

## APPELS À SUJETS 2020 CONCOURS DE L'ÉCOLE DOCTORALE 227 MNHN-SU

### Sujet de la thèse

Découverte des enzymes algales pour la sulfatation des polysaccharides de leurs matrices extracellulaires

### UMR

UMR8227

### Équipe

Glycobiologie Marine (GM)

### Directeur de thèse HDR

MICHEL, Gurvan (DR1 CNRS, HDR)

### Nom et prénom

Michel, Gurvan

### Mail :

[gurvan.michel@sb-roscoff.fr](mailto:gurvan.michel@sb-roscoff.fr)

### Co-directrice de thèse

Ficko-Blean, Elizabeth (CR1 CNRS)

Mail : [efickoblean@sb-roscoff.fr](mailto:efickoblean@sb-roscoff.fr)

### Rôle dans l'encadrement de la thèse

Gurvan Michel (DR1 CNRS, HDR) sera le directeur de la thèse avec une co-direction d'Elizabeth Ficko-Blean (CR1 CNRS, [efickoblean@sb-roscoff.fr](mailto:efickoblean@sb-roscoff.fr)) porteuse du projet.

### Publications récentes des directeurs de thèse avec leurs anciens doctorants

*(5 doctorants maximum)*

#### **Anaïs Naretto (2015-18, ED 515)**

Naretto A, Fanuel M, Ropartz D, Rogniaux H, Larocque R, Czjzek M, Teillier C\* and **Michel G\*** (2019) The agar-specific hydrolase ZgAgaC from the marine bacterium *Zobellia galactanivorans* defines a new GH16 protein subfamily, **Journal of Biological Chemistry**, 294, 6923-6939.

#### **Aurore Labourel (2010-13, ED 397 iViv)**

Jam M, **Ficko-Blean E**, Labourel A, Larocque R, Czjzek M, **Michel G\*** (2016) Unraveling the multivalent binding of a marine family 6 carbohydrate-binding module with its native laminarin ligand. *FEBS Journal*, 283, 1863-1879.

Groisillier A, Labourel A, **Michel G** and Tonon T (2015) The mannitol utilization system of the marine bacterium *Zobellia galactanivorans*. *Applied and Environmental Microbiology*, 81, 1799-1812.

Labourel A, Jam M, Legentil L, Sylla B, Hehemann JH, Ferrières V, Czjzek M and **Michel G\*** (2015) Structural and biochemical characterization of the laminarinase ZgLam<sub>GH16</sub> from *Zobellia galactanivorans* suggests a preferred recognition of branched laminarin. *Acta Crystallographica D71*, 173-184.

Labourel A, Jam M, Jeudy A, Hehemann JH, Czjzek M, **Michel G\*** (2014) The  $\beta$ -glucanase ZgLamA from *Zobellia galactanivorans* evolved a bent active site adapted for an efficient degradation of algal laminarin. *Journal of Biological Chemistry*, 289, 2027-2042.

#### **François Thomas (2008-11, ED 397 iViv)**

Thomas F, Bordron P, Eveillard D, **Michel G\*** (2017) Gene expression analysis of *Zobellia galactanivorans* during the degradation of algal polysaccharides reveals both substrate-specific and shared transcriptome-wide responses. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1808.

Thomas F, Lundqvist LC, Jam M, Jeudy A, Barbeyron T, Sandström C, **Michel G**, Czjzek M. (2013) Comparative characterization of two marine alginate lyases from *Zobellia galactanivorans* reveals distinct modes of action and exquisite adaptation to their natural substrate. *Journal of Biological Chemistry*, 288, 23021-23037

Thomas F, Barbeyron T, Tonon T, Genicot S, Czjzek M and **Michel G\*** (2012) Characterization of the first alginolytic operons in a marine bacterium: From their emergence in marine *Flavobacteriia* to their independent transfers to marine *Proteobacteria* and human gut *Bacteroides*. *Environmental Microbiology*, 14, 2379-94.

Thomas F, Hehemann JH, Rebuffet E, Czjzek M and **Michel G\*** (2011) Gut and environmental *Bacteroidetes*: the food connection. *Frontiers in Microbiology*, 2, 93.

Thomas F, Barbeyron T and **Michel G\*** (2011) Evaluation of reference genes for real time quantitative PCR in the marine flavobacterium *Zobellia galactanivorans*. *Journal of Microbiological Methods*, 84, 61-66.

#### **Etienne Rebuffet (2007-10, ED 397 iViv)**

**Ficko-Blean E**, Duffieux D, Rebuffet E, Larocque R, Groisillier A, **Michel G\*** and Czjzek M\* (2015) Biochemical and structural investigation of two paralogous glycoside hydrolases from *Zobellia galactanivorans*: novel insights into the evolution, dimerization plasticity and catalytic mechanism of the GH117 family. *Acta Crystallographica D71*, 209-223.

Fournier JB, Rebuffet E, Delage L, Grijol R, Meslet-Cladière L, Rzonca J, Potin P, **Michel G**, Czjzek M and Leblanc C (2014) The bacterial vanadium iodoperoxidase from the marine Flavobacteriaceae *Zobellia galactanivorans* reveals novel molecular and evolutionary features of halide specificity in this enzyme family. *Applied and Environmental Microbiology*, 80, 7561-7573.

Rebuffet E, Groisillier A, Thompson A, Jeudy A, Barbeyron T, Czjzek M\* and **Michel G\*** (2011) Discovery and structural characterization of a novel glycosidase family of marine origin. *Environmental Microbiology*, 13, 1253-1270.

Rebuffet E, Barbeyron T, Jeudy A, Jam M, Czjzek M and **Michel G\*** (2010) Identification of catalytic residues and mechanistic analysis of family GH82  $\iota$ -carrageenases. *Biochemistry*, 49, 7590–7599.

Groisillier A, Hervé C, Jeudy A, Rebuffet E, Chevolut Y, Pluchon PF, Flament D, Geslin C, Morgado I, Power D, Branno M, Moreau H, **Michel G**, Boyen C and Czjzek M (2010) MARINE-EXPRESS: taking advantage of high throughput cloning and expression strategies for the post-genomic analysis of marine organisms. *Microbial Cell Factories*, 9, 45.

#### **Jan-Hendrik Hehemann (2006-09, ED 397 iViv)**

Hehemann JH, Correc G, Thomas F, Bernard T, Barbeyron T, Jam M, Helbert W, **Michel G\***, Czjzek M\* (2012) Biochemical and structural characterization of the complex agarolytic enzyme system from the marine bacterium *Zobellia galactanivorans*. *Journal of Biological Chemistry*, 287, 30571-84

Hehemann J-H, Correc G, Barbeyron T, Helbert W, Czjzek M\* and **Michel G\*** (2010) Transfer of carbohydrate-active enzymes from marine bacteria to Japanese gut microbiota. *Nature*, 464, 908-912.

Hehemann J-H, **Michel G**, Barbeyron T and Czjzek M. (2010) Expression, purification and preliminary X-ray diffraction analysis of the catalytic module of a  $\beta$ -agarase from the flavobacterium *Zobellia galactanivorans*. *Acta Crystallographica F*, 66, 413-417.

Hehemann J-H, G Correc, **G Michel**, W Helbert, T Barbeyron, M Czjzek. Porphyranases, and use thereof for hydrolyzing polysaccharides. **Brevet international**. Dépôt 20 juillet 2010, WO2011010062 A1.

#### Descriptif du sujet de thèse et méthodes envisagées

Les carraghénanes sont des galactanes sulfatés présents uniquement dans la matrice extracellulaire des algues rouges. Sous l'égide du laboratoire LBI2M (SBR Roscoff), le génome de l'algue rouge carraghénophyte *Chondrus crispus* a été séquencé<sup>1</sup>. Son contenu a révélé plusieurs enzymes pouvant être impliquées dans la biosynthèse des carraghénanes, notamment des sulfotransférases (ST), qui ajoutent des groupements sulfate à des accepteurs en utilisant le donneur de sulfate 3'phosphoadenosine-5'phosphosulfate (PAPS).

Ce projet doctoral portera sur les 10 ST identifiées dans le génome de *C. crispus*. Notre hypothèse principale est que ces ST seraient actives sur les carraghénanes. Nous posons donc les questions suivantes : (i) Si ces ST sont bien actives sur les carraghénane quelles sont leurs spécificités exactes? (ii) Comment ces ST interagissent avec leurs substrats au niveau structural ? (iii) Après avoir déterminé les spécificités fines des ST par une analyse structure / fonction, comment ces nouvelles données expérimentales modifieraient notre compréhension de la voie biosynthétique des carraghénanes et de l'évolution des matrices extracellulaires eucaryotiques en général. Ce dernier point prend tout son relief sachant que les ST des algues rouges sont homologues des ST impliquées dans la biosynthèse des glycosaminoglycanes de la matrice extracellulaire des animaux<sup>1</sup>.

Le projet se focalisera sur la caractérisation structurale et biochimique de ces ST. Les protéines recombinantes seront produites dans *Escherichia coli* et purifiées par des méthodes chromatographiques. En cas d'échec, les protéines seront soumises à des essais de production dans la levure. Les ST peuvent agir soit sur des précurseurs d'oligo-carraghénanes, soit au niveau d'une chaîne de carraghénane mature. Les ST devraient donc être plus actives sur des substrats partiellement ou totalement désulfatés. L'équipe Glycobiologie Marine (GM) possède les outils enzymatiques nécessaires pour produire les substrats oligosaccharidiques permettant de tester avec succès les activités et les spécificités des ST<sup>2</sup>. Les oligo-carraghénanes ainsi obtenus seront désulfatés par hydrolyse enzymatique à l'aide de sulfatases<sup>2</sup> et utilisés comme molécules substrats. La présence d'un groupement sulfate résultant d'une activité ST sera mise en évidence en utilisant des méthodes analytiques telles que la chromatographie liquide haute pression (HPLC), l'électrophorèse de glucides

assistée par fluorophore (FACE) ou par l'électrophorèse de carbohydrates natifs en gels de polyacrylamide (C-PAGE). Afin d'analyser la spécificité des ST, la position des groupements sulfates dans les produits obtenus pourra aussi être déterminée en utilisant d'autres techniques comme la chromatographie liquide en couche mince (TLC), la spectrométrie de masse et la résonance magnétique nucléaire du proton (RMN <sup>1</sup>H). Des études de mutagenèse dirigée sur les ST seront aussi effectuées. Notamment les acides aminés du site actif seront mutés pour établir leur rôle dans la catalyse et/ou la reconnaissance des substrats. Des expériences de calorimétrie seront menées pour caractériser les paramètres thermodynamiques des interactions protéine-glucide. Enfin, la cristallographie aux rayons X permettra de déterminer la structure 3D des ST, notamment en complexes avec leurs substrats, produits ou inhibiteurs. Ces études structure / fonction permettront de mieux comprendre les déterminants moléculaires de la reconnaissance des oligo-carraghénanes par ces ST.

La caractérisation de ST actives sur les carraghénanes devrait révéler des systèmes de reconnaissance de polysaccharides complexes hautement spécialisés. Les résultats obtenus devraient améliorer notre compréhension des voies de biosynthèse des carraghénanes et permettre une meilleure compréhension de l'évolution des matrices extracellulaires. En effet les homologues les plus proches des ST d'algues rouges sont les ST animales impliquées dans la biosynthèse des glycosaminoglycanes sulfatés (héparane, chondroïtine), suggérant que la biosynthèse des polysaccharides sulfatés est une voie ancestrale commune entre les animaux et les algues rouges<sup>1</sup>. Cette observation soulève la possibilité intéressante de développer une boîte à outils unique d'enzymes modifiant la paroi cellulaire algale avec la possibilité future de concevoir rationnellement la biosynthèse et la modification d'oligosaccharides (sulfatés) ayant un fort potentiel bioactif.

1. Collen J et al. Proc Natl Acad Sci U S A 2013.
2. Ficko-Blean et al. Nature Communications, 2017

### Stratégie de publication

Il y a très peu d'enzymes d'algues caractérisées. Ce projet de thèse sera la première étude sur des sulfotransférases d'algues, ayant à la fois un impact fondamental (compréhension de voie de biosynthèse de polysaccharides pariétaux) et biotechnologique (enzymes de modification de polysaccharides sulfatés). Ces travaux seront publiables dans les journaux internationaux généralistes (e.g. PNAS), de biochimie (e.g. Journal of Biological Chemistry, Glycobiology) ou de biologie végétale (e.g. Plant Cell, New Phytologist).

Nous avons une « boîte à outils » d'enzymes bactériennes marines uniquement disponibles au sein de l'équipe de Glycobiologie Marine (e.g. kappa-, iota- et lambda-carraghénases, 3,6-anhydro-D-galactosidases, sulfatases spécifiques des carraghénanes)<sup>2</sup>. Ces enzymes seront utilisées pour produire des oligosaccharides substrats (sulfatés ou non-sulfatés) pour les ST. La préparation enzymatique de tels substrats pour des ST sera publiée indépendamment dans des journaux de glycobiologie ou de glycochimie (e.g. Carbohydrate Polymer, Carbohydrate Research).

## Faisabilité en trois ans avec échéancier

Comme la production recombinante de protéines eucaryotes est difficile, une procédure de clonage à moyen débit à partir d'ADNc sera utilisée pour tous les gènes de ST de *C. crispus* afin de maximiser le nombre de constructions pour les essais de surproduction de protéines. Au cours de la thèse, l'accent sera ensuite mis sur les ST qui auront été exprimée sous forme soluble lors des essais de surexpression de protéines.

Un facteur limitant est la disponibilité commerciale limitée des substrats oligo-carraghénanes. Néanmoins, les algues rouges, en particulier les sporophytes et les gamétophytes de *C. crispus*, sont facilement récoltables à la Station biologique de Roscoff. Une technique d'extraction chimique douce mise au point au laboratoire sera utilisée d'obtenir des carraghénanes purs, ayant une structure native préservée.

## Profil du candidat recherché

Activités:

Conduire toutes les expériences en biologie moléculaire, en production de protéines recombinantes et en biochimie pour des analyses structure / fonction.

Le projet portera surtout sur la production de protéines eucaryotes. Le candidat devra donc avoir une expérience dans la production de protéines en système hétérologue bactérien et/ou dans la levure.

Des compétences en biologie moléculaire (clonage, mutagenèse dirigée, PCR, électrophorèse) sont demandées. La caractérisation des protéines sera effectuée par des techniques structurales et biochimiques. Des compétences en biochimie (e.g. HPLC, calorimétrie) et/ou cristallographie des rayons X seraient donc un atout.

De bonnes compétences en communication scientifique (anglais) sont nécessaires.

## Financement hors salaire (missions, séminaires, fonctionnement, ...)

Gurvan MICHEL a coordonné récemment le projet ANR Blue Enzymes (ANR-14-CE19-0020, 2015-2019) et le projet Algolife pour la SBR (projet financé par BPI France, 2014-2019). Il est actuellement le coordinateur du projet ANR Breaking Alg (ANR-18-CE43-0003). Le sujet de thèse proposé est proche thématiquement de ces projets qui s'intéressent aussi à des enzymes spécifiques des polysaccharides d'algues. L'équipe GM possède donc les fonds propres pour assurer le fonctionnement, les missions et les participations à des congrès du futur doctorant.

## Disponibilité du matériel nécessaire le cas échéant

A la Station Biologique de Roscoff il y a des plateformes technologiques en microscopie, séquençage, transcriptomique, protéomique, bioinformatique, et cristallisation des protéines. La SBR est idéalement située sur la côte nord de la Bretagne et les algues rouges sauvages y sont facilement récoltables.

Au sein de l'UMR8227, le groupe GM est un leader international dans le domaine des enzymes spécifiques des polysaccharides de macroalgues, couvrant de multiples approches : biochimie, structures des protéines, glycobiologie, génomique et génétique. Le groupe GM dirige la plateforme cristallographique de la SBR et bénéficie d'un accès régulier à SOLEIL, le synchrotron Français. Les collaborations externes sont également en place pour la caractérisation structurale des oligosaccharides (collaboration avec la plateforme BIBS, INRA Nantes).