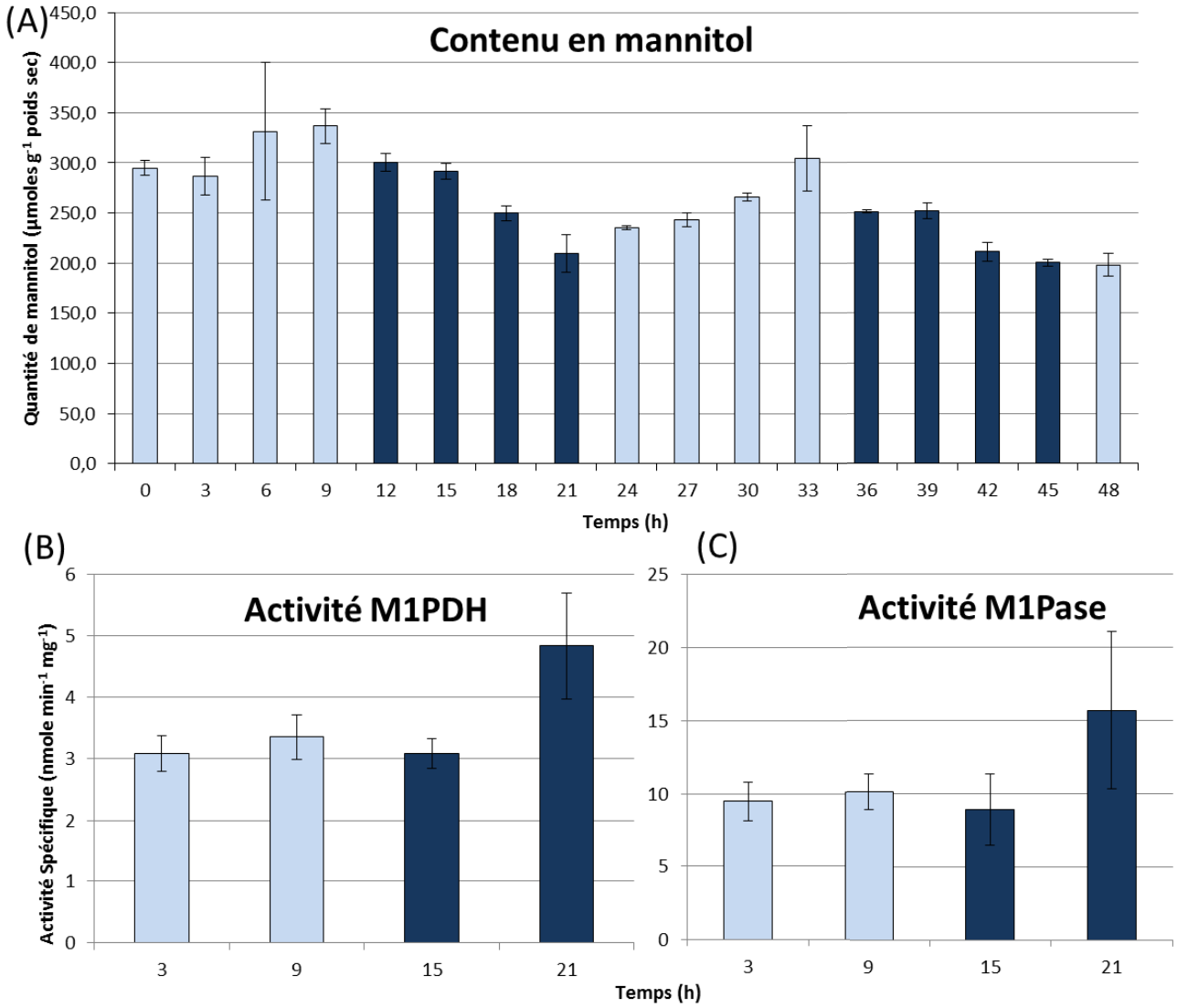


Figure 23 : Variation de la quantité de mannitol (A) et mesures des activités enzymatiques EsM1PDH (B) et EsM1Pase (C) au cours du cycle diurnal. Les barres en bleu clair représentent les échantillons d'algues prélevés pendant les phases lumineuses et les barres en bleu foncé ceux récoltés lors des phases obscures de deux cycles diurnaux consécutifs.

2) Expression hétérologue des M1PDHs d'*E. siliculosus* chez *Es. coli*

Des expériences d'expression hétérologue ont déjà été réalisées avec le gène EsM1PDH1 natif, car il correspond au gène le plus exprimé parmi les trois codant pour des M1PDHs (Rousvoal *et al.* 2011). Cependant, aucune surexpression n'a pu être observée. C'est pourquoi la caractérisation biochimique de l'enzyme a été réalisée à partir d'extraits acellulaires d'*Es. coli*, par comparaison entre des activités enzymatiques mesurées dans des extraits de bactéries ayant été transformées avec un vecteur contenant le gène EsM1PDH1, et dans des extraits de bactéries contenant le vecteur d'expression vide. Cependant, cette approche n'est pas la plus satisfaisante pour déterminer les paramètres cinétiques d'une enzyme, c'est pourquoi nous avons mis en œuvre une nouvelle approche pour tenter de surexprimer dans la fraction soluble d'*Es. coli* différentes constructions correspondant aux trois gènes d'EsM1PDHs (**Figure 24**).

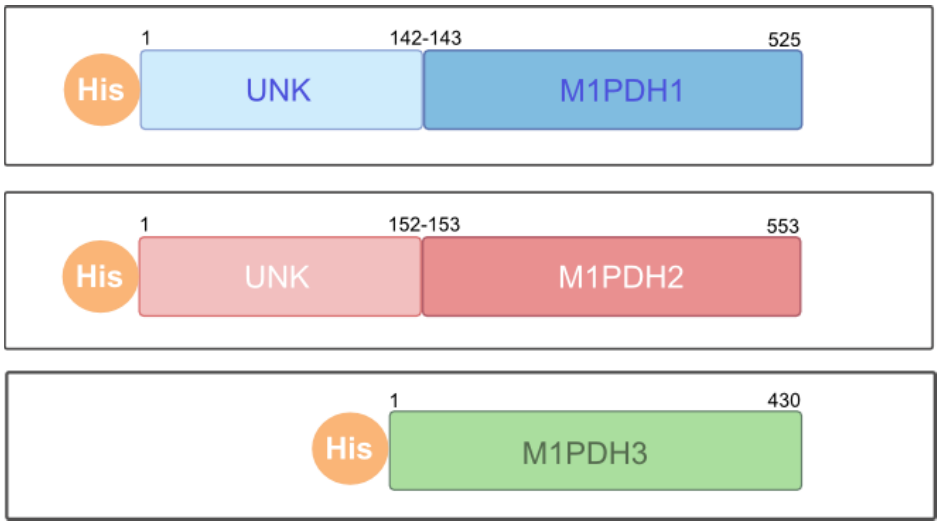


Figure 24 : Description des protéines EsM1PDH1, 2 et 3 ciblées pour la production d'EsM1PDHs recombinantes chez *Es. coli*. UNK : domaine de fonction inconnue. His : étiquette histidine à l'extrémité N-terminale.

En effet, au lieu de considérer la séquence native du gène EsM1PDH1, et pour tenter d'améliorer l'expression chez *Es. coli* d'une protéine issue d'un organisme eucaryote très éloigné phylogénétiquement de cette bactérie, le gène d'EsM1PDH1 a été synthétisé par la société GeneArt afin d'optimiser l'usage des codons chez *Es. coli*. Cette approche a aussi été menée pour les deux autres gènes. Pour le gène d'EsM1PDH1, 413 nucléotides ont été modifiés sur un total de 1575, soit 26% de différence entre la séquence d'*Ectocarpus* et celle optimisée par GeneArt. Pour le gène d'EsM1PDH2, 472 nucléotides sur 1659 ont été modifiés soit 28%. Pour le gène

d'EsM1PDH3, 356 nucléotides sur 1290 (28%) ont été altérés. On constate donc un changement d'un peu plus de 25% en moyenne, soit un nucléotide sur 4, dans les séquences d'*Ectocarpus*. Les modifications peuvent être visualisées dans les **Figures 54, 55** et **56** en annexe. De plus, une analyse plus approfondie de la localisation de ces changements de bases révèle que celles qui sont modifiées le sont majoritairement en troisième position des codons (**Table 12**).

	Position 1	Position 2	Position 3
EsM1PDH1	7,7%	4,3%	88%
EsM1PDH2	9,1%	5,1%	85,8%
EsM1PDH3	7,9%	4,8%	87,6%

Table 12 : Comparaison des bases modifiées dans les codons entre les séquences natives d'*E. siliculosus* et celles synthétisées par GeneArt.

2.1) Détermination de l'activité M1PDH recombinante pour les trois enzymes complètes possédant un tag histidine à l'extrémité N-terminale

2.1.1) Mesure d'activité M1PDH sur des extraits acellulaires d'*Es. coli*

Les premiers essais de clonage ont été réalisés sur les trois gènes complets, avec un tag de six histidines en position N-terminale. Des tests d'activité enzymatique ont ensuite été réalisés sur extraits acellulaires d'*Es. coli* pour mettre en évidence une augmentation de l'activité M1PDH dans les bactéries transformées avec les gènes d'intérêt. En effet, *Es. coli* possède une M1PDH (Chase, 1986). Seul le sens réduction du F6P a été testé. Pour chaque gène, les tests ont été réalisés sur trois cultures issues de clones bactériens différents (réplicats biologiques 1, 2 et 3). Les activités spécifiques calculées à partir des extraits acellulaires d'*Es. coli* pour les protéines EsM1PDHs correspondent aux différences entre des activités M1PDH mesurées dans des extraits bactériens préparés à partir de bactéries transformées avec un plasmide contenant un des gènes *EsM1PDH* et celles calculées dans des bactéries transformées avec un plasmide ne contenant pas de gène d'algue. Une analyse statistique de type test t a été réalisée pour comparer les résultats déterminés pour chacune des trois constructions.

Ces expériences ont été réalisées en considérant les différents types de souches d'expression transformées (BL21(DE3), BL21(DE3)codon+, origami(DE3), C41(DE3), C43(DE3)). Cependant, la différence d'activité entre les extraits bactériens contenant le plasmide vide et ceux avec le plasmide recombinant la plus forte a été observée pour les transformants BL21(DE3), et ce sont ces résultats qui ont été exploités (**Figure 25**).

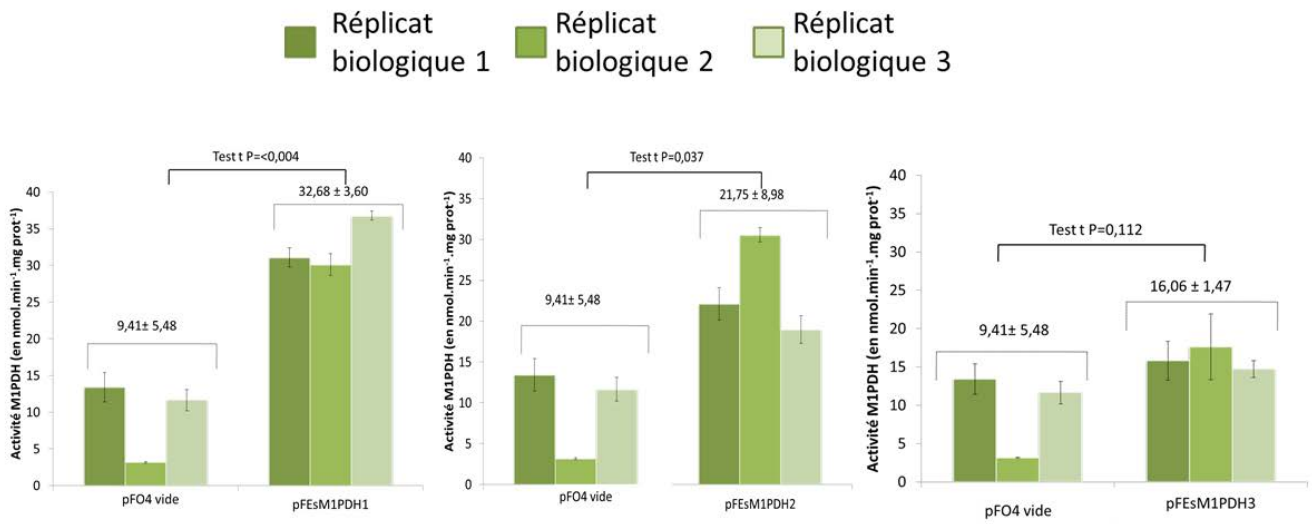


Figure 25 : Résultats des tests d'activité enzymatique réalisés sur les extraits obtenus à partir de bactéries BL21(DE3) transformées avec le vecteur pFO4 vide, et de bactéries BL21(DE3) transformées avec un plasmide contenant un des trois gènes EsM1PDH1, EsM1PDH2 ou EsM1PDH3 optimisés.

On obtient des différences significatives d'activité de 23,27 nmol min^{-1} mg^{-1} de protéine pour le gène EsM1PDH1 et de 12,34 nmol min^{-1} mg^{-1} de protéine pour le gène EsM1PDH2. Ces différences sont du même ordre de grandeur que celles observées lors du premier test d'expression hétérologue du gène natif d'EsM1PDH1 chez *Es. coli* (Rousvoal *et al.* 2011). Par contre, aucune différence n'a été mesurée pour EsM1PDH3.

Pour la suite du travail, seules les constructions transformées dans les cellules BL21(DE3) seront considérées.

2.1.2) Analyse du niveau de production des protéines EsM1PDH recombinantes dans les extraits acellulaires bactériens

Suite à ces premiers résultats, la présence et les niveaux d'expression des différentes protéines recombinantes ont été évalués par SDS-PAGE et par Western-blot avec un anticorps anti-His dirigé contre l'étiquette histidine (**Figure 26**).

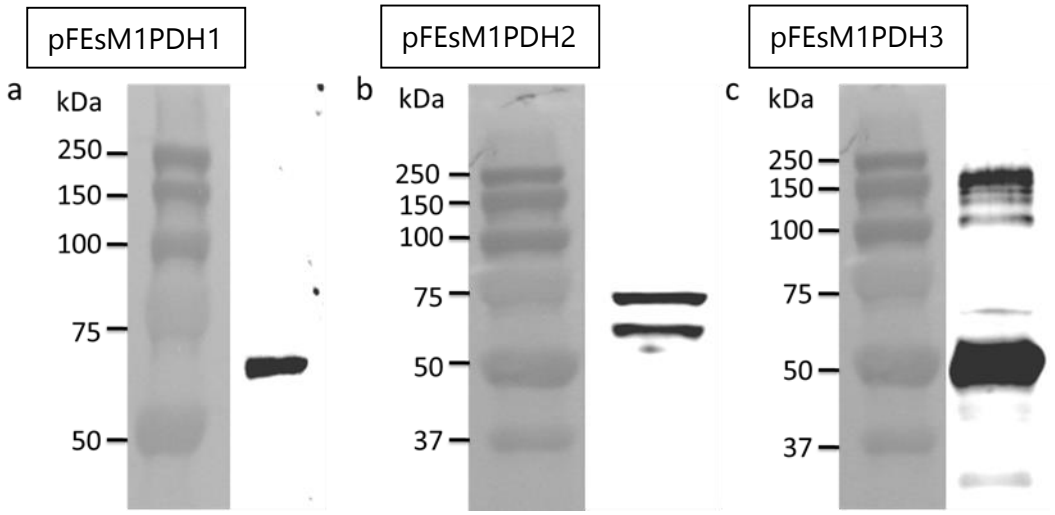


Figure 26 : Mise en évidence des protéines recombinantes EsM1PDH dans des extraits bactériens par Western-blot. A : extrait bactérien contenant la protéine codée par le plasmide pFEsM1PDH1 ; B : extrait bactérien contenant la protéine codée par le plasmide pFEsM1PDH2 ; C : extrait bactérien contenant la protéine codée par le plasmide pFEsM1PDH3. A gauche des trois panels, marqueur de poids moléculaire en lumière blanche. Ces photos sont représentatives d'expériences qui ont été répétées plusieurs fois.

Les cultures ont été réalisées dans 1 L de milieu ZYP5052. Le gel SDS n'a pas suffi à mettre en évidence une surexpression des protéines d'intérêt. Cependant, après Western-blot, les extraits bactériens préparés à partir de bactéries contenant le plasmide pFEsM1PDH1 présentent une bande unique à la taille attendue pour la protéine d'intérêt, soit environ 58 kDa, confirmant la production de la protéine recombinante. Pour les extraits correspondant au plasmide pFEsM1PDH2, on constate deux bandes révélées sur la membrane. L'une est à la taille attendue (environ 60 kDa), l'autre légèrement plus haute. Ce phénomène a été observé à chaque fois que cette expérience a été répétée. Il pourrait s'agir de la protéine recombinante EsM1PDH2 à laquelle serait fixée une protéine présente chez *Es. coli*. Enfin, pour les extraits bactériens préparés pour la protéine EsM1PDH3, une bande majoritaire est présente à la taille (soit environ 50 kDa), et

plusieurs bandes aspécifiques sont aussi révélées sur la membrane, notamment à des poids moléculaires plus élevés.

2.1.3) Tests de purification des trois enzymes EsM1PDH recombinantes

Les tests d'activité enzymatique sur extraits de bactéries et d'expression de protéines recombinantes ayant été positifs, des essais de purification par chromatographie d'affinité ont été réalisés sur les trois protéines. Cependant, aucune d'entre elles n'a pu être purifiée après cette étape car aucune bande majoritaire n'a pu être détectée sur gel SDS-PAGE. Considérant ces résultats négatifs et le fait que les protéines recombinantes EsM1PDH1 et 3 ne se fixaient pas ou très peu sur colonne Hisprep, comme indiqué par l'absence de pic à DO_{280nm} lors de l'élution, et par la présence de bandes révélées par Western-blot uniquement dans les fractions non retenues par la colonne, des essais plus poussés ont été réalisés à partir d'extraits de bactéries transformées avec le plasmide pFEsM1PDH2.

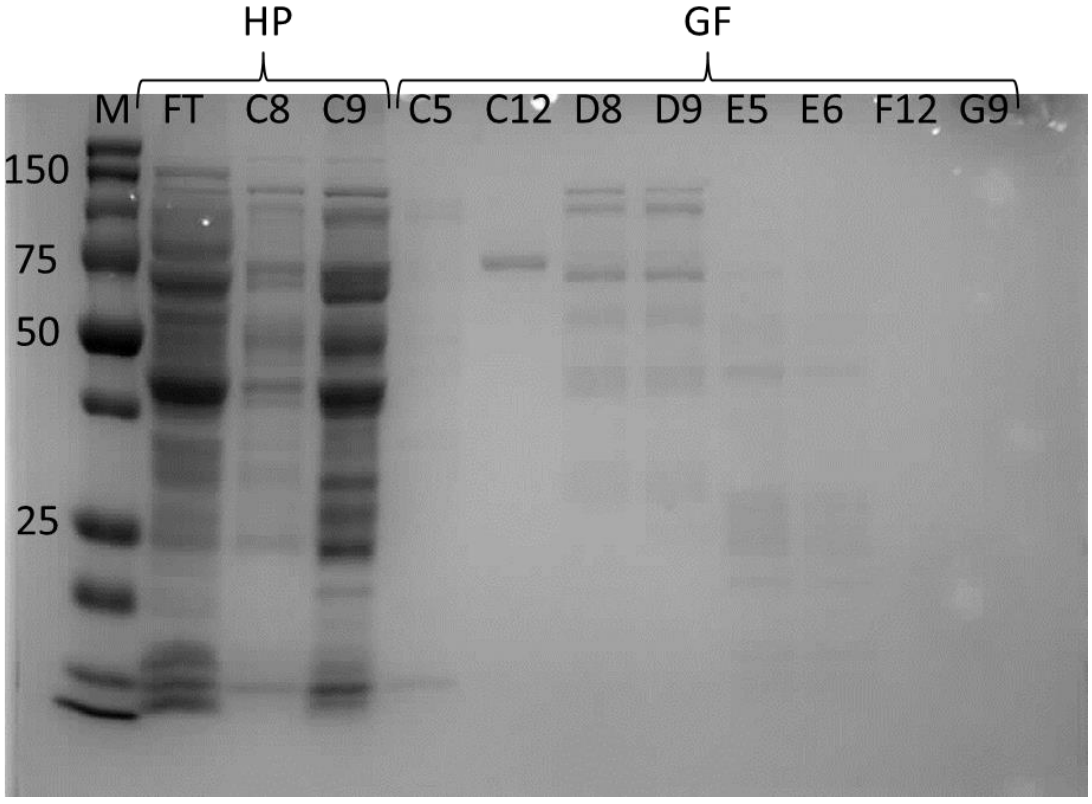


Figure 27 : Gel SDS-PAGE d'extraits protéiques EsM1PDH2 après différentes étapes de purification. HP : colonne d'affinité Hisprep, avec les fractions FT (fraction non retenue), C8 et C9 (fractions correspondant au pic de DO_{280nm} lors de l'élution). GF : gel filtration, avec plusieurs fractions (C5, C12, D8, D9, E5, E6, F12, G9) correspondant aux différents pics d'élution.

Ainsi, comme expliqué plus haut, après migration d'un aliquote des extraits bactériens avant purification, aucune surexpression n'a été constatée sur gel SDS-PAGE. Après purification par colonne d'affinité (Hisprep), par contre, plusieurs bandes à la taille attendue ont été repérées mais aucune bande majoritaire (**Figure 27**). Après chromatographie d'exclusion de taille (gel filtration, GF), quelques bandes de faible intensité ont été observées dans certaines fractions. Ces observations ne concernent que les gels SDS-PAGE. Les Western-blot montrent des bandes révélées après purification par colonne d'affinité. Par contre, après gel filtration, seule une très faible bande apparait dans les fractions correspondant à la taille attendue, souvent difficile à distinguer sur gel SDS mais qui apparaît en Western Blot. De plus, de l'activité M1PDH a été mesurée après GF dans certaines fractions contenant une bande de faible intensité à la bonne taille (**Figure 28**). Cependant, la quantité de protéines récupérée dans les fractions actives après Gel Filtration (GF) est faible, de l'ordre de 0,25 mg. Se posent alors deux questions : (1) l'activité mesurée correspond-elle réellement à l'activité de la protéine recombinante ou plutôt à l'activité d'une protéine d'*Es. coli* contaminante, et (2) comment faire pour augmenter le rendement de protéine recombinante purifiée après GF ?

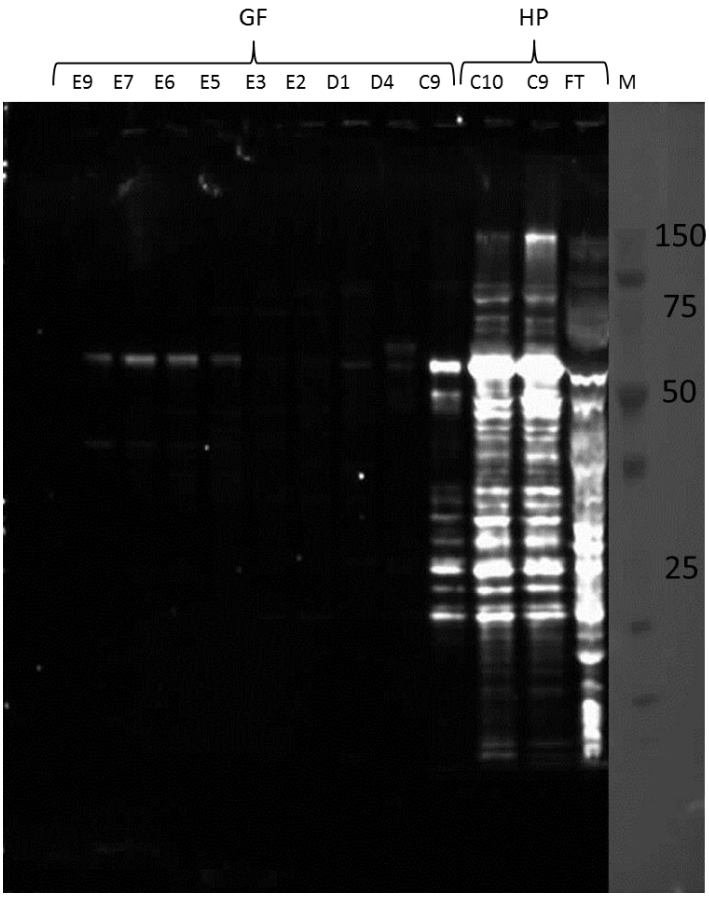


Figure 28 : Analyse par Western-blot d'extraits protéiques EsM1PDH2 après différentes étapes de purification : FT : fraction non retenue en Hisprep, C9 et C10 : fractions correspondant au pic de DO lors de l'élution d'Hisprep. Les fractions correspondant aux différents pics d'élution en GF : C9, D4, D1, E1, E2, E3, E5, E6, E7, E9. M : marqueur de taille moléculaire.

Ces deux problèmes pouvaient être contournés en utilisant des méthodes de purifications plus stringentes, et/ou en ajoutant des étapes au cours du processus de purification pour augmenter le degré de pureté de la protéine d'intérêt, tout en essayant de diminuer les pertes de protéines entre chaque étape. Dans ce contexte, différents essais ont été réalisés :

-utilisation de différentes colonnes échangeuses d'anions (HiTrap Q FF et HiTrap Q HP), et de colonnes de chromatographie à exclusion de taille, dont la Sephacryl s200 (résolution inférieure à la Superdex, mais gamme de séparation plus large et matrice légèrement différente)

-modifications des conditions de culture, dont la température (essais à 15, 20 et 37°C), le milieu (LB doublement induit ou ZYP5052), le volume de culture (100 mL, 200mL ou 1 L), et la durée de culture (24h, 28h, 32h et 48h).

-modifications de la composition des tampons de purification, notamment leurs concentrations en NaCl (0, 50, 100, 150, 200 et 300 mM) ou la concentration finale en imidazole (500 mM ou 1 M).

Suite à ces différentes tentatives, le degré de purification, estimé par la quantité de bandes sur gel, a été légèrement amélioré en réalisant une étape de purification supplémentaire en amont de l'Hisprep avec une échangeuse d'anions Q FF (**Figure 29**). Cependant, les quantités de protéines purifiées étaient toujours extrêmement faibles, et ne suffisaient pas pour envisager la caractérisation enzymatique, ni pour découper les bandes afin de s'assurer de l'identité des protéines intéressantes par spectrométrie de masse.

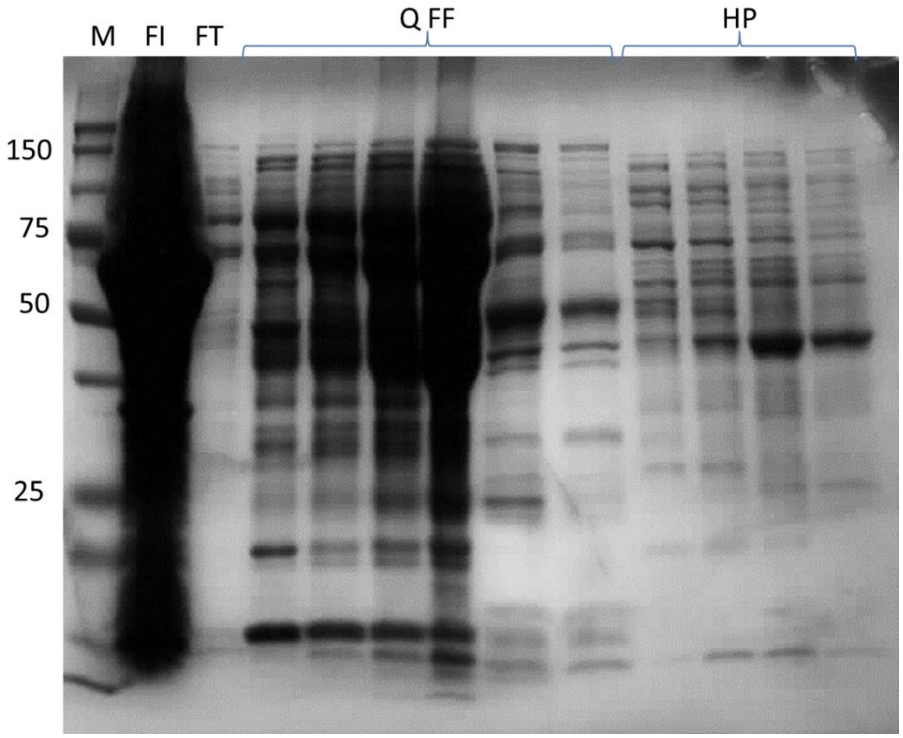


Figure 29 : Gel SDS-PAGE d'extraits protéiques de EsM1PDH2 après deux étapes de purification : une colonne échangeuse d'anions Q FF et une colonne d'affinité Hisprep (HP). FI : fraction insoluble, obtenue à partir des culots après lyse ; FT : fraction non retenue par la colonne. M : marqueur de taille moléculaire.

Par contre, la présence de la protéine recombinante a été mise en évidence dans les fractions insolubles, c'est-à-dire les corps d'inclusions correspondant à des agrégats de protéines non-ordonnées, par migration en gel SDS-PAGE (**Figure 29**) et par Western–blot (**Figure 30**). Ce résultat indique que la protéine EsM1PDH2 est bien produite par les bactéries, mais que la majeure partie se retrouve dans les corps d'inclusion. Seulement une faible quantité d'EsM1PDH2 est

présente dans la fraction soluble, comme observée après immunodétection avec les anticorps anti-his tag (**Figure 30**). Ceci permet quand même de mesurer une activité M1PDH à partir de bactéries contenant le plasmide pFEsM1PDH2, mais pas de purifier EsM1PDH2. Des expériences ont donc été menées pour tenter de récupérer les protéines recombinantes contenues dans ces fractions insolubles.

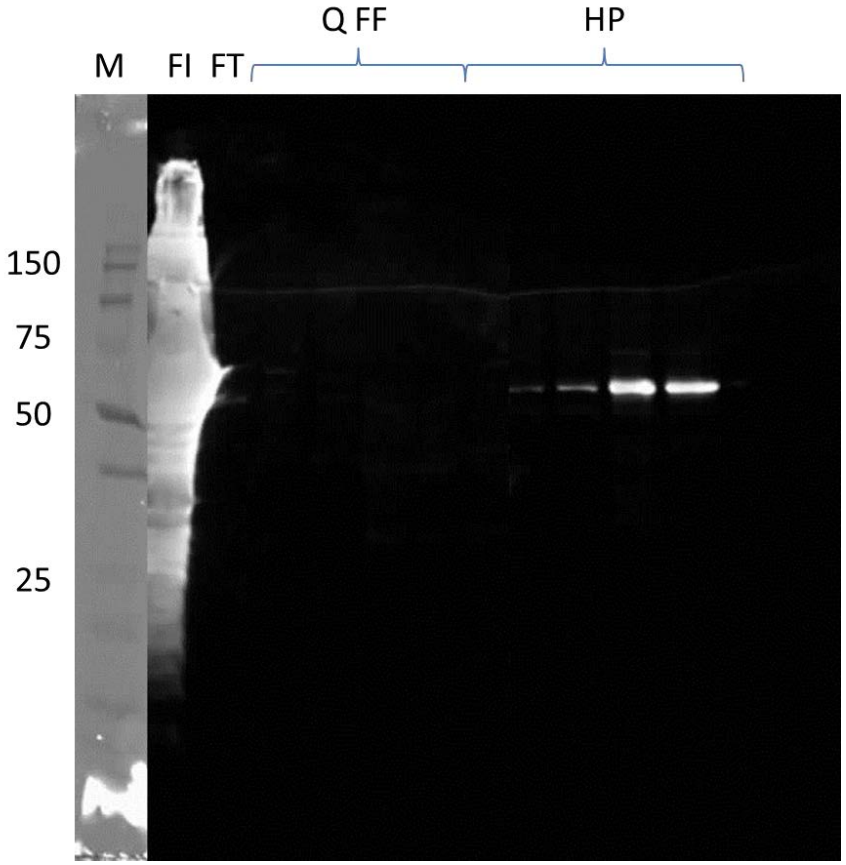


Figure 30 : Analyse par Western-blot de la fraction insoluble (FI) d'un extrait acellulaire préparé à partir de bactéries transformées avec le plasmide pFEsM1PDH2, et correspondant au gel SDS-PAGE de la Figure 28. FT : volume non retenu dans la colonne d'Hisprep. Q FF et HP : fractions déposées après colonne échangeuse d'anion et colonne d'affinité. M : marqueur de taille moléculaire.

2.1.4) Essais de dénaturation/renaturation de la protéine recombinante EsM1PDH2 à partir de corps d'inclusion

Une quantité importante de protéines EsM1PDH2 étant contenue dans la fraction insoluble, les bactéries recombinantes ont été observées au microscope afin de vérifier la présence de corps d'inclusions, et effectivement de telles structures ont été mises en évidence. Par conséquent, des essais de dénaturation/renaturation de protéines ont été menés afin de pouvoir les extraire et les

renaturer. Cependant, après le criblage de 96 conditions de tampons pour tenter d'obtenir un repliement correct des protéines dénaturées, aucune des conditions testées n'a permis d'obtenir des résultats satisfaisants permettant d'envisager d'appliquer ce type de protocole pour obtenir de la protéine recombinante active en quantité suffisante pour réaliser des tests biochimiques.

2.2) Expression de protéines EsM1PDH complètes et tronquées, et contenant au moins un tag histidine à leurs extrémités

Compte-tenu de ces résultats, deux nouvelles approches ont été envisagées pour purifier de la M1PDH recombinante d'*E. siliculosus*. Dans un premier temps, il a été décidé d'essayer de produire des formes tronquées pour les protéines EsM1PDH1 et 2, c'est-à-dire de ne pas considérer l'extension N-terminale de fonction inconnue. En effet, la présence de ce domaine pourrait gêner la surexpression de ces protéines chez *Es. coli*, et/ou diminuer leur fixation à la colonne de nickel lors de l'étape de purification par chromatographie d'affinité. De plus, pour tenter de favoriser la fixation des protéines recombinantes à la colonne de nickel, une étiquette histidine supplémentaire a été ajoutée à l'extrémité C-terminale des trois protéines EsM1PDH. Les différentes constructions considérées sont présentées **Figure 31**.

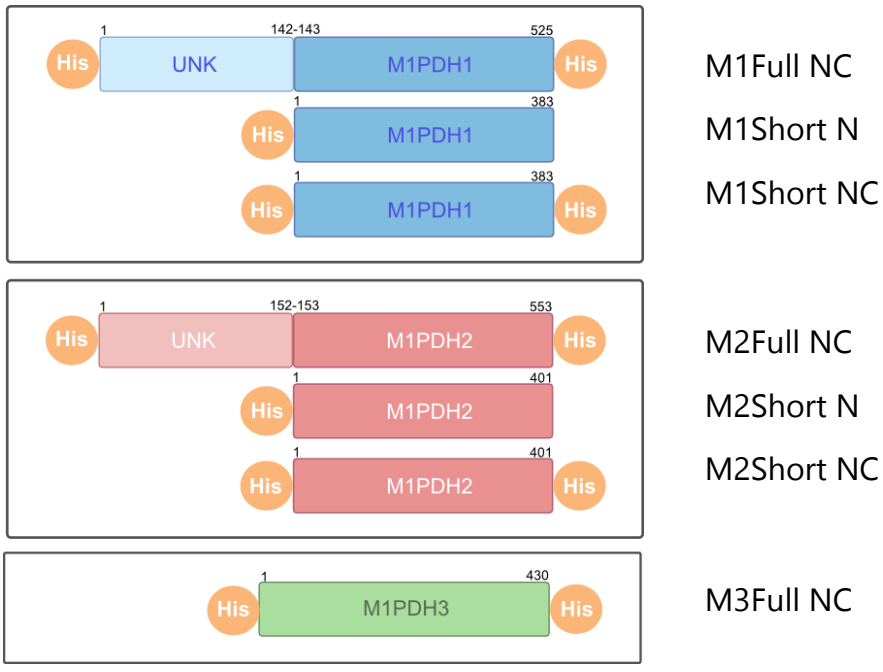


Figure 31 : Description des constructions EsM1PDH1, 2 et 3 ciblées afin de favoriser la surexpression de protéines EsM1PDH recombinantes chez *Es. coli*. UNK : domaine de fonction inconnue. His : étiquette histidine aux extrémités N- et C-terminales.

2.2.1) Mesure d'activité M1PDH sur des extraits acellulaires d'*Es. coli*

La même démarche que celle suivie dans la partie 2.1.1 a été mise en œuvre après les nouveaux clonages. Mais ici les deux sens de la réaction ont été testés.

Concernant les résultats obtenus pour les extraits correspondant à la protéine EsM1PDH1, les trois types de construction sont actifs dans les deux sens de la réaction (**Figure 32**), et les valeurs sont similaires à celles décrites dans la partie 2.1.1 et dans Rousvoal *et al.* (2011). Ainsi, il semblerait que l'absence de l'extension N-terminale et la présence de l'étiquette His aux deux extrémités n'affectent pas l'activité de l'enzyme EsM1PDH1.

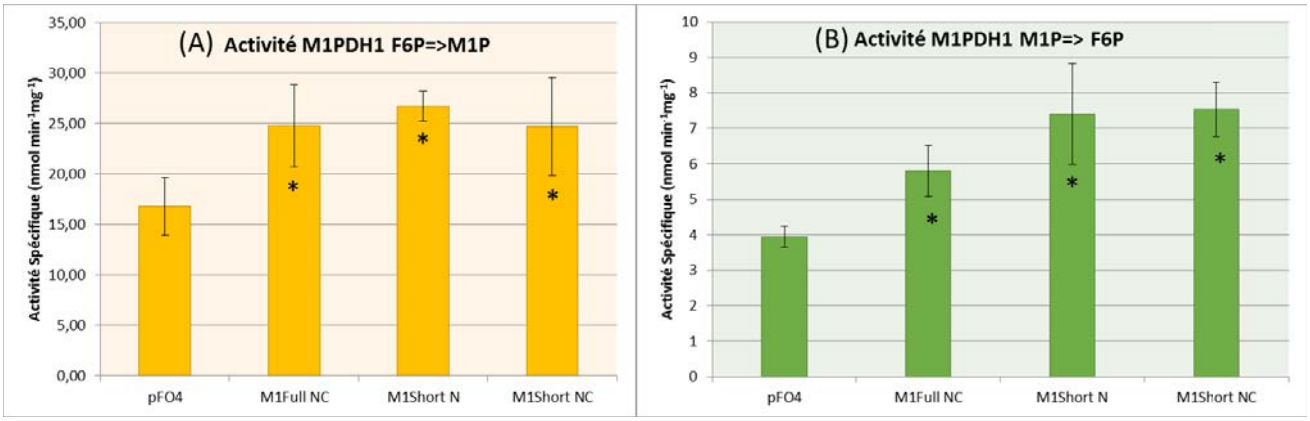


Figure 32 : Mesures d'activités enzymatiques effectuées pour les constructions d'EsM1PDH1. pFO4 : mesures d'activité enzymatique dans des extraits de bactéries transformées avec un vecteur vide. M1Full NC : gène EsM1PDH1 entier avec étiquette histidine en N-terminal et en C-terminal. M1Short N : gène EsM1PDH1 tronqué avec étiquette histidine en N-terminal. M1Short NC : gène EsM1PDH1 tronqué avec étiquette histidine en N-terminal et en C-terminal. Un test t a été réalisé pour comparer les différences entre plasmide vide et plasmide contenant un gène EsM1PDH. Les mesures ont été réalisées sur trois cultures issues de clones bactériens différents, et avec trois réplicats techniques par culture.

Pour EsM1PDH2, l'activité de la construction M2Full NC dans le sens réduction du F6P est similaire à celle mesurée en 2.1.1 (**Figure 33**). Une très faible activité est peut-être aussi présente au niveau de la construction M2shortN, comme indiqué par le résultat du test statistique. Dans le sens oxydation du M1P, cependant, M2Full NC et M2Short NC présentent une activité enzymatique.

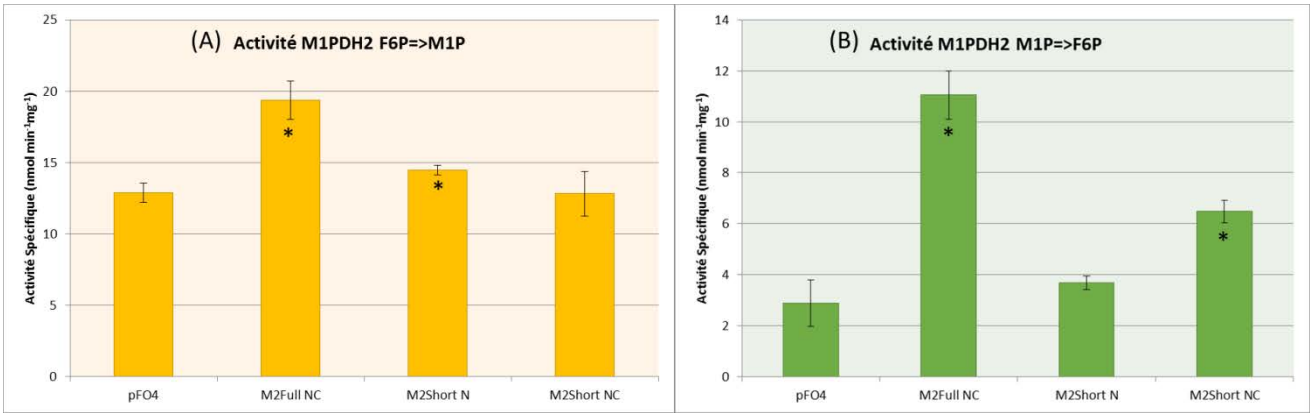


Figure 33 : Mesures d'activités enzymatiques effectuées pour les constructions d'EsM1PDH2. pFO4 : mesures d'activité enzymatique dans des extraits de bactéries transformées avec un vecteur vide. M2Full NC : gène EsM1PDH2 entier avec étiquette histidine en N-terminal et en C-terminal. M2Short N : gène EsM1PDH2 tronqué avec étiquette histidine en N-terminal. M2Short NC : gène EsM1PDH2 tronqué avec étiquette histidine en N-terminal et en C-terminal. Un test t a été réalisé pour comparer les différences entre plasmide vide et plasmide contenant un gène EsM1PDH. Les mesures ont été réalisées sur trois cultures issues de clones bactériens différents, et avec trois réplicats techniques par culture.

Enfin, pour l'enzyme EsM1PDH3, les deux constructions sont actives dans les deux sens de la réaction (**Figure 34**). Ceci contraste avec les résultats présentés plus haut pour lesquels aucune activité M1PDH n'a pu être mesurée dans des extraits préparés à partir de bactéries transformées avec le plasmide pFESM1PDH3.

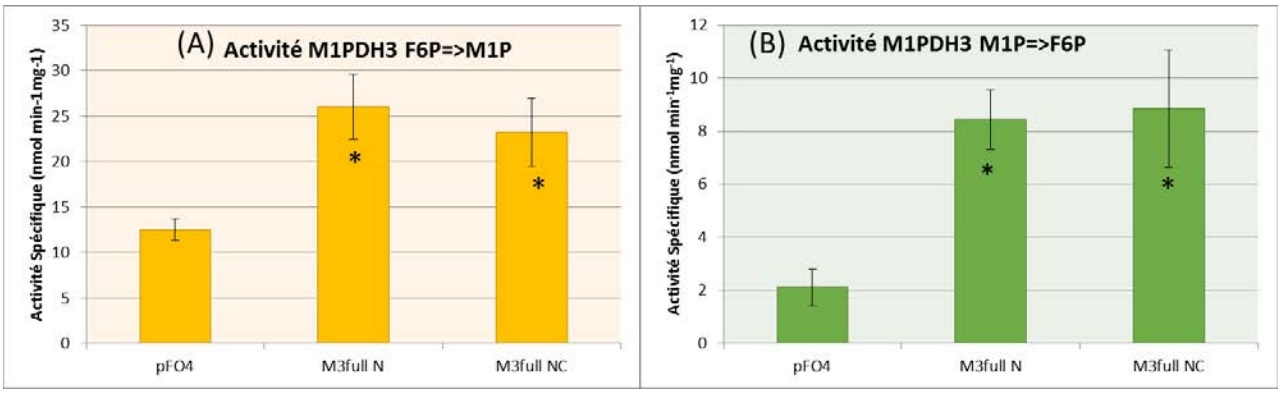


Figure 34 : Mesures d'activités enzymatiques effectuées pour les constructions d'EsM1PDH3. pFO4 : mesures d'activité enzymatique dans des extraits de bactéries transformées avec un vecteur vide. M3Full N : gène EsM1PDH3 entier avec étiquette histidine en N-terminal. M3Full NC : gène EsM1PDH3 entier avec étiquette histidine en N-terminal et en C-terminal. Un test t a été réalisé pour comparer les différences entre plasmide vide et plasmide contenant un gène EsM1PDH. Les mesures ont été réalisées sur trois cultures issues de clones bactériens différents, et avec trois réplicats techniques par culture.

L'ensemble de ces résultats indiquent que les trois protéines recombinantes d'*Ectocarpus* montrent de l'activité chez *Es. coli*. Par conséquent, l'étape suivante a consisté à mettre en évidence s'il y avait ou pas surexpression des protéines dans la phase soluble, car c'est la condition indispensable pour leur purification et leur caractérisation.

2.2.2) Analyse du niveau de production des protéines EsM1PDH recombinantes dans les extraits acellulaires bactériens

Pour chaque protéine d'intérêt et pour chaque construction, trois clones ont été traités en parallèle : culture dans 10 ml de ZYP5052, préparation des extraits acellulaires, migration sur gel, coloration au bleu de coomassie et immuno-détection par Western-blot avec des anticorps anti-His tag.

Un gel SDS-PAGE a été réalisé après lyse des bactéries avec, pour chaque construction (EsM1PDH tronquée avec un tag histidine : M1Short N, EsM1PDH tronquée avec deux tag histidine : M1Short NC et EsM1PDH avec deux tag histidine : M1Full NC), dépôt d'un aliquote de la fraction soluble et de la fraction insoluble (**Figure 35**) obtenues pour les trois clones.

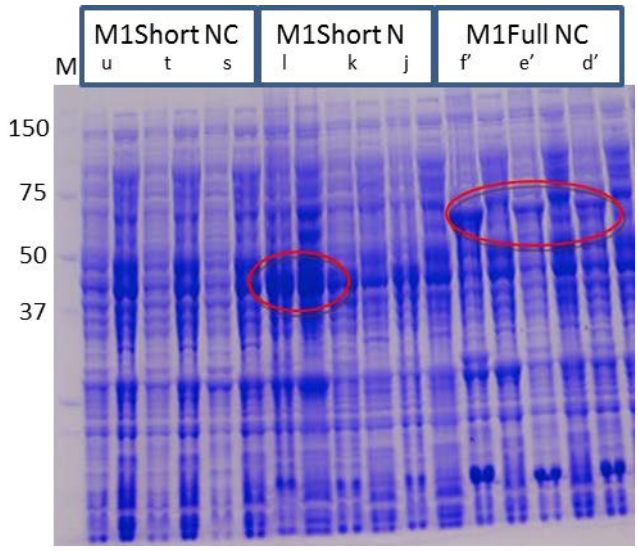


Figure 35 : Exemple de gel SDS-PAGE obtenu après migration d'aliquotes de fractions insolubles et solubles pour les différentes constructions d'EsM1PDH1, en triplicats biologiques (trois clones par construction). Pour chaque clone (représenté par une lettre), un extrait de fraction insoluble est déposé, puis un extrait de fraction soluble. M : marqueur de taille moléculaire. Les cercles rouges indiquent la présence d'une bande dans la fraction insoluble et

dans la fraction soluble de l'extrait bactérien (premier encadré, M1Short N), ou la présence de la bande d'intérêt que dans la fraction insoluble de l'extrait bactérien (deuxième encadré, M1Full NC). M : marqueur de poids moléculaires en kDa.

Ces résultats montrent la présence de bandes à la taille attendue dans les fractions solubles et insolubles pour les constructions M1Short N. Cependant, il est difficile d'être absolument sûr que ces bandes correspondent à la protéine recherchée, en particulier à cause de la quantité importante de protéines dans les fractions. Par conséquent, un test par Western-blot a été réalisé (**Figure 36**).

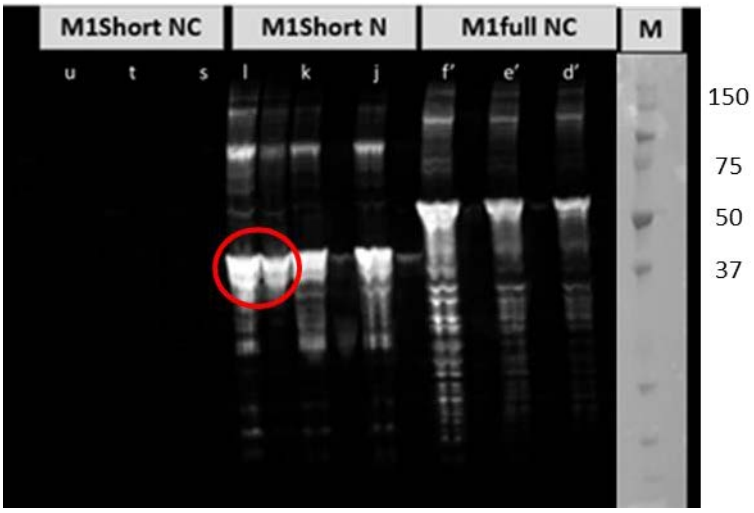


Figure 36 : Analyse par Western-blot de fractions insolubles et solubles décrites dans la Figure 35 ci-dessus. Le même ordre de chargement des échantillons a été appliqué. M1Short NC : construction EsM1PDH1 tronquée avec deux tag histidine ; M1Short N : construction EsM1PDH1 tronquée avec un tag histidine ; M1full NC : construction EsM1PDH1 avec deux tag histidine. M : marqueur de poids moléculaires en kDa.

Pour l'enzyme EsM1PDH1, la fraction soluble obtenue à partir du clone l semble contenir une quantité importante de protéine d'intérêt, alors que ce n'est pas le cas pour les autres clones. Ce clone correspond à la forme tronquée d'EsM1PDH1, avec un seul tag en N-terminal. Ce clone sera donc considéré ultérieurement pour des expériences de purification.

Les gels SDS-PAGE des constructions M1PDH2 et M1PDH3 étant très semblables à celui des constructions M1PDH1 (nombreuses bandes présentes sans bande majoritaire à la taille attendue), il n'a pas été jugé pertinent de les présenter. C'est pourquoi seules les analyses par Western-blot sont illustrées ci-dessous.

Les signaux obtenus avec l'anticorps anti-his sont très faibles au niveau des fractions insolubles pour la construction M2ShortNC, et quasiment inexistants au niveau des autres fractions produites pour les EsM1PDH2 tronquées (**Figure 37**). Pour la construction correspondant au gène complet, on constate des bandes à la bonne taille (environ 60 kDa) révélées dans les fractions insolubles et un peu dans les fractions solubles. Suite à ces observations, des tests de production ont été réalisés en volume plus important de culture (1L), mais ils n'ont pas permis de produire en plus grande quantité les différentes formes des protéines d'intérêt dans les fractions solubles.

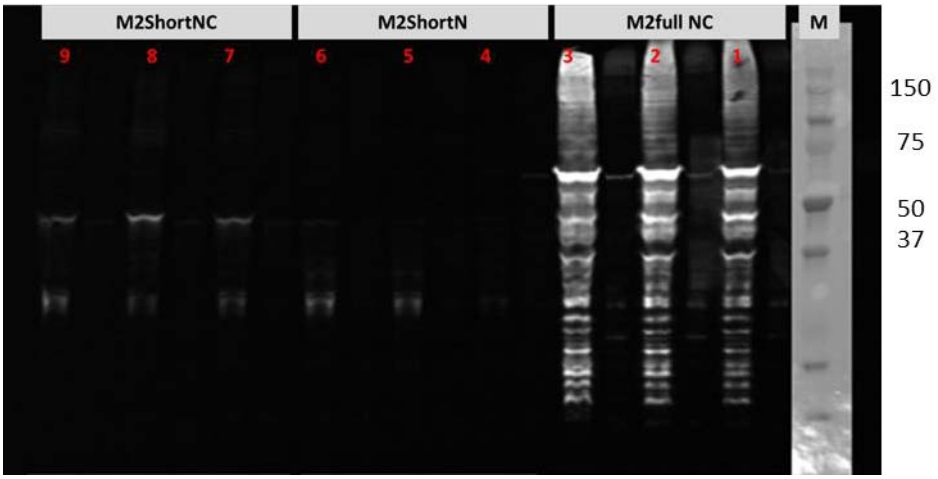


Figure 37 : Analyse par Western-blot de fractions insolubles et solubles correspondant à 3 clones pour chaque construction d'EsM1PDH2. M2Short NC : construction EsM1PDH2 tronquée avec deux tag histidine ; M2Short N : construction EsM1PDH2 tronquée avec un tag histidine ; M2full NC : construction EsM1PDH2 avec deux tag histidine. M : marqueur de poids moléculaires en kDa.

Pour l'enzyme EsM1PDH3, un grand nombre de bandes aspécifiques sont révélées par immuno-détection, ne permettant pas de conclure quant à l'expression des différentes protéines recombinantes (**Figure 38**). Cependant, il semble tout de même qu'une bande révélée avec plus d'intensité se situe à la taille attendue (50 kDa).

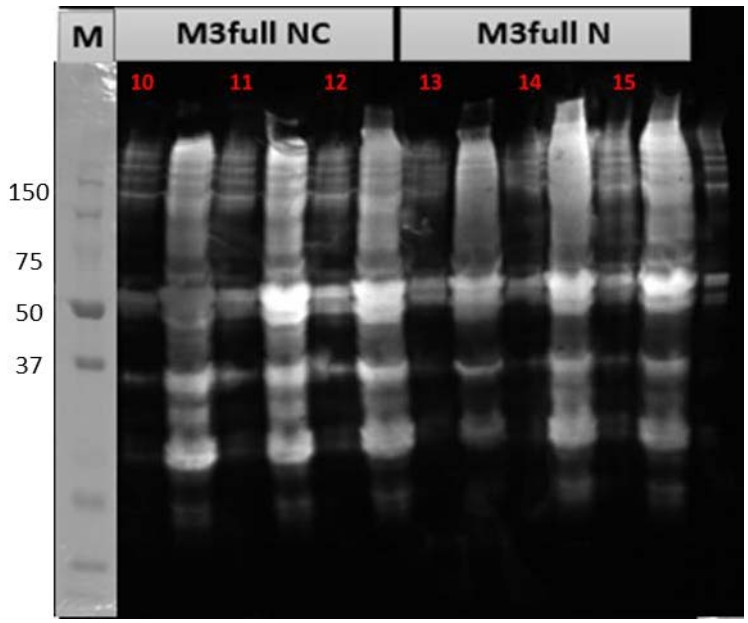


Figure 38 : Analyse par Western-blot de fractions solubles et insolubles correspondant à 3 clones pour chaque construction d'EsM1PDH3. M3full NC : construction EsM1PDH3 avec deux tag histidine ; M3full N : construction EsM1PDH3 avec un tag histidine. M : marqueur de poids moléculaires en kDa.

Des doutes subsistants quant à la présence de protéines EsM1PDH3 recombinantes solubles suite à ces résultats, des essais de purification sur la construction M3full N ont été réalisés. Cependant, aucune purification de cette protéine n'a pu être observée.

Suite aux différents tests réalisés sur les différentes constructions d'EsM1PDH, la construction la plus à même de permettre d'étudier une M1PDH d'*E. siliculosus* recombinante est la EsM1PDH tronquée (clone l) avec un seul tag histidine en N-terminal car elle semble surexprimée et donc produite en quantité suffisante par *Es. coli* pour permettre la purification et la caractérisation d'une M1PDH recombinante d'algue brune. C'est par conséquent sur cette protéine que les efforts ont été portés dans la suite de ce chapitre.

3) Purification et caractérisation biochimique de la forme tronquée d'EsM1PDH1

3.1) Purification de la protéine EsM1PDH1 tronquée à partir de cultures d'*Es. coli.*

Après culture en milieu ZYP5052 et lyse des cellules de bactéries par French Press, l'extrait bactérien est purifié en deux étapes successives. Afin de séparer la protéine recombinante des autres, elle est d'abord fixée sur colonne de nickel. L'élution de la protéine recombinante se fait ensuite en appliquant un gradient d'imidazole, et on suit l'absorbance à 280 nm pour déterminer quand elle est décrochée de la colonne (**Figure 39**). Pour la protéine EsM1PDH1 tronquée, cette élution se fait lorsque le gradient d'imidazole atteint une concentration de 300 mM.

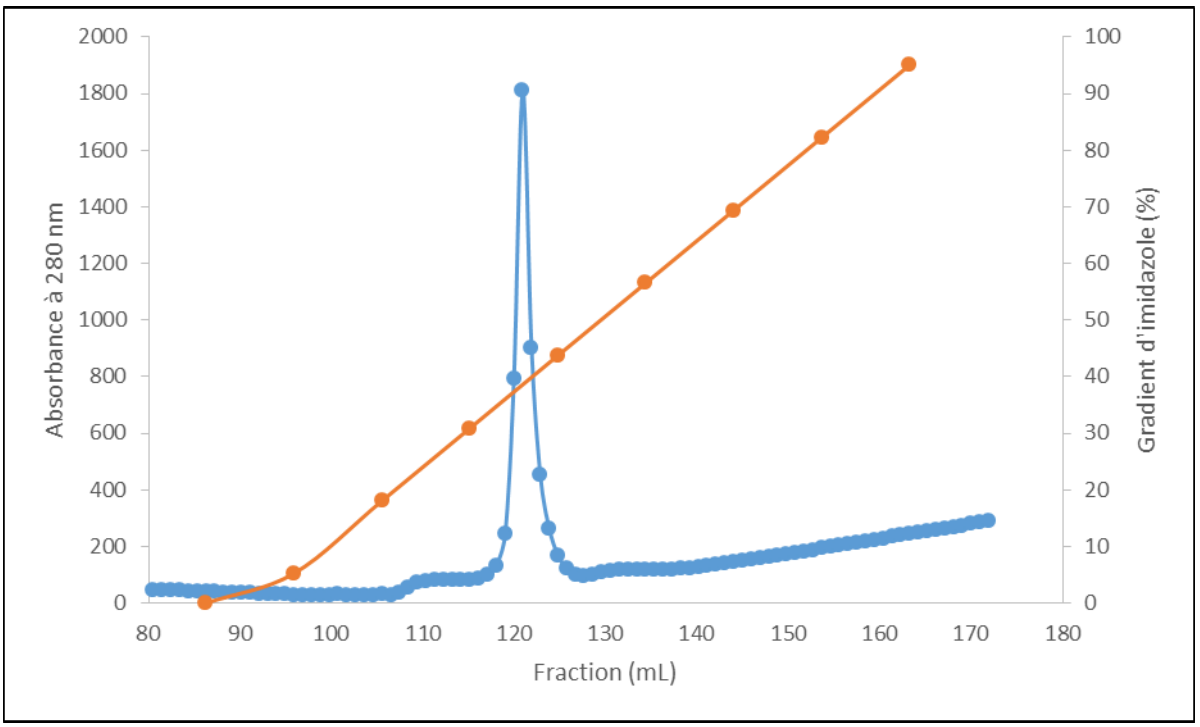


Figure 39 : Profil d'élution de la protéine EsM1PDH1 tronquée par un gradient d'imidazole à partir d'une colonne d'affinité.

Les fractions correspondant à la protéine éluée sont alors considérées pour la seconde étape de purification, basée sur l'utilisation d'une colonne de gel filtration qui permet de séparer les molécules en fonction de leur taille. Une calibration de la colonne est au préalable nécessaire pour pouvoir déterminer les temps d'élution de protéines de poids moléculaires connus, afin de pouvoir établir une courbe de calibration qui permet ensuite de déterminer la masse de la protéine d'intérêt purifiée. La comparaison entre la masse déterminée expérimentalement et la masse

théorique de la protéine obtenue par analyse de la séquence primaire en acides aminés renseigne quant à la structure quaternaire de la protéine recombinante. Pour faire la calibration, les protéines β-amylase, éthanol déshydrogénase, albumine anhydrase carbonique ont été utilisées (**Figure 40**).

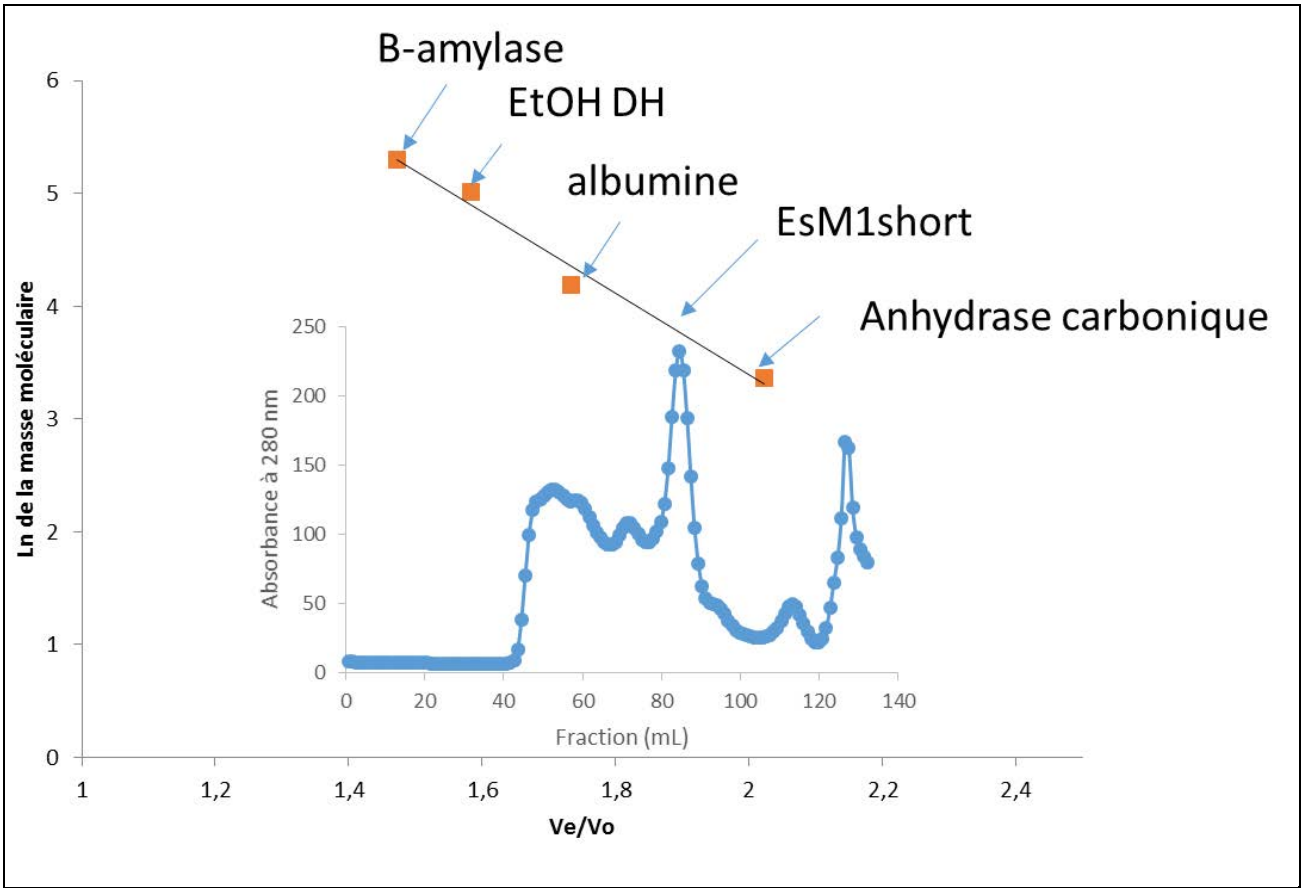


Figure 40 : Elution de la protéine recombinante EsM1PDH1 tronquée par gel filtration et estimation de son poids moléculaire. Des protéines de taille connue ont permis la calibration de la colonne Superdex 200, réalisée sur l'Akta Avant (GE Healthcare, USA) : EtOH DH : éthanol déshydrogénase. Ve : volume de sortie de la protéine de référence, Vo : volume mort de la colonne.

La protéine EsM1PDH1 tronquée est éluée majoritairement vers 87 mL. Cela correspond à un ratio Ve/Vo de 87/44 = 1,977 et donc à une taille de 44 kDa. C'est dans cette fraction que la concentration en protéines est la plus élevée et c'est aussi la seule où de l'activité M1PDH a été mise en évidence. Considérant que le poids moléculaire attendu était de 44 kDa, les résultats suggèrent que la protéine est active sous forme monomérique.

Afin d'analyser le degré de pureté après gel filtration, un gel SDS-PAGE ainsi qu'un Western-blot ont été réalisés (**Figures 41 et 42**).

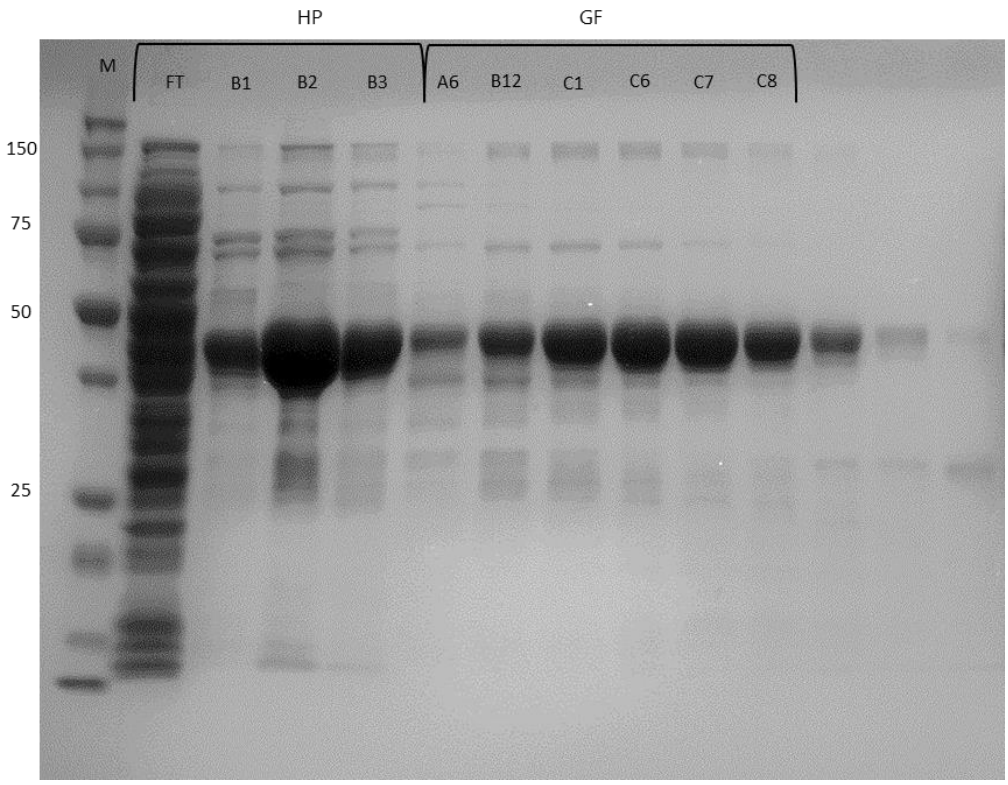


Figure 41 : Gel SDS-PAGE de fractions issues des étapes de chromatographie d'affinité (HP) et d'exclusion de taille (GF) pour EsM1Short N. FT : fraction non retenue dans la colonne. M : marqueur de poids moléculaires en kDa.

Les fractions B1, B2 et B3, correspondant à l'éluat de la colonne d'affinité, contiennent une bande majoritaires à la taille attendue (environ 44 kDa). Cependant, quelques bandes aspécifiques sont encore présentes, surtout dans la partie du gel correspondant à des poids moléculaires plus élevés. Après gel filtration, il n'y a quasiment plus de bandes aspécifiques dans les fractions C6, C7 et C8 correspondant à environ 87 mL. Le degré de pureté de l'échantillon protéique a donc été amélioré. On peut également constater que dans les autres pics du profil d'élution de gel filtration (A6, B12), il n'y a pas de bande majoritaire à la taille attendue, sauf pour le premier pic qui correspond à l'élution de tous les agrégats de protéines. Une hypothèse possible est qu'une partie de la protéine recombinante produite est emmenée par les agrégats, c'est pourquoi on la retrouve aussi dans cette fraction.

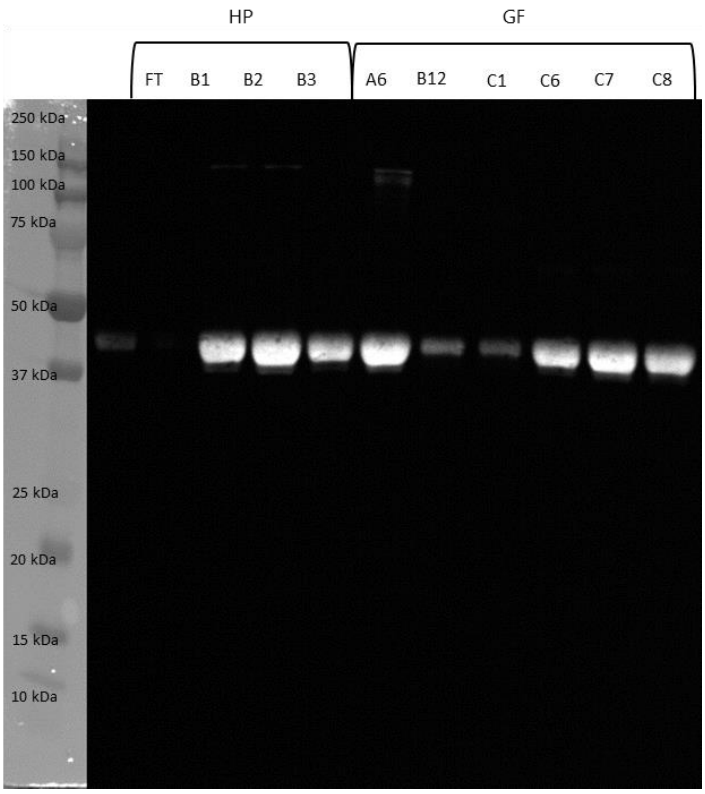
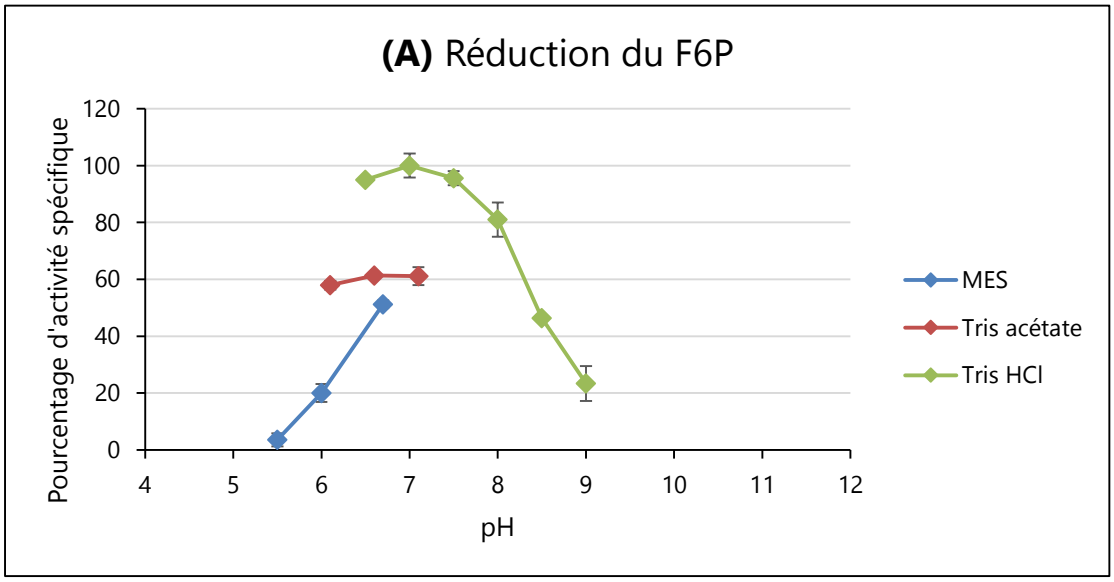


Figure 42 : Analyse par Western-blot de fractions issues des étapes de chromatographie d'affinité (HP) et d'exclusion de taille (GF) pour EsM1Short N. L'ordre de chargement est le même que celui du gel au-dessus. Fractions FT : fraction non retenue dans la colonne en HP, B1 B2 B3 : fractions correspondantes au pic de DO_{280nm} lors de l'élution de la colonne HP, A6 : premier pic de DO correspondant aux protéines de haut poids moléculaire en GF, B12 C1 : deuxième pic de DO en GF, C6 C7 C8 : pic de DO à environ 87 mL en GF correspondant à la taille attendue pour le monomère de la protéine recombinant. A gauche, marqueur de poids moléculaire.

L'analyse par immuno-détection (**Figure 42**) révèle la présence d'une bande unique dans chaque fraction analysée, et à la même taille que les bandes majoritaires observées sur gel SDS-PAGE. Celles-ci semblent donc bien correspondre à la protéine recombinante surexprimée. De plus, une analyse par DLS permettant d'évaluer la pureté d'un échantillon montre que l'extrait protéique de M1Short N après GF est monodisperse à 99,7%.

3.2) Détermination des pH et tampons optimaux pour les mesures d'activités de réduction du F6P et d'oxydation du M1P

Compte-tenu de la réversibilité de la réaction catalysée par les M1PDHs, les analyses de pH optimum ont été réalisées dans les deux sens de la réaction. La gamme de pH testée va de 4 à 10 pour le sens réduction du F6P, et de 4 à 12 pour le sens d'oxydation du M1P car une analyse bibliographique a montré que cette réaction a lieu plutôt à pH basique. Différents tampons ont été testés pour obtenir les différents pH : trois différents afin d'avoir des valeurs de pH se chevauchant pour le sens réduction du F6P (le MES, le Tris acétate et le Tris-HCl), et cinq différents pour le sens oxydation du M1P pour tenir compte de la difficulté à observer la décroissance d'activité de l'enzyme à pH élevé. Les résultats sont présentés **Figure 43**.



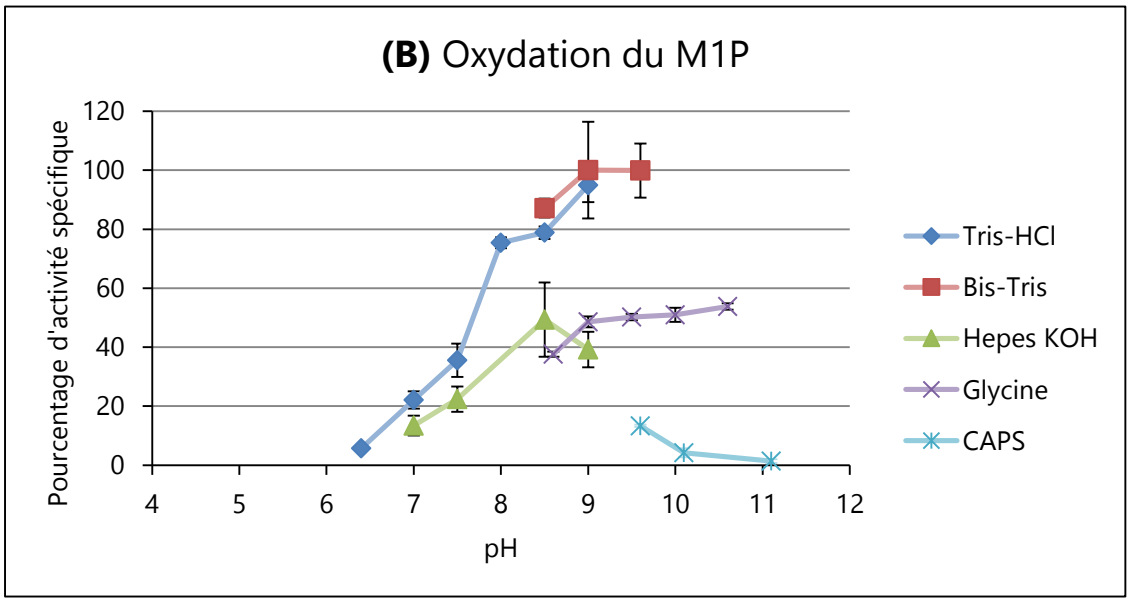


Figure 43 : Détermination du pH optimal pour l'activité de l'enzyme dans le sens réduction du fructose-6-phosphate (A) et dans le sens oxydation du mannitol-1-phosphate (B). Pour chaque point expérimental, les barres d'erreur représentent l'écart-type sur trois réplicats techniques. Tous les tampons ont été préparés à 50 mM.

Pour la réduction du F6P, l'activité la plus forte a été mesurée à pH 7, condition qui a ensuite été considérée comme 100%. Cette activité diminue à partir du pH 7, en présence de tampons à pH plus acides et plus basiques. Elle représente 20 % de l'activité maximale à pH 9 et est quasiment nulle à pH 5.5. Pour des pH compris entre 6 et 7, l'activité est la plus élevée en présence de tampon Tris-HCl, puis en Tris-acétate. Les valeurs obtenues avec le Tris Acétate n'ont pas montré de différence significative parmi les différents pH testés. Compte tenu de ces résultats, le tampon Tris-HCl 100 mM à pH 7 a été utilisé pour tous les tests enzymatiques ultérieurs. Il est intéressant de mentionner que lors de l'étude de l'activité EsM1PDH1 publiée en 2011, l'activité de réduction du F6P a été mesurée en tampon 50 mM Tris-acétate pH 6,3, condition pour laquelle l'activité de la forme tronquée recombinante de cette enzyme ne présente que 60% de son activité maximale (**Figure 43 A**).

Pour l'oxydation du mannitol-1-phosphate, nous avons dû utiliser une gamme de tampons plus large afin de mieux appréhender la valeur du pH optimum. L'activité maximale a été mesurée à pH 9-9.5 en tampon Tris-HCl ou Bis-Tris. Les valeurs obtenues pour ces pH avec les autres tampons testés (glycine, Hepes-KOH) sont plus faibles. L'activité diminue à pH plus acide quel que soit le tampon testé, jusqu'à pH 7 pour l'Hepes-KOH (15% d'activité) et jusqu'à pH 6,5 pour le tampon Tris-HCl (5% d'activité). Pour les pH plus basiques que le pH optimum, l'activité se maintient jusqu'à pH 9,5-10 pour les tampons Bis-Tris et glycine, et diminue à partir du pH 9,5 pour le tampon CAPS. Celui-ci est le tampon où l'activité la plus faible par rapport aux autres a été mesurée. Sur la base de ces observations, le tampon Tris-HCl à pH 9 sera utilisé dans les tests enzymatiques ultérieurs. Comme mentionné plus haut pour l'activité de réduction du F6P, il faut noter que lors des travaux de Rousvoal *et al.* (2011), l'activité d'oxydation du M1P a été déterminée en présence de tampon 10 mM Hepes-KOH pH 9,0, qui permet de mesurer une activité égale à seulement 40% de celle la plus élevée déterminée pour la protéine recombinante tronquée (**Figure 43 B**).

3.3) Détermination de la température optimale d'activité d'EsM1PDH1 tronquée

La température optimale d'activité enzymatique a aussi été déterminée dans les deux sens de la réaction (**Figure 44**). Cependant, les tests ont d'abord été réalisés dans le sens de réduction du F6P afin de déterminer un intervalle de température dans lequel l'enzyme est la plus active, puis de comparer ces résultats avec ceux obtenus dans l'autre sens de la réaction.

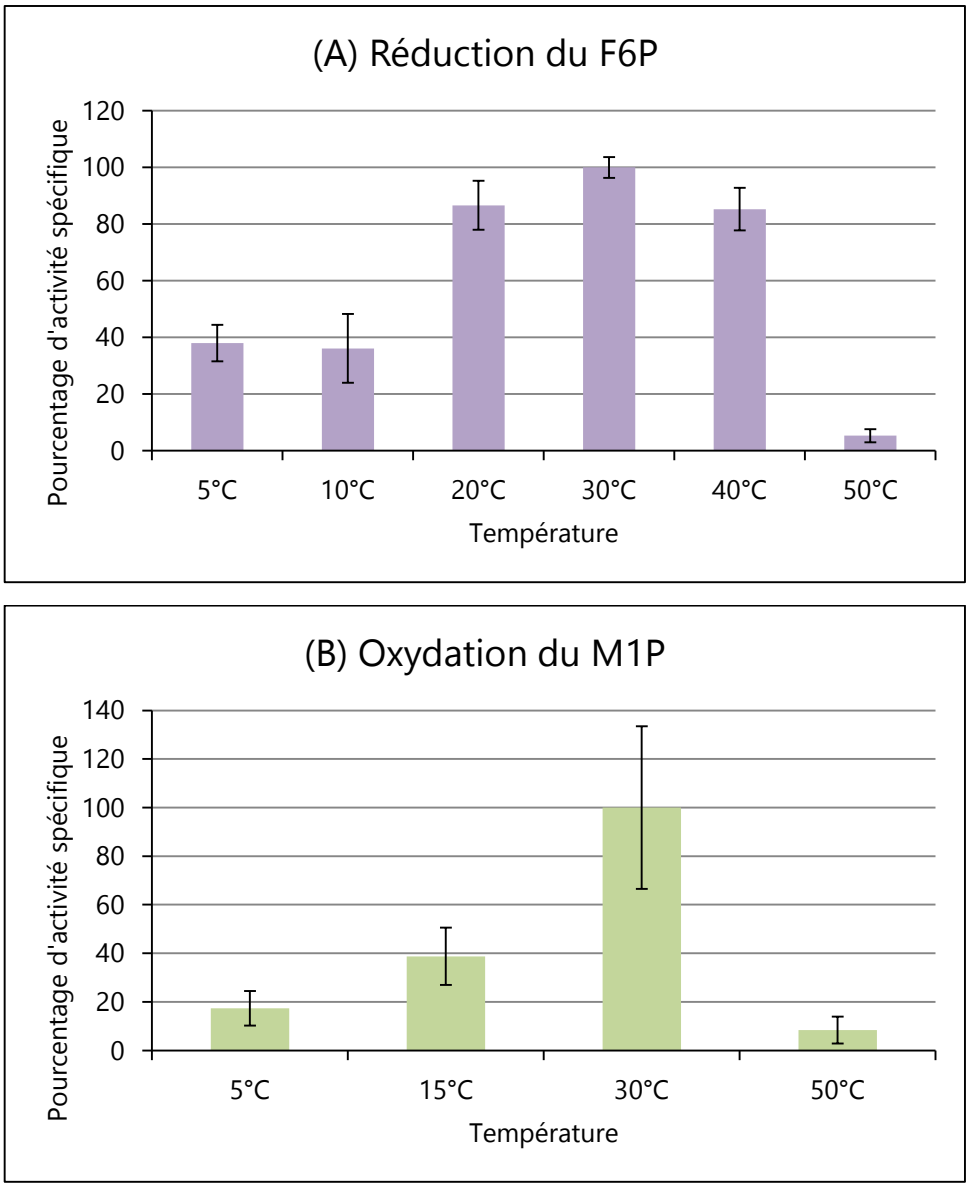


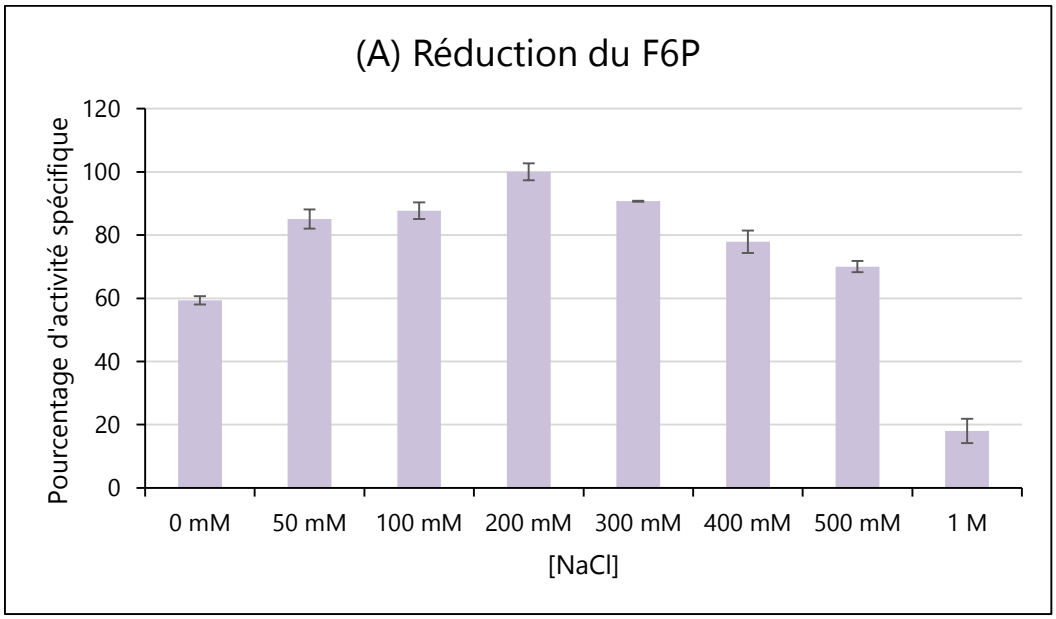
Figure 44 : Détermination de la température optimale d'activité enzymatique dans le sens réduction du fructose-6-phosphate et d'oxydation du mannitol-1-phosphate. Pour chaque point expérimental, les barres d'erreur représentent l'écart-type sur trois réplicas techniques.

D'après les résultats obtenus, l'activité de l'enzyme est maximale entre 20 et 40°C pour le sens réduction du F6P (100% d'activité à 30°C, **Figure 44 A**), et cette observation est confirmée pour

l'oxydation du M1P (100% d'activité à 30°C aussi, **Figure 44 B**). Elle est quasiment nulle à 50°C. Par contre, il est intéressant de noter que cette enzyme est toujours active à 5 et 10 °C, même si les valeurs d'activité sont divisées par 3 par rapport aux valeurs obtenues à 30°C pour le sens réduction du F6P et par 5 dans l'autre sens de la réaction. Ainsi, l'enzyme EsM1PDH est active même dans les conditions où la température descend sous les 10°C. Cette situation est possible dans le milieu naturel, notamment à marée basse et en hiver.

3.4) Influence de la quantité de NaCl dans le milieu réactionnel sur les deux activités d'EsM1PDH1 tronquée

L'influence du NaCl sur l'activité M1PDH avait déjà été démontrée dans des extraits bruts d'*Es. coli* en 2011 par l'équipe. Le but était donc ici de comparer les résultats entre une enzyme présente dans un contexte physiologique particulier, et l'enzyme purifiée.



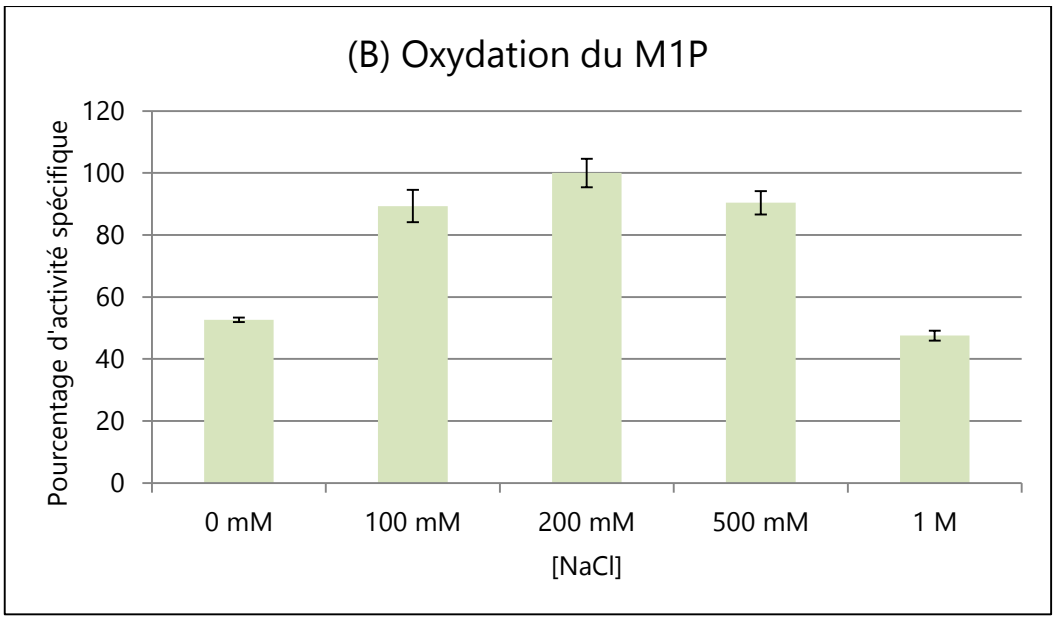


Figure 45 : Influence du NaCl sur l'activité de l'enzyme M1short N, dans le sens réduction du fructose-6-phosphate (A) et dans le sens oxydation du mannitol-1-phosphate (B). Pour chaque point expérimental, les barres d'erreur représentent l'écart-type sur trois réplicats techniques.

Dans le sens F6P donne M1P, on constate que l'ajout de NaCl dans le milieu réactionnel permet d'augmenter l'activité spécifique de l'enzyme. En effet, la valeur la plus forte (définie comme 100%) est obtenue après incubation en présence de 200 mM de NaCl (**Figure 45 A**). En absence de NaCl, l'activité correspond à 60 % de celle calculée précédemment. Par contre, des concentrations supérieures à 200 mM inhibent cette activité, avec une diminution qui est quasiment proportionnelle à la quantité de NaCl rajoutée.

L'activité d'oxydation du M1P est aussi influencée par la concentration en NaCl, dans des proportions similaires à ce qui a été observé pour la réaction inverse (**Figure 45 B**). L'activité maximale a été mesurée aussi en présence de 200 mM de NaCl, alors qu'elle est moitié moins élevée en absence de chlorure de sodium. Il est également intéressant de noter que l'activité dans le sens oxydation du mannitol-1-phosphate semble moins sensible à de fortes concentrations de NaCl que l'activité inverse : en effet à 1 M de NaCl, l'enzyme est toujours à plus de 40% de son activité maximale, alors qu'elle descend à moins de 20% pour le sens réduction du fructose-6-phosphate.

Ces résultats sur l'enzyme tronquée purifiée montrent que l'influence du NaCl sur l'activité enzymatique dans les deux sens est similaire, ce qui est différent de ce qui a été observé après mesures à partir d'extraits bactériens contenant l'enzyme EsM1PDH1 entière. En effet, l'activité de

réduction du F6P était stimulée par addition de 100-200 mM de NaCl dans le milieu réactionnel, mais, dans l'autre sens de la réaction, une inhibition de l'activité dès l'ajout de 100 mM de NaCl avait été observée (Rousvoal *et al.* 2011). Ces résultats peuvent peut-être s'expliquer par le fait que le type de protéines utilisé pour réaliser ces expériences est différent, enzyme entière maintenue en contact avec des composants cellulaires bactériens d'un côté, et enzyme purifiée tronquée de l'autre.

3.5) Influence de différents cofacteurs sur les activités enzymatiques

Jusqu'à présent, c'est le NAD(H) qui a été considéré pour les mesures d'activités enzymatiques. Afin de vérifier que c'est bien le cofacteur le plus efficace pour ces deux réactions, le NAD(H) a été remplacé par le NADP(H) dans les milieux réactionnels (**Figure 46**).

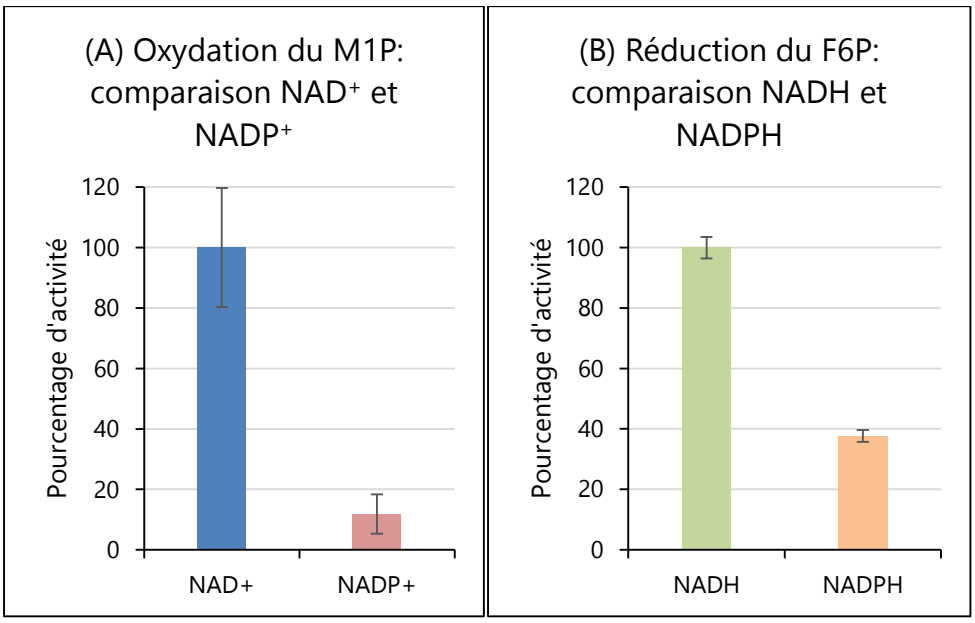


Figure 46 : Influence de la nature du cofacteur sur les activités d'oxydation du M1P (A) et de réduction du F6P (B). Deux couples de cofacteurs ont été testés : le NADH/NAD^+, et le NADPH/$NADP^+$. Pour chaque point expérimental, les barres d'erreur représentent l'écart-type sur trois réplicats techniques.

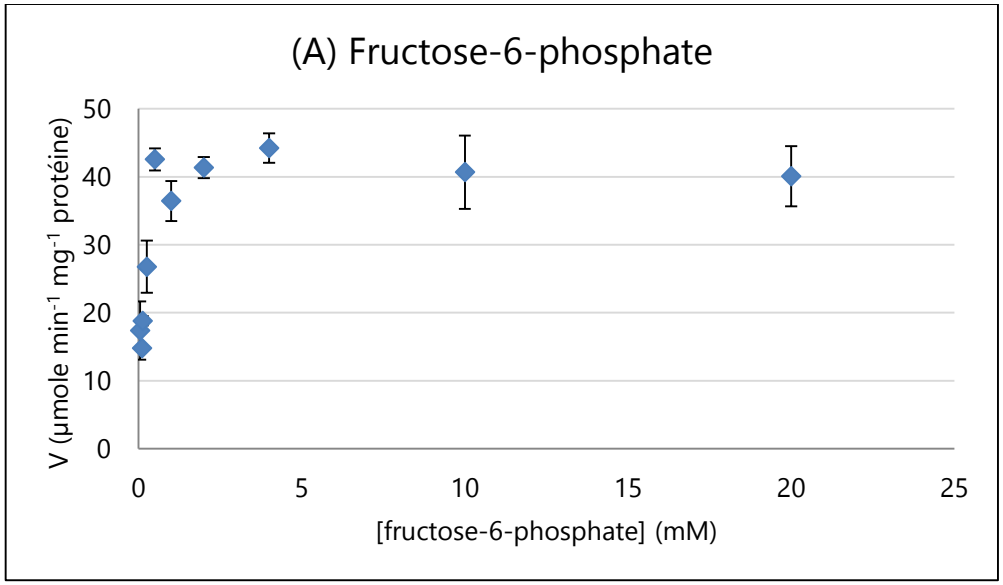
D'après les résultats obtenus, l'activité spécifique de l'enzyme est plus importante pour le couple NADH/NAD^+ que pour le couple NADPH/$NADP^+$. L'influence du cofacteur est plus forte sur l'activité d'oxydation que sur celle de réduction, et confirme les observations précédentes sur l'enzyme d'*E. siliculosus* présente dans des extraits bactériens (Rousvoal *et al.* 2011).

3.6) Etude des paramètres cinétiques d'EsM1PDH1 tronquée

Les activités mesurées sur l'enzyme suivent une cinétique de type Michaelienne en présence de substrats et en présence de cofacteurs. Les valeurs obtenues ont ainsi été utilisées pour obtenir des représentations de Lineweaver & Burk. C'est à partir de ces représentations que les constantes cinétiques (V_m, K_m, k_{cat} et k_{cat}/K_m) ont été calculées.

3.7.1) Sens réduction du fructose-6-phosphate

Afin de déterminer les paramètres cinétiques de l'enzyme recombinante purifiée EsM1PDH1 tronquée, les activités enzymatiques spécifiques ont été calculées en présence de F6P, dans une gamme de concentrations allant de 0,1 à 20 mM (**Figure 47**).



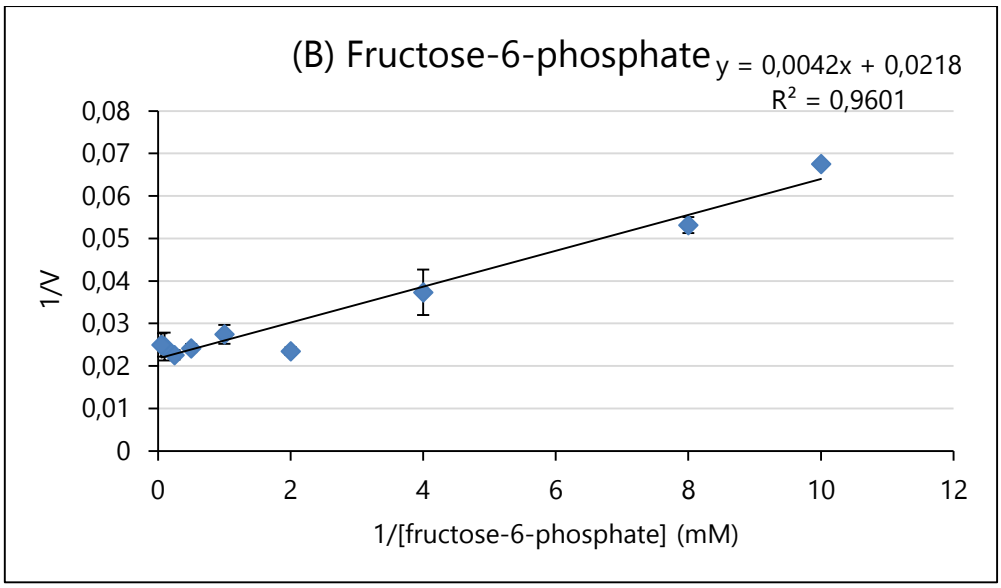


Figure 47 : Détermination des paramètres cinétiques de l'enzyme EsM1short N dans le sens réduction du fructose-6-phosphate. (A) Représentation de Michaelis and Menten. Pour chaque point expérimental, les barres d'erreur représentent l'écart-type sur trois réplicats techniques. (B) Graphique de Lineweaver & Burk déduit à partir des valeurs décrites dans la partie A.

A pH7, cette protéine suit une cinétique de type Michaelienne en fonction de la concentration en F6P. Les valeurs de V_m augmentent jusqu'à une valeur de concentration en F6P de 5 mM, puis cette V_m stagne pour les autres conditions testées. La constante de Michaelis-Menten (K_m) calculée pour ce substrat est de 0,19 mM, et sa vitesse maximale (V_m) de 46 µmol min^{-1} mg^{-1}. Le turnover (k_{cat}) est de 32 s^{-1} et le k_{cat}/K_m de 0,17 M^{-1} s^{-1}.

De plus, d'autres substrats tels le glucose-6-phosphate et le mannose-6-phosphate ont été testés afin de déterminer la spécificité de l'enzyme. Aucune activité n'a été mesurée avec ces substrats, indiquant que la M1PDH1 est strictement spécifique au F6P dans ce sens de la réaction. Les paramètres cinétiques ont également été calculés pour le cofacteur NADH, avec des concentrations allant de 0,05 mM à 1 mM (**Figure 48**).

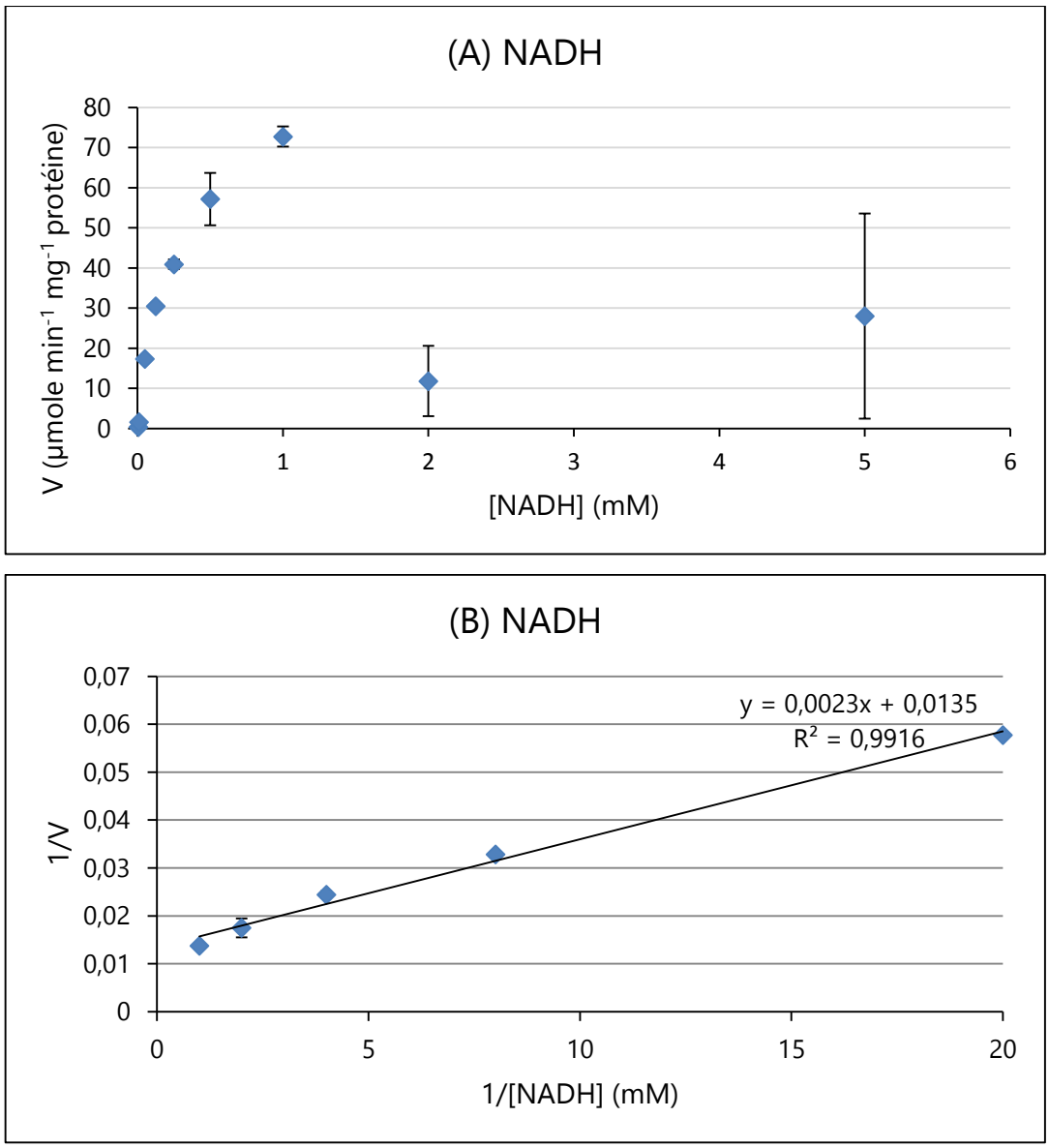
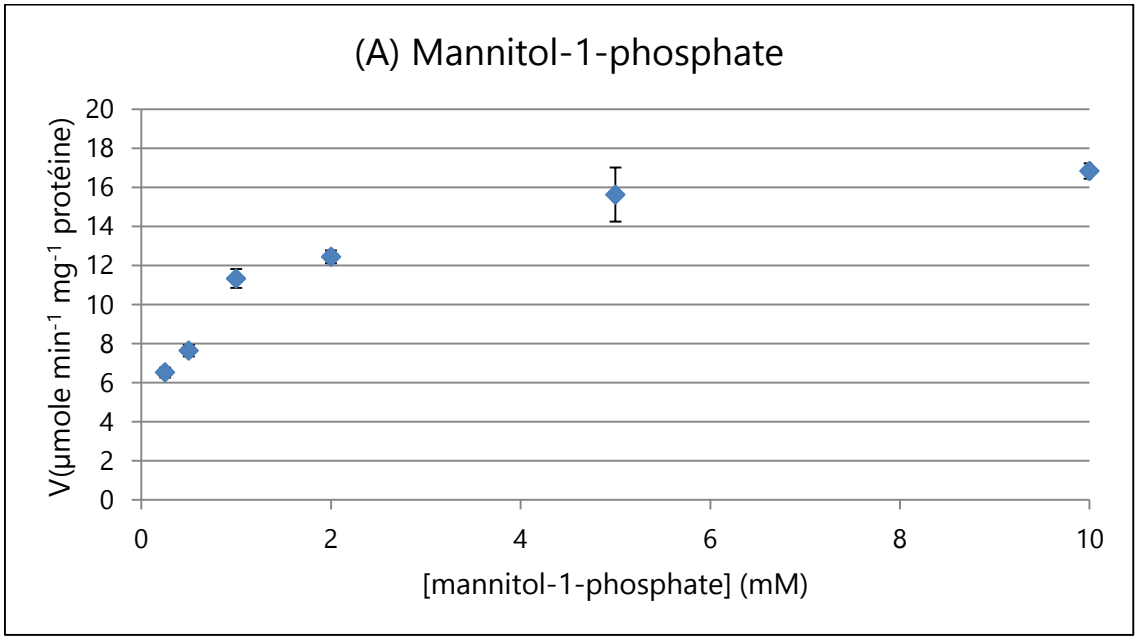


Figure 48 : Détermination des paramètres cinétiques du cofacteur NADH dans le sens réduction du fructose-6-phosphate. (A) Représentation de Michaelis and Menten. Pour chaque concentration, les barres d'erreur représentent l'écart-type sur trois réplicats techniques. (B) Graphique de Lineweaver & Burk déduit à partir des valeurs décrites dans la partie A, correspondantes aux concentrations de NADH de 0,05 à 1 mM.

La courbe de Michaelis and Menten montre que la vitesse d'activité de l'enzyme est inhibée pour des concentrations de NADH supérieures à 1 mM. Par conséquent, pour le calcul des constantes cinétiques, les vitesses de réactions correspondant aux conditions 2 mM et 5 mM n'ont pas été considérées. La constante de Michaelis-Menten (K_m) calculée pour ce substrat est de 0,16 mM, sa vitesse maximale (V_m) de 74 µmol min^{-1} mg^{-1},et le k_{cat}/K_m de 0,2 M^{-1} s^{-1}.

3.7.2) Sens oxydation du mannitol-1-phosphate

Dans l'autre sens de la réaction, les activités enzymatiques spécifiques ont été calculées en présence de M1P, dans une gamme de concentrations allant de 0,25 à 10 mM. A pH 9, la protéine suit une cinétique de type Michaelienne en fonction de la concentration en M1P (**Figure 49**). La constante de Michaelis-Menten (K_m) calculée pour ce substrat est de 0,38 mM, et sa vitesse maximale (V_m) de 15,6 µmol min^{-1} mg^{-1}. Le turnover (k_{cat}) est de 10,9 s^{-1}et le k_{cat}/K_m de 0,03 M^{-1} s^{-1}.



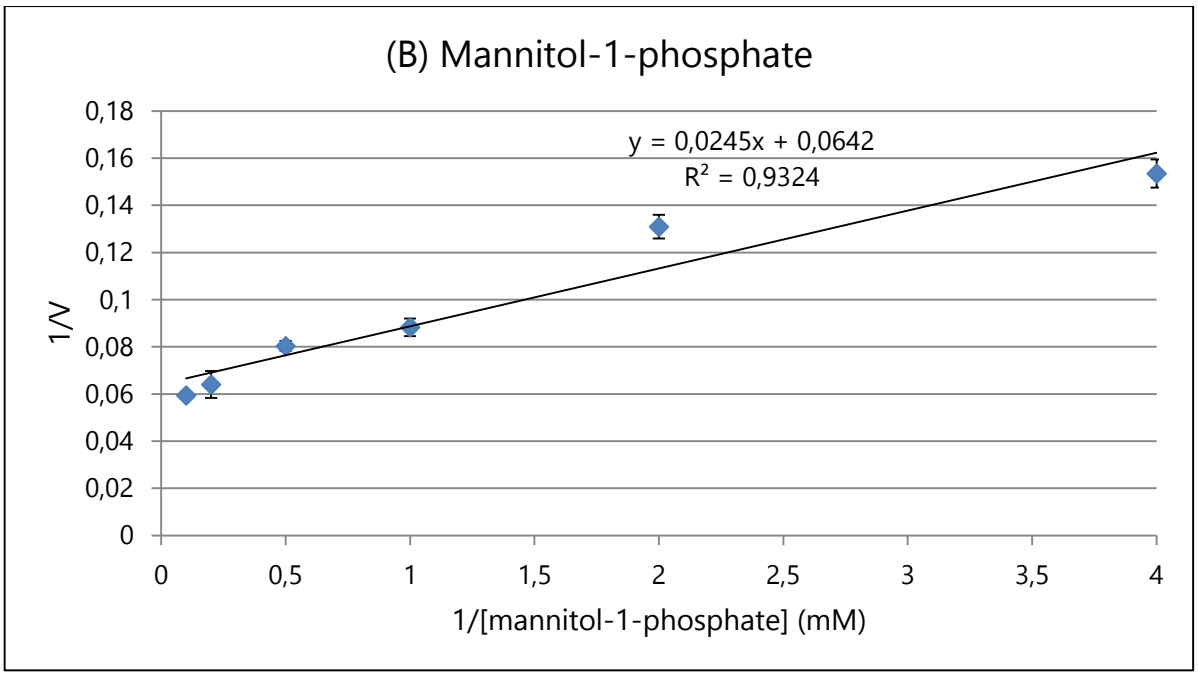
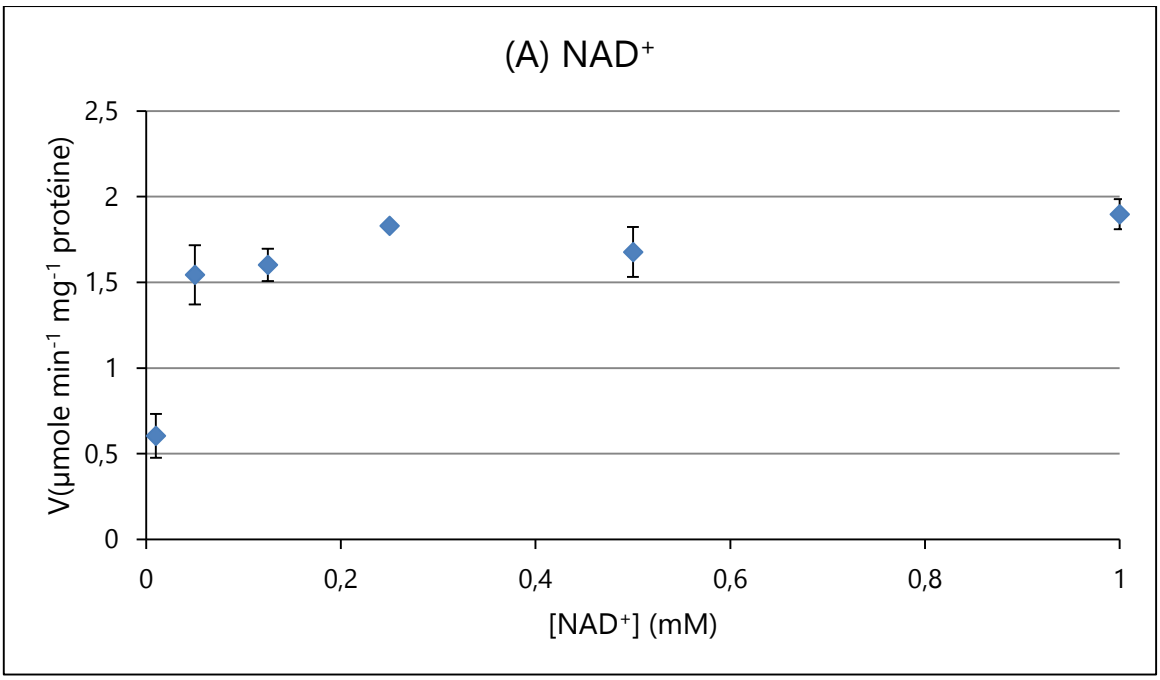


Figure 49 : Détermination des paramètres cinétiques de l'enzyme EsM1short N dans le sens oxydation du mannitol-1-phosphate. (A) Représentation de Michaelis-Menten. Pour chaque point expérimental, les barres d'erreur représentent l'écart-type sur trois réplicas techniques. (B) Graphique de Lineweaver & Burk déduit à partir des valeurs décrites dans la partie A.

De plus, d'autres substrats tels le glucose-1-phosphate et le mannose-1-phosphate ont été testés afin de déterminer la spécificité de l'enzyme, et aucune activité n'a été détectée en présence de ces deux sucres phosphatés. L'activité de la M1PDH1 tronquée semble donc strictement spécifique du M1P dans ce sens de la réaction.

Les paramètres cinétiques ont également été calculés pour le cofacteur NAD^+, avec des concentrations allant de 0,01 mM à 1 mM (**Figure 50**). La constante de Michaelis-Menten (K_m) calculée pour ce substrat est de 0,022 mM, sa vitesse maximale (V_m) de 1,95 µmol min^{-1} mg^{-1}, et le k_{cat}/K_m de 0,495 M^{-1} s^{-1}.



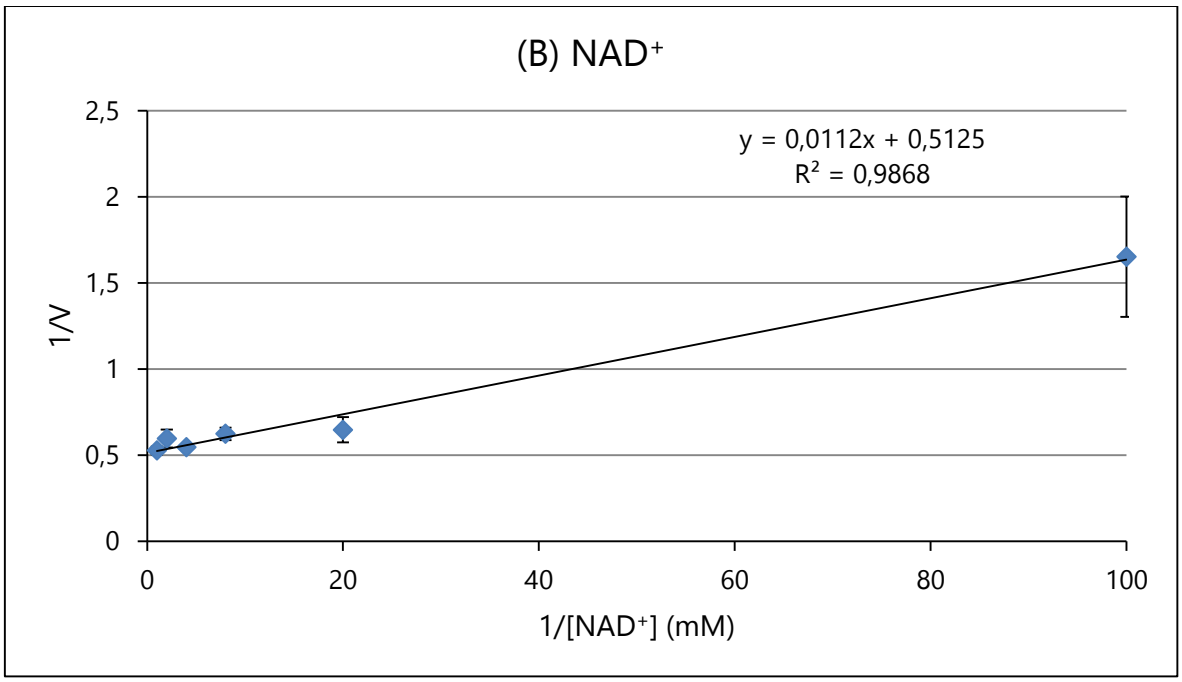


Figure 50 : Détermination des paramètres cinétiques du cofacteur NAD⁺ dans le sens oxydation du M1P. (A) Représentation de Michaelis and Menten. Pour chaque point expérimental, les barres d'erreur représentent l'écart-type sur trois réplicas techniques. (B) Graphique de Lineweaver & Burk, déduit à partir des valeurs décrites dans la partie A.

3.7.3) Comparaison des paramètres cinétiques entre M1PDH étudiées chez divers organismes

Les paramètres cinétiques obtenus pour l'EsM1PDH1 tronquée recombinante ont été comparés à ceux déterminés pour des M1PDHs procaryotiques et eucaryotiques (**Table 13**). Cette

liste n'est dans sans doute pas exhaustive, mais se veut représentative des différents organismes chez lesquels l'enzyme a été étudiée.

	Organisme	Activité spécifique ou V_m mesurée en µmol min^{-1} mg $protéines^{-1}$	K_m substrat (mM)	K_m cofacteurs (mM)	Préparation enzymatique
Algues brunes	*E. siliculosus*	**46 (F6P)** **15,6 (M1P)**	0,19 (F6P) 0,38 (M1P)	0,16 (NADH) 0,022 (NAD^+)	Enzymes recombinantes
	Sargassum pacificum		0,28 (F6P) 0,25 (M1P)		Purification partielle (précipitation au sulfate d'ammonium)
Algues rouges	*Caloglossa continua*	0,023 ; **22,9**	0,15 (F6P) 1458 (F6P+NaCl) 138 (M1P+NaCl) 0,05 (M1P)	5,4 ($NADH^+$NaCl) 32 (NAD^++NaCl)	Extraits acellulaires+purifié (par gel filtration)
	Caloglossa leprieurii		0,69 (F6P) 0,09 (M1P)		Extraits acellulaires
	Dixoniella grisea		1,18 (F6P) 0,61 (M1P)		Extraits acellulaires
Algues vertes	*Tetraselmis subcordiformis*		5,5 (F6P)		Extraits acellulaires
Bactéries	*Es. coli*	37	0,2 (F6P) 0,2 (M1P)		Extraits acellulaires
	Acinetobacter baylyi	130	13,6 (mM)		Extraits acellulaires
	Brochothrix thermosphacta		0,25 (F6P) 0,05 (M1P)	0,03 (NADH) 0,05 (NAD^+)	Purification partielle (précipitation au sulfate d'ammonium)
	Streptococcus mutans		1,66 (F6P) 0,15 (M1P)	0,016 (NADH) 0,06 (NAD^+)	Purification partielle (précipitation au sulfate d'ammonium et chromatographie d'affinité)
Fungi	*Micromonospora*	0,248, 0,477			Extraits acellulaires
	Aspergillus fumigatus	80 170	2,1 (F6P) 0,23 (M1P)	0,014 (NADH) 0,75 (NAD^+)	Extraits acellulaires Enzyme purifiée
	Aspergillus niger		0,54 (F6P) 0,038 (M1P)	0,005 (NADH) 0,083 (NAD^+)	Purification partielle (précipitation au butyryl alcohol)
	Cryptococcus neoformans		0,3 (F6P) 0,055 (M1P)	0,099 (NADH) 0,11 (NAD^+)	Purification partielle (précipitation au protamine sulfate)
Parasites	*Ei. tenella*		0,2(F6P)		Extraits acellulaires

Table 13 : Comparaison des paramètres cinétiques obtenus pour des M1PDH de diverses origines. Les substrats considérés pour la détermination des paramètres cinétiques sont indiqués entre parenthèses. Les valeurs pour les différentes enzymes ont été extraites de la base de données BRENDA (http://www.brenda-enzymes.info/), où sont centralisées des données concernant des enzymes connues ainsi que les références bibliographiques correspondantes, et dans les références suivantes : Ikawa et al., 1972; Eggert et al., 2006; Richter and Kirst, 1987.

Les valeurs de paramètres cinétiques obtenus pour l'enzyme recombinante M1PDH1 tronquée d'*E. siliculosus* sont semblables à celles retrouvées chez différents organismes d'origine très distincte tels que l'algue rouge *Caloglossa*, la bactérie *Brochothrix thermosphacta* et les mycètes *Aspergillus niger* et *Cryptococcus neoformans*. La constante cinétique correspondant au F6P est également semblable à celle retrouvée chez le parasite *Ei. tenella*. Cependant, très peu de tests ont été réalisés avec des protéines purifiées. Il est donc difficile de comparer ces valeurs de paramètres cinétiques et de conclure, d'autant plus que ces tests n'ont sans doute pas été tous réalisés dans les conditions optimales pour l'activité de l'enzyme (tampon, pH, température,…).

III) Analyse de la variation de l'expression des gènes du cycle du mannitol au cours du cycle diurnal

1) Les gènes de synthèse du mannitol

L'étude de la variation de l'expression des gènes du cycle du mannitol a été réalisée dans un contexte particulier, celui du cycle diurnal. Il s'agit de l'alternance entre la phase lumineuse et la phase obscure. Parmi les gènes responsables de la biosynthèse du mannitol, l'expression de ceux correspondant aux M1PDHs a d'abord été étudiée. Des expériences similaires ont déjà été décrites dans l'article Rousvoal *et al.* (2011), et ont été menées sur des échantillons d'algues prélevés toutes les 6 h pendant deux jours consécutifs. De plus, ces résultats ont été obtenus avec un appareil de PCR quantitative qui n'est plus utilisé à la Station (Chromo4, Bio-Rad). Par conséquent, afin de pouvoir comparer des variations de profil d'expression des gènes M1PDH avec ceux des autres gènes codant pour des protéines impliquées dans le cycle du mannitol dans des conditions expérimentales similaires, ces expériences ont été refaites et complétées avec des échantillons correspondant à des algues prélevées toutes les 3h pendant le premier jour de l'expérience, pour tenter notamment d'être plus résolutif. De plus, comme l'appareil de PCRq utilisé n'est pas le même (LightCycler 480, Roche), de nouvelles amorces ont été déterminées pour ces expériences.

Les résultats sont présentés **Figure 51**. Pour le gène *EsM1PDH1*, on constate que l'expression relative augmente jusqu'à 12 h après le début de l'expérience, puis diminue pendant les 12 h suivantes, suggérant une expression plus élevée au moment de la transition jour-nuit. Ce phénomène semble se répéter pendant les deux jours consécutifs, bien que les niveaux d'expression soient plus faibles au cours du deuxième jour. L'ensemble de ces observations est supporté au niveau statistique. Les profils observés pour le gène *EsM1PDH2* sont un peu différents. L'expression relative diminue pendant les six premières heures de l'expérience, puis augmente jusqu'au temps 18 h, et diminue à nouveau lors du premier jour. Ces variations sont significatives au niveau statistique. Comme pour le gène *EsM1PDH1*, ce phénomène semble se répéter le deuxième jour. Des profils similaires sont observés pour le gène EsM1PDH3, mais décalé dans le temps puisque l'expression relative la plus faible est observée au temps 12 h et non au temps 6 h comme pour *EsM1PDH2*. Cependant, ces variations ne sont pas supportées au niveau statistique.

De plus, alors que pour les gènes *EsM1PDH1* et *EsM1PH2* les niveaux d'expression relative sont similaires, on constate que les valeurs pour le gène *EsM1PDH3* sont très faibles, ce qui est à corréler avec l'absence d'EST dans les ressources génomiques d'*E. siliculosus* (Cock *et al.* 2010).

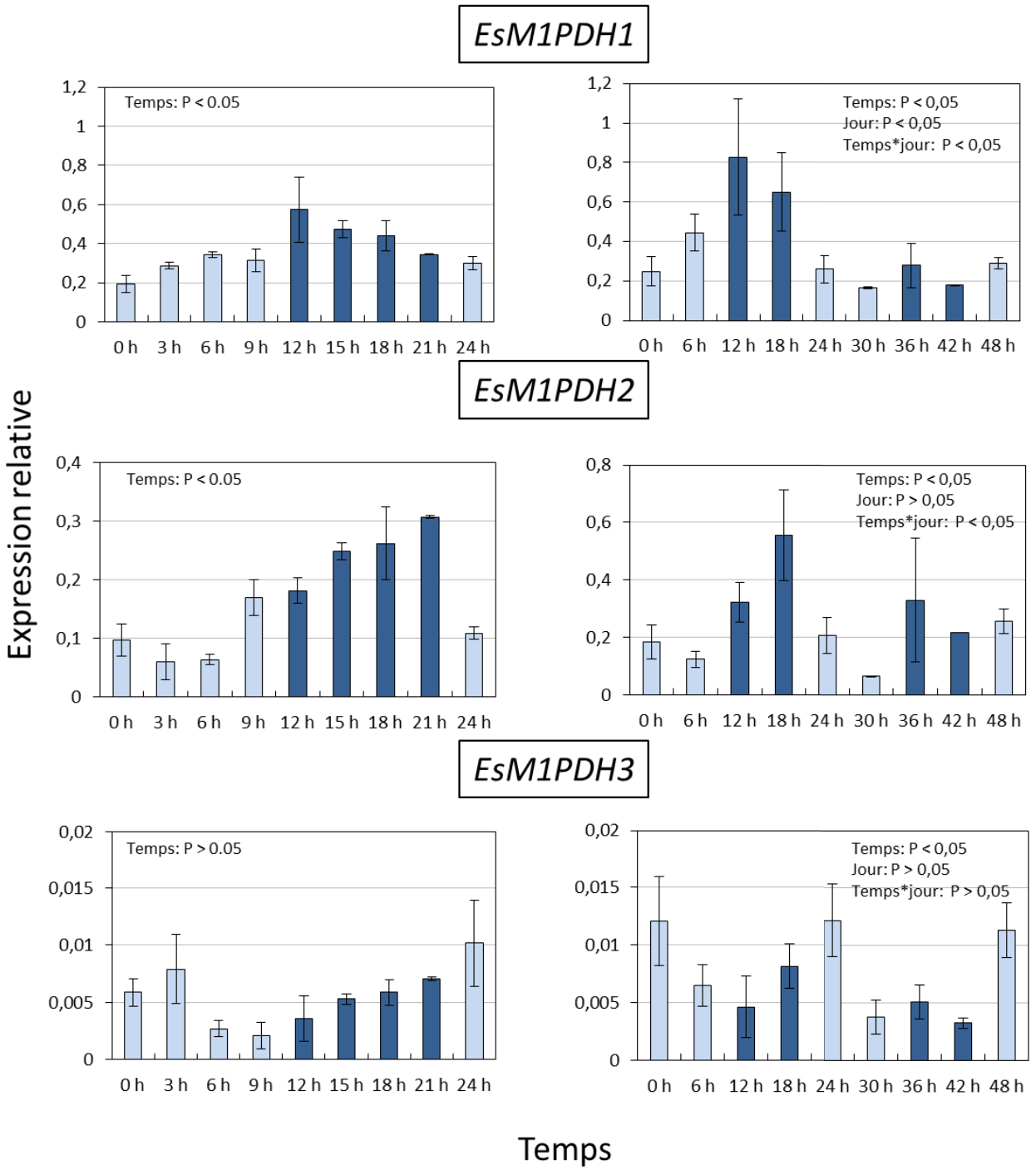


Figure 51 : Profils d'expression relative des gènes *EsM1PDH1*, *2* et *3* en fonction du cycle diurnal. Bleu clair: algues prélevées pendant le jour ; bleu foncé : algues prélevées pendant la nuit. Les tests ont été réalisés en triplicats biologiques pour le premier jour, et en duplicats biologiques pour le second jour. Pour chaque point expérimental, les barres d'erreur représentent l'écart-type

sur trois réplicats techniques. L'analyse statistique des résultats a été réalisée par ANOVA à mesures répétées en considérant le facteur « temps » pour les panels de gauche, et les facteurs 'temps », « jour » et « interaction temps et jour » pour les panels de droite comme facteurs de variation.

L'analyse de l'expression de ces trois gènes suggère qu'ils sont régulés au niveau transcriptionnel au cours du cycle diurnal, avec des rythmes d'expression différents. Des profils similaires ont été publiés pour *EsM1PDH1* et *EsM1PDH2* (Rousvoal *et al.* 2011). Par contre, il est difficile de vouloir comparer les expressions relatives obtenues avec deux appareils différents (Biorad et Roche), les amorces utilisées n'étant pas les mêmes.

L'expression des gènes *EsM1Pase1* et *EsM1Pase2* avait été analysée en début de thèse, et ces résultats sont publiés dans Groisillier *et al.* (2014). Cependant, pour les mêmes raisons que celles décrites pour les gènes M1PDH, des analyses ont été refaites, et les résultats sont présentés **Figure 52**. Pour le gène *EsM1Pase1*, la quantité de transcrits diminue durant la période de nuit le premier jour, mais ces observations ne sont pas supportées par l'analyse ANOVA. Ce phénomène semble se répéter sur les deux jours car sur 48h de test, on peut voir que la quantité de transcrits diminue durant les phases obscures et augmente durant les phases lumineuses. Les variations liées au temps d'expérimentation sont significatives. Pour le gène *EsM1Pase2*, les profils sont différents. En effet, les niveaux de transcrits semblent augmenter puis diminuer durant le jour, et ce phénomène se répète durant la nuit. Ces résultats sont soutenus par l'analyse statistique. Ce type de profil se retrouve sur les deux jours d'expérience. Les profils obtenus pour les deux gènes sont similaires à ceux décrits dans Groisillier *et al.* (2014).

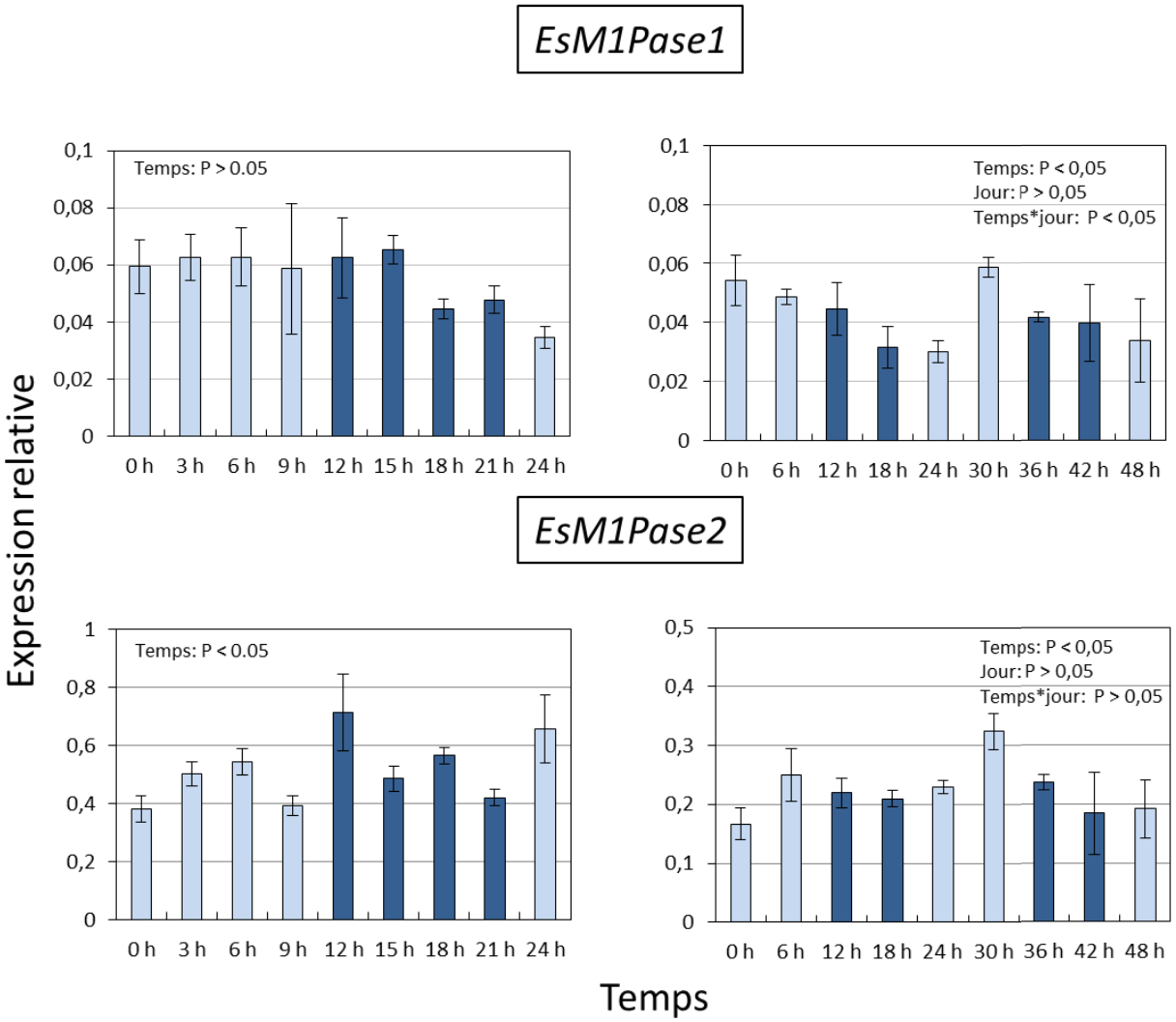


Figure 52 : Profils d'expression relative des gènes *EsM1Pase1* et *2* en fonction du cycle diurnal obtenus par PCR quantitative. Bleu clair: algues prélevées pendant le jour ; bleu foncé : algues prélevées pendant la nuit. Les tests ont été réalisés en triplicats biologiques pour le premier jour, et en duplicats biologiques pour le second jour. Pour chaque point expérimental, les barres d'erreur représentent l'écart-type sur trois réplicats techniques. L'analyse statistique des résultats a été réalisée par ANOVA à mesures répétées en considérant le facteur « temps » pour les panels de gauche, et les facteurs 'temps », « jour » et « interaction temps et jour » pour les panels de droite comme facteurs de variation.

2) Les gènes de recyclage du mannitol

Enfin, la même analyse a été réalisée pour les deux gènes impliqués dans le recyclage du mannitol : *EsM2DH* et *EsHK*. On observe des différences dans les valeurs d'expressions relatives obtenues entre les échantillons prélevés sur 24 h et ceux prélevés sur 48 h, qui restent à ce jour

inexpliquées. En effet, ces expériences ont été refaites plusieurs fois avec toujours les mêmes résultats. Qui plus est, les échantillons du premier jour pour les panels de droite sont les mêmes que ceux considérés pour les panels de gauche.

Pour le gène *EsM2DH*, il ne semble pas y avoir de différence significative dans l'expression relative durant le premier jour (**Figure 53**). Cela semble également être le cas pour les échantillons prélevés sur 48h, et les niveaux d'expression relative sont moins élevés que ceux du jour 1.

Pour le gène *EsHK*, une différence significative dans l'expression relative est constatée durant le premier jour, même si aucune tendance ne semble se dégager (**Figure 53**). La même observation est possible pour les échantillons prélevés sur deux jours.

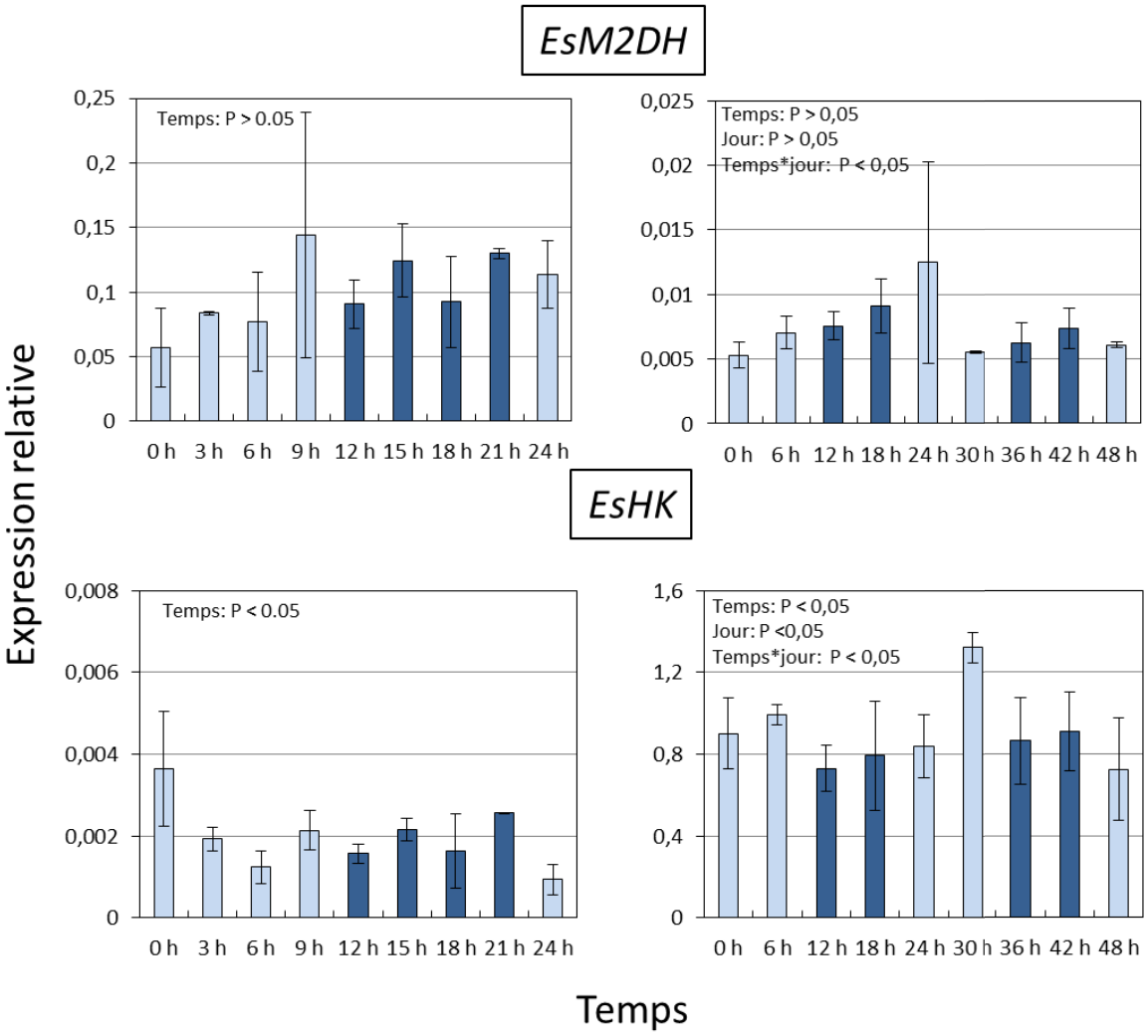


Figure 53 : Profils d'expression relative des gènes *EsM2DH* et *EsHK* en fonction du cycle diurnal obtenus par PCR quantitative. Bleu clair: algues prélevées pendant le jour ; bleu foncé : algues prélevées pendant la nuit. Les tests ont été réalisés en triplicats biologiques pour le premier jour, et en duplicats biologiques pour le second jour. Pour chaque point expérimental, les barres d'erreur représentent l'écart-type sur trois réplicas techniques. L'analyse statistique des résultats a

été réalisée par ANOVA à mesures répétées en considérant le facteur « temps » pour les panels de gauche, et les facteurs 'temps », « jour » et « interaction temps et jour » pour les panels de droite comme facteurs de variation.

Nous avons voulu étudier la variation de l'expression des gènes du cycle du mannitol chez *E. siliculosus* dans le contexte du cycle diurnal. Ceux correspondant aux enzymes de synthèse du mannitol semblent être régulés au niveau transcriptionnel au cours de l'alternance jour/nuit, mais avec des rythmes différents. En revanche, il ne semble pas y avoir de régulation transcriptionnelle pour les gènes du recyclage du mannitol, car même si une différence significative est observée pour le gène *EsHK* au cours d'une journée, le cycle diurnal ne semble pas en être la cause.

Discussion

1. Les M1PDHs d'algues brunes: des M1PDHs pas tout à fait comme les autres

Le mannitol est une moléculaire ubiquitaire car produite par une large diversité d'organisme, excepté les animaux. Cependant, les enzymes impliquées dans son métabolisme, et en particulier les déshydrogénases, sont différentes selon les organismes considérés (**Table 14**).

Enzyme	Numéro EC	Réaction catalysée	Exemple d'organisme
Mannitol-1-phosphate déshydrogénase	1.1.1.17	D-mannitol 1-phosphate + NAD(+) <=> D-fructose 6-phosphate + NADH	*E. siliculosus* (Rousvoal *et al.*, 2011)
Mannitol-2-déshydrogénase	1.1.1.67	D-mannitol + NAD(+) <=> D-fructose + NADH	*Pseudomonas fluorescens* (Brünker *et al.*, 1997)
Mannitol-2-déshydrogénase	1.1.1.138	D-mannitol + NADP(+) <=> D-fructose + NADPH	*Alternaria alternata* (Velez *et al.*, 2007)
Mannitol-1-déshydrogénase	1.1.1.255	D-mannitol + NAD^+ <=> D-mannose + NADH	*Céleri* (Stoop *et al.*, 1995)
Mannitol déshydrogénase (cytochrome)	1.1.2.2	D-mannitol + ferricytochrome c <=> D-fructose + ferrocytochrome c + 2 H(+)	*Acetobacter xylinum* (Oikawa et al., 2014)

Tableau 14: Différents types de déshydrogénases impliquées dans le métabolisme du mannitol. <=> indique une réaction réversible.

Si l'on fait abstraction de l'activité correspondant au numéro EC 1.1.2.2 et qui correspond à une enzyme utilisant un cytochrome comme accepteur, les autres déshydrogénases appartiennent à trois superfamilles principales d'alcool déshydrogénases. La première correspond aux « short-chain dehydrogenases/reductases » (SDR), caractérisées par une taille d'environ 250 acides aminés. En N-terminal, elles contiennent un site de fixation pour le coenzyme dont le motif conservé est Gly-X-X-X-Gly-X-Gly, et un autre motif Tyr-X-X-X-Lys essentiel pour l'activité catalytique (Jörnvall and Persson, 1995). Ces protéines ne contiennent pas de zinc. La seconde famille correspond aux « medium chain dehydrogenases/reductases », qui comprend des protéines d'environ 350 acides aminés, dépendent du zinc pour leurs activités enzymatiques, et

ont un motif de fixation du coenzyme qui est Gly-X-Gly-X-X-Gly (Riveros-Rosas et al., 2003). Enfin, la troisième superfamille est celle des « long-chain dehydrogenases/reductases », et regroupe des protéines dont la taille est comprise entre 360 et 550 acides aminés (Persson et al., 1991). Au sein de cette superfamille, on distingue le groupe des « polyol-specific long-chain dehydrogenases/reductases »(PSLDRs), qui contient à la fois des M1PDH et des M2DH, mais aussi des D-mannonate 5-oxydoréductases, des D-altronate 5-oxydoréductases, et des D-arabinitol 4-déshydrogénase de procaryotes et d'eucaryotes, qui forment plusieurs sous-familles bien distinctes (Klimacek and Nidetzky, 2002). Ces PSLDRs se distinguent en outre par un site conservé de fixation du cofacteur (Gly-X-Gly(Ser)-X-X-X-Arg(Leu)) et par un motif particulier Lys-X-X-X-X-Asn-X-X-His qui jouerait un rôle majeur dans la liaison du substrat et la catalyse (Klimacek et Nidetzky, 2002). Les PSLDRs catalysent des réactions d'oxydo-réductions impliquant des alcools secondaires en présence des co-facteurs NAD(H) ou NADP(H), mais en absence de métal. En plus du rôle dans le métabolisme du mannitol, certaines peuvent être impliquées dans la voie de dégradation des héxuronates ainsi que le métabolisme de l'arabinitol. Au niveau structural, le site actif des PSLDRs est localisé dans une crevasse formée par le rapprochement du domaine Rossmann-fold situé dans la partie N-terminale, qui fixe le coenzyme, et le domaine C-terminal contenant plusieurs hélices alpha et les résidus impliqués dans la fixation du substrat, la reconnaissance et la catalyse. Ce site actif contient une tétrade de résidus Lys / Asn / His très conservée au sein de laquelle l'acide aminé Lys correspond au site catalytic (Kavanagh et al., 2002, 2003). Parmi les PSLDRs, les M1PDHs sont les enzymes les plus courtes (environ 360 acides aminés), mais contiennent tous les éléments structuraux caractéristiques de ce groupe de protéines. Afin de déterminer si la différence de taille entre les M1PDH et les autres PSLDRs s'explique par la délétion d'une partie unique de protéine ou par plusieurs délétions de séquences à l'intérieur des M1PDHs, les structures secondaires de plusieurs PSLDRs avec des spécificités de substrats différentes, ont été comparées (Kavanagh *et al.*, 2003). Ainsi, il a été observé chez les M1PDHs l'absence d'un certain nombre d'hélices et de brins localisés à la surface des autres PSLDRs, alors que les éléments de structure secondaire qui sont dans la partie « core » sont conservés. Ceci suggère que des gains et pertes d'éléments ont eu lieu au cours de l'évolution des PSLDRs, plutôt qu'un évènement unique de troncature ou de fusion.

Compte-tenu de la position phylogénétique des M1PDH d'algues brunes et d'*Ei. tenella*, et la présence d'une extension N-terminale unique aux M1PDHs de ces organismes, on peut suggérer que ces quatre séquences représentent une nouvelle branche dans la famille des PLSDRs. Même

si elles n'ont pas été encore caractérisées, il est aussi envisageable de penser que les deux gènes de M1PDH identifiés chez *Micromonas* (Michel *et al.*, 2010), qui ne possèdent pas d'extension N-terminale, appartiennent aussi à cette branche. La taille de la partie M1PDH correspond à 383-430 acides aminés pour les EsM1PDHs d'*Ectocarpus* et *S. japonica*, 441 acides aminés pour *Ei. tenella*, et 530 acides aminés chez *Micromonas*.

La présence de cette extension N-terminale est intrigante à plusieurs niveaux. L'alignement de cette séquence en acides aminés a permis de mettre en évidence de courts motifs conservés entre algue brune et sporozoaire. Cependant, elle ne contient ni domaine transmembranaire, ni site conservé pouvant donner une quelconque indication quant à son importance dans la localisation et/ou la régulation de l'activité de la protéine qui la contient. Qui plus est, cette extension n'est pas indispensable à l'activité de l'enzyme M1PDH1 car la forme tronquée recombinante est la seule protéine qui a pu être exprimée soluble et ensuite purifiée pour effectuer la caractérisation biochimique. Une des voies qui pourrait être suivie pour élucider la fonction de cette extension N-terminale pourrait-être de produire la protéine correspondante en quantité suffisante pour réaliser des expériences de pull-down. En effet, on pourrait ainsi déterminer si cette extension intervient dans la fixation de protéines, et si oui, chercher à identifier ces protéines.

Chez la diatomée *Phaeodactylum tricornutum*, une extension N-terminale a été observée chez une enzyme impliquée dans le métabolisme des stérols (Fabris et al., 2014). La protéine complète n'a pas pu être exprimée ni chez *Es. coli* ni chez *S. cerevisiae*, cependant une forme délétée de 46 acides aminés en N-terminal a pu être surexprimée chez *Es. coli*. Cette protéine tronquée n'étant pas active, les auteurs ont essayé de surexprimer la protéine complète dans une autre souche de levure (TM5) conçue pour une induction plus importante de la protéine recombinante. Cependant, la séquence de 46 acides aminés qui a été enlevée possède un signal d'adressage potentiel au reticulum endoplasmique ce qui peut être la cause de la difficulté rencontrée par les auteurs pour la surexpression de la protéine complète.

Concernant la caractérisation de la M1PDH d'*Ei. tenella*, l'expression du gène correspondant n'a été observée qu'à un niveau faible chez *Es. coli* et les cellules de mammifères COS (résultats non publiés), alors qu'elle a été plus efficace chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* et le système baculovirus (Schmatz, 1997; Geary and Favreau, 2004). En effet, un des facteurs qui semblent avoir compliqué l'expression de la M1PDH chez *Es. coli* est que cette protéine forme des complexes avec des protéines de type 14-3-3 d'*Es. coli* (Geary and Favreau, 2004). Il a aussi été observé la formation de complexes entre M1PDH et 14-3-3 dans le parasite. Les protéines 14-3-3

sont connues pour intervenir dans la transduction de signaux, la régulation de la transcription, et le contrôle du cycle cellulaire chez les cellules eucaryotes (Aitken 1996). Dans ce contexte, il a été suggéré que ces protéines interviendraient dans la régulation de l'activité M1PDH au cours du cycle de vie et infectieux du parasite (Schmatz 1997). Une analyse par homologie de séquence chez *E. siliculosus* a permis de trouver deux gènes candidats pouvant correspondre à des protéines 14-3-3 (Esi0049_0126 et Esi0175_0029).

2. L'enzyme EsM1PDH1 tronquée recombinante : une M1PDH avec ses propres paramètres biochimiques

Lors de l'étude des M1PDHs d'*Ectocarpus* en 2011 (Rousvoal *et al.*, 2011), les conditions pour tester les activités enzymatiques sur extraits bactériens avaient été déterminées après recherche bibliographique. Ainsi, les tampons Tris-acétate pH 6,3 et Hepes-KOH pH 9 avaient été retenus et utilisés pour les tests enzymatiques dans les deux sens de la réaction. La caractérisation biochimique de l'enzyme M1Short N a mis en évidence une différence dans la nature des tampons (Tris-HCl) et dans les pH (7 et 9) optimum à utiliser. Ces différences de pH optimum pourrait peut-être permettre de réguler l'activité M1PDH pour favoriser un sens par à l'autre en fonction des conditions physiologiques intracellulaires, notamment dans le cytosol puisque les M1PDHs semblent être cytoplasmiques.

L'analyse de l'effet du NaCl sur l'activité de la protéine M1Short N purifiée a également permis des observations intéressantes. En effet, l'activité enzymatique augmente dans les deux sens de la réaction lors d'ajout de NaCl, avec une activité maximale à 200 mM, considérant que la concentration intracellulaire en NaCl chez *E. siliculosus* est d'environ 450 mM (Dittami et al., 2009). Ces résultats sont similaires à ceux obtenus lors de l'étude en 2011 sur la EsM1PDH1 en extraits bactériens pour le sens réduction du F6P, pas dans le sens oxydation du M1P. En effet, l'activité oxydation du M1P diminuait dès l'ajout de 100 mM de NaCl dans le milieu réactionnel. Les tests d'activité enzymatique endogène M1PDH d'*Ectocarpus* dans le sens réduction du F6P donne des résultats un peu différents concernant la sensibilité de cette activité au NaCl puisqu'un maximum d'activité enzymatique a été constaté avec une concentration finale de 400 mM en NaCl (au lieu de 200 mM pour l'enzyme purifiée). Il n'est pas possible de commenter quant à l'autre sens de la réaction car aucune activité M1P donne F6P n'a été mesurée à partir extraits protéiques d'*E. siliculosus*.

Il est intéressant de noter que cette influence du sel sur l'activité de l'enzyme EsM1PDH semble être corrélée à une influence sur l'expression des gènes EsM1PDH1 et EsM1PDH2 (Rousvoal *et al.*, 2011) : en effet, l'expression relative de ces deux gènes augmente drastiquement en présence de NaCl, pouvant augmenter jusqu'à un facteur 10. Cela semble également être le cas pour une autre enzyme d'*E. siliculosus*, la polyketide synthase de type III, pour laquelle l'expression du gène correspondant augmente avec la salinité (Meslet-Cladière *et al.*, 2013). De même, l'activité optimale de l'enzyme EsGMD1 (une GDP-mannose déshydrogénase), impliquée dans la synthèse de l'alginate, polysaccharide pariétal, est observée à 500 mM de NaCl (Tenhaken *et al.*, 2011). Par contre, l'effet inverse est constaté pour l'enzyme M1Pase2, qui catalyse la seconde étape dans la synthèse du mannitol, et pour laquelle l'activité enzymatique est inhibée dès 100 mM de NaCl. L'influence du NaCl sur les enzymes d'*E. siliculosus* semble donc être enzyme-dépendant.

D'autres composés peuvent influencer l'activité enzymatique des M1PDHs. En 2001, Allocco *et al.* ont montré l'effet bloquant du nitrophénide sur le développement d'*Ei. tenella* par l'inhibition de l'enzyme M1PDH. Nous avons voulu testé l'effet de cet inhibiteur sur l'enzyme M1PDH tronquée purifiée. Malheureusement, les solvants utilisés pour solubiliser le nitrophénide inhibent cette activité. Une autre manière de tester l'effet de cet inhibiteur serait peut-être de réaliser des expériences similaires à celles pratiquées sur *Eimeria* afin d'observer si le nitrophénide altère la croissance d'*E. siliculosus*. On pourrait aussi mesurer les effets de ce composé sur l'activité endogène M1PDH et sur l'accumulation de mannitol dans les cellules. Cela pourrait contribuer à mieux comprendre le rôle physiologique du métabolisme du mannitol dans la physiologie de l'algue. Ce type d'expériences pourrait aussi être réalisé en condition de stress salin. En effet, si le nitrophénide diminue le métabolisme du mannitol, il serait intéressant de savoir si la réponse d'*E. siliculosus* au stress salin est altérée ou pas.

A partir des résultats obtenus avec la protéine tronquée M1Short N, il serait aussi intéressant de réaliser des essais de cristallogenèse. Cependant, du fait de la très faible homologie avec la seule M1PDH dont la structure a été élucidée (*Shigella flexneri*, 3H2Z), il sera sans doute très difficile de déterminer la structure globale de l'EsM1PDH1 par remplacement moléculaire. C'est pourquoi une modélisation de novo (selénio-méthionine) est à envisager. Le but de cette étude étant de mieux comprendre le cycle du mannitol dans son ensemble, les essais de cristallogenèse seront également à réaliser sur les autres enzymes du cycle. Cependant, compte-tenu des difficultés à surexprimer chez *Es. coli* des gènes d'*Ectocarpus*, et ce malgré l'optimisation des

codons réalisée par GeneArt, une alternative intéressante serait d'utiliser un hôte eucaryote pour la surexpression d'enzymes recombinantes, tel que *Pichia pastoris* (Boettner et al., 2002). Ce système est d'ailleurs en développement au sein de la plateforme de surexpression du laboratoire.

3. L'analyse de l'expression des gènes du cycle du mannitol chez les *E. siliculosus* au cours du cycle diurnal : un premier pas pour considérer le cycle du mannitol dans sa globalité

Considérant les résultats d'analyse d'expression de gènes impliqués dans le métabolisme du mannitol au cours du cycle diurnal, c'est la première fois que les gènes correspondant à toutes les étapes du cycle du mannitol sont étudiés simultanément pour étudier l'influence de ce paramètre. Des variations ont été observées au cours du cycle diurnal, mais il est difficile de dégager des tendances claires. Par exemple, tous les gènes codant pour les enzymes potentiellement impliqués dans la production de mannitol, les trois *ESM1PDHs* et la *EsM1Pase2*, ne sont pas induits au cours de la phase lumineuse, c'est-à-dire la période du cycle diurnal au cours de laquelle e mannitol est synthétisé (**Figure 51 et 52**). Si on suit le même cheminement, les gènes codant pour les deux enzymes impliquées dans le recyclage du mannitol ne semblent pas avoir leurs niveaux d'expression les plus élevés au cours de la phase obscure. Cependant, si on se focalise sur la cinétique de 24 h, la plus résolutive car basée sur des échantillons d'algues prélevés toutes les 3 h, le gène *EsM1PDH1* semble le plus exprimé à la transition jour-nuit, et l'expression d'*EsM1Pase2* est maintenue à son niveau d'expression le plus élevé au cours de la phase lumineuse. Quoi qu'il en soit, l'expression des gènes n'est sans doute pas le seul niveau auquel peut se faire la régulation des activités enzymatiques impliquées dans le cycle du mannitol, considérant aussi le rôle central du métabolisme de ce polyol dans la physiologie des algues brunes. Si on considère ce qui été observé chez *Ei. tenella*, la régulation de l'activité M1PDH semble impliquer des interactions protéines-protéines entre la M1PDH et des protéines 14-3-3. Des travaux sont donc nécessaires dans le futur pour étudier la régulation du métabolisme du mannitol chez *E. siliculosus*, et les algues brunes en général.

Afin de compléter les travaux sur le cycle du mannitol chez *E. siliculosus*, il est également nécessaire de vérifier si les prédictions d'activités enzymatiques pour les gènes HK et M2DH sont vraies. Cela est d'autant plus intéressant qu'une récente étude chez l'algue brune *Saccharina japonica* décrit la purification d'une M2DH recombinante mais non active (Shao *et al.*, 2014). Enfin, une question peu étudiée jusqu'à présent est celle du transport du mannitol chez les algues brunes. En effet, les algues brunes représentent un panel de morphologie très varié (Charrier *et al.*,

2012), et ces différences pourraient impliquées des phénomènes de transport de solutés, dont le mannitol. Se pourrait-il que, chez les kelps, c'est-à-dire les grandes algues pour lesquelles différents niveaux de complexité dans les organes, les tissus, et les types cellulaires ont été observés, on retrouve une situation similaire à celle des plantes : une synthèse du mannitol dans certaines parties de la plante et transport vers d'autres parties ? Une façon très préliminaire d'aborder cette question est de regarder si le génome d'*Ectocarpus* contient des gènes pouvant coder pour des protéines correspondant à des transporteurs de mannitol. Ainsi, une analyse par BlastP en utilisant les deux transporteurs caractérisés chez le céleri AgMaT1 (Noiraud *et al.*, 2001) et AgMAT2 (Juchaux-Cachau *et al.*, 2007 ont permis d'identifier chez *E. siliculosus* quatre protéines (Esi0038_0093, Esi0024_0063, Esi0025_0097, Esi0007_0024) présentant 33-38% d'identité avec les protéines de plantes. Cependant, d'autres candidats pourraient être identifiés en considérant d'autres types de transporteurs identifiés chez des organismes autres que les plantes terrestres.

Conclusion et perspectives

On a pu constater que le cycle du mannitol chez différents organismes fait intervenir différentes types de réactions. Cependant, il y a encore des lignées évolutives où les bases moléculaires de la synthèse et du recyclage du mannitol n'ont pas été élucidées, et/ou pour lesquelles le rôle physiologique n'est pas clair. C'est notamment le cas pour les micro- et macroalgues rouges : des informations quant à l'importance du métabolisme du mannitol au cours de la réponse aux stress salins ont été obtenues, mais aucun gène impliqué dans le métabolisme du mannitol, en particulier pour les activités M1PDH et M1Pase, n'a été caractérisé jusqu'à présent en dépit de la purification d'enzymes natives chez *Caloglossa*. Concernant la lignée verte, il serait intéressant de caractériser les gènes codant pour les protéines de fusion M1PDH-M1Pase et ceux de M1Pase isolés identifiés chez *Micromonas*, notamment pour déterminer s'il existe des différences d'efficacité enzymatique entre les protéines de microalgues vertes et celles caractérisées chez d'autres organismes.

Chez les algues brunes, le cycle du mannitol est un métabolisme important dans leur physiologie. Cependant, les quatre réactions enzymatiques directement impliquées dans cette voie métabolique ne représentent qu'une fraction limitée du réseau métabolique global. En effet, chez *E. siliculosus,* plus de 1860 réactions biochimiques ont été identifiées à ce jour via la reconstruction du premier modèle métabolique à l'échelle du génome pour une macroalgue (Prigent *et al.*, 2014). Compte-tenu de la nature chimérique du métabolisme et de l'originalité de certaines voies chez les algues brunes, il existe un fort potentiel pour caractériser de nouvelles enzymes, et donc mieux comprendre la physiologie de ces organismes, notamment dans le métabolisme primaire au niveau de la synthèse de la laminarine et la synthèse de la paroi. Ce potentiel est encore plus vaste si on s'intéresse aux métabolites secondaires, comme les oxylipines et les dérivés du phloroglucinol par exemple.

Enfin, une meilleure connaissance du métabolisme des algues brunes permettra de mieux comprendre leur physiologie, et ainsi de mieux appréhender leur réponse aux changements environnementaux. De plus, ces connaissances seraient utiles pour mieux gérer et exploiter la ressource représentée par ces organismes. De ce fait, en fonction des molécules d'intérêt ciblées, il serait possible d'optimiser les périodes de récolte et/ou de sélectionner des algues pour l'aquaculture.

Annexes

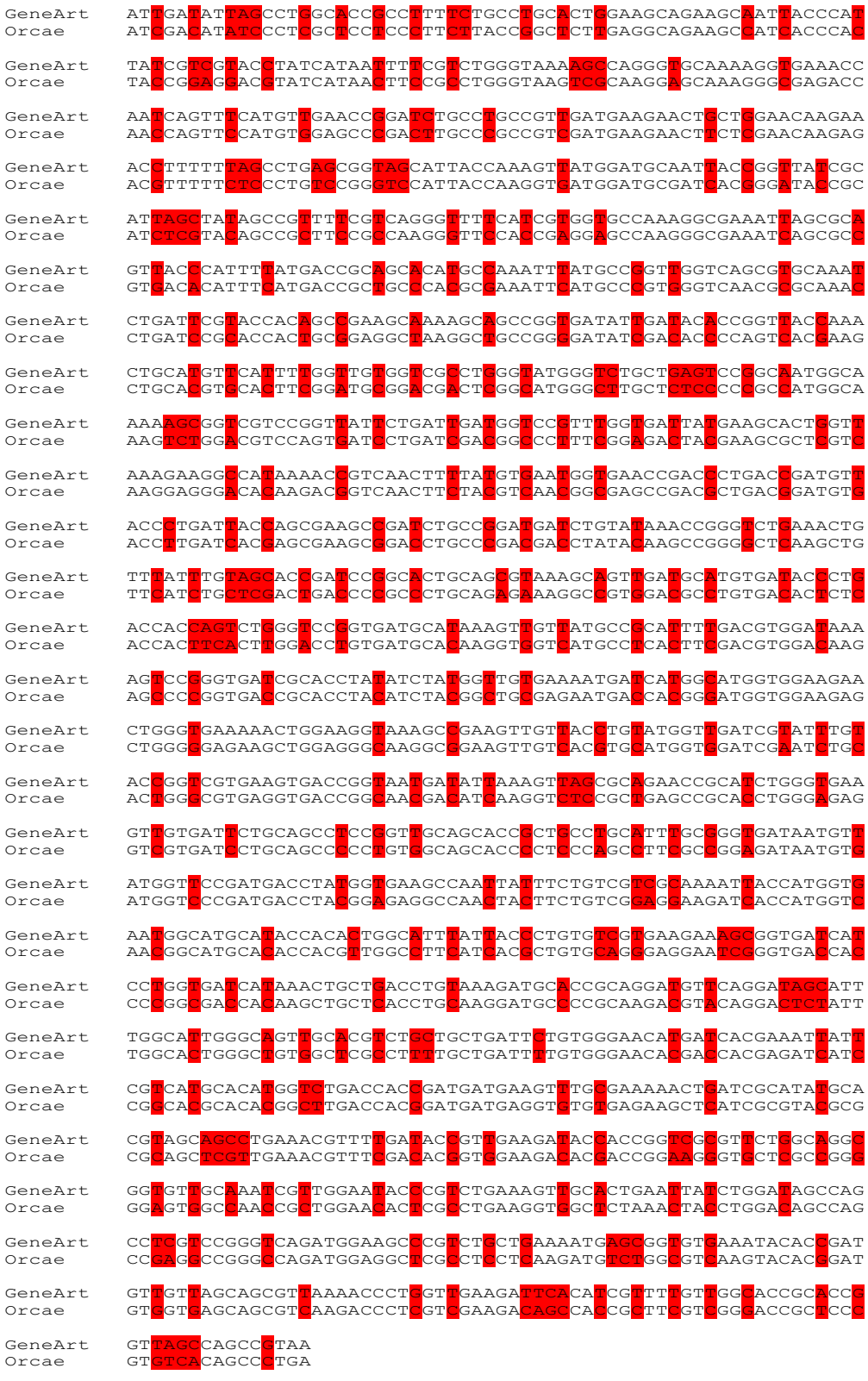


Figure 54 : Visualisation des modifications réalisées par GeneArt pour l'optimisation des codons dans le gène EsM1PDH1.

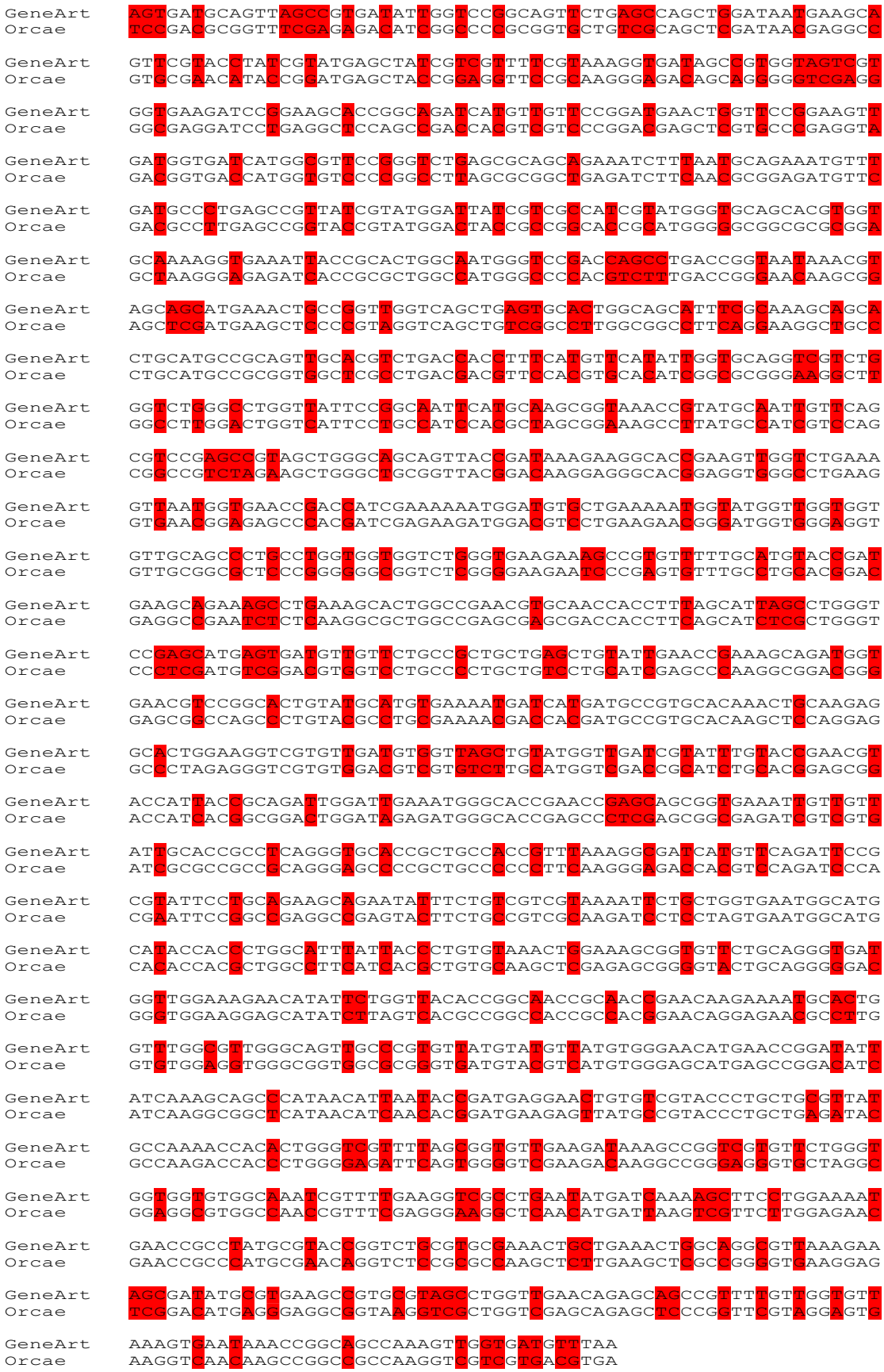


Figure 55 : Visualisation des modifications réalisées par GeneArt pour l'optimisation des codons dans le gène EsM1PDH2.

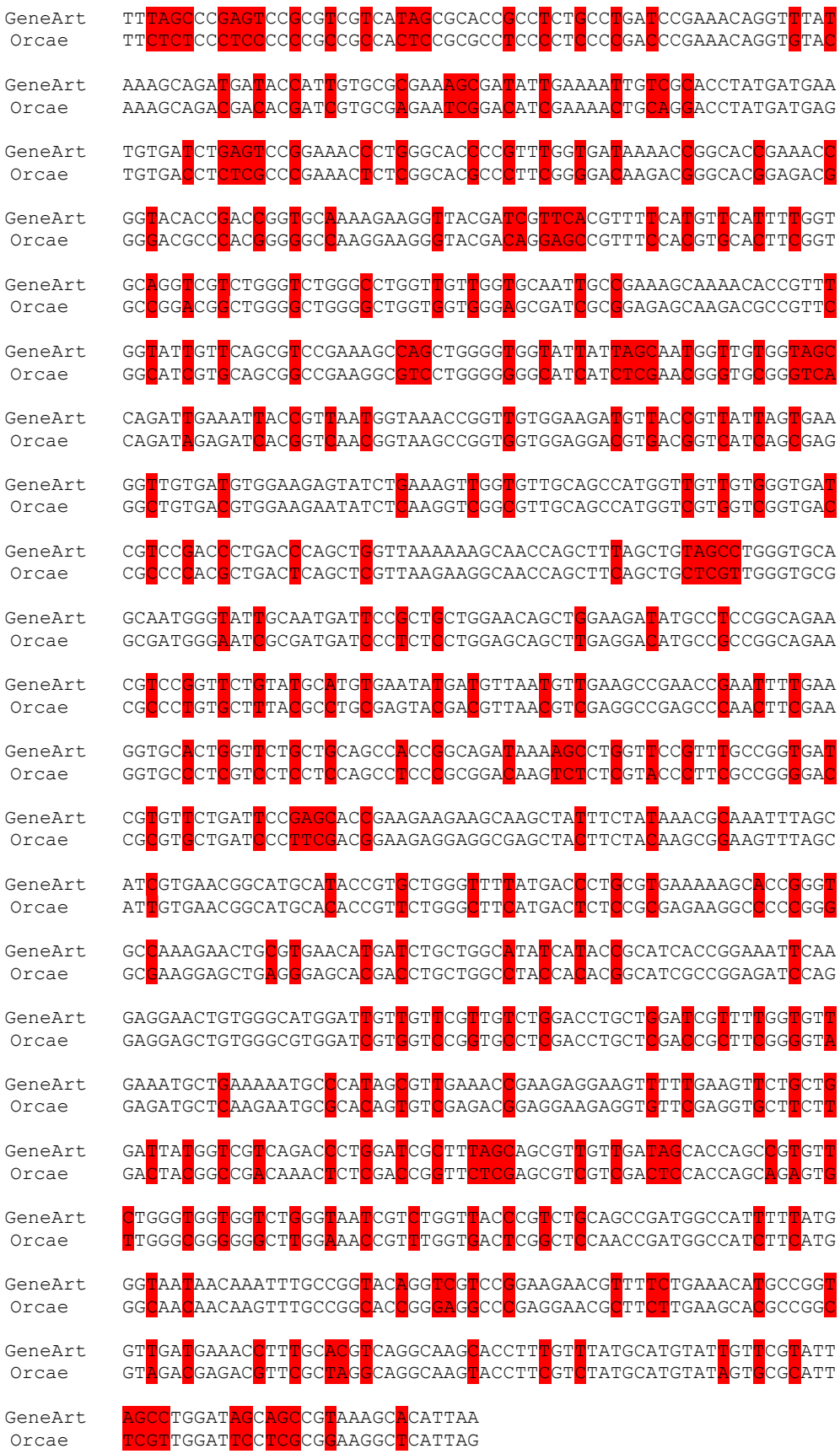


Figure 56 : Visualisation des modifications réalisées par GeneArt pour l'optimisation des codons dans le gène EsM1PDH3.

- Liste des formations :
  - Internes à la Station Biologique de Roscoff :

- « Linux initiation » le 26/04/2012 : 6h
- « Linux : développement de scripts shell » le 25/05/2012 : 6h
- « Utilisation du cluster de calcul » le 18/069/2012 : 6h
- « Galaxy initiation » le 16/05/2014 : 6h
  - Proposées par Biogenouest et la plateforme Corsaire :

- « Ecole chercheurs Biologie Intégrative et Génomique dans le Grand Ouest BIGOU » les 07-09/11/2011, soit 2 jours complets
- « Biostatistiques dans R » 1 journée à Rennes (7/11/12) : 6h ; 1 journée à Roscoff (12/11/12) : 6h

- Liste des Posters :

- 3ième journée des Jeunes Chercheurs (Octobre 2011), Station Biologique de Roscoff : « Mannitol cycle in *Ectocarpus*: integrative approach and metabolic modeling » Bonin P., Eveillard D., Siegel A., Boyen C., and Tonon T.
- "Esil2012: algal post-genomics" 5ième meeting international sur l'algue brune modèle *Ectocarpus siliculosus* (Avril 2012), Station Biologique de Roscoff : « Characterization of enzymes catalyzing mannitol recycling in the model brown alga *Ectocarpus siliculosus* » Bonin P., Groisillier A., Rousvoal S., Boyen C., Tonon T.
- Journées de la Société Phycologique de Françe (Décembre 2013), Station Biologique de Roscoff : « Mannitol biosynthesis in *Ectocarpus siliculosus* » Bonin P., Groisillier A., Guibert A., Rousvoal S., Boyen C., Tonon T.
- Congrès organize par la Federation of European Societies of Plant Biology (FESPB), Dublin (Juin 2014) : "Different pathways of mannitol metabolism in land plants and brown algae" Bonin P., Groisillier A., Shao Z., Rousvoal S., Michel G., Goulitquer S., Guibert A., Raimbault A., Krahulec S., Dittami S.M., Nidetzky B., Duan D., Boyen C., Tonon T.

- Liste des présentations orales :

- Journées de l'Ecole Doctorale Diversité du Vivant (Octobre 2012) : «Le cycle du mannitol chez les algues brunes: approche intégrative et modélisation métabolique chez *Ectocarpus siliculosus* (ManCyc)»
- 4ième journée des Jeunes Chercheurs 2012 (Décembre 2012) (Station Biologique de Roscoff) : « Mannitol cycle in brown algae: integrative approach and metabolic modeling in *Ectocarpus siliculosus* (ManCyc) »

- Liste des publications

- Groisillier A., Shao Z., Michel G., Goulitquer S., Bonin P., Krahulec S., Nidetzky B., Duan D., Boyen C., Tonon T. (2014) Mannitol metabolism in brown algae involves a new phosphatase family. Journal of Experimental Botany 65:559–70.

Mannitol cycle in Ectocarpus: integrative approach and metabolic modeling

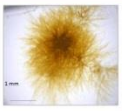
Bonin P.[1,2], Eveillard D.[3], Siegel A.[4,5], Boyen C.[1,2], and Tonon T.[1,2]

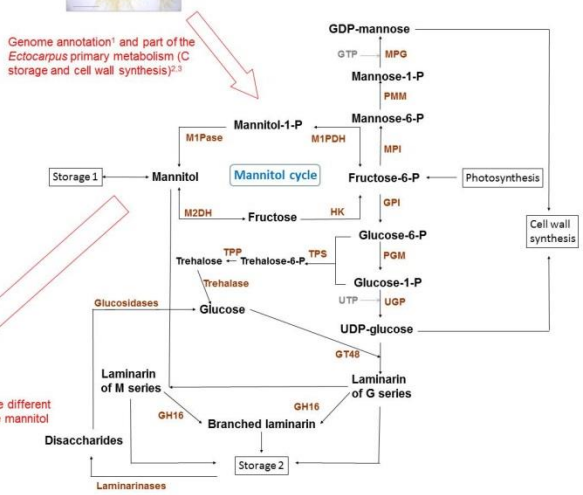
[1]UPMC Univ Paris 6, UMR 7139 Marine Plants and Biomolecules, Station Biologique, 29680 Roscoff, France.
[2]CNRS, UMR 7139 Marine Plants and Biomolecules, Station Biologique, 29680 Roscoff, France.
[3]CNRS, Universite´ of Nantes, LINA-UMR 6241, Nantes, France.
[4]CNRS, Universite´ de Rennes 1, IRISA-UMR 6074, Rennes, France.
[5]INRIA, Centre Rennes-Bretagne Atlantique, Symbiose, Rennes, France.

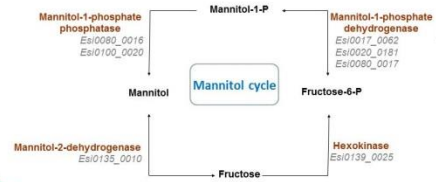
Introduction

Because of their specific habitat, the **intertidal zone**, and of their evolutionary history, independent from plants and animals, **brown algae** exhibit some peculiarities in their primary and secondary metabolism. Among these organisms, ***Ectocarpus siliculosus*** has been chosen as a model species, and its genome sequenced, in parallel with the development of other medium/high throughput profiling techniques.

One of these unusual pathways, the **mannitol cycle**, is used to **store carbon from photo-assimilation**. In addition, production of mannitol is known to be regulated under **changes in salinity**. Therefore, a better understanding of functioning and regulation of the mannitol metabolism should help to understand how brown algae cope with their harsh environment.

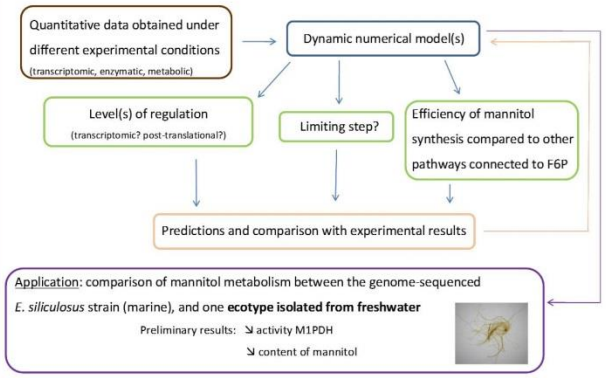






Study about the different reactions in the mannitol cycle[4]

Objectives of the PhD



1. To **biochemically characterize all the enzymes** involved in the mannitol cycle (specificity, kinetics parameters), in algal extracts and after heterologous expression.

2. To study the influence of different parameters (changes in abiotic conditions, diurnal cycle) on **enzymatic activities** (*in vivo* and using recombinant proteins), on **expression of corresponding genes**, and on **content of metabolites** (including sugars, polyols and some of their phosphate and nucleotide derivatives).

3. To integrate these data into metabolic networks to assess the levels of regulation, and to **predict fluxes** within this metabolism.

4. To test the predictions in order to **implement the model**, and then to apply it for instance to **determine if there is a link between adaptation of *Ectocarpus* strains and the metabolism of mannitol.**

References :
[1]**Cock *et al.*** (2010) The *Ectocarpus* genome and the independent evolution of multicellularity in brown algae. *Nature*, 465, 617-621.
[2]**Michel *et al.*** (2010) Central and storage carbon metabolism of the brown alga *Ectocarpus siliculosus*: insights into the origin and evolution of storage carbohydrates in Eukaryotes. *New Phytologist*, 188, 67-81.
[3]**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 Phytologist*, 188, 82-97.
[4]**Rousvoal *et al.*** (2010) Mannitol-1-phosphate dehydrogenase activity in *Ectocarpus siliculosus*, a key role for mannitol synthesis in brown algae. *Planta* 233, 261-273.

Characterization of enzymes catalyzing mannitol recycling in the model brown alga *Ectocarpus siliculosus*

Bonin P.[1,2,*], Groisillier A.[1,2], Rousvoal S.[1,2], Boyen C.[1,2], Tonon T.[1,2]

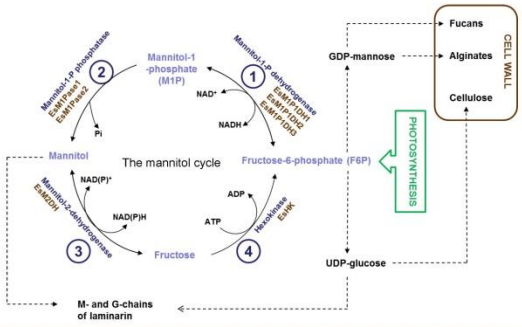
[1]UPMC Univ Paris 6, UMR 7139 Marine Plants and Biomolecules, Station Biologique, 29680 Roscoff, France.
[2]CNRS, UMR 7139 Marine Plants and Biomolecules, Station Biologique, 29680 Roscoff, France.
*Patricia Bonin received a PhD grant by the Émergence-UPMC 2011 research program.

Introduction

Brown algae belong to a phylogenetic lineage distantly related to terrestrial plants and animals. They are almost exclusively found in the intertidal zone, a harsh and frequently changing environment where organisms are submitted to marine and terrestrial constraints. Because of their unique evolutionary history and of their habitat, they feature several peculiarities in their primary and secondary metabolism. One of them is the mannitol cycle, which plays a central role in brown algal physiology because it represents one pathway used to store carbon from photoassimilation. This polyol has also been shown to be important during response to saline stress.

Genes encoding enzymes potentially involved in the mannitol cycle of *E. siliculosus* have been identified through annotation of the genome, and we describe here results on the recycling of mannitol. This metabolic process involves two distinct steps. The mannitol is first converted into fructose by a mannitol-2-dehydrogenase, and then to fructose-6-phosphate by a hexokinase. To better understand these steps, each gene coding for these enzymes is under characterization by: (1) RT-qPCR experiments to monitor changes in transcript accumulation using samples harvested through diurnal cycles ; (2) heterologous expression in *E.coli* to establish enzymatic specificity and kinetics parameters of the corresponding proteins.

***E. siliculosus* Bogas database**	**Step 3: EsM2DH**	**Step 4: EsHK**
Genomic locus	Esi0135_0010	Esi0139_0025
Length of CDS (nt)	2001	1122
Number of introns	16	7
Number of ESTs	5	1
Length of proteins (aa)	666	373
Molecular weight (kD)	73,8	38,7
Isoeletric point	5,18	4,51

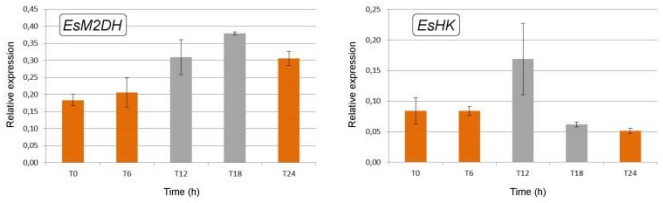


Gene expression analysis

It was analyzed through the day/night cycle. Biological triplicates were used for these quantitative real-time PCR experiments. We can observe that *EsM2DH* was more highly expressed during the dark period. Beside, *EsHK* seems also induced temporary at the beginning of the dark phase.

In addition, no variations for these two genes were observed under abiotic stress conditions (microarrays data, Dittami et al. Genome Biology 2009).

RT-qPCR analysis on *EsM2DH* and *EsHK*. The samples were taken at different times during the diurnal cycle (T0, T6, T12, T18, T24). Grey background indicates samples taken through the dark period.

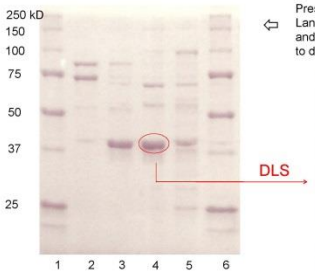


Biochemical characterization

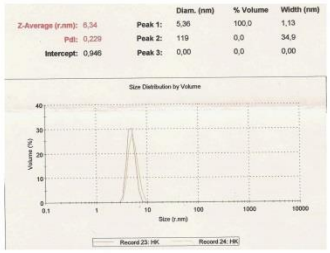
To characterize EsM2DH and EsHK enzymes, corresponding genes were cloned in the plasmid pFO4 (His-tag in ?-terminal end), and transformed in *E. coli* BL21 DE3 codon+.

So far, overexpression has been observed for EsHK only. This enzyme was purified through His-prep column in a first step, and then by Gel Filtration in a second step. Dynamic Light Scattering (DLS) analysis showed a fraction containing a unique type of protein. (see figures on the right).

From protein fraction on lane 4, enzymatic activity of EsHK, in presence of fructose, was calculated to be 113.76 ± 5.51 µmoles.min^{-1}.mg^{-1}.



Presence of HK in fractions produced after Gel Filtration. Lanes 1 and 6 correspond to the protein ladder ; lanes 2,3,4 and 5 are the different fractions tested on polyacrylamide gel to determine presence or absence of the enzyme.



Dynamic Light Scattering results. This method permits to determine the size distribution profile of small particles in suspension.

Outlooks

From preliminary results obtained for the EsHK, it will now be interesting to determine its substrate specificty and then its kinetic parameters. In parallel, it will be necessary to enhance heterologous expression of EsM2DH by testing different plasmids and *E. coli* strains. Molecular data produced for both genes and enzymes will then be integrated in a more global analysis of the *Ectocarpus* mannitol cycle.

Mannitol biosynthesis in *Ectocarpus siliculosus*

Bonin P.[1,2], Groisillier A.[1,2], Guibert A.[1,2], Rousvoal S.[1,2], Boyen C.[1,2], Tonon T.[1,2]

[1]UPMC Univ Paris 6, UMR 7139 Marine Plants and Biomolecules, Station Biologique, 29680 Roscoff, France.
[2]CNRS, UMR 7139 Marine Plants and Biomolecules, Station Biologique, 29680 Roscoff, France.

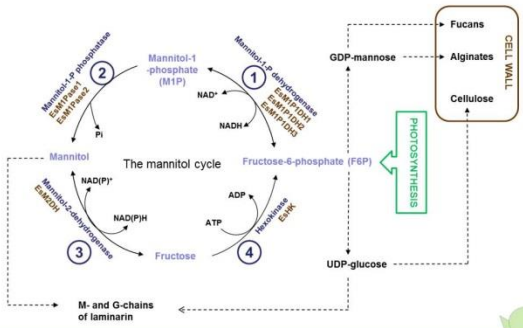
Émergence-UPMC 2011

Introduction

Brown algae belong to a phylogenetic lineage distantly related to terrestrial plants and animals. They are almost exclusively found in the intertidal zone, a harsh and frequently changing environment where organisms are submitted to marine and terrestrial constraints. Because of their unique evolutionary history and of their habitat, they feature several peculiarities in their primary and secondary metabolism. One of them is the mannitol cycle, which plays a central role in brown algal physiology because it represents one pathway used to store carbon from photoassimilation. This polyol has also been shown to be important during response to saline stress.

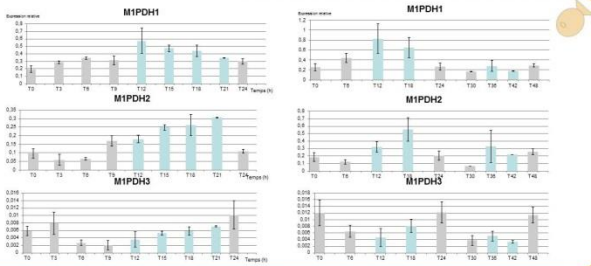
Mannitol metabolism in brown algae involved two steps for synthesis, and two steps for recycling. We will describe results on the first step of biosynthesis of mannitol, i.e. the reduction of fructose-6-phosphate into mannitol-1-phosphate catalyzed by the mannitol-1-phosphate dehydrogenase (M1PDH). Genes encoding enzymes potentially involved in the mannitol cycle have been identified through genome annotation of the model brown alga *E. siliculosus*, including three that potentially code for EsM1PDHs. To biochemically characterize the corresponding proteins, genes have been expressed in *E. coli*. Purified recombinant proteins are currently under investigation to determine and compare their substrate specificity and their kinetics parameters. Such experiments are completed by gene expression analysis to assess potential regulation at the transcriptomic level through the diurnal cycle.

Common name	EsM1PDH1	EsM1PDH2	EsM1PDH3
Genomic locus	Esi0017_0062	Esi0020_0181	Esi0080_0017
Length of CDS (nt)	1578	1662	1293
Number of introns	14	13	9
Number of ESTs	36	4	0
Length of proteins (aa)	525	553	430
Molecular weight (kDa)	58	60	47
Isoelectric point	5,93	6,94	5,19



Gene expression analysis

Samples were considered through the diurnal cyclen during one or two consecutive days. Biological triplicates were used for these quantitative real-time PCR experiments. The three genes seems to be regulated by the diurnal cycle, but with different timing.

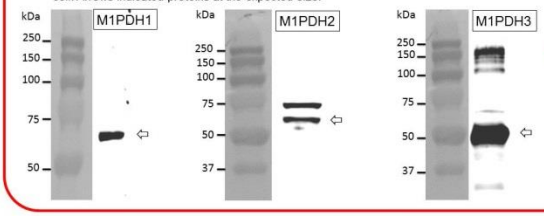


RT-qPCR analysis on EsM1PDH genes. The samples were taken at different times during the diurnal cycle at 3 h (left panel) and 6 h (right panel) intervals. Blue bars indicate samples taken during the dark period.

Biochemical characterization

To characterize the three EsM1PDHs enzymes, corresponding synthetic genes were cloned in the plasmid pFO4 (His-tag in N-terminal end), and transformed in *E. coli* BL21 (DE3).

Western Blot analysis with His-tag antibodies on protein extracts from recombinant *E. coli*. Arrows indicated proteins at the expected size.



Recombinant M1PDH1 and M1PDH2 were then purified by a two-step procedure: affinity chromatography and gel filtration.

Measurements of activity for the recombinant proteins:

Experimental conditions: 10 µg of enzyme and 6 mM of fructose-6-phosphate

M1PDH1 → 5,04 nmol.min^{-1}.mg^{-1}

M1PDH2 → 5,71 nmol.min^{-1}.mg^{-1}

Improvement is now necessary to avoid loss of proteins in the flow through during the affinity chromatography purification step.

Outlooks

Preliminary experiments shown activities for the two *E. siliculosus* enzymes M1PDH1 and M1PDH2. Further work will involve the determination of kinetics parameters for these two enzymes, and testing if M1PDH3 is an active enzyme. In addition, these data will be integrated to a metabolic network in order to predict fluxes within the mannitol metabolism in *Ectocarpus silisulosus*.

Different pathways of mannitol metabolism in land plants and brown algae



Patricia Bonin[1,2], Agnès Groisillier[1,2], Zhanru Shao[1,2,3], Sylvie Rousvoal[1,2], Gurvan Michel[1,2], Sophie Goulitquer[4], Anaïs Guibert[1,2],Alice Raimbault[1,2], Stefan Krahulec[5], Simon M. Dittami[1,2], Bernd Nidetzky[5], Delin Duan[3], Catherine Boyen[1,2], Thierry Tonon[1,2].

[1] Sorbonne Universités, UPMC Univ. Paris 06, UMR 8227, Integrative Biology of Marine Models, Station Biologique de Roscoff, France; [2] CNRS, UMR 8227, Integrative Biology of Marine Models, Station Biologique de Roscoff, France; [3] Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao, China; [4] Plate-forme MetaboMER, CNRS and UPMC, FR2424, Station Biologique de Roscoff, France; [5] Institute of Biotechnology and Biochemical Engineering, Graz University of Technology, Austria.

Introduction

Brown algae represent multicellular photosynthetic organisms distantly related to land plants and animals. They are mainly found in the intertidal zone, a harsh and frequently changing environment. Among their metabolic features, mannitol is used for carbon storage, as well as osmoprotectant and antioxidative.

Mannitol is produced by land plants from fructose-6-phosphate (F6P) via mannose-6-phosphate and mannitol-1-phosphate (M1P) in source tissues, and then translocated to sink tissues where it is recycled to F6P for use as a carbon and energy source (Stoop et al., 1996) (Figure 1). In brown algae, mannitol synthesis involves the direct reduction of F6P into M1P, by a mannitol-1-phosphate dehydrogenase (M1PDH), and the hydrolysis of the phosphoric ester of M1P by a mannitol-1-phosphatase (M1Pase) (Iwamoto and Shiraiwa, 2005). This latter step also occurs in some plants (Grant and Rees, 1981; Rumpho et al., 1983). However, little is known on these pathways at the molecular level in both types of organisms.

Taking benefit of the sequencing and annotation of the model brown alga *Ectocarpus siliculosus* genome (Cock et al.; 2010; Michel et al., 2010), three candidate genes were identified for the M1PDH step (EsM1PDH1, EsM1PDH2, and EsM1PDH3), and two for the M1Pase (EsM1Pase1 and EsM1Pase2). To better understand the mannitol production in *E. siliculosus*, we first determined endogenous M1PDH and M1Pase activities during the diurnal cycle. Then, algal genes were expressed in *Escherichia coli* to purify and characterize the corresponding recombinant proteins. This strategy was implemented because reverse genetic tools are not yet available for *E. siliculosus*.

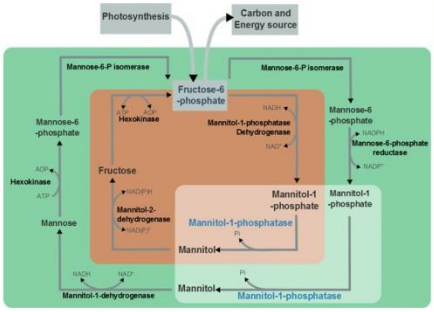


Figure 1. Metabolism of mannitol in brown algae (orange background) and land plants (green background). The white shadow indicates a common step in mannitol synthesis between brown algae and land plants

Endogenous enzyme activities involved in mannitol synthesis

M1PDH and M1Pase enzymatic activities were measured on crude extracts of *Ectocarpus siliculosus* in samples harvested during the diurnal cycle. Variations observed between the light and dark phases were not significant (analysis of variance, P= 0.09 for M1PDH activity and P=0.162 for M1Pase activity) (Figure 2). Furthermore there was no correlation between these enzymatic activities and the mannitol content determined for the same samples (Gravot et al., 2010).

In land plants, mannitol has been reported in a wide variety of families (Table 1), but M1Pase activity has been measured only in a few species. In addition, no gene coding for this activity has been identified yet.

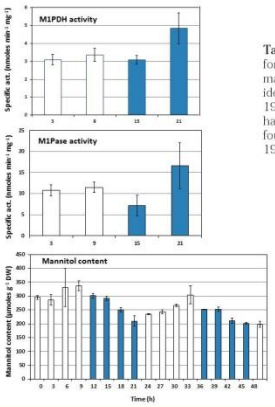


Figure 2. Variations of M1PDH, M1Pase, and mannitol content in *E. siliculosus* through the diurnal cycle. Blue bars indicate results for algae harvested during the night.

Table 1. List of plant families for which species containing mannitol have been identified (Stoop et al., 1996). M1Pase activities have only been detected in four species (Grant and Rees, 1981; Rumpho et al., 1983).

Family	M1Pase activity
Apiaceae	+ (celery)
Arecaceae	
Brassicaceae	
Bromeliaceae	
Buxaceae	
Cactaceae	
Combretaceae	
Cucurbitaceae	
Euphorbiaceae	
Fabaceae	+ (*Vigna mungo*)
Gnetaceae	
Poaceae	+ (rye)
Liliaceae	
Oleaceae	
Plaranaceae	
Rosaceae	+ (apple)
Rubiaceae	
Scrophulariaceae	

Biochemical characterization of EsM1PDHs and EsM1Pases

To characterize the three putative **EsM1PDHs**, synthetic genes with optimized codons were cloned in the plasmid pFO4 (His-tag in N-terminal end), and transformed in *E. coli* BL21 (DE3). Activities were then measured on bacterial crude extracts.

	Specific activities on bacterial crude extracts determined in presence of fructose-6-phosphate as substrate (nmoles min⁻¹ mg protein⁻¹)	
	pFO4 plasmid with EsM1PDH genes	pFO4 plasmid empty
EsM1PDH1	32.7±3.6	9.4±5.5
EsM1PDH2	21.8±8.9	9.4±5.5
EsM1PDH3	16.1±1.5	9.4±5.5

Table 2. Comparaison of M1PDH activities between bacterial extracts produced from bacteria containing or not the genes of interest (three biological replicates).

Based on these results, the three EsM1PDH seems active in E. coli. The next step is to purify the recombinant proteins to study their enzymatic parameters.

For the putative **EsM1Pases**, no heterologous expression was detected for EsM1Pase1. In contrast, EsM1Pase2 was over-expressed in *E. coli*, allowing the purification of the recombinant protein and its biochemical analysis (Figure 3; Groisillier et al., 2014).

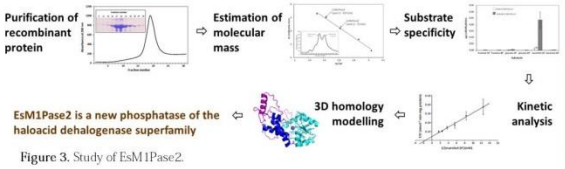


Figure 3. Study of EsM1Pase2.

EsM1Pase2 is a true M1Pase and its characterization paves the way for identification of M1Pase in land plants.

Outlooks

Brown algae, because of their habitat and of their evolutionary history, feature some unusual metabolic pathways, such as the mannitol cycle which is part of their primary metabolism. We have started deciphering the molecular bases of the production of this polyol in *E. siliculosus*. A new type of phosphatase has been identified, and work is in progress to characterize recombinant EsM1PDHs. It will also be interesting to complete these studies by considering enzymes potentially involved in the recycling of mannitol. All these results will be used to implement a kinetic modeling approach, to better understand the functioning and the importance of the mannitol metabolism in brown algal physiology. Knowledge gained in *E. siliculosus* should also benefit research on such metabolic process in land plants.

References: Stoop J., Williamson J., Masonphart D. (1996) Mannitol metabolism in plants: a method for coping with stress. Trends in Plant Science 1:139–144 ; Iwamoto K., Shiraiwa Y. (2005) Salt-regulated mannitol metabolism in algae. Marine Biotechnology (New York, NY) 7:407–15 ; Grant C.R., Rees T. ap (1981) Sorbitol metabolism by apple seedlings. Phytochemistry 20:1505–1511 ; Rumpho M.E., Edwards G.E., Loescher W.H. (1983) A pathway for photosynthetic carbon flow to mannitol in celery leaves: activity and localization of key enzymes. Plant physiology 73:869–73 ; Cock J.M., *et al* (2010) The Ectocarpus genome and the independent evolution of multicellularity in brown algae. Nature 465:617–21 ; Michel G., Tonon T., Scornet D., Cock J.M., Kloareg B. (2010) Central and storage carbon metabolism of the brown alga Ectocarpus siliculosus: insights into the origin and evolution of storage carbohydrates in Eukaryotes. The New phytologist 188:67–81 ; Gravot A., Dittami S.M., Rousvoal S., Lugan R., Eggert A., Collén J., Boyen C., Bouchereau A., Tonon T. (2010) Diurnal oscillations of metabolite abundances and gene analysis provide new insights into central metabolic processes of the brown alga Ectocarpus siliculosus. The New phytologist 188:98–110 ; Groisillier A., Shao Z., Michel G., Goulitquer S., Bonin P., Krahulec S., Nidetzky B., Duan D., Boyen C., Tonon T. (2014) Mannitol metabolism in brown algae involves a new phosphatase family. Journal of Experimental Botany 65:559–70

Références bibliographiques

Aguilar-Osorio, G., Vankuyk, P. a, Seiboth, B., Blom, D., Solomon, P.S., Vinck, A., Kindt, F., Wösten, H. a B., and de Vries, R.P. (2010). Spatial and developmental differentiation of mannitol dehydrogenase and mannitol-1-phosphate dehydrogenase in Aspergillus niger. Eukaryot. Cell **9**: 1398–402.

Aitken, A. (1996). 14-3-3 and its possible role in co-ordinating multiple signalling pathways. Trends Cell Biol. **6**: 341–347.

Akagawa, E., Kasahara, Y., and Yamanel, K. (1995). of Bacillus of.: 3241–3245.

Akazaki, H., Kawai, F., Chida, H., Matsumoto, Y., Hirayama, M., Hoshikawa, K., Unzai, S., Hakamata, W., Nishio, T., Park, S.Y., and Oku, T. (2008). Cloning, expression and purification of cytochrome c(6) from the brown alga Hizikia fusiformis and complete X-ray diffraction analysis of the structure. Acta Crystallogr. Sect. F. Struct. Biol. Cryst. Commun. **64**: 674–80.

Akinterinwa, O., Khankal, R., and Cirino, P.C. (2008). Metabolic engineering for bioproduction of sugar alcohols. Curr. Opin. Biotechnol. **19**: 461–7.

Allocco (1999). Biosynthesis and catabolism of mannitol is developmentally regulated in the protozoan parasite eimeria tenella.

Allocco, J.J., Nare, B., Myers, R.W., Feiglin, M., Schmatz, D.M., and Profous-Juchelka, H. (2001). Nitrophenide (Megasul) blocks Eimeria tenella development by inhibiting the mannitol cycle enzyme mannitol-1-phosphate dehydrogenase. J. Parasitol. **87**: 1441–8.

Van Arkel, J., Sévenier, R., Hakkert, J.C., Bouwmeester, H.J., Koops, A.J., and van der Meer, I.M. (2013). Tailor-made fructan synthesis in plants: a review. Carbohydr. Polym. **93**: 48–56.

Baharum, H., Morita, H., Tomitsuka, A., Lee, F.-C., Ng, K.-Y., Rahim, R.A., Abe, I., and Ho, C.-L. (2011). Molecular cloning, modeling, and site-directed mutagenesis of type III polyketide synthase from Sargassum binderi (Phaeophyta). Mar. Biotechnol. (NY). **13**: 845–56.

Le Bail, A., Billoud, B., Kowalczyk, N., Kowalczyk, M., Gicquel, M., Le Panse, S., Stewart, S., Scornet, D., Cock, J.M., Ljung, K., and Charrier, B. (2010). Auxin metabolism and function in the multicellular brown alga Ectocarpus siliculosus. Plant Physiol. **153**: 128–44.

Le Bail, A., Billoud, B., Le Panse, S., Chenivesse, S., and Charrier, B. (2011). ETOILE regulates developmental patterning in the filamentous brown alga Ectocarpus siliculosus. Plant Cell **23**: 1666–78.

Le Bail, A., Dittami, S.M., de Franco, P.-O., Rousvoal, S., Cock, M.J., Tonon, T., and Charrier, B. (2008). Normalisation genes for expression analyses in the brown alga model Ectocarpus siliculosus. BMC Mol. Biol. **9**: 75.

Baldauf, S.L. (2008). An overview of the phylogeny and diversity of eukaryotes. J. Syst. Evol. **46**: 263–273.

Bartsch, I., Wiencke, C., Bischof, K., Buchholz, C.M., Buck, B.H., Eggert, A., Feuerpfeil, P., Hanelt, D., Jacobsen, S., Karez, R., and others (2008). The genus Laminaria sensu lato: recent insights and developments. Eur. J. Phycol. **43**: 1–86.

Behrens, S., Mitchell, W., and Bahl, H. (2001). Molecular analysis of the mannitol operon of Clostridium acetobutylicum encoding a phosphotransferase system and a putative PTS-modulated regulator. Microbiology **147**: 75–86.

Bhatt, S.M., Mohan, A., and Srivastava, S.K. (2013). Challenges in Enzymatic Route of Mannitol Production. ISRN Biotechnol. **2013**: 1–13.

Billoud, B., Nehr, Z., Le Bail, A., and Charrier, B. (2014). Computational prediction and experimental validation of microRNAs in the brown alga Ectocarpus siliculosus. Nucleic Acids Res. **42**: 417–29.

Boettner, M., Prinz, B., Holz, C., Stahl, U., and Lang, C. (2002). High-throughput screening for expression of heterologous proteins in the yeast Pichia pastoris. J. Biotechnol. **99**: 51–62.

Brown, J.W. and Sorhannus, U. (2010). A molecular genetic timescale for the diversification of autotrophic stramenopiles (Ochrophyta): substantive underestimation of putative fossil ages. PLoS One **5**: e12759.

Brünker, P., Altenbuchner, J., Kulbe, K.D., and Mattes, R. (1997). Cloning, nucleotide sequence and expression of a mannitol dehydrogenase gene from Pseudomonas fluorescens DSM 50106 in Escherichia coli. Biochim. Biophys. Acta **1351**: 157–67.

Brünker, P., Minas, W., Kallio, P.T., and Bailey, J.E. (1998). Genetic engineering of an industrial strain of Saccharopolyspora erythraea for stable expression of the Vitreoscilla haemoglobin gene (vhb). Microbiology **144 (Pt 9**: 2441–8.

Calmes, B., Guillemette, T., Teyssier, L., Siegler, B., Pigné, S., Landreau, A., Iacomi, B., Lemoine, R., Richomme, P., and Simoneau, P. (2013). Role of mannitol metabolism in the pathogenicity of the necrotrophic fungus Alternaria brassicicola. Front. Plant Sci. **4**: 131.

Cataldi, T.R.I., Margiotta, G., Iasi, L., Chio, B. Di, Xiloyannis, C., Bufo, S.A., Chimica, D., Vegetale, P., and Sauro, V.N. (2000). Determination of Sugar Compounds in Olive Plant

Extracts by Anion-Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detection a complete profile of the sugar components of leaves and. **2**: 3902–3907.

Ceccaroli, P., Saltarelli, R., Guescini, M., Polidori, E., Buffalini, M., Menotta, M., Pierleoni, R., Barbieri, E., and Stocchi, V. (2007). Identification and characterization of the Tuber borchii D-mannitol dehydrogenase which defines a new subfamily within the polyol-specific medium chain dehydrogenases. Fungal Genet. Biol. **44**: 965–78.

Chan, Z., Grumet, R., and Loescher, W. (2011). Global gene expression analysis of transgenic, mannitol-producing, and salt-tolerant Arabidopsis thaliana indicates widespread changes in abiotic and biotic stress-related genes. J. Exp. Bot. **62**: 4787–803.

Charrier, B., Coelho, S.M., Le Bail, A., Tonon, T., Michel, G., Potin, P., Kloareg, B., Boyen, C., Peters, A.F., and Cock, J.M. (2008). Development and physiology of the brown alga Ectocarpus siliculosus: two centuries of research. New Phytol. **177**: 319–32.

Chase, T. (1986). Mannitol-1-phosphate dehydrogenase of Escherichia coli. Biochem. J.: 435–443.

Chaturvedi, V., Bartiss, a, and Wong, B. (1997). Expression of bacterial mtlD in Saccharomyces cerevisiae results in mannitol synthesis and protects a glycerol-defective mutant from high-salt and oxidative stress. J. Bacteriol. **179**: 157–62.

Chizhov, A.O., Dell, A., Morris, H.R., Reason, A.J., Haslam, S.M., McDowell, R. a., Chizhov, O.S., and Usov, A.I. (1998). Structural analysis of laminarans by MALDI and FAB mass spectrometry. Carbohydr. Res. **310**: 203–210.

Cock, J.M. et al. (2010). The Ectocarpus genome and the independent evolution of multicellularity in brown algae. Nature **465**: 617–21.

Coelho, S.M., Godfroy, O., Arun, A., Le Corguillé, G., Peters, A.F., and Cock, J.M. (2011). Genetic regulation of life cycle transitions in the brown alga Ectocarpus. Plant Signal. Behav. **6**: 1858–60.

Colin, C., Leblanc, C., Wagner, E., Delage, L., Leize-Wagner, E., Van Dorsselaer, A., Kloareg, B., and Potin, P. (2003). The brown algal kelp Laminaria digitata features distinct bromoperoxidase and iodoperoxidase activities. J. Biol. Chem. **278**: 23545–52.

Collén, J., Guisle-Marsollier, I., Léger, J.J., and Boyen, C. (2007). Response of the transcriptome of the intertidal red seaweed Chondrus crispus to controlled and natural stresses. New Phytol. **176**: 45–55.

Conde, A., Silva, P., Agasse, A., Conde, C., and Gerós, H. (2011). Mannitol transport and mannitol dehydrogenase activities are coordinated in Olea europaea under salt and osmotic stresses. Plant Cell Physiol. **52**: 1766–75.

Conde, C., Agasse, A., Silva, P., Lemoine, R., Delrot, S., Tavares, R., and Gerós, H. (2007a). OeMST2 encodes a monosaccharide transporter expressed throughout olive fruit maturation. Plant Cell Physiol. **48**: 1299–308.

Conde, C., Silva, P., Agasse, A., Lemoine, R., Delrot, S., Tavares, R., and Gerós, H. (2007b). Utilization and transport of mannitol in Olea europaea and implications for salt stress tolerance. Plant Cell Physiol. **48**: 42–53.

Cosse, A., Leblanc, C., Potin, P., Plants, M., Biologique, S., and Cedex, F.R. V (2008). Dynamic Defense of Marine Macroalgae Against Pathogens : From Early Activated to Gene - Regulated Responses Adaptation in Marine Species », Unite I . INTRODUCTION. **2296**.

Cosse, A., Potin, P., and Leblanc, C. (2009). Patterns of gene expression induced by oligoguluronates reveal conserved and environment-specific molecular defense responses in the brown alga Laminaria digitata. New Phytol. **182**: 239–50.

Costa, R.S., Hartmann, A., Gaspar, P., Neves, A.R., and Vinga, S. (2014). An extended dynamic model of Lactococcus lactis metabolism for mannitol and 2,3-butanediol production. Mol. Biosyst. **10**: 628–39.

Davison, I.R. and Pearson, G.A. (1996). Stress tolerance in intertidal seaweeds. J. Phycol. **32**: 197–211.

Deniaud-Bouët, E., Kervarec, N., Michel, G., Tonon, T., Kloareg, B., and Hervé, C. (2014). Chemical and enzymatic fractionation of cell walls from Fucales: insights into the structure of the extracellular matrix of brown algae. Ann. Bot.

Dittami, S.M. et al. (2009). Global expression analysis of the brown alga Ectocarpus siliculosus (Phaeophyceae) reveals large-scale reprogramming of the transcriptome in response to abiotic stress. Genome Biol. **10**: R66.

Dittami, S.M., Aas, H.T.N., Paulsen, B.S., Boyen, C., Edvardsen, B., and Tonon, T. (2011a). Mannitol in six autotrophic stramenopiles and Micromonas. Plant Signal. Behav. **6**: 1–3.

Dittami, S.M. and Edvardsen, B. (2012). Culture Conditions Influence Cellular Rna Content in Ichthyotoxic Flagellates of the Genus Pseudochattonella (Dictyochophyceae)1. J. Phycol. **48**: 1050–1055.

Dittami, S.M., Gravot, A., Goulitquer, S., Rousvoal, S., Peters, A.F., Bouchereau, A., Boyen, C., and Tonon, T. (2012a). Towards deciphering dynamic changes and evolutionary mechanisms involved in the adaptation to low salinities in Ectocarpus (brown algae). Plant J. **71**: 366–77.

Dittami, S.M., Gravot, A., Renault, D., Goulitquer, S., Eggert, A., Bouchereau, A., Boyen, C., and Tonon, T. (2011b). Integrative analysis of metabolite and transcript abundance during the short-term response to saline and oxidative stress in the brown alga Ectocarpus siliculosus. Plant. Cell Environ. **34**: 629–42.

Dittami, S.M., Proux, C., Rousvoal, S., Peters, A.F., Cock, J.M., Coppée, J.-Y., Boyen, C., and Tonon, T. (2011c). Microarray estimation of genomic inter-strain variability in the genus Ectocarpus (Phaeophyceae). BMC Mol. Biol. **12**: 2.

Dittami, S.M., Riisberg, I., John, U., Orr, R.J.S., Jakobsen, K.S., and Edvardsen, B. (2012b). Analysis of expressed sequence tags from the marine microalga Pseudochattonella farcimen (Dictyochophyceae). Protist **163**: 143–61.

Dring, M.J. and Brown, F.A. (1982). Photosynthesis of Intertidal Brown Algae During and After Periods of Emersion : A Renewed Search for Physiological Causes of Zonation. **8**: 301–308.

Dulermo, T., Rascle, C., Billon-Grand, G., Gout, E., Bligny, R., and Cotton, P. (2010). Novel insights into mannitol metabolism in the fungal plant pathogen Botrytis cinerea. Biochem. J. **427**: 323–32.

Eggert, A., Raimund, S., Daele, K. Van Den, and Karsten, U. (2006). Biochemical characterization of mannitol metabolism in the unicellular red alga Dixoniella grisea (Rhodellophyceae). Eur. J. Phycol. **41**: 405–413.

Eggert, A., Raimund, S., Michalik, D., West, J., and Karsten, U. (2007). Ecophysiological performance of the primitive red alga Dixoniella grisea (Rhodellophyceae) to irradiance, temperature and salinity stress: growth responses and the osmotic role of mannitol. Phycologia **46**: 22–28.

Enquist-Newman, M. et al. (2014). Efficient ethanol production from brown macroalgae sugars by a synthetic yeast platform. Nature **505**: 239–43.

Fabris, M., Matthijs, M., Carbonelle, S., Moses, T., Pollier, J., Dasseville, R., Baart, G.J.E., Vyverman, W., and Goossens, A. (2014). Tracking the sterol biosynthesis pathway of the diatom Phaeodactylum tricornutum. New Phytol.

Falkowski, P.G., Katz, M.E., Knoll, A.H., Quigg, A., Raven, J. a, Schofield, O., and Taylor, F.J.R. (2004). The evolution of modern eukaryotic phytoplankton. Science **305**: 354–60.

Farnham, G., Strittmatter, M., Coelho, S., Cock, J.M., and Brownlee, C. (2013). Gene silencing in Fucus embryos: developmental consequences of RNAi-mediated cytoskeletal disruption. J. Phycol. **829**: n/a–n/a.

Franco, P.-O. De, Rousvoal, S., Tonon, T., and Boyen, C. (2009). Whole genome survey of the glutathione transferase family in the brown algal model Ectocarpus siliculosus. Mar. Genomics **1**: 135–48.

Fu, G., Nagasato, C., Oka, S., Cock, J.M., and Motomura, T. (2014). Proteomics Analysis of Heterogeneous Flagella in Brown Algae (Stramenopiles). Protist **165**: 662–675.

Gaspar, P., Neves, a. R., Ramos, a., Gasson, M.J., Shearman, C. a., and Santos, H. (2004). Engineering Lactococcus lactis for Production of Mannitol: High Yields from Food-Grade Strains Deficient in Lactate Dehydrogenase and the Mannitol Transport System. Appl. Environ. Microbiol. **70**: 1466–1474.

Geary, T. and Favreau, M. (2004). (19) United States (12) Patent Application Publication (10) Pub . No .: US 2004 / 0018581 A1. **1**.

Ghoreishi, S.M. and Shahrestani, R.G. (2009). Innovative strategies for engineering mannitol production. Trends Food Sci. Technol. **20**: 263–270.

Grant, C.R. and Rees, T. ap (1981). Sorbitol metabolism by apple seedlings. Phytochemistry **20**: 1505–1511.

Gravot, A., Dittami, S.M., Rousvoal, S., Lugan, R., Eggert, A., Collén, J., Boyen, C., Bouchereau, A., and Tonon, T. (2010). Diurnal oscillations of metabolite abundances and gene analysis provide new insights into central metabolic processes of the brown alga Ectocarpus siliculosus. New Phytol. **188**: 98–110.

Groisillier, A. et al. (2010). MARINE-EXPRESS: taking advantage of high throughput cloning and expression strategies for the post-genomic analysis of marine organisms. Microb. Cell Fact. **9**: 45.

Groisillier, A., Shao, Z., Michel, G., Goulitquer, S., Bonin, P., Krahulec, S., Nidetzky, B., Duan, D., Boyen, C., and Tonon, T. (2014). Mannitol metabolism in brown algae involves a new phosphatase family. J. Exp. Bot. **65**: 559–70.

Van Hal, J.W., Huijgen, W.J.J., and López-Contreras, a M. (2014). Opportunities and challenges for seaweed in the biobased economy. Trends Biotechnol. **32**: 231–3.

Heesch, S., Cho, G.Y., Peters, A.F., Le Corguillé, G., Falentin, C., Boutet, G., Coëdel, S., Jubin, C., Samson, G., Corre, E., Coelho, S.M., and Cock, J.M. (2010). A sequence-tagged genetic

map for the brown alga Ectocarpus siliculosus provides large-scale assembly of the genome sequence. New Phytol. **188**: 42–51.

Henstra, S. a., Duurkens, R.H., and Robillard, G.T. (2000). Multiple Phosphorylation Events Regulate the Activity of the Mannitol Transcriptional Regulator MtlR of the Bacillus stearothermophilus Phosphoenolpyruvate-dependent Mannitol Phosphotransferase System. J. Biol. Chem. **275**: 7037–7044.

Hervé, C., de Franco, P.-O., Groisillier, A., Tonon, T., and Boyen, C. (2008). New members of the glutathione transferase family discovered in red and brown algae. Biochem. J. **412**: 535–44.

Honeyman, A.L. and Curtiss, R. (1992). Isolation, characterization, and nucleotide sequence of the Streptococcus mutans mannitol-phosphate dehydrogenase gene and the mannitol-specific factor III gene of the phosphoenolpyruvate phosphotransferase system. Infect. Immun. **60**: 3369–75.

Hörer, S., Stoop, J., Mooibroek, H., Baumann, U., and Sassoon, J. (2001). The crystallographic structure of the mannitol 2-dehydrogenase NADP+ binary complex from Agaricus bisporus. J. Biol. Chem. **276**: 27555–61.

Hu, L., Lu, H., Liu, Q., Chen, X., and Jiang, X. (2005). Overexpression of mtlD gene in transgenic Populus tomentosa improves salt tolerance through accumulation of mannitol. Tree Physiol. **25**: 1273–81.

Hult, K. and Gatenbeck, S. (1979). Enzyme Activities of the Mannitol Cycle and some Connected Pathways in Alternaria alternata, with Comments on the Regulation of the Cycle. Acta Chem. Scand. **B**: 239–243.

Ikawa, T., T, W., and Nisizawa, K. (1972). Enzymes involved int he last steps of the biosynthesis of mannitol in brown algae. Plant Cell Physiol. **13**: 1017–1029.

Iwamoto, K., Kawanobe, H., Ikawa, T., and Shiraiwa, Y. (2003). Characterization of Salt-Regulated Mannitol-1-Phosphate Dehydrogenase in the Red Alga Caloglossa continua 1. Society **133**: 893–900.

Iwamoto, K., Kawanobe, H., Shiraiwa, Y., and Ikawa, T. (2001). Purification and Characterization of Mannitol-l-Phosphatase in the Red Alga Caloglossa continua (Ceramiales, Rhodophyta). Mar. Biotechnol. (NY). **3**: 493–500.

Iwamoto, K. and Shiraiwa, Y. (2005). Salt-regulated mannitol metabolism in algae. Mar. Biotechnol. (NY). **7**: 407–15.

Jacobsen, J.H. and Frigaard, N.-U. (2014). Engineering of photosynthetic mannitol biosynthesis from CO2 in a cyanobacterium. Metab. Eng. **21**: 60–70.

Jennings, D.B., Daub, M.E., Pharr, D.M., and Williamson, J.D. (2002). Constitutive expression of a celery mannitol dehydrogenase in tobacco enhances resistance to the mannitol-secreting fungal pathogen Alternaria alternata. Plant J. **32**: 41–9.

Jennings, D.B., Ehrenshaft, M., Pharr, D.M., and Williamson, J.D. (1998). Roles for mannitol and mannitol dehydrogenase in active oxygen-mediated plant defense. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **95**: 15129–33.

Jörnvall, H. and Persson, B. (1995). Short-chain dehydrogenases/reductases (SDR). Biochemistry **34**.

Juchaux-Cachau, M., Landouar-Arsivaud, L., Pichaut, J.-P., Campion, C., Porcheron, B., Jeauffre, J., Noiraud-Romy, N., Simoneau, P., Maurousset, L., and Lemoine, R. (2007). Characterization of AgMaT2, a plasma membrane mannitol transporter from celery, expressed in phloem cells, including phloem parenchyma cells. Plant Physiol. **145**: 62–74.

Karakas, B. and Collins, F. (1997). Salinity and drought toierance of mannitol-accumulating transgenic tobacco.: 609–616.

Karsten, U., Barrow, K.., West, J.A., and King, R.J. (1997a). Mannitol metabolism in the intertidal mangrove red alga Caloglossa leprieurii : salinity effects on enzymatic activity. Phycologia **36**: 150–156.

Karsten, U., Barrow, K.D., Nixdorf, O., West, J.A., and King, R.J. (1997b). Characterization of mannitol metabolism in the mangrove red alga Caloglossa ieprieurii (Montagne) J.Agardh. Planta **49**: 173–178.

Karsten, U., West, J. a., Mostaert, a. S., King, R.J., Barrow, K.D., and Kirst, G.O. (1992). Mannitol in the Red Algal Genus Caloglossa (Harvey) J. Agardh. J. Plant Physiol. **140**: 292–297.

Kavanagh, K.L., Klimacek, M., Nidetzky, B., and Wilson, D.K. (2002). Crystal structure of Pseudomonas fluorescens mannitol 2-dehydrogenase binary and ternary complexes. Specificity and catalytic mechanism. J. Biol. Chem. **277**: 43433–42.

Kavanagh, K.L., Klimacek, M., Nidetzky, B., and Wilson, D.K. (2003). Crystal structure of Pseudomonas fluorescens mannitol 2-dehydrogenase: evidence for a very divergent long-chain dehydrogenase family. Chem. Biol. Interact. **143-144**: 551–8.

Keeling, P.J. (2004). DIVERSITY AND EVOLUTIONARY HISTORY OF PLASTIDS AND THEIR HOSTS. Am. J. Bot. **91**: 1481–1493.

Kirst, G.O. (1975). Beziehungen zwischen mannitkonzentration und osmotischer belastung bei der brackwasseralge Platymonas subcordiformisHazen. Zeitschrift für Pflanzenphysiologie **76**: 316–325.

Klimacek, M. and Nidetzky, B. (2002). Examining the relative timing of hydrogen abstraction steps during NAD(+)-dependent oxidation of secondary alcohols catalyzed by long-chain D-mannitol dehydrogenase from Pseudomonas fluorescens using pH and kinetic isotope effects. Biochemistry **41**: 10158–65.

Krahulec, S., Armao, G.C., Bubner, P., Klimacek, M., and Nidetzky, B. (2009). Polyol-specific long-chain dehydrogenases/reductases of mannitol metabolism in Aspergillus fumigatus: biochemical characterization and pH studies of mannitol 2-dehydrogenase and mannitol-1-phosphate 5-dehydrogenase. Chem. Biol. Interact. **178**: 274–82.

Krahulec, S., Armao, G.C., Klimacek, M., and Nidetzky, B. (2011). Enzymes of mannitol metabolism in the human pathogenic fungus Aspergillus fumigatus--kinetic properties of mannitol-1-phosphate 5-dehydrogenase and mannitol 2-dehydrogenase, and their physiological implications.

Krahulec, S., Armao, G.C., Weber, H., Klimacek, M., and Nidetzky, B. (2008). Characterization of recombinant Aspergillus fumigatus mannitol-1-phosphate 5-dehydrogenase and its application for the stereoselective synthesis of protio and deuterio forms of D-mannitol 1-phosphate. Carbohydr. Res. **343**: 1414–23.

Küpper, F.C., Gaquerel, E., Boneberg, E.-M., Morath, S., Salaün, J.-P., and Potin, P. (2006). Early events in the perception of lipopolysaccharides in the brown alga Laminaria digitata include an oxidative burst and activation of fatty acid oxidation cascades. J. Exp. Bot. **57**: 1991–9.

Küpper, F.C., Kloareg, B., Guern, J., and Potin, P. (2001). Oligoguluronates elicit an oxidative burst in the brown algal kelp Laminaria digitata. Plant Physiol. **125**: 278–91.

Küpper, F.C., Schweigert, N., Ar Gall, E., Legendre, J.-M., Vilter, H., and Kloareg, B. (1998). Iodine uptake in Laminariales involves extracellular, haloperoxidase-mediated oxidation of iodide. Planta **207**: 163–171.

Ladero, V., Ramos, A., Wiersma, A., Goffin, P., Schanck, A., Kleerebezem, M., Hugenholtz, J., Smid, E.J., and Hols, P. (2007). High-level production of the low-calorie sugar sorbitol by Lactobacillus plantarum through metabolic engineering. Appl. Environ. Microbiol. **73**: 1864–72.

Leblanc, C. et al. (2006). Iodine transfers in the coastal marine environment: the key role of brown algae and of their vanadium-dependent haloperoxidases. Biochimie **88**: 1773–85.

Lee, W.E. (1967). Mannitol Acetyl Phosphate Phosphotransferase of Aspergillus. Biochem. Biophys. Res. Commun. **29**: 337–342.

Liberator, P., Anderson, J., Feiglin, M., Sardana, M., Griffin, P., Schmatz, D., and Myers, R.W. (1998). Molecular cloning and functional expression of mannitol-1-phosphatase from the apicomplexan parasite Eimeria tenella. J. Biol. Chem. **273**: 4237–44.

Marsilio, V., Lanza, B., Campestre, C., and Angelis, M. De (2000). Oven-dried table olives: textural properties as related to pectic composition. **1276**: 1271–1276.

Mehta, R.J., Fare, L.R., Shearer, M.E., and Nash, C.H. (1977). Mannitol oxidation in two Micromonospora isolates and in representative species of other actinomycetes. Appl. Environ. Microbiol. **33**: 1013–5.

Meslet-Cladière, L., Delage, L., Leroux, C.J.-J., Goulitquer, S., Leblanc, C., Creis, E., Gall, E.A., Stiger-Pouvreau, V., Czjzek, M., and Potin, P. (2013). Structure/function analysis of a type iii polyketide synthase in the brown alga Ectocarpus siliculosus reveals a biochemical pathway in phlorotannin monomer biosynthesis. Plant Cell **25**: 3089–103.

Michel, G., Tonon, T., Scornet, D., Cock, J.M., and 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 Phytol. **188**: 67–81.

Michel, G., Tonon, T., Scornet, D., Cock, J.M., and 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 Phytol. **188**: 82–97.

Mithöfer, A., Schulze, B., and Boland, W. (2004). Biotic and heavy metal stress response in plants: evidence for common signals. FEBS Lett. **566**: 1–5.

Morris, C. a, Owen, J.R., Thomas, M.C., El-Hiti, G. a, Harwood, J.L., and Kille, P. (2014). Intracellular localization and induction of a dynamic RNA-editing event of macro-algal V-ATPase subunit A (VHA-A) in response to copper. Plant. Cell Environ. **37**: 189–203.

Niehaus, W.G. and Flynn, T. (1994). Regulation of mannitol biosynthesis and degradation by Cryptococcus neoformans. J. Bacteriol. **176**: 651–5.

Noiraud, N., Maurousset, L., and Lemoine, R. (2001). Identification of a mannitol transporter, AgMaT1, in celery phloem. Plant Cell **13**: 695–705.

Novotny, M.J., Reizer, J., Esch, F., and Saier, M.H. (1984). Purification and properties of D-mannitol-1-phosphate dehydrogenase and D-glucitol-6-phosphate dehydrogenase from Escherichia coli. J. Bacteriol. **159**: 986–90.

Nyvall, P., Corre, E., Boisset, C., Barbeyron, T., Rousvoal, S., Scornet, D., Kloareg, B., and Boyen, C. (2003). Characterization of mannuronan C-5-epimerase genes from the brown alga Laminaria digitata. Plant Physiol. **133**: 726–35.

O'Sullivan, L., Murphy, B., McLoughlin, P., Duggan, P., Lawlor, P.G., Hughes, H., and Gardiner, G.E. (2010). Prebiotics from marine macroalgae for human and animal health applications. Mar. Drugs **8**: 2038–64.

Obata, T., Schoenefeld, S., Krahnert, I., Bergmann, S., Scheffel, A., and Fernie, A.R. (2013). Gas-Chromatography Mass-Spectrometry (GC-MS) Based Metabolite Profiling Reveals Mannitol as a Major Storage Carbohydrate in the Coccolithophorid Alga Emiliania huxleyi. Metabolites **3**: 168–84.

Oikawa, T., Nakai, J., Tsukagawa, Y., and Soda, K. (2014). A Novel Type of D-Mannitol Dehydrogenase from Acetobacter xylinum: Occurrence, Purification, and Basic Properties. Biosci. Biotechnol. Biochem. **61**: 1778–1782.

Pal, D., Khozin-Goldberg, I., Didi-Cohen, S., Solovchenko, A., Batushansky, A., Kaye, Y., Sikron, N., Samani, T., Fait, A., and Boussiba, S. (2013). Growth, lipid production and metabolic adjustments in the euryhaline eustigmatophyte Nannochloropsis oceanica CCALA 804 in response to osmotic downshift. Appl. Microbiol. Biotechnol. **97**: 8291–306.

Parida, A.K. and Das, A.B. (2005). Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. Ecotoxicol. Environ. Saf. **60**: 324–49.

Persson, B., Krook, M., and Jornvall, H. (1991). Characteristics of short-chain alcohol dehydrogenases and related enzymes. Eur. J. Biochem. **200**: 543–543.

Peters, A.F., Mann, A.D., Córdova, C. a, Brodie, J., Correa, J. a, Schroeder, D.C., and Cock, J.M. (2010). Genetic diversity of Ectocarpus (Ectocarpales, Phaeophyceae) in Peru and northern Chile, the area of origin of the genome-sequenced strain. New Phytol. **188**: 30–41.

Peters, A.F., Marie, D., Scornet, D., Kloareg, B., and Mark Cock, J. (2004). Proposal of Ectocarpus Siliculosus (Ectocarpales, Phaeophyceae) As a Model Organism for Brown Algal Genetics and Genomics. J. Phycol. **40**: 1079–1088.

Pharr, D.M., STOOP, J.M.H., WILLIAMSON, J.D., FEUSI, M.E.S., MASSEL, M.O., and CONKLING, M.A. (1995). The dual role of mannitol as osmoprotectant and photoassimilate in celery. HortScience **30**: 1182–1188.

Popper, Z. a, Michel, G., Hervé, C., Domozych, D.S., Willats, W.G.T., Tuohy, M.G., Kloareg, B., and Stengel, D.B. (2011). Evolution and diversity of plant cell walls: from algae to flowering plants. Annu. Rev. Plant Biol. **62**: 567–90.

Postma, P.W., Lengeler, J.W., and Jacobson, G.R. (1993). Phosphoenolpyruvate:carbohydrate phosphotransferase systems of bacteria. Microbiol. Rev. **57**: 543–94.

Potin, P., Bouarab, K., Salaün, J.-P., Pohnert, G., and Kloareg, B. (2002). Biotic interactions of marine algae. Curr. Opin. Plant Biol. **5**: 308–317.

Prigent, S., Collet, G., Dittami, S.M., Delage, L., de Corny, F.E., Dameron, O., Eveillard, D., Thiele, S., Cambefort, J., Boyen, C., Siegel, A., and Tonon, T. (2014). The genome-scale metabolic network of Ectocarpus siliculosus (EctoGEM): a resource to study brown algal physiology and beyond. Plant J.: n/a–n/a.

Read, B. a et al. (2013). Pan genome of the phytoplankton Emiliania underpins its global distribution. Nature **499**: 209–13.

Reed, R.H., Davison, I.R., and Chudek, I.A. (1985). The osmotic role of mannitol in the Phaeophyta: an appraisal. Phycologia **24**: 35–47.

Richter, D. and Kirst, G. (1987). D-mannitol dehydrogenase and D-mannitol-1-phosphate dehydrogenase in Platymonas subcordiformis: some characteristics and their role in osmotic adaptation. Planta: 528–534.

Richter, H., De Graaf, A.A., Hamann, I., and Unden, G. (2003). Significance of phosphoglucose isomerase for the shift between heterolactic and mannitol fermentation of fructose by Oenococcus oeni. Arch. Microbiol. **180**: 465–70.

Ritter, A., Dittami, S.M., Goulitquer, S., Correa, J. a, Boyen, C., Potin, P., and Tonon, T. (2014). Transcriptomic and metabolomic analysis of copper stress acclimation in Ectocarpus siliculosus highlights signaling and tolerance mechanisms in brown algae. BMC Plant Biol. **14**: 116.

Ritter, A., Goulitquer, S., Salaün, J.-P., Tonon, T., Correa, J. a, and Potin, P. (2008). Copper stress induces biosynthesis of octadecanoid and eicosanoid oxygenated derivatives in the brown algal kelp Laminaria digitata. New Phytol. **180**: 809–21.

Ritter, A., Ubertini, M., Romac, S., Gaillard, F., Delage, L., Mann, A., Cock, J.M., Tonon, T., Correa, J. a, and Potin, P. (2010). Copper stress proteomics highlights local adaptation of two strains of the model brown alga Ectocarpus siliculosus. Proteomics **10**: 2074–88.

Riveros-Rosas, H., Julian-Sanchez, A., Villalobos-Molina, R., Pardo, J.P., and Pina, E. (2003). Diversity, taxonomy and evolution of medium-chain dehydrogenase/reductase superfamily. Eur. J. Biochem. **270**: 3309–3334.

Rockwell, N.C., Duanmu, D., Martin, S.S., Bachy, C., Price, D.C., Bhattacharya, D., Worden, A.Z., and Lagarias, J.C. (2014). Eukaryotic algal phytochromes span the visible spectrum. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **111**: 3871–6.

Rousvoal, S., Groisillier, A., Dittami, S.M., Michel, G., Boyen, C., and Tonon, T. (2011). Mannitol-1-phosphate dehydrogenase activity in Ectocarpus siliculosus, a key role for mannitol synthesis in brown algae. Planta **233**: 261–73.

Ruijter, G.J.G., Bax, M., Patel, H., Flitter, S.J., van de Vondervoort, P.J.I., de Vries, R.P., VanKuyk, P.A., and Visser, J. (2003). Mannitol is required for stress tolerance in Aspergillus niger conidiospores. Eukaryot. Cell **2**: 690–8.

Rumpho, M.E., Edwards, G.E., and Loescher, W.H. (1983). A pathway for photosynthetic carbon flow to mannitol in celery leaves: activity and localization of key enzymes. Plant Physiol. **73**: 869–73.

Saha, B.C. and Racine, F.M. (2011). Biotechnological production of mannitol and its applications. Appl. Microbiol. Biotechnol. **89**: 879–91.

Sand, M., Mingote, A.I., Santos, H., Müller, V., and Averhoff, B. (2013). Mannitol, a compatible solute synthesized by Acinetobacter baylyi in a two-step pathway including a salt-induced and salt-dependent mannitol-1-phosphate dehydrogenase. Environ. Microbiol. **15**: 2187–97.

Sand, M., Rodrigues, M., González, J.M., de Crécy-Lagard, V., Santos, H., Müller, V., and Averhoff, B. (2014). Mannitol-1-phosphate dehydrogenases/phosphatases: a family of novel bifunctional enzymes for bacterial adaptation to osmotic stress. Environ. Microbiol.: 1–9.

Schmatz, D.M. (1997). The mannitol cycle in Eimeria.

Schmatz, D.M., Baginsky, W.F., and Turner, M.J. (1989). Evidence for and characterization of a mannitol cycle in Eimeria tenella. Mol. Biochem. Parasitol. **32**: 263–70.

Shaltiel-Karyo, R., Frenkel-Pinter, M., Rockenstein, E., Patrick, C., Levy-Sakin, M., Schiller, A., Egoz-Matia, N., Masliah, E., Segal, D., and Gazit, E. (2013). A blood-brain barrier (BBB)

disrupter is also a potent α-synuclein (α-syn) aggregation inhibitor: a novel dual mechanism of mannitol for the treatment of Parkinson disease (PD). J. Biol. Chem. **288**: 17579–88.

Shao, Z., Zhang, P., Li, Q., Wang, X., and Duan, D. (2014). Characterization of mannitol-2-dehydrogenase in Saccharina japonica: evidence for a new polyol-specific long-chain dehydrogenases/reductase. PLoS One **9**: e97935.

Shen, B., Jensen, R.G., and Bohnert, H.J. (1997). Mannitol Protects against Oxidation by Hydroxyl Radicals. Plant Physiol. **115**: 527–532.

Silberfeld, T., Leigh, J.W., Verbruggen, H., Cruaud, C., de Reviers, B., and Rousseau, F. (2010). A multi-locus time-calibrated phylogeny of the brown algae (Heterokonta, Ochrophyta, Phaeophyceae): Investigating the evolutionary nature of the "brown algal crown radiation". Mol. Phylogenet. Evol. **56**: 659–74.

Solomon, P.S., Tan, K.-C., and Oliver, R.P. (2005). Mannitol 1-phosphate metabolism is required for sporulation in planta of the wheat pathogen Stagonospora nodorum. Mol. Plant. Microbe. Interact. **18**: 110–5.

Solomon, P.S., Waters, O.D.C., Jörgens, C.I., Lowe, R.G.T., Rechberger, J., Trengove, R.D., and Oliver, R.P. (2006). Mannitol is required for asexual sporulation in the wheat pathogen Stagonospora nodorum (glume blotch). Biochem. J. **399**: 231–9.

Solomon, P.S., Waters, O.D.C., and Oliver, R.P. (2007). Decoding the mannitol enigma in filamentous fungi. Trends Microbiol. **15**: 257–62.

Stoop, J. and Pharr, D.M. (1994). Mannitol Metabolism in Celery Stressed by Excess Macronutrients. Plant Physiol. **106**: 503–511.

Stoop, J., Williamson, J., and Masonpharr, D. (1996). Mannitol metabolism in plants: a method for coping with stress. Trends Plant Sci. **1**: 139–144.

Stoop, J.M.H. and Mooibroek, H. (1998). Cloning and Characterization of NADP-Mannitol Dehydrogenase cDNA from the Button Mushroom , Agaricus bisporus , and Its Expression in Response to NaCl Stress Cloning and Characterization of NADP-Mannitol Dehydrogenase cDNA from the Button Mushroom , Agari. Appl. Environ. Microbiol. **64**: 4689–4696.

Studier, F.W. (2005). Protein production by auto-induction in high density shaking cultures. Protein Expr. Purif. **41**: 207–34.

Suvarna, K., Bartiss, a, and Wong, B. (2000). Mannitol-1-phosphate dehydrogenase from Cryptococcus neoformans is a zinc-containing long-chain alcohol/polyol dehydrogenase. Microbiology **146 (Pt 1**: 2705–13.

Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., and Kumar, S. (2011). MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. Mol. Biol. Evol. **28**: 2731–9.

Tarczynski, M.C., Jensen, R.G., and Bohnert, H.J. (1992). Expression of a bacterial mtlD gene in transgenic tobacco leads to production and accumulation of mannitol. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **89**: 2600–4.

Tenhaken, R., Voglas, E., Cock, J.M., Neu, V., and Huber, C.G. (2011). Characterization of GDP-mannose dehydrogenase from the brown alga Ectocarpus siliculosus providing the precursor for the alginate polymer. J. Biol. Chem. **286**: 16707–15.

Thomas, F., Cosse, A., Goulitquer, S., Raimund, S., Morin, P., Valero, M., Leblanc, C., and Potin, P. (2011). Waterborne signaling primes the expression of elicitor-induced genes and buffers the oxidative responses in the brown alga Laminaria digitata. PLoS One **6**: e21475.

Thomas, F., Cosse, A., Panse, S. Le, Kloareg, B., and Potin, P. (2014). Kelps feature systemic defense responses : insights into the evolution of innate immunity in multicellular eukaryotes Franc.

Tonon, T., Rousvoal, S., Roeder, V., and Boyen, C. (2008). Expression Profiling of the Mannuronan C5-Epimerase Multigenic Family in the Brown Alga Laminaria Digitata (Phaeophyceae) Under Biotic Stress Conditions 1. J. Phycol. **44**: 1250–1256.

Trail, F. and Xu, H. (2002). Purification and characterization of mannitol dehydrogenase and identification of the corresponding cDNA from the head blight fungus, Gibberella zeae (Fusarium graminearum). Phytochemistry **61**: 791–6.

Ueng, S.T.-H., Hartanowicz, P., Lewandoski, C., Keller, J., Holick, M., and McGuinness, E.T. (1976). D-Mannitol Dehydrogenase from Absidia glauca. Purification, Metabolic Role, and Subunit Interaction. **15**: 1743–1749.

Vélëz, H., Glassbrook, N.J., and Daub, M.E. (2008). Mannitol biosynthesis is required for plant pathogenicity by Alternaria alternata. FEMS Microbiol. Lett. **285**: 122–9.

Vélëz, H., Glassbrook, N.J., and Daub, M.E. (2007). Mannitol metabolism in the phytopathogenic fungus Alternaria alternata. Fungal Genet. Biol. **44**: 258–68.

Voegele, R.T., Hahn, M., Lohaus, G., Link, T., Heiser, I., Mendgen, K., and Germany, R.T. V (2005). Possible Roles for Mannitol and Mannitol Dehydrogenase in the Biotrophic Plant Pathogen Uromyces fabae 1. Society **137**: 190–198.

Wargacki, A.J. et al. (2012). An engineered microbial platform for direct biofuel production from brown macroalgae. Science **335**: 308–13.

Watanabe, S., Hamano, M., Kakeshita, H., Bunai, K., Tojo, S., Yamaguchi, H., Fujita, Y., Wong, S.-L., and Yamane, K. (2003). Mannitol-1-phosphate dehydrogenase (MtlD) is required for mannitol and glucitol assimilation in Bacillus subtilis: possible cooperation of mtl and gut operons. J. Bacteriol. **185**: 4816–24.

Wei, N., Quarterman, J., and Jin, Y.-S. (2013). Marine macroalgae: an untapped resource for producing fuels and chemicals. Trends Biotechnol. **31**: 70–7.

Williamson, J.D., Stoop, J.M., Massel, M.O., Conkling, M. a, and Pharr, D.M. (1995). Sequence analysis of a mannitol dehydrogenase cDNA from plants reveals a function for the pathogenesis-related protein ELI3. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **92**: 7148–52.

Wisselink, H.., Weusthuis, R.., Eggink, G., Hugenholtz, J., and Grobben, G.. (2002). Mannitol production by lactic acid bacteria: a review. Int. Dairy J. **12**: 151–161.

Wisselink, H.W., Moers, A.P.H. a, Mars, A.E., Hoefnagel, M.H.N., de Vos, W.M., and Hugenholtz, J. (2005). Overproduction of heterologous mannitol 1-phosphatase: a key factor for engineering mannitol production by Lactococcus lactis. Appl. Environ. Microbiol. **71**: 1507–14.

Yamaguchi, T., Ikawa, T., and Nisizawa, K. (1969). Pathway of mannitol formation during photosynthesis in brown algae. Plant Cell Physiol. **10**: 425–440.

Ye, R.-X., Yu, Z., Shi, W.-W., Gao, H.-J., Bi, Y.-H., and Zhou, Z.-G. (2013). Characterization of α-type carbonic anhydrase (CA) gene and subcellular localization of α-CA in the gametophytes of Saccharina japonica. J. Appl. Phycol. **26**: 881–890.

Ymele-Leki, P., Houot, L., and Watnick, P.I. (2013). Mannitol and the mannitol-specific enzyme IIB subunit activate Vibrio cholerae biofilm formation. Appl. Environ. Microbiol. **79**: 4675–83.

Zerbato, M., Holic, N., Moniot-Frin, S., Ingrao, D., Galy, A., and Perea, J. (2013). The brown algae Pl.LSU/2 group II intron-encoded protein has functional reverse transcriptase and maturase activities. PLoS One **8**: e58263.

Zhifang, G. and Loescher, W.H. (2003). Expression of a celery mannose 6-phosphate reductase in Arabidopsis thaliana enhances salt tolerance and induces biosynthesis of both mannitol and a glucosyl-mannitol dimer.: 275–283.

Les algues brunes sont des organismes photosynthétiques multicellulaires appartenant à la lignée des straménopiles, et dont l'habitat principal est la zone intertidale. Une de leurs caractéristiques métaboliques est d'utiliser le mannitol (polyalcool à six atomes de carbone) comme forme de stockage du carbone issu de la photosynthèse. Le métabolisme du mannitol chez ces organismes fait intervenir quatre enzymes, deux pour la synthèse et deux pour le recyclage, regroupées dans le cycle du mannitol. Parmi les algues brunes, *Ectocarpus siliculosus* est l'organisme modèle pour étudier différents aspects de leur biologie. Au cours de la thèse, trois gènes de cette algue codant pour les enzymes responsables de la première étape du cycle du mannitol, la mannitol-1-phosphate déshydrogénase (M1PDH), ont été étudiés (*EsM1PDH1*, *EsM1PDH2*, et *EsM1PDH3*). Les M1PDHs catalysent une réaction réversible entre le fructose-6-phosphate et le mannitol-1-phosphate. Une analyse phylogénétique basée sur la comparaison de M1PDHs caractérisées

chez différents organismes (bactéries, champignons, algues, Apicomplexa) suggère que les M1PDHs d'algues brunes et d'Apicomplexa constituent un nouveau groupe parmi les Polyol-specific long-chain dehydrogenases and reductases. Une version du gène *EsM1PDH,* codant pour une protéine tronquée en N-terminal afin d'éliminer un domaine de fonction inconnue, a été surexprimé chez la bactérie *Escherichia coli*. La protéine recombinante tronquée a été purifiée et caractérisée au niveau biochimique, notamment pour déterminer ses paramètres cinétiques dans les deux sens de la réaction catalysée par les M1PDHs. Ces résultats ont été complétés par l'analyse de l'expression des gènes codant pour les enzymes du cycle du mannitol chez *E. siliculosus* au cours du cycle diurnal. L'ensemble de ces observations contribue à mieux comprendre une voie métabolique clé dans la physiologie des algues brunes.

Brown algae are multicellular photosynthetic organisms belonging to the stramenopile lineage and which are mainly found in the intertidal zone. One of their metabolic characteristics is to store carbon fixed by photosynthesis through the production of mannitol, a 6-carbon non-cyclic polyol. Synthesis and recycling of mannitol in these organisms occur through the mannitol cycle, which includes two steps for synthesis and two steps for recycling. Among brown algae, *Ectocarpus siliculosus* represents the model organism to study different aspects of their biology. During this PhD thesis, three genes coding for the enzyme involved in the first step of the mannitol cycle, the mannitol-1-phosphate dehydrogenase (M1PDH), were studied (*EsM1PDH1*, *EsM1PDH2*, and *EsM1PDH3*). M1PDHs catalyze a reversible reaction between fructose-6-phosphate and mannitol-1-phosphate. A phylogenetic analysis based on comparison of M1PDHs characterized from diverse organisms (bacteria, fungi, alga, and Apicomplexa) suggests that M1PDH from brow algae and Apicomplexa form a new group among the Polyol-specific long-chain dehydrogenases and reductases. One modified version of the *EsM1PDH1* gene, coding for a N-terminal truncated protein in order to deleted a domain of unknown function, was overexpressed in the bacteria *Escherichia coli*. The truncated recombinant protein was purified and biochemically characterized, notably to determine kinetic parameters in both directions of the reversible reaction catalyzed by M1PDH. These results were completed by analysis of changes in expression of genes encoding enzymes involved in the mannitol cycle during the diurnal cycle. These observations contribute to increasing the understanding of a key metabolic pathway in brown algal physiology.