



**HAL**  
open science

# Étude des glutathion S-transférases chez les algues brunes *Laminaria digitata* et *Ectocarpus siliculosus*

Pierre-Olivier de Franco

► **To cite this version:**

Pierre-Olivier de Franco. Étude des glutathion S-transférases chez les algues brunes *Laminaria digitata* et *Ectocarpus siliculosus*. Génomique, Transcriptomique et Protéomique [q-bio.GN]. Rennes 1, 2009. Français. NNT: . tel-01110214

**HAL Id: tel-01110214**

**<https://hal.sorbonne-universite.fr/tel-01110214>**

Submitted on 27 Jan 2015

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Distributed under a Creative Commons Attribution - NonCommercial - NoDerivatives 4.0 International License

N° ORDRE : **3816**  
de la thèse

**THESE**

Présentée

**DEVANT L'UNIVERSITE DE RENNES 1**

pour obtenir

le grade de **DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE RENNES 1**

Mention Biologie

par

**Pierre-Olivier de FRANCO**

Equipe d'accueil : Génomique fonctionnelle des algues, UMR 7139 CNRS/UPMC, Végétaux  
Marins et Biomolécules, Station Biologique de Roscoff

Ecole Doctorale : Vie-Agro-Santé

Composante universitaire : Université Pierre et Marie Curie, Paris VI

**Etude des glutathion S-transférases chez les algues brunes**  
***Laminaria digitata* et *Ectocarpus siliculosus***

Soutenue le 6 mars 2009 devant la commission d'Examen

Dr David MACHEREL	Pr. Université d'Angers	Rapporteur
Dr Arnaud HUVET	C.R. IFREMER, Brest	Rapporteur
Dr Alain BOUCHEREAU	Pr. Université Rennes 1	Examineur
Dr Fabrice MOREL	D.R. INSERM, Rennes	Examineur
Dr Thierry TONON	M.C.U. UPMC, Paris VI	Co-directeur de thèse
Dr Catherine BOYEN	D.R. CNRS	Directrice de thèse



*" Qui persévère, n'ira pas à la pêche..."*



# REMERCIEMENTS

Je remercie vivement Catherine Boyen, directrice de l'UMR 7139 et directrice de thèse. Combiner ces deux tâches ne fut pas une chose facile et j'ai beaucoup apprécié la confiance et la grande liberté que tu m'as accordée. Je te remercie pour ton écoute, ta patience et ta compréhension malgré toutes les contraintes que je t'ai imposées. J'ai beaucoup de respect pour toi et j'admire ta personnalité scientifique, ce fut un plaisir de travailler à tes côtés.

Je remercie chaleureusement Thierry Tonon, mon co-directeur de thèse, sans qui cette thèse ne se serait pas aussi bien déroulée. Merci pour ton encadrement quotidien, tes mises au point, tes nombreuses questions qui m'ont toujours obligé à plus de rigueur, merci pour les manipes que tu as fait pour moi ! Merci pour tes corrections d'articles et du manuscrit de thèse. J'ai une très grande confiance en toi et avec toi j'ai appris le sens du mot responsabilité ... Andrés peut le confirmer, avec toi les thésards sont bien encadrés ! Je te souhaite une longue carrière dans le monde de la recherche et j'espère que tu y trouveras le succès que tu mérites.

Je remercie les autres membres de l'équipe Jonas Collén, Agnès Groisillier, Simon Dittami et tout particulièrement, Sylvie Rousvoal avec qui j'ai collaboré. Merci d'avoir répondu présent quand j'ai compté sur vous. J'espère que vous continuerez un peu de l'histoire des GST !

J'adresse également toute ma reconnaissance à David Macherel, Arnaud Huvet, Fabrice Morel et Alain Bouchereau, qui m'ont fait l'honneur de juger ce travail. Je remercie également les membres de mon comité de thèse, Patrick Cormier, Ivan Coué et mon tuteur Fabrice Morel, pour leurs critiques et leurs conseils qui ont eu un impact dans la gestion de ces travaux.

Je voudrais remercier ici toutes les personnes de l'UMR 7139 de la Station Biologique qui m'ont apporté leur aide et leurs conseils, et qui ont contribué à une atmosphère de travail dynamique et enrichissante. Merci à tous les thésards Andrés Ritter, Maud Lemoine, Jérôme Dabin, Diane Jouanneau, Simon Dittami, François Thomas, Aude Lebail, Jan-Hendrick Hehemann, Etienne Rebuffet, Stéphanie Salaün et Bernhard Gschloessl (oui je sais je suis un tout petit peu ...), merci aux moins jeunes mais jeunes qd même, Audrey Cosse, Gaëlle Correc, Ludovic Delage, Sébastien Colin, Gurvan Michel, Sabine Génicot, Pi Nyvall et les séniors Philippe Potin, Tristan Barbeyron, Mirjam Czjzek, William Helbert, Mark Cock, Akira Peters

et Bernard Kloareg. Merci à tous pour votre amitié et votre générosité. Je remercie sincèrement Murielle Jam, Delphine Scornet et Maryvonne Saout sur qui j'ai toujours pu compter, et cela depuis le premier jour où je suis arrivé au labo (en octobre 2002 ...). Vous êtes indispensables à cette unité !!! J'ai aussi une pensée toute particulière pour Bénédicte Charrier qui sait d'où je viens (IBP-power) et qui, je l'espère, deviendra une grande chef d'équipe ! Je remercie tout particulièrement Cécile Hervé qui m'a encadré en stage de M2, m'as donné les bases de la rigueur scientifique et a été un exemple dans la réalisation de cette thèse. Tu as laissé une marque au laboratoire et je te souhaite d'y revenir un jour. J'ai essayé de mettre autant d'attention dans l'encadrement d'Eric Guevelou, t'as du potentiel, reste humble mais fonce ;) ! Je remercie aussi Sophie Goulitquer qui a soutenu sa thèse en décembre dernier et avec qui j'ai eu l'occasion de travailler. J'avoue, on n'a pas fait le Nature que j'espérais mais avec un bon spectro, nul doute qu'on serait allé bien loin !!

Il serait criminel de ne pas remercier les locataires du bureau 335, alors dans l'ordre de longévité je remercie la famille Phasme, Captain Igloo, Sushi et bien sûr mes deux compères Maud et Dédé. Merci pour ces trois ans passés dans 12 m<sup>2</sup>, ça crée des liens !! Merci pour tous ces moments de décontractions, ces ragots, ces drôles d'odeurs et toutes les discussions non scientifiques qui sont d'une importance capitale. Merci à toi Andrès pour ces moments de détente qui ont fait de cette thèse un vrai bonheur: les trips de pêche aux bars, les sorties plongée, les saunas, les parties de billard et toutes les conneries dans le bureau. J'ai appris beaucoup de choses à tes côtés et j'espère que cette amitié saura dépasser les frontières du Finistère.

Je remercie également tous les membres de la Station Biologique de Roscoff qui ont partagé mon quotidien pendant plusieurs années: dans l'ordre des bureaux: 3<sup>ème</sup> étage YD: Miguel Frada, Antonio Pagarete, Daniella Mella, Medhi Bendif, Laurence Garczarek (vive la PCRq), Céline Manceau; 2<sup>ème</sup> étage: Guillaume Bouyer (un vrai ami.. merci pour le chat), les Stéphane (Egée et Bach), Nathalie Desban, Frédéric Le Sourd, Pierre Colas (c'est toujours un plaisir de déjeuner avec vous ☺), Nathalie Ouhlen, Robert Belle (notre maître à tous sur la table de pool), Frantz Rigal, Sabrina Le Cam, Taimour Jolly, Valéria Oppliger; 1<sup>er</sup> étage Matthieu Bruneaux, Constance de Villardi, Aurélie Chambouvet; Rez de chaussée: Jean-Bernard Keramoal (pensée émue), Martine Kerizin, sans oublier le docteur L.M Labhite qui n'a toujours pas de boîte aux lettres ! Chez les écolos de LD : Claire Gollety, Gauthier Schaal, Régis Lasbleiz, Vincent Ouisse, Guy Levavasseur (jamais assez remercié), les plongeurs

Wilfried Thomas, Yann Fontanna, Gilles Maron (c'est toujours un plaisir de déjeuner avec vous ☺ bis); Le service info : Gildas Le Corguillé, Erwan Corre et Thierry Descombes, merci les gars, vous m'avez bien aidé ! Et du côté de l'Hôtel de France, l'indispensable Alain Paoli (t'es pas couché ?), Nicole et Christian Sanséau, Barbara Guézennec (n° 299 !), les gars de l'atelier (Jack, continue de siffler) et tout le personnel du Gulf Stream. Vous allez me manquer c'est sûr !

J'ai remercié chaleureusement les membres de l'AJC et plus particulièrement les deux bureaux que j'ai présidé et qui m'ont tant apporté. Merci à Emmanuelle Billard, Baptiste Faure et Damien Guiffant, et à Claire, Maud et Bernhard. Merci à tous ceux qui sont engagés dans les actions de l'association, j'espère que ça continuera !

Je remercie bien évidemment ma famille qui m'a toujours soutenu et qui a fait preuve d'une grande patience. C'est grâce à vous si j'en suis là. Je remercie aussi Sophie Paradis, WL, que j'ai rencontré ici à Roscoff en novembre 2004. Merci de croire en moi et d'avoir accepté de devenir ma femme ! Tu as été ma bouffée d'oxygène pendant ces trois années. Même si la distance est difficile à vivre, elle est riche d'enseignements et forge un couple. C'est avec bonheur que je partagerai ta vie, à Nîmes ou ailleurs. Merci pour les voyages en Sardaigne, aux US (Un jour on habitera à New York, on bossera à l'ONU, ou on ouvrira un restau sur la 5<sup>ème</sup> avenue !), merci pour les leçons de ski... merci pour tout.

Je remercie aussi mes amis, ce groupe fort qui a partagé les grands moments de ma vie. Merci aux thésards qui me comprennent: Martial et Julie, qui ont entamé un processus de colonisation de la planète, Dorian qui mettra plus de temps que moi pour écrire sa thèse, merci à Constance, Nico, Vince, Olive, Solweig, Jul, Tonton, François, Seb, Floflo, Alban, Féfé, Karima ... pour votre amitié.

Et puis dans le désordre, j'ai une pensée pour la West Coast avec Alexandre Degrave, Meryll Martin, Sabine et Dédé ... un module de M2 inoubliable, les colloc' de la maison du bonheur à Taulé: Ludovic Joubin, Marie Voisin, Baptiste Faure et Camille; les potes de la fac d'Orsay : Gilles Beck, Ferréol Braud, Thibault Boutin, Popo (Thomas Polatian), Mout, Lien Bach, Tarik El Melouki, Christophe Belin, l'équipe des doctoriales et puis aussi le club de basket de Plougoum, le golf de Carantec et son parcours gratuit, Snoop Dogg and the dirty beaches, Deezer.fr, voyages-sncf.com, pêcheaubar.com, ma Renault Super 5 volée sur le parking de la gare de Morlaix, les goodies des fournisseurs de labo et tant d'autres choses ...



# SOMMAIRE

## INTRODUCTION

---

<b>1. MODELES BIOLOGIQUES.....</b>	<b>1</b>
1.1 LES MACROALGUES .....	1
1.2 LES CONTRAINTES DE LA ZONE INTERTIDALE .....	2
1.2.1 <i>La lumière</i> .....	3
1.2.2 <i>La température</i> .....	3
1.2.3 <i>La salinité</i> .....	4
1.2.4 <i>L'hydrodynamisme</i> .....	4
1.2.5 <i>Pollutions</i> .....	5
1.3 LA REPOSE AU STRESS CHEZ LES ALGUES .....	5
1.3.1 <i>Le métabolisme oxydatif</i> .....	6
1.3.2 <i>Le métabolisme des oxylipines</i> .....	8
1.3.3 <i>Métabolisme halogéné</i> .....	11
1.4 ÉVOLUTION.....	13
1.5 DEUX MODELES D'ALGUES BRUNES.....	14
1.5.1 <i>Laminaria digitata</i> .....	14
1.5.1.1 Cycle de vie et culture .....	15
1.5.1.2 Ressources génomiques.....	17
1.5.2 <i>Ectocarpus siliculosus</i> .....	18
1.5.2.1 Cycle de vie.....	19
1.5.2.2 Ressources génomiques.....	20
<b>2. LE GLUTATHION .....</b>	<b>22</b>
2.1 METABOLISME.....	24
2.2 LES ENZYMES DU CYCLE $\gamma$ -GLUTAMYL .....	26
2.2.1 <i>Synthèse du glutathion</i> .....	26
2.2.2 <i>Dégradation du glutathion</i> .....	27
2.3 OXYDO-REDUCTION DU GLUTATHION .....	29
2.3.1 <i>Glutathion peroxydases</i> .....	29
2.3.2 <i>Glutathion réductase</i> .....	31
2.4 CONJUGAISON DU GLUTATHION.....	33
2.4.1 <i>Composés exogènes</i> .....	33
2.4.2 <i>Composés endogènes</i> .....	34
2.4.2.1 Les eicosanoïdes.....	34
2.4.2.2 Autres métabolites conjugués.....	37
2.5 LES PHYTOCHELATINES, UN POLYMERE DE GSH .....	38
2.6 MODIFICATIONS DU POOL DE GLUTATHION EN FONCTION DE FACTEURS ENVIRONNEMENTAUX.....	38
2.7 LE GLUTATHION CHEZ LES ALGUES.....	39
<b>3. LES GLUTATHION S-TRANSFERASES .....</b>	<b>42</b>
3.1 HISTORIQUE.....	42
3.2 FONCTION DES GST DANS LA CELLULE: VARIATIONS AUTOUR D'UN MECANISME GENERAL .....	43
3.2.1 <i>Principe de la réaction de conjugaison</i> .....	43
3.2.2 <i>Les GST, des enzymes du métabolisme de détoxification active de composés xénobiotiques</i> .....	44
3.2.3 <i>Phase I:</i> .....	45
3.2.4 <i>Phase II:</i> .....	46
3.2.5 <i>Phase III:</i> .....	46
3.2.6 <i>Adressage pour le transport transmembranaire</i> .....	47
3.2.7 <i>Protection contre les dommages du stress oxydant</i> .....	47
3.2.8 <i>Activité ligandine: fixation non-enzymatique et transport intracellulaire</i> .....	48
3.3 LES GST CYTOSOLIQUES .....	48
3.3.1 <i>Classification</i> .....	48
3.3.2 <i>Nomenclature</i> .....	50
3.3.3 <i>Organisation génomique</i> .....	51
3.3.4 <i>Structure tridimensionnelle des GST</i> .....	52

3.3.4.1	Le domaine I: un motif thioredoxine .....	54
3.3.4.2	Le domaine II .....	56
3.3.4.3	Site de dimérisation .....	56
3.3.4.4	Fixation des substrats .....	57
3.3.4.4.1	Fixation du glutathion: site G .....	58
3.3.4.4.2	Fixation du second substrat: site H .....	59
3.3.4.5	Des résidus responsables de la diversification fonctionnelle .....	59
3.4	LES DIFFERENTES CLASSES DE GST CYTOSOLIQUES ET LEURS PRINCIPALES FONCTIONS .....	61
3.4.1	<i>Theta</i> .....	61
3.4.2	<i>Zeta</i> .....	61
3.4.3	<i>Tau</i> .....	62
3.4.4	<i>Phi</i> .....	63
3.4.5	<i>Lambda</i> .....	63
3.4.6	<i>Delta</i> .....	63
3.4.7	<i>Epsilon</i> .....	63
3.4.8	<i>Omega</i> .....	64
3.4.9	<i>Rho</i> .....	64
3.4.10	<i>Bêta</i> .....	64
3.4.11	<i>Alpha</i> .....	64
3.4.12	<i>Mu</i> .....	65
3.4.13	<i>Pi</i> .....	65
3.4.14	<i>Sigma</i> .....	65
3.4.15	<i>Gamma</i> .....	67
3.4.16	<i>Nu</i> .....	67
3.5	EVOLUTION DES GST CYTOSOLIQUES .....	67
3.5.1	<i>Phase 1</i> .....	68
3.5.2	<i>Phase 2</i> .....	70
3.6	GST KAPPA .....	72
3.6.1	<i>Fonctions</i> .....	73
3.6.2	<i>Structure</i> .....	73
3.7	GST MICROSOMALES .....	74
3.7.1	<i>Fonctions</i> .....	74
3.7.2	<i>Evolution</i> .....	75
3.7.3	<i>Structure des GST microsomales</i> .....	76
3.8	ACTIVITES GST IN VITRO .....	79
3.8.1	<i>Substrats</i> .....	79
3.8.2	<i>Inhibiteurs</i> .....	82
3.9	LES GST CHEZ LES ALGUES .....	82
3.9.1	<i>Des marqueurs biologiques</i> .....	83

## PROBLEMATIQUE

---

<b>1.</b>	<b>CONTEXTE SCIENTIFIQUE.....</b>	<b>85</b>
1.1	LA RECHERCHE DE MARQUEURS MOLECULAIRE DU STRESS CHEZ LES ALGUES .....	85
1.2	CARACTERISATION DES GST DE <i>C. CRISPUS</i> .....	86
1.3	L'ACCES A DES BASES DE DONNEES .....	87
<b>2.</b>	<b>LE PROJET DE THESE .....</b>	<b>88</b>
2.1	QUELLE EST L'IMPORTANCE DU METABOLISME DU GLUTATHION CHEZ <i>E. SILICULOSUS</i> ? .....	88
2.2	QUELLE EST LA CLASSIFICATION DES GST D'ALGUES BRUNE ? .....	88
2.3	COMMENT LES GENES DE GST ONT-ILS EVOLUE AU SEIN DU GENOME D' <i>E. SILICULOSUS</i> ? .....	89
2.4	QUELS TRAITEMENTS DES ALGUES MODIFIENT L'EXPRESSION DES GENES DE GST? .....	89
2.5	QUELS SONT LES SUBSTRATS DES GST D'ALGUES BRUNES ET ROUGES ? .....	89

# MATERIELS ET METHODES

---

<b>1. MATERIEL BIOLOGIQUE</b> .....	<b>91</b>
1.1 LAMINARIA DIGITATA .....	91
1.2 ECTOCARPUS SILICULOSUS .....	91
<b>2. TRAITEMENTS EXOGENES DES SPOROPHYTES DE LAMINARIA DIGITATA ET D'ECTOCARPUS SILICULOSUS</b> .....	<b>92</b>
2.1 COMPOSES CHIMIQUES .....	92
2.2 TRAITEMENTS .....	92
<b>3. TESTS PHYSIOLOGIQUES</b> .....	<b>94</b>
3.1 MESURE DU BURST OXYDATIF .....	94
3.2 DOSAGE DU GLUTATHION .....	94
<b>4. ANALYSES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE</b> .....	<b>95</b>
4.1 OLIGONUCLEOTIDES .....	95
4.2 EXTRACTION DES ACIDES NUCLEIQUES .....	95
4.2.1 <i>Extraction des ARN totaux</i> .....	95
4.2.2 <i>Extraction de l'ADN génomique d'E. siliculosus</i> .....	96
4.2.3 <i>Southern blot</i> .....	96
4.3 ANALYSES DE L'EXPRESSION DES GENES .....	97
4.3.1 <i>Rétro-transcription</i> .....	97
4.3.2 <i>PCR quantitative</i> .....	97
4.3.2.1 <i>Gènes de référence</i> .....	98
4.3.2.2 <i>Calculs</i> .....	98
4.3.2.3 <i>Analyses statistiques</i> .....	99
4.4 SEQUENÇAGE .....	99
<b>5. ANALYSE IN SILICO DES SEQUENCES</b> .....	<b>100</b>
5.1 IDENTIFICATION DE SEQUENCES DE GST DANS LES BASES DE DONNEES .....	100
5.2 ANNOTATION DU GENOME D'ECTOCARPUS SILICULOSUS .....	100
5.3 GESTION ET ANALYSE DES SEQUENCES .....	102
5.3.1 <i>Vector NTi®</i> .....	102
5.4 PHYLOGENIE .....	102
5.5 MODELISATION DES STRUCTURES TRIDIMENSIONNELLES .....	103
<b>6. ANALYSES BIOCHIMIQUES</b> .....	<b>103</b>
6.1 ANALYSES DES PROTEINES.....	103
6.1.1 <i>Extraction</i> .....	103
6.1.2 <i>Dosage des protéines</i> .....	103
6.1.3 <i>Mesure de l'activité GST dans l'extrait protéique total d'algue</i> .....	104
6.2 EXPRESSION HETEROLOGUE ET CARACTERISATION DES GST RECOMBINANTES.....	104
6.2.1 <i>Expression hétérologue chez Escherichia coli</i> .....	104
6.2.2 <i>Extraction des protéines</i> .....	105
6.2.3 <i>Purification par chromatographie sur colonne de nickel</i> .....	106
6.2.4 <i>Analyse de la purification par gel SDS-PAGE</i> .....	106
6.2.5 <i>Dialyse</i> .....	106
6.2.6 <i>Conservation des protéines</i> .....	106
6.2.7 <i>Concentration des protéines</i> .....	106
6.2.8 <i>Chromatographie d'exclusion de taille</i> .....	107
6.2.9 <i>Chromatographie d'échange d'ions</i> .....	108
6.2.10 <i>Western blot</i> .....	108
6.2.11 <i>Expression hétérologue des GST microsomaux chez la levure et obtention de fractions enrichies en microsomes</i> .....	109
6.2.12 <i>Mesures d'activités enzymatiques</i> .....	109
6.2.12.1 <i>Activités transférases</i> .....	110
6.2.12.2 <i>Activités peroxydases</i> .....	111

6.2.12.3	Effets du pH et de la température .....	111
6.2.12.4	Détermination des paramètres cinétiques .....	111
6.2.12.5	Mesure de l'Activité prostaglandine synthase .....	111
6.2.13	<i>Recherche de partenaires protéiques des GST de Laminaria digitata</i> .....	112
6.2.13.1	Extraction des protéines d'algues .....	112
6.2.13.2	Pull-down .....	113

## RESULTATS

---

<b>1.</b>	<b>LE METABOLISME DU GLUTATHION CHEZ <i>E. SILICULOSUS</i></b> .....	<b>121</b>
1.1	MESURE DE LA QUANTITE DE GLUTATHION DANS PLUSIEURS SOUCHES D' <i>E. SILICULOSUS</i> CULTIVEES AU LABORATOIRE .....	121
1.2	LE CUIVRE STIMULE LA PRODUCTION DE GLUTATHION CHEZ <i>E. SILICULOSUS</i> .....	123
1.3	LES GENES DU METABOLISME DU GLUTATHION SONT CONSERVES CHEZ <i>E. SILICULOSUS</i> .....	124
1.4	L'ACTIVITE ENZYMATIQUE GLUTATHION S-TRANSFERASE TOTALE VARIE EN FONCTION DE TRAITEMENTS CHIMIQUES CHEZ <i>E. SILICULOSUS</i> .....	126
<b>2.</b>	<b>ANALYSE DES FAMILLES DE GLUTATHION S-TRANSFERASES CHEZ LES ALGUES BRUNES <i>L. DIGITATA</i> ET <i>E. SILICULOSUS</i></b> .....	<b>129</b>
2.1	IDENTIFICATION DES GST DANS LES RESSOURCES GENOMIQUES DE MACROALGUES .....	129
2.1.1	<i>Les GST dans les banques d'EST de L. digitata</i> .....	129
2.1.2	<i>Les GST dans les banques d'EST et le génome d'E. siliculosus</i> .....	130
2.1.3	<i>Analyse d'autres banques de macroalgues</i> .....	135
2.1.4	<i>Récapitulatif des séquences de GST identifiées chez L. digitata et E. siliculosus</i> .....	135
<b>3.</b>	<b>CARACTERISATION DES GST CYTOSOLIQUES</b> .....	<b>138</b>
3.1	IDENTITE DES SEQUENCES PROTEIQUES.....	138
3.2	LOCALISATION GENOMIQUE.....	140
3.3	STRUCTURE DES GENES.....	142
3.3.1	<i>LdGST</i> .....	142
3.3.2	<i>EsGST</i> .....	144
3.4	EPISSAGE ALTERNATIF.....	148
3.5	ETUDE PHYLOGENETIQUE DES GST CYTOSOLIQUES DE MACROALGUES .....	150
3.5.1	<i>Position des GST d'algues parmi les GST cytosoliques.</i> .....	150
3.6	ANALYSE DES SEQUENCES PROTEIQUES .....	160
3.6.1	<i>Etude du site de fixation du glutathion</i> .....	162
3.6.2	<i>Etude du site de fixation du second substrat</i> .....	162
3.6.3	<i>Dimérisation</i> .....	163
3.6.4	<i>Localisation des résidus divergents</i> .....	165
3.6.4.1	<i>EsGST Sigma groupe A</i> .....	165
3.6.4.2	<i>EsGST Sigma groupe B</i> .....	169
3.7	CARACTERISATION DES GST MICROSOMALES .....	172
3.7.1	<i>Structure des Gènes</i> .....	172
3.7.2	<i>Analyse des séquences protéiques mEsGST</i> .....	173
3.7.3	<i>Etude phylogénétique des GST microsomales</i> .....	176
3.8	CARACTERISATION DE LA PROTEINE ESGST13, UNE GST KAPPA .....	178
<b>4.</b>	<b>FONCTIONS BIOLOGIQUES DES GLUTATHION S-TRANSFERASES CHEZ LES ALGUES.</b>	<b>180</b>
4.1	ANALYSE DES VARIATIONS D'EXPRESSION DES GENES EN FONCTION DES TRAITEMENTS EXOGENES	180
4.1.1	<i>Laminaria digitata</i> .....	181
4.1.1.1	<i>GST Sigma groupe A</i> .....	182
4.1.1.2	<i>GST Sigma groupe B</i> .....	182
4.1.2	<i>Ectocarpus siliculosus</i> .....	183
4.1.2.1	<i>GST Sigma groupe A</i> .....	183
4.1.2.2	<i>GST Sigma groupe B</i> .....	186
4.1.2.3	<i>GST Kappa</i> .....	189
4.1.2.4	<i>GST microsomales</i> .....	190

4.1.2.5	GST putatives .....	192
4.2	CARACTERISATION DES GST CYTOSOLIQUES RECOMBINANTES.....	194
4.2.1	<i>Expression des gènes en système hétérologue.....</i>	194
4.2.1.1	LdGST1 .....	194
4.2.1.2	LdGST2 .....	196
4.2.1.3	LdGST3 .....	198
4.2.1.4	LdGST4 .....	202
4.2.1.5	EsGST1 .....	204
4.2.1.6	EsGST3 .....	207
4.2.2	<i>Activités enzymatiques des GST recombinantes.....</i>	210
4.2.3	<i>Identification d'inhibiteurs de l'activité enzymatique .....</i>	213
4.2.4	<i>Recherche de partenaires protéiques .....</i>	214
4.2.5	<i>Activité enzymatique de CcGST2 en présence de PGH2.....</i>	215
4.3	CARACTERISATION DE L'ACTIVITE DES GST MICROSOMALES. ....	218

## DISCUSSION

---

<b>1.</b>	<b>LE GLUTATHION CHEZ ECTOCARPUS SILICULOSUS .....</b>	<b>219</b>
1.1	LES ENZYMES DU CYCLE $\gamma$ -GLUTAMYL SONT REPRESENTEES PAR UN FAIBLE NOMBRE DE GENES .....	219
1.1.1	<i>Les enzymes dont l'activité est GST-dépendante sont représentées par un grand nombre de gènes.</i>	220
<b>2.</b>	<b>ORIGINE ET EVOLUTION DES GST D'ALGUES BRUNES.....</b>	<b>222</b>
2.1	CLASSES DE GST DU PROTISTE ANCESTRAL .....	223
2.2	EVOLUTION DE LA CLASSE SIGMA CHEZ LES ALGUES BRUNES .....	226
2.2.1	<i>Structure du gène de GST Sigma ancestral.....</i>	226
2.2.2	<i>Evolution par duplication.....</i>	227
2.2.2.1	Groupes A et B .....	227
2.2.3	<i>Diversification fonctionnelle des paralogues de GST .....</i>	232
2.2.4	<i>Hétérodimérisation.....</i>	233
2.2.5	<i>Elongation des protéines EsGST2 et EsGST9.....</i>	233
2.2.6	<i>Formation de pseudogènes.....</i>	233
2.3	EVOLUTION DE LA CLASSE MGST3 CHEZ LES ALGUES BRUNES. ....	234
2.4	PERTINENCE DE LA CLASSE KAPPA. ....	234
2.5	ORIGINE BACTERIENNE DES GST PUTATIVES D' <i>E. SILICULOSUS</i> .....	235
2.6	PERTE DES CLASSES THETA ET ZETA .....	235
<b>3.</b>	<b>FONCTION BIOLOGIQUE DES FAMILLES DE GST CHEZ LES ALGUES. ....</b>	<b>236</b>
3.1	ACTIVITES ENZYMATIQUES DES GST MICROSOMALES.....	236
3.2	FONCTION DES GST SIGMA CHEZ LES ALGUES.....	236
3.3	EFFETS DES TRAITEMENTS EXOGENES.....	241
3.3.1	<i>L'accumulation de transcrits .....</i>	241
3.3.2	<i>Conditions de traitement .....</i>	241
3.3.3	<i>Les traitements exogènes modifient l'accumulation des transcrits.....</i>	242
3.3.3.1	Stress oxydant .....	242
3.3.3.2	Métaux lourds.....	243
3.3.3.3	Herbicides.....	244
3.3.3.4	Hydrocarbures .....	245
3.3.3.5	Oxylipines .....	245
3.3.3.6	Stress osmotique.....	245
3.3.4	<i>Variations d'expression génique entre paralogues .....</i>	246
3.4	PARTENAIRES PROTEIQUES .....	247

**CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES .....249**

---

**BIBLIOGRAPHIE**

**ANNEXES**

# LISTE DES FIGURES

## INTRODUCTION

---

Figure 1: Zone de balancement des marées à Roscoff. ....	2
Figure 2: Burst oxydatif chez <i>L. digitata</i> en réponse à l'élicitation par des doses croissantes d'oligogulonates, d'après (Küpper et al., 2001). ....	7
Figure 3: Biosynthèse des oxylipines chez les animaux et les plantes supérieures, d'après (Blée, 2002). ....	9
Figure 4: Arbre phylogénétique consensus des eucaryotes (d'après Baldauf, 2003). ....	13
Figure 5: Cycle de vie de <i>Laminaria digitata</i> . ....	15
Figure 6: <i>Laminaria digitata</i> dans son environnement naturel. ....	16
Figure 7: Sporophytes de <i>Laminaria digitata</i> cultivés au laboratoire. ....	17
Figure 8: Protoplastes de <i>Laminaria digitata</i> . ....	17
Figure 9: Planche photographique d' <i>Ectocarpus siliculosus</i> . ....	19
Figure 10: Cycle de vie d' <i>Ectocarpus siliculosus</i> , d'après Charrier et al. (2008). ....	20
Figure 11: Structures du glutathion. ....	23
Figure 12: Métabolisme du glutathion. ....	25
Figure 13: Conjugaison du glutathion et de l'atrazine (1) et de la fosfomycine (2). ....	33
Figure 14: Métabolisme oxydatif de l'acide arachidonique. ....	34
Figure 15: Exemple de composés endogènes conjugués au glutathion, d'après Blair (2006). ..	35
Figure 16: Biosynthèse des leucotriènes en relation avec le métabolisme du glutathion. ....	36
Figure 17 : Détoxification du 4-HNE en relation avec le métabolisme du glutathion. ....	37
Figure 18: Contenu en glutathion cellulaire mesuré dans différentes espèces d'algues brunes et rouges. ....	39
Figure 19: Concentrations de glutathion cellulaire mesurées chez <i>Fucus vesiculosus</i> cultivé à différentes températures. ....	40
Figure 20: Mécanisme de la substitution nucléophile. ....	43
Figure 21: Conjugaison du glutathion (GSH) et du 1-chloro-2,4-dinitrobenzène (CDNB). ....	44
Figure 22: Mécanisme de l'addition nucléophile. ....	44
Figure 23: Biotransformation des xénobiotiques. ....	45
Figure 24: Arbre phylogénétique illustrant les relations unissant les différentes classes de GST cytosoliques. ....	50
Figure 25: Représentation tri-dimensionnelle des sous-unités de différentes classes de GST. ....	53
Figure 26: Représentation de la structure tridimensionnelle de la GST Sigma de rat. ....	55
Figure 27: Mise en évidence des sites de fixation des substrats de la GST Sigma de rat, d'après Kanaoka et al., 1997. ....	57
Figure 28: Interactions entre le glutathion et le site G de 1PD2, d'après Kanaoka et al., 1997. ....	58
Figure 29: Isomérisation du maleylacétoacétate par les GST Zeta. ....	62
Figure 30: Séquestration des anthocyanines par la classe Tau. ....	62
Figure 31: Exemple d'isomérisation de stéroïdes par les GST Alpha, d'après Sheehan et al., 2001. ....	65
Figure 32: Isomérisation de l'acide rétinolique par les GST pi d'après Sheehan et al., 2001. ....	65
Figure 33: Isomérisation de PGH2 en PGD2 catalysée par les GST Sigma de vertébrés, d'après Sheehan et al., 2001. ....	66
Figure 34: Phase 1 du modèle d'évolution des GST, d'après Frova, 2006. ....	68
Figure 35: Schéma des structures secondaires du motif thiorédoxine et des variantes évolutives, d'après Frova, 2006. ....	69

Figure 36: Phase 2 du modèle d'évolution des GST, d'après Frova, 2006. ....	70
Figure 37: Arbre schématique de l'évolution des MAPEG. ....	76
Figure 38: Structure tridimensionnelle de MGST1. ....	78
Figure 39: Exemples d'inhibiteurs de l'activité des glutathion S-transférases. ....	82

## PROBLEMATIQUE

---

Figure 40: Inhibition de la synthèse des prostaglandines chez <i>C. crispus</i> dans des extraits protéiques incubés en présence d'acide arachidonique, d'après (Hervé et al., 2007). ....	87
--	----

## MATERIELS ET METHODES

---

Figure 41. Principe enzymo-colorimétrique du dosage du glutathion. ....	94
Figure 42: Stratégie employée pour annoter manuellement les gènes impliqués dans le métabolisme du glutathion chez l'algue brune d' <i>E. siliculosus</i> . ....	100
Figure 43. Carte du vecteur d'expression pFO4. ....	105
Figure 44. Principe de la chromatographie d'exclusion de taille. ....	107

## RESULTATS

---

Figure 45: Dosage du glutathion total (GSH+GSSG) dans différentes souches d' <i>E. siliculosus</i> cultivées au laboratoire. ....	121
Figure 46: Dosage du pool de glutathion total après différents traitements d' <i>E. siliculosus</i> . ....	123
Figure 47: Activité GST totale dans l'extrait protéique brut d' <i>E. siliculosus</i> . L'activité GST a été déterminée en présence de CDNB. ....	127
Figure 48: Organisation génomique des GST cytosoliques d' <i>E. siliculosus</i> . ....	141
Figure 49: Structure des gènes <i>LdGST1</i> (A), <i>LdGST2</i> (B) et <i>LdGST3</i> (C). ....	143
Figure 50: Structure du gène <i>LdGST4</i> . ....	144
Figure 51: Structure des gènes de GST cytosoliques d' <i>E. siliculosus</i> . ....	145
Figure 52: Alignement des GST cytosoliques et localisation des introns. ....	146
Figure 53: Epissage alternatif des gènes <i>EsGST8</i> et <i>EsGST9</i> . ....	149
Figure 54: Arbre phylogénétique, calculé par la méthode du Minimum Evolution, présentant les relations existantes entre des GST cytosoliques de classes connues et des GST d'algues brunes et rouges. ....	151
Figure 55: Arbre phylogénétique calculé par la méthode du Neighbor Joining, présentant les relations existantes entre les différentes classes de GST cytosoliques et des GST d'algues. ....	153
Figure 56: Arbre phylogénétique des GST de la classe Sigma obtenu par la méthode du Neighbor Joining. ....	156
Figure 57: Arbre phylogénétique des GST de la classe Sigma obtenu par la méthode du maximum de parcimonie. ....	157
Figure 58: Arbre phylogénétique des GST de la classe sigma obtenu par la méthode du Maximum de vraisemblance. ....	158
Figure 59: Arbre phylogénétique des GST de la classe sigma excluant <i>EsGST2</i> obtenu par la méthode du Maximum de vraisemblance. ....	159
Figure 60: Alignement des prostaglandine D synthases humaine (1IYI) et murine (1PD2) avec les GST sigma des groupes A et B de <i>L. digitata</i> et <i>E. siliculosus</i> . ....	161

Figure 61: Alignement protéique des GST Sigma du groupe A d' <i>Ectocarpus</i> avec la PGDS de rat.....	166
Figure 62: Modélisation de la structure de la protéine EsGST6. ....	167
Figure 63: Alignement des GST Sigma du groupe B d' <i>Ectocarpus</i> avec la prostaglandine D synthase de rat. ....	170
Figure 64: Modélisation de la structure de la protéine EsGST12. ....	171
Figure 65: Organisation génomique des gènes de GST microsomales d' <i>E. siliculosus</i> .....	172
Figure 66: Structure des gènes de GST microsomales d' <i>E. siliculosus</i> .....	173
Figure 67: Alignement protéique des mEsGST avec RnMGST1. ....	174
Figure 68: Profil d'hydropathie consensus des mEsGST[1-3]. ....	175
Figure 69: Arbre phylogénétique des MAPEG obtenu par la méthode du Neighbor Joining. ....	177
Figure 70: Structure du gène EsGST13.....	178
Figure 71: Alignement de la protéine EsGST13 avec les GST Kappa humaine et de nématode. ....	179
Figure 72: Mesure de la quantité d'H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> libérée par <i>L. digitata</i> en réponse à différents traitements. ....	181
Figure 73: Profils d'accumulation des transcrits des gènes LdGST après 6h de traitements. ....	182
Figure 74: Modification du profil d'accumulation des transcrits du gène <i>EsGST3</i> en fonction de divers traitements.....	185
Figure 75: Modification du profil d'accumulation des transcrits du gène <i>EsGST9</i> en fonction de divers traitements.....	185
Figure 76: Modification du profil d'accumulation des transcrits du gène <i>EsGST1</i> en fonction de divers traitements.....	187
Figure 77: Modification des profils d'accumulation des transcrits du gène <i>EsGST2</i> en fonction de divers traitements.....	188
Figure 78: Modification du profil d'accumulation des transcrits du gène <i>EsGST12</i> en fonction de divers traitements.....	188
Figure 79: Modification du profil d'accumulation des transcrits du gène <i>EsGST13</i> en fonction de divers traitements.....	189
Figure 80: Modification du profil d'accumulation des transcrits du gène <i>mEsGST1</i> en fonction de divers traitements.....	191
Figure 81: Modification du profil d'accumulation des transcrits du gène <i>mEsGST2</i> en fonction de divers traitements.....	191
Figure 82: Modification du profil d'accumulation des transcrits du gène <i>Esi0047_0117</i> en fonction de divers traitements. ....	193
Figure 83: Modification du profil d'accumulation des transcrits du gène <i>Esi019_0095</i> en fonction de divers traitements. ....	193
Figure 84: Purification de la protéine LdGST1 par chromatographie d'affinité sur colonne de nickel. ....	195
Figure 85: Purification de la protéine LdGST2 par chromatographie d'affinité. ....	197
Figure 86: Purification de la protéine LdGST3 par chromatographie d'affinité. ....	199
Figure 87: Purification de la protéine LdGST3 par chromatographie d'exclusion de taille... ..	200
Figure 88: Analyse par Western blot de la purification des protéines LdGST[1,2,3].....	201
Figure 89: Purification de la protéine LdGST4 par chromatographie d'affinité. ....	203
Figure 90: Purification de la protéine EsGST1 par chromatographie d'affinité.....	205
Figure 91: Purification de la protéine EsGST1 par chromatographie d'échange d'ions.....	206
Figure 92: Purification de la protéine EsGST3 par chromatographie d'affinité.....	208
Figure 93: Purification de la protéine EsGST3 par chromatographie d'échange d'ions.....	209

Figure 94: Détermination des paramètres cinétiques de LdGST3 pour le glutathion par analyse de Lineweaver-Burk. ....	210
Figure 95: Détermination du pH optimal de LdGST3 recombinante. ....	211
Figure 96: Recherche de partenaires protéiques de LdGST3 par pull-down. ....	214
Figure 97: Chromatogrammes d'élution des produits formés après 10 min d'incubation dans différents mélanges réactionnels contenant de la PGH2. ....	216
Figure 98: Proportions de produits formés dans différents mélanges réactionnels. ....	217

## **DISCUSSION**

---

Figure 99: Théorie endosymbiotique, d'après Bhattacharya, 2004. ....	223
Figure 100: Evolution supposée des familles de GST dans les grandes lignées d'eucaryotes. ....	225
Figure 101: Modes de duplication des gènes. ....	228
Figure 102: Phylogénie des algues brunes, d'après (Kawai et al., 2007). ....	229
Figure 103: Modèle d'évolution de la famille multigénique des GST Sigma chez les algues brunes. ....	231

## **CONCLUSIONS**

---

Figure 104: Schéma spéculatif des fonctions présumées des GST d'algues. ....	250
--	-----

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: les différentes classes de glutathion S-transférases cytosoliques et leur répartition majeure dans les différentes lignées du vivant.....	49
Tableau 2: Répartition des GST cytosoliques dans certains génome séquencés. ....	51
Tableau 3: Substrats généralement utilisés pour la détermination de l'activité de conjugaison des GST.....	80
Tableau 4: Substrats généralement utilisés pour la mesure de l'activité peroxydase des GST.....	81
Tableau 5: Activités GST mesurées sur des extraits d'algues, d'après Pflugmacher et al., 1999 et Cairrao et al., 2004. ....	83
Tableau 6: Concentration des produits utilisés pour les traitements exogènes.....	93
Tableau 7: Gamme étalon d'ADN génomique considérée pour les expériences de PCRq chez <i>L. digitata</i> . ....	97
Tableau 8. Gamme étalon d'ADN génomique considérée pour les expériences de PCRq chez <i>E. siliculosus</i> .....	98
Tableau 9. Outils informatiques utilisés pour réaliser l'annotation des gènes potentiellement impliqués dans le métabolisme du glutathion chez d' <i>E. siliculosus</i> .....	101
Tableau 10. Substrats et conditions d'utilisation pour la mesure de l'activité transférase.....	110
Tableau 11: Liste des oligonucléotides utilisés au cours de mon travail de thèse. ....	115
Tableau 12: Numéros d'accension des séquences utilisées pour l'analyse phylogénétique des GST cytosoliques. ....	118
Tableau 13: Numéros d'accension des séquences utilisées pour l'analyse phylogénétique des GST microsomaux. ....	120
Tableau 14: Inventaire des gènes liés au métabolisme du glutathion dans le génome d' <i>E. siliculosus</i> . ....	125
Tableau 15 : Homologues des GST cytosoliques de <i>L. digitata</i> . ....	130
Tableau 16: Homologues des GST cytosoliques d' <i>E. siliculosus</i> .....	131
Tableau 17: Homologues des GST microsomaux d' <i>E. siliculosus</i> . ....	132
Tableau 18: Homologues de la protéine EsGST13. ....	133
Tableau 19: Homologues des GST putatives d' <i>E. siliculosus</i> . ....	134
Tableau 20: Inventaire des différentes familles de GST chez <i>L. digitata</i> et <i>E. siliculosus</i> ....	136
Tableau 21: Pourcentages d'identité et de similarité entre les GST cytosoliques d' <i>E. siliculosus</i> et <i>L. digitata</i> . ....	139
Tableau 22: Pourcentages d'identité entre les différents groupes de GST Sigma.....	160
Tableau 23: Acides aminés impliqués dans la dimérisation des GST Sigma. ....	163
Tableau 24: Identité et similitude des GST microsomaux d' <i>E. siliculosus</i> .....	172
Tableau 25: Pourcentages d'identité entre la protéine EsGST13 et des GST Kappa. ....	178
Tableau 26: Activités enzymatiques des protéines recombinantes. ....	212
Tableau 27: Inhibition de l'activité enzymatique de la protéine LdGST3.....	213
Tableau 28: Activités enzymatiques des GST microsomaux. ....	218
Tableau 29: Classes de GST conservées dans les grand groupes d'eucaryotes.....	224
Tableau 30: Conservation de la position des introns de la classe Sigma dans certaines séquences d'algues brunes . ....	226
Tableau 31: Activité des GST Sigma.....	239

## LISTES DES ABREVIATIONS

AGPI	acide gras polyinsaturé
AOC	allène oxyde cyclase
APX	ascorbate peroxydase
ASK	<i>Apoptosis Stress-related Kinase</i>
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BOGAS	<i>Bioinformatic Online Genome Annotation System</i>
CLIC	canal chlore intracellulaire
COX	cyclooxygénase
CUOOH	cumène hydroperoxyde
CYP450	cytochrome P450
DDT	dichloro-Diphenyl-Trichloroéthane
DHAR	dehydroascorbate réductase
DP	dipeptidase
DsbA	<i>Disulphide bond isomerase</i>
DTNB	acide 5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzoïque
EAO	espèce active de l'oxygène
EET	acide epoxy-eicosatétraénoïque
EST	étiquette de séquence transcrite
FLAP	<i>5-Lipoxygenase Associated Protein</i>
FPLC	<i>Fast Protein Liquid Chromatography</i>
GCLC	glutamate cystéine ligase, sous unité catalytique
GCLM	glutamate cystéine ligase, sous unité régulatrice
GGT	gamma-glutamyl transpeptidase
GPx	glutathion peroxydase
GR	glutathion réductase
GR	glutathion réductase
Grx	glutarédoxine
GS	glutathion synthétase
GSH	glutathion réduit
GSSG	glutathion disulfure
GST	glutathion S-transférase
HCCA	2-hydroxychromène-2-carboxylate isomérase

HEPE	acide hydroxy-eicosapentaénoïque
HETE	acide hydroxy-eicosatétraénoïque
HNE	hydroxynonanal
HODE	acide hydroxy-octadécadiénoïque
HOTrE	acide hydroxy-octadécatriénoïque
HpETE	acide hydroperoxy-eicosatétraénoïque
HRP	<i>Horseraddish peroxidase</i>
HSP	<i>Heat Shock Protein</i>
JNK	<i>c-Jun N-terminal Kinase</i>
KEGG	<i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i>
LOX	lipoxygénase
LTA4	leucotriène A4
LTC <sub>4</sub> S	Leucotriène C4 synthase
MAPEG	<i>Membrane Associated Protein in Eicosanoid and Glutathione metabolism</i>
MeJA	méthyle jasmonate
NADPH	nicotinamine adenine dinucléotide phosphate
ONE	oxononanal
PAGE	<i>PolyAcrylamide Gel Electrophoresis</i>
PAM	<i>Point Accepted Mutation</i>
PG	prostaglandine
PGDS	prostaglandine D2 synthase
PGES	prostaglandine E synthase
PR <sub>x</sub>	péroxyrédoxine
PSI	<i>Pound per Square Inch</i>
SOD	superoxyde dismutase
TNB	acide 5-thio-2-nitrobenzoïque
TR	thiorédoxine réductase
Trx	thiorédoxine
VHOC	composé volatil halogéné



# **INTRODUCTION**

## 1. Modèles Biologiques

---

Le sujet de cette thèse est la caractérisation des glutathion S-transférases (GST) chez les algues brunes *Laminaria digitata* et *Ectocarpus siliculosus*. Il convient donc de réaliser, dans une première partie, un état des lieux de la biologie de ces deux modèles pour mieux comprendre leur place dans l'écosystème marin. Je présenterai ensuite une partie bibliographique sur le glutathion et notamment son implication dans les mécanismes de conjugaison enzymatique. Enfin, je réaliserai une synthèse des connaissances acquises sur la famille des glutathion S-transférases. Ayant axé mes recherches sur le rôle des enzymes dans la réponse au stress, je m'attacherai à rapporter, dans chaque partie, les principaux résultats dans ce domaine.

### 1.1 Les macroalgues

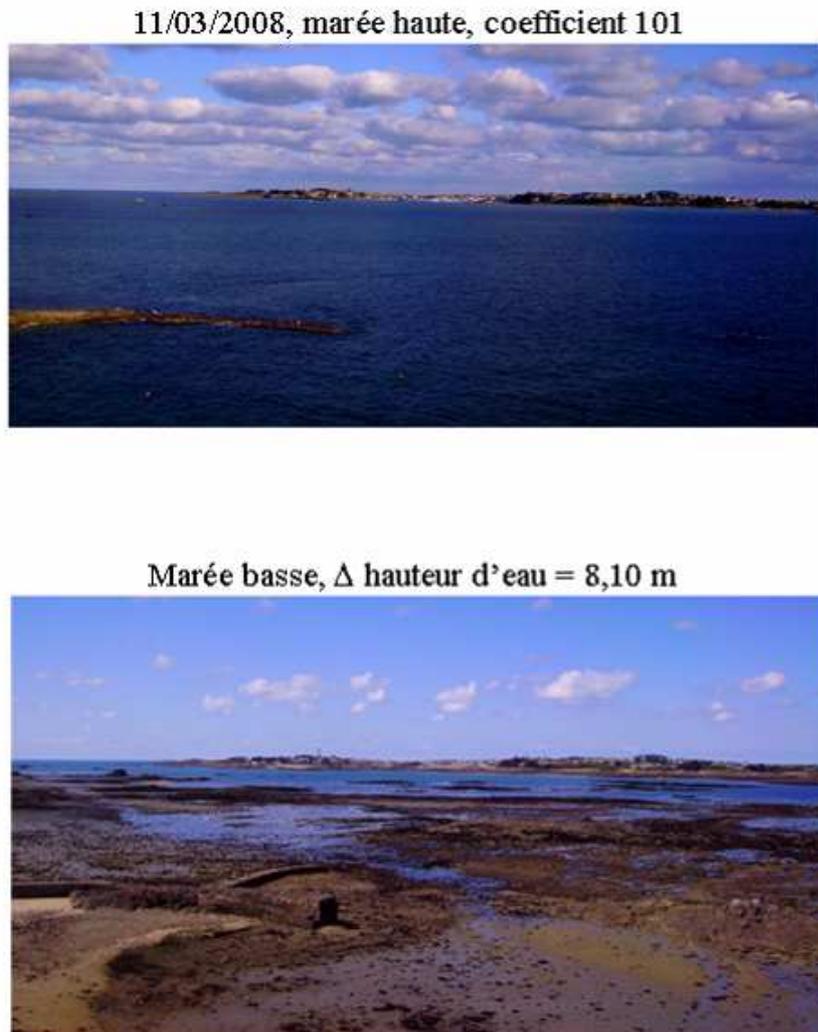
Les algues sont des organismes photosynthétiques dont le cycle de vie se déroule en milieu aquatique. Elles sont une part très importante de la biodiversité et constituent la base des réseaux trophiques des écosystèmes d'eaux douces, saumâtres et marines.

L'appellation "algue" regroupe des organismes d'origines évolutives très différentes et nous ne nous intéresserons dans cette introduction qu'aux macroalgues. Les macroalgues sont multicellulaires et s'opposent aux microalgues, unicellulaires. Elles ne forment pas un groupe évolutif unique mais regroupent les espèces appartenant aux classes Chlorophyceae (algues vertes), Rhodophyceae (algues rouges) et Phaeophyceae (algues brunes).

Les macroalgues marines vivent entre le haut de la zone intertidale (zone de balancement des marées) et une profondeur maximale dépendant de la pénétration de la lumière nécessaire pour la photosynthèse. L'appareil végétatif, ou thalle, peut présenter des morphologies très variées selon les espèces. Elles sont fixées sur des substrats abiotiques par l'intermédiaire de rhizoïdes ou de crampons, mais se développent également en tant qu'épiphytes ou endophytes d'autres algues. Les macroalgues interagissent avec les autres organismes marins, au sein d'un environnement physico-chimique très changeant. Les facteurs environnementaux les plus limitants sont la lumière, la température, la salinité, la disponibilité des nutriments et le mouvement des vagues. Les interactions biologiques concernent les relations entre les algues et des bactéries épiphytes, des champignons, d'autres algues, des virus, des organismes sessiles et des herbivores.

## 1.2 Les contraintes de la zone intertidale

Les macroalgues vivent principalement dans la zone intertidale (estran) qui est caractérisée par la zone de balancement des marées (Figure 1). C'est un environnement particulièrement contraignant pour les organismes qui sont consécutivement soumis à des conditions de vie strictement aquatiques et des conditions de vie terrestres. Dans cette zone, la marée opère une sélection sévère des organismes et la végétation algale change par paliers successifs le long de l'estran.



**Figure 1: Zone de balancement des marées à Roscoff.**

Ainsi, le bas de la zone littorale, site le plus immergé et le moins contraignant, présente la plus grande diversité. Il existe toutefois des cuvettes sur la grève où l'eau ne se retire pas complètement et qui constituent un écosystème particulier ; l'épaisseur d'eau recouvrant les algues y varie au cours de la journée parfois de façon importante. L'alternance

des marées modifie cycliquement la hauteur d'eau et change inévitablement les paramètres physico-chimiques du milieu. Les macroalgues ont donc développé des stratégies pour répondre aux perturbations d'origine abiotique.

### 1.2.1 [La lumière](#)

L'eau agit comme un filtre sélectif de certaines longueurs d'ondes et dans la zone de balancement des marées, l'épaisseur de ce filtre varie continuellement au cours de la montée et la descente des eaux. Cela influe sur la qualité et la quantité de la lumière reçue par les algues. La composition de la lumière joue un rôle important dans la morphogenèse et la reproduction des algues (Coelho et al., 2001). De même, la photopériode influence le cycle de développement de certaines algues, par exemple dans l'apparition du thalle dressé des laminaires (Luning and Neushul, 1978).

Lorsque le rayonnement solaire pénètre dans l'eau, les radiations rouges et jaunes sont absorbées en premier, puis les vertes et les bleues. Puisque les algues vertes possèdent de la chlorophylle absorbant dans le rouge et que les algues brunes et rouges possèdent des pigments surnuméraires (respectivement caroténoïdes et phycobilines), absorbant dans le bleu/vert et transmettant cette énergie à la chlorophylle, on a longtemps postulé que la composition pigmentaire des algues conditionnait leur répartition altitudinale. Cependant, on constate que les algues vertes ne sont pas limitées aux zones peu profondes et leur capacité d'absorption dans la région jaune/vert augmente avec la concentration en pigments. Il semblerait donc que la répartition des algues soit plus fonction de l'intensité lumineuse que de la qualité spectrale (Lobban and Harrison, 1994).

Certains rayonnements, comme les UV, sont nocifs. Les algues s'en protègent par divers moyens. Les algues brunes de l'estran, fortement exposées, se protègent grâce aux phlorotanins, les algues vertes possèdent des phénylpropanoïdes et divers groupes de microalgues et d'algues rouges possèdent des acides aminés voisins de la mycosporine (Krabs et al., 2004; Cardozo et al., 2007).

### 1.2.2 [La température](#)

La température varie principalement avec la latitude et les courants. Il existe des macroalgues tropicales (caulerpes, Dictyotales, Sargassaceae), d'autres plus ou moins cosmopolites (*Ectocarpus*) ou polaires (*Ascoseira*). La variation annuelle moyenne de température des océans est estimée à 5°C mais peut considérablement augmenter dans les estuaires et dans les baies. De plus, les algues de la zone intertidale peuvent être exposées à marée basse à de fortes chaleurs ou à de très basses températures en fonction des saisons.

Les réactions biochimiques sont largement influencées par la température. Par conséquent, la photosynthèse, la respiration et la croissance faisant intervenir de nombreuses enzymes, ces processus dépendent également des fluctuations thermiques. Cependant, les algues ont colonisé toutes les régions du globe car elles disposent de mécanismes de tolérance leur permettant de s'adapter aux changements de température.

### **1.2.3 [La salinité](#)**

La salinité, d'environ 35 g.L<sup>-1</sup> dans les océans, influence la pression osmotique du milieu cellulaire. Les macroalgues marines ne peuvent donc généralement pas vivre en eau douce et réciproquement, les plantes terrestres ne supportent que des stress hypersalins modérés. Il existe cependant des algues capables de supporter de grandes variations de salinité. *Enteromorpha intestinalis* est une algue verte marine qui peut vivre en eau douce. A l'inverse, les laminaires (algues brunes) sont sténohalines, c'est-à-dire qu'elles ne supportent pas de grandes variations de salinité. Les cellules sont alors protégées par des parois robustes et des mucilages hydrophiles. De nombreuses algues régulent leur pression osmotique avec des osmolytes, tels que le mannitol chez les algues brunes.

Dans la zone de balancement des marées, les algues peuvent subir des variations de salinité liées à l'émersion. En cas de dessiccation (phénomène qui peut être amplifié par le soleil, le gel et le vent), le milieu cellulaire se concentre et le sel cristallise à la surface de l'algue. Certaines algues comme *Pelvetia canaliculata* peuvent rester plusieurs jours de suite émergées, en étant humectées uniquement lors des hautes mers de vives eaux. De plus, la pluie peut représenter un apport plus ou moins important et brutal d'eau douce sur ces algues découvertes.

### **1.2.4 [L'hydrodynamisme](#)**

Il est généralement admis que la diffusion des molécules dans les masses d'eau est un phénomène tellement lent que si les masses d'eaux n'étaient pas agitées, la vie y serait impossible. Cependant, le mouvement des vagues et des courants crée des conditions d'arrachement auxquelles les organismes ont dû s'adapter. Les macroalgues sont fixées à leur substrat par l'intermédiaire d'un rhyzoïde et de crampons. Dans le cas d'algues épiphytes ou endophytes, la croissance se déroule sur ou à l'intérieur d'autres algues. Certaines macroalgues possèdent donc des stipes massifs plus ou moins rigides (*Laminaria hyperborea*, *Laminaria digitata*) et d'autres utilisent des flotteurs, pneumatocystes, pour se maintenir à la verticale (*Ascophyllum*, *Fucus*).

### 1.2.5 Pollutions

Les pollutions sont généralement dues à l'introduction de substances chimiques dans l'environnement, résultant de l'activité humaine. Les composés les plus souvent rencontrés dans le milieu marin sont les métaux lourds, les dérivés du pétrole et les produits de synthèse comme les herbicides, les pesticides et les antifouling. Les effets des polluants sur les macroalgues sont dépendants de leurs paramètres physicochimiques tels que la solubilité, l'adsorption, et la complexation chimique.

Bien que les herbicides et les pesticides ne soient pas directement utilisés dans l'environnement marin, la présence de ces composés est détectée aux abords des estuaires en lien avec les pratiques agricoles environnantes. La plupart des herbicides inhibent la photosynthèse. Comme les pesticides, ils représentent des sources de composés xénobiotiques toxiques métabolisables par les organismes aquatiques.

La toxicité des métaux lourds dépend du type d'ion métallique, de la présence de particules organiques dans l'eau, et varie selon les espèces d'algues. En général, l'ordre de toxicité est Hg>Cu>Cd>Ag>Pb>Zn. Les algues disposent de plusieurs mécanismes pour détoxifier les métaux et/ou augmenter leur tolérance. Les polysaccharides anioniques associés à la paroi cellulaire et aux espaces intercellulaires, séquestrent les cations métalliques par un mécanisme d'échange d'ions, empêchant ainsi une partie des métaux de pénétrer dans les cellules (de Andrade et al., 2002; Salgado et al., 2005). Chez les algues brunes, les composés polyphénoliques, présents dans les physodes, chélatent les ions métalliques qui sont ensuite exudés hors des cellules (Ragan et al., 1979; Karez and Pereira, 1995).

Le pétrole est un mélange complexe d'hydrocarbures de type alcanes, cyclo-alcanes et aromatiques. Ces composés réduisent la photosynthèse et la croissance chez les algues en inhibant les échanges gazeux, en perturbant les membranes chloroplastiques, en détruisant la chlorophylle, et en altérant la perméabilité cellulaire. Chez certaines espèces d'algues brunes, la pénétration des hydrocarbures est diminuée par la présence de mucilage. En laboratoire, la concentration à laquelle les hydrocarbures sont toxiques dépend du type de composé, de la température de l'eau, et de la présence d'autres polluants (Lobban and Harrison, 1994).

## 1.3 La réponse au stress chez les algues

Le stress se définit par une contrainte, c'est-à-dire une situation qui s'écarte de la normale. Cet état implique une réponse de l'organisme pour maintenir son homéostasie. Le stress peut être d'origine abiotique et l'organisme réagit par des mécanismes de tolérance.

Lorsqu'il est d'origine biotique, la réponse implique des mécanismes de défense et de résistance.

Plusieurs voies de réponse au stress ont été étudiées chez les macroalgues et j'ai choisi d'en détailler plus particulièrement trois.

### 1.3.1 Le métabolisme oxydatif

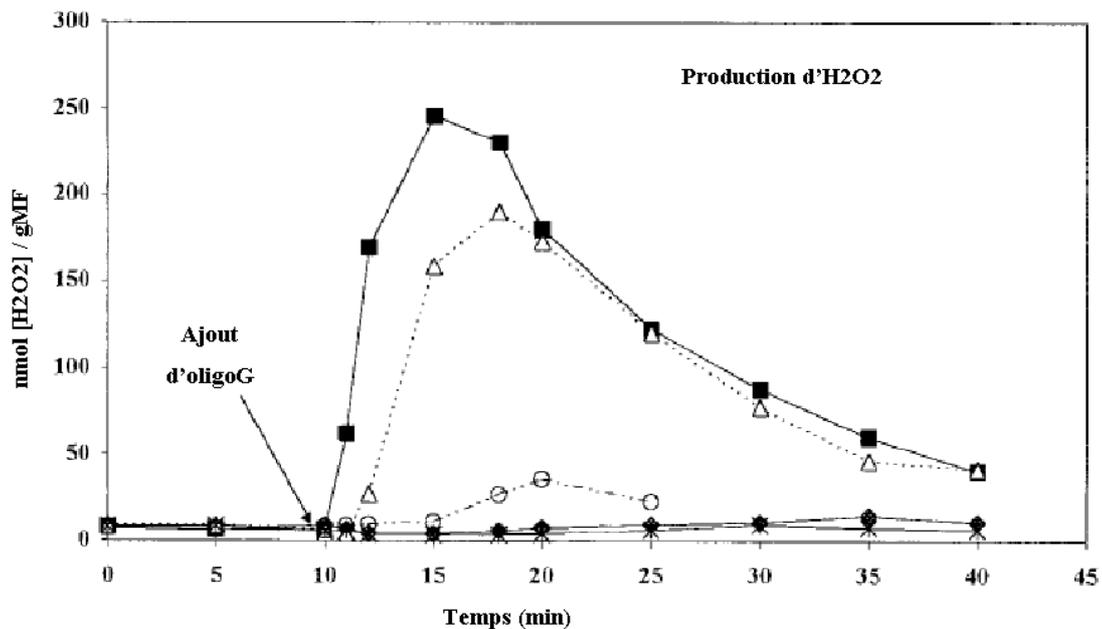
La production d'espèces actives de l'oxygène (EAO) est associée à un grand nombre de stress et le métabolisme oxydatif joue un rôle central dans les réponses mises en place chez les algues (Davison and Pearson, 1996). Les EAO regroupent l'ensemble des composés issus de la réduction de l'oxygène moléculaire, ainsi que les radicaux libres oxygénés : l'anion superoxyde ( $O_2^-$ ), le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ), le radical hydroxyle ( $HO\cdot$ ), le monoxyde d'azote ( $NO\cdot$ ) et les radicaux libres organiques (peroxydes  $ROO\cdot$ , hydroperoxydes  $ROOH$ , alcoxydes  $RO\cdot$ ). D'une manière générale, toute réaction faisant intervenir de l'oxygène moléculaire est susceptible d'être à l'origine d'une production d'EAO, et c'est notamment le cas des chaînes de transport d'électrons respiratoire et photosynthétique (Alscher et al., 2002). Dans les conditions normales, il existe un équilibre entre la production d'EAO et leur dégradation.

Les EAO synthétisées consécutivement à un stress biotique ou abiotique sont extrêmement réactives et peuvent se fixer à plusieurs types de molécules biologiques telles que les lipides, les acides aminés, et les bases azotées.

Les enzymes "antioxydantes" telles que la catalase, la superoxide dismutase (SOD) ou les enzymes du cycle de l'ascorbate/glutathion (ascorbate peroxydase (APX), dehydroascorbate réductase (DHAR), glutathion réductase (GR)) sont impliquées dans l'élimination des EAO localisées dans différents compartiments cellulaires, et donc dans la réduction du stress oxydant. L'activité de ces enzymes a été détectée dans un grand nombre d'algues vertes, rouges et brunes (Collen and Pedersen, 1996; Collén and Davison, 1999c, b; Lohrmann et al., 2004). En 1999, Collén et Davison ont montré que la production d'EAO est induite dans des thalles de *Fucus*, situés dans le bas de la zone de balancement des marées, lorsqu'ils sont soumis à de basses températures et en condition de dessiccation. Les espèces de *Fucus* vivant naturellement en haut de l'estran ne présentent pas ce type de réponse, suggérant que l'adaptation à ces traitements est associée à la capacité des algues à limiter le stress oxydant. Ceci pourrait être dû aux fortes concentrations de composés antioxydants

(tocophérols,  $\beta$ -carotène, ascorbate, glutathion) et aux fortes activités des enzymes antioxydantes.

Chez l'algue brune *L. digitata*, l'élicitation par des oligogulonates induit la production massive, rapide et transitoire de peroxyde d'hydrogène dans le milieu extracellulaire, phénomène nommé "burst oxydatif" (Küpper et al., 2001) (Figure 2). Les oligogulonates sont des oligosaccharides (15 à 25 résidus) issus de la coupure de l'alginate, polysaccharide majoritaire de la paroi des algues brunes, par une alginate lyase. L'élicitation par ce composé mime l'action d'un organisme s'attaquant à la paroi.



**Figure 2: Burst oxydatif chez *L. digitata* en réponse à l'élicitation par des doses croissantes d'oligogulonates, d'après (Küpper et al., 2001).**

Les jeunes sporophytes ont été élicités par des oligogulonates à 1 µg/mL (croix), 2,5 µg/mL (rond blanc), 10 µg/mL (triangles) et 100 µg/mL (carrés noirs). Le contrôle non élicité est représenté par des ronds noirs.

Chez *L. digitata*, le burst oxydatif permet de contrôler la croissance des bactéries épiphytes et l'élicitation augmente la résistance vis-à-vis de l'algue brune endophyte *Laminariocolax tomentosoides* (Küpper et al., 2002). Des observations similaires ont été réalisées chez l'algue rouge *Gracilaria conferta* où l'élicitation par des oligogars induit un burst oxydatif éliminant la flore bactérienne épiphytante (Weinberger and Friedlander, 2000). De plus, chez l'algue rouge *Chondrus crispus*, l'incubation en présence d'extrait de l'algue verte endophytique *Acrochaete operculata* génère une production d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, plus importante dans la phase gamétophytante que dans la phase sporophytante. Ceci induit une résistance de la phase haploïde de l'algue rouge par rapport à son pathogène (Bouarab et al., 1999).

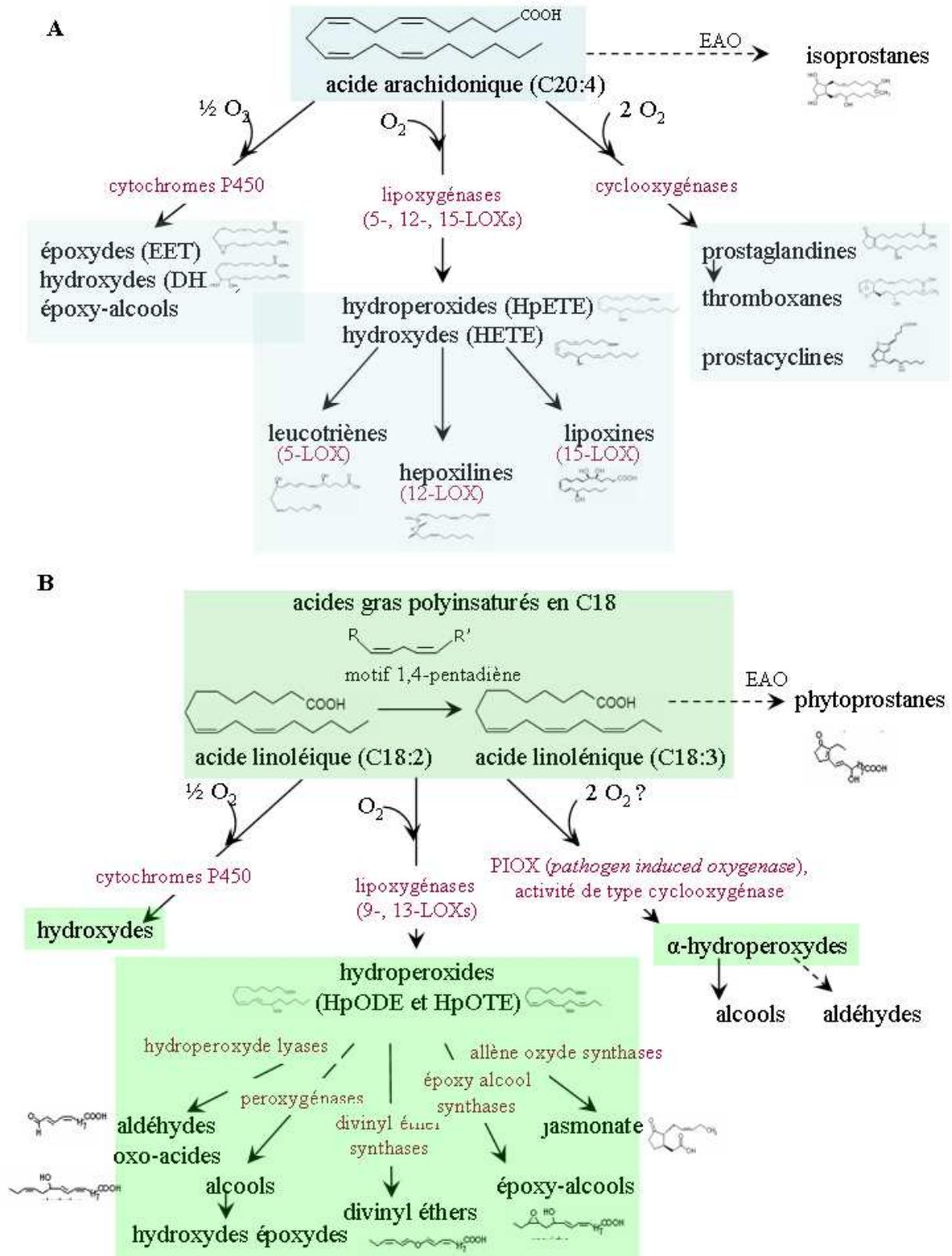
### 1.3.2 Le métabolisme des oxylipines

Les radicaux libres libérés au cours d'un stress peuvent réagir avec les lipides membranaires et provoquer leur peroxydation. Il en résulte une désorganisation des structures membranaires, entraînant le dysfonctionnement des protéines qui y sont imbriquées, et la libération de pentanes et d'aldéhydes qui, à fortes concentrations, sont toxiques pour la cellule. Les acides gras polyinsaturés (AGPI) sont les principaux constituants de la membrane lipidique et les plus sujets aux attaques radicalaires.

Les oxylipines sont des composés produits au cours du métabolisme des acides gras polyinsaturés par réaction avec des espèces activées de l'oxygène. Chez de nombreux organismes, ces molécules sont toxiques lorsqu'elles sont synthétisées en trop grande quantité. Cependant, elles peuvent aussi intervenir dans les mécanismes de signalisation lorsqu'elles sont présentes en très faible concentration et dans des conditions physiologiques bien spécifiques. La biosynthèse des oxylipines est précédée par l'activation d'une lipase qui libère des acides gras libres, qui deviennent substrats pour un certain nombre d'enzymes, dont des lipoxygénases (LOX) des cyclooxygénases (COX) et des cytochromes P450 (CYP450) (Figure 3).

Chez les mammifères, les oxylipines sont majoritairement formées à partir des acides gras en C20 (eicosanoïdes), avec comme précurseur principal l'acide arachidonique (C20:4). Elles jouent un rôle majeur dans les processus inflammatoires, et notamment au cours des processus infectieux, dans les phénomènes d'allergies, ou au cours d'exposition à des médicaments et des xénobiotiques. Les prostaglandines, thromboxanes et leucotriènes font partie des oxylipines les plus étudiées chez ces organismes (Funk, 2001). Chez les animaux, les oxylipines de types cyclopentanones (prostaglandines) sont produits par une cyclooxygénase à partir de l'acide arachidonique.

Chez les plantes terrestres, le métabolisme des oxylipines fait intervenir principalement des acides gras en C18 (octadécanoides), dont l'acide linoléique (C18:2) et l'acide linolénique (C18:3), et dans une moindre mesure un acide gras en C16, l'acide palmitoléique (C16:3). Elles jouent un rôle essentiel dans la défense contre les agents pathogènes en agissant en tant que molécule signal et/ou composés protecteurs ayant une activité antimicrobienne ou cicatrisante (Weber, 2002). Chez les plantes, les oxylipines de type cyclopenténones, sont produites par une allène oxyde cyclase (AOC), active uniquement dans la voie de l'acide linolénique (C18:3). Parmi les dérivés cyclopenténiques, les plus étudiés, l'acide jasmonique et son dérivé méthyle ester, le méthyle jasmonate, sont des hormones clés des mécanismes de défense (Howe and Schilmiller, 2002).



**Figure 3: Biosynthèse des oxylipines chez les animaux et les plantes supérieures, d'après (Blée, 2002).**

(A) Chez les animaux, l'acide arachidonique est le substrat préférentiel d'une cascade oxydative impliquant des cytochromes P450, des lipoxygénases et des cyclooxygénases formant respectivement des époxydes, des hydroperoxydes et des prostaglandines.

(B) Chez les plantes supérieures, l'acide linoléique et l'acide linoléique sont les principaux substrats pour la production d'oxylipines.

En réponse à des stress biotiques et abiotiques, un grand nombre d'algues marines produisent des oxylipines dérivées à la fois des eicosanoïdes et des octadécanoïdes (Gerwick et al., 1999; Bouarab et al., 2004; Guschina and Harwood, 2006; Ritter et al., 2008). Le rôle biologique de ces composés chez ces organismes demeure une énigme, ce qui rend ce métabolisme intéressant à étudier. De plus, leurs voies de synthèse sont très peu connues. Sur la base des structures d'oxylipines caractérisées jusqu'à présent, il semble que les algues rouges et brunes disposent de 5-, 8-, 9-, 12-, 15-LOX agissant sur les AGPI en C20 et également de 3-, 6-, 9- et 10-LOX qui agissent sur les AGPI en C18 (Gerwick et al., 1999).

Chez l'algue rouge *G. chilensis*, la réponse à une blessure provoque la libération d'acides gras libres et d'eicosanoïdes hydroxylés (8-HETE et 7,8-di-HETE) (Lion et al., 2006). Chez une autre algue rouge, *C. crispus*, la présence d'extraits acellulaires de l'algue verte pathogène *A. operculata* induit l'accumulation d'acide arachidonique (C20:4), d'acide linoléique (C18:3) et d'acide stéaridonique (C18:4) (Bouarab et al., 2004). Chez l'algue brune *L. digitata*, un stress occasionné par la présence d'un excès de cuivre dans l'eau de mer génère la formation de lipopéroxydes et la synthèse, entre autres, de 12-oxo-PDA (C18) précurseur de l'acide jasmonique, de prostaglandines, et d'un composé unique, le 18-hydroxy-17-oxo-ETE (Ritter et al., 2008). De même, les lipopolysaccharides bactériens (LPS) induisent la libération d'acides gras libres chez *L. digitata* et l'accumulation de 13-HOTrE, dérivé oxydé de l'acide linoléique (C18:2), et de 15-HEPE, produit à partir de l'acide eicosapentaénoïque (C20:5) (Küpper et al., 2006). En revanche, les oligogulonates, inducteurs d'un burst oxydant chez *L. digitata*, ne provoquent pas la production de d'oxylipines (Cosse et al., 2007). Il semble donc que différentes voies de signalisation soient impliquées dans l'induction du burst oxydant et de la production d'oxylipines.

L'effet du méthyle jasmonate chez *C. crispus* a suscité un intérêt particulier. En effet, le MeJA étant un acteur de l'interaction hôte pathogène chez les plantes (Howe, 2005), son rôle a été supposé dans l'interaction *C. crispus* / *A. operculata*. En revanche, le MeJA n'a jamais été mis en évidence dans cette algue, bien que l'acide jasmonique ait été détecté chez une autre algue rouge, *Gelidium latifolium* (Krupina and Dathe, 1991). Chez *C. crispus* le traitement des algues avec du MeJA ou des hydroperoxydes (12-HpETE et 13-HpODE) induit une résistance temporaire à l'infection par *A. operculata* (Bouarab et al., 2004). De même, des traitements avec le MeJA modifient le transcriptome de *C. crispus* et induisent l'expression de gènes de stress après 6h (Collén et al., 2006). Ce composé possède donc potentiellement une fonction importante dans les voies de défenses de *C. crispus*, où il active le métabolisme oxydatif des C20 et des C18, et génère la production d'hydroperoxydes et de cyclopenténones

tels que les prostaglandines (Gaquerel et al., 2007). Chez l'algue brune *Fucus vesiculosus*, bien que sa présence n'ait jamais été démontrée, le méthyle jasmonate induit l'accumulation de phlorotannins (Arnold et al., 2001).

Certaines algues marines produisent des aldéhydes volatiles de la famille des n-hexanal, hexenals et nonenal (Boonprab et al., 2003). Ces composés sont formés chez les plantes vertes à partir d'acides gras en C18 convertis en hydroperoxydes par une 13-LOX, puis clivés par l'action d'une hydroperoxyde lyase. Par exemple, chez *L. digitata*, des aldéhydes en C6 et en C9 sont relâchés après élicitation par des oligogulonates ou consécutivement à une baisse du niveau de la mer (Goultquer et al., 2008). Il a ainsi été suggéré que ces molécules pourraient constituer une forme de communication entre les algues.

En conclusion, les algues rouges et brunes produisent simultanément des oxylipines issues de la voie de l'acide arachidonique (C20:4), de l'acide linoléique (C18:2) et de l'acide linoléique (C18:3), en condition de stress biotiques et abiotiques. Ceci suggère l'implication de ce type de molécules dans la cascade de signalisation induite au cours de la réponse à ces stress. Ces trois voies sont également présentes chez les chlorophytes et les bryophytes. En revanche, chez les opisthokontes (animaux et champignons), la voie de l'acide linoléique (C18:3) n'existe pas. Cette voie aurait donc été acquise au cours de l'endosymbiose primaire entre un protiste ancestral, possédant les voies en C20:4 et en C18:2, et une cyanobactérie photosynthétique. L'acquisition du plaste au cours de cette endosymbiose a permis l'évolution de la voie des C18:3, conservée chez les algues rouges, les algues brunes et la lignée verte. Les spermatophytes ne produisent pas d'eicosanoïdes (C20) car ils ont vraisemblablement perdu les élongases et/ou les désaturases impliquées dans la synthèse de l'acide arachidonique (Bouarab et al., 2004).

### 1.3.3 Métabolisme halogéné

Dans le milieu marin, la production de composés halogénés organiques volatiles (VHOC) est directement corrélée aux blooms de phytoplancton et à l'abondance des macroalgues le long des côtes. Ces composés ont un impact fort sur l'environnement en général puisqu'ils sont impliqués dans la destruction de l'ozone et la formation des nuages au dessus de l'océan (O'Dowd et al., 2002; McFiggans et al., 2004).

Chez les macroalgues, une augmentation de la production des composés organiques chlorés, bromés et iodés est associée à des variations de pH et d'intensité lumineuse (Mtolera et al.,

1996). Chez *L. digitata*, l'iode peut représenter jusqu'à 4,7 % du poids sec de jeunes plantules (Küpper et al., 1998), faisant de cet organisme le plus important accumulateur d'iode. De même, les algues rouges appartenant à la classe des Ceramiales sont parmi les plus importants accumulateurs de brome avec 3,7% du poids sec (Saenko et al., 1978).

Les enzymes responsables de la formation des VHOC chez les macroalgues rouges et brunes, sont des halopéroxydases à vanadium. Elles catalysent l'oxydation des halogènes en présence de peroxyde d'hydrogène, produisant ainsi un intermédiaire halogéné diffusible ( $XOH$ ,  $X_2$ ,  $X_3^-$ ) qui peut réagir avec des substrats organiques. La plupart des activités halopéroxydases détectées dans les algues brunes et rouges sont de type iodo- et bromopéroxydases (Leblanc et al., 2006) et les iodopéroxydases forment une famille multigénique chez *L. digitata* (Colin et al., 2005). Le métabolisme des VHOC semble lié au métabolisme des EAO et pourrait être impliqué dans la biotransformation du peroxyde d'hydrogène produit au cours d'un stress. Chez *L. digitata*, l'émission de composés volatiles iodés et d'iode moléculaire  $I_2$  fait suite à l'élicitation par les oligogulonates (Palmer et al., 2005). Récemment, la complexation d'iodure  $I^-$  avec des EAO a été mise en évidence chez *L. digitata*, constituant le premier système antioxydant inorganique chez un être vivant (Küpper et al., 2008). Les halopéroxydases à vanadium pourraient aussi être impliquées dans l'adhésion des algues et le renforcement de la paroi en modulant le pontage entre alginates et polyphénols (Vreeland et al., 1998).

Chez les algues rouges, les VHOC ont un rôle dans les réponses de défense, en agissant en tant que substance toxique et répulsive contre les micro-organismes et les herbivores (Paul et al., 2006), ou en prévenant l'installation d'organismes épiphytes (Ohsawa et al., 2001). De plus, ces composés sont reconnus pour interférer avec les systèmes de signalisation bactériens et induire la dispersion des biofilms (Maximilien et al., 1998; Borchardt et al., 2001).

Les algues brunes et rouges ont donc développé des mécanismes originaux de réponse aux stress biotiques et abiotiques. C'est notamment dans ce contexte que plusieurs espèces d'algues sont utilisées comme modèle d'études dans le laboratoire Végétaux Marins et Biomolécules, UMR 7139. Mes travaux de thèse étant focalisés sur les algues brunes, je vais parler plus en détail de ces organismes dans le chapitre qui suit.

## 1.4 Évolution

Le terme algue regroupe des organismes appartenant à des lignées évolutives indépendantes (Figure 4). Aussi, une classification basée uniquement sur la composition pigmentaire ne reflète pas l'arbre phylogénétique réel du vivant. Une endosymbiose primaire entre une cyanobactérie photosynthétique et un hôte eucaryote a permis l'acquisition du plaste et a donné naissance aux algues rouges (Rhodophytes) et à la lignée verte, comprenant notamment les algues vertes (Chlorophytes) et les plantes terrestres (Streptophytes). Algues rouges et vertes sont donc issues d'un même parent eucaryotique et présentent des plastides à deux membranes. Les algues brunes (Phaeophyceae) sont elles issues d'une endosymbiose secondaire entre un protiste hétérotrophe et un ancêtre unicellulaire d'algue rouge, et présentent des plastides à trois membranes. Les diatomées et oomycètes appartiennent également au groupe des hétérokontes (Boyen et al., 2001; Baldauf, 2003).

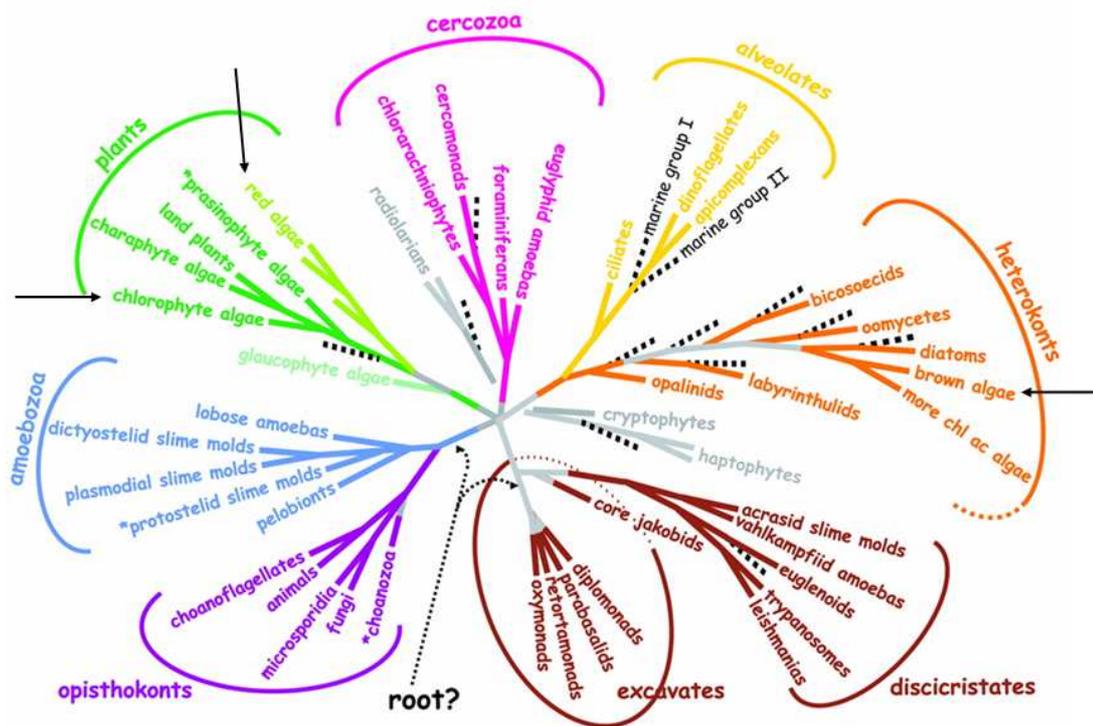


Figure 4: Arbre phylogénétique consensus des eucaryotes (d'après Baldauf, 2003).

La position des trois grands groupes de macroalgues est indiquée par des flèches.

Les algues brunes appartiennent à la division des hétérokontes, une lignée évolutive indépendante, au même titre que celle des plantes et des Opisthokontes, et ont acquis des caractéristiques métaboliques physiologiques, cellulaires et écologiques originales. De plus, les algues brunes constituent l'un des cinq groupes au sein desquels est apparue la multicellularité.

Les cycles de vie des algues sont assez complexes, avec des alternances de générations parfois très différentes en taille et en forme. De plus, certaines algues présentent souvent une phase de reproduction parthénogénétique, comme chez *Ectocarpus siliculosus*, qui permet la répétition d'un stade de vie lorsque la syngamie n'a pas eu lieu. La plupart des algues adaptent leur cycle de reproduction en fonction des conditions environnementales, notamment la température et la photopériode, et cette stratégie permet aux algues de survivre et de se propager au cours des saisons.

## 1.5 Deux modèles d'algues brunes

Les algues brunes appartiennent à la division des hétérokontes qui regroupe les organismes caractérisés par l'existence, au cours de leur cycle de vie, d'une cellule biflagellée avec deux flagelles de taille différente. La plupart des hétérokontes sont des organismes marins. Les algues brunes présentent des caractéristiques physiologiques et anatomiques uniques. L'environnement marin impose ses contraintes aux mécanismes photosynthétiques et lorsqu'elles sont immergées, les algues ne perçoivent pas la totalité du spectre lumineux. Les algues brunes ont adapté leurs antennes collectrices pour absorber plus de rayonnements que les plantes terrestres (Lobban and Harrison, 1994). Les chlorophylles a et c, et la fucoxanthine (caroténoïdes), sont les pigments majoritaires et à l'origine de la couleur brune des algues. La paroi des algues brunes représente également une caractéristique originale car elle est composée d'une phase squelettique constituée par la cellulose, et d'une phase matricielle chargée, contenant majoritairement des alginates et des fucanes sulfatés (Kloareg and Quatrano, 1987, 1988; Küpper et al., 2001). Les phéophycées stockent le carbone sous forme de laminarine et de mannitol (Kremer, 1975; Davis et al., 2003). Autour du noyau, on observe généralement la présence de physodes. Ces vésicules renferment des composés phénoliques, les phlorotannins, qui semblent jouer un rôle dans la répulsion des herbivores, la protection contre les UV et les EAO, et la chélation des métaux (Ragan and Craigie, 1980; Pinto et al., 2003; Amsler, 2008).

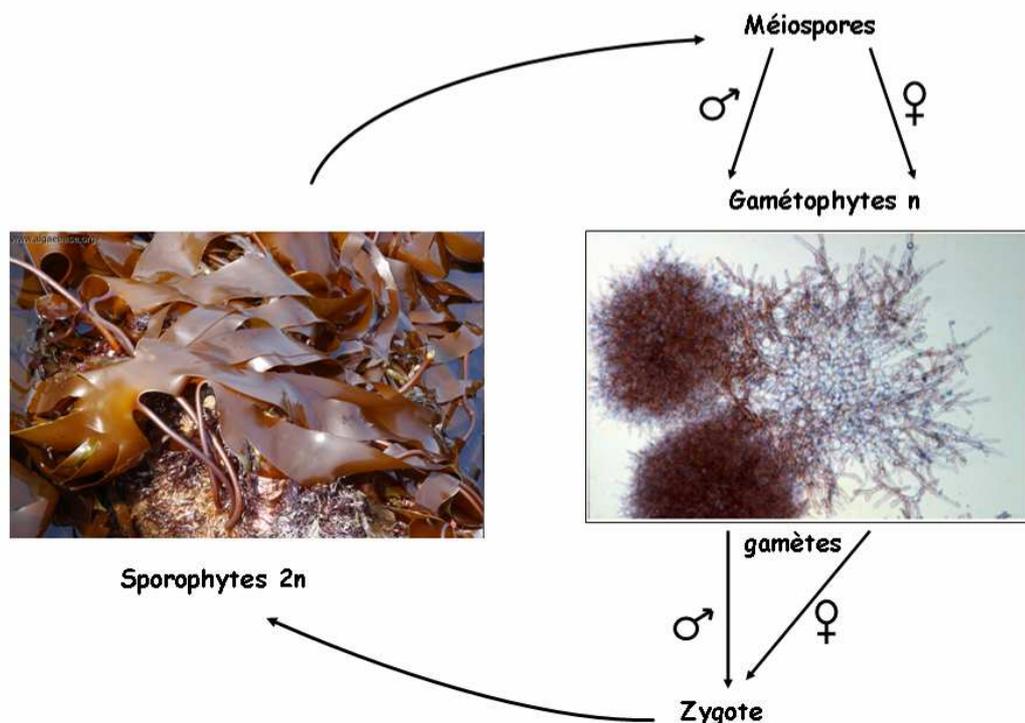
### 1.5.1 Laminaria digitata

Le genre *Laminaria* est l'un des plus importants parmi la classe des Phaeophyceae, rassemblant 63 espèces parmi les 123 que compte l'ordre des *Laminariales*. Les laminaires représentent une biomasse considérable dans les écosystèmes rocheux des zones tempérées et polaires où elles forment de véritables champs. *L. digitata* se développe dans les étages littoraux inférieurs, où elle reste immergée en permanence, à l'exception des basses mers de

fort coefficient (supérieur à 90). De part sa position sur l'estran, *L. digitata* n'est exposée qu'à 10 à 20 % de l'intensité lumineuse (Luning, 1992). De plus, elle n'est que très rarement soumise à la dessiccation ou aux variations de salinité liées à l'alternance des marées. Les laminaires sont exploitées industriellement car elles constituent une source importante d'hydrocolloïdes utilisés comme émulsifiants ou gélifiants. Les alginates qui peuvent représenter jusqu'à 45 % du poids sec de *L. digitata* (Kloareg and Quatrano, 1988) sont des polysaccharides pariétaux constitués d'un enchaînement d'acides  $\alpha$ -L-guluroniques (G) et d'acides  $\beta$ -D-mannuroniques (M) liés en  $\alpha$ -1,4. Plusieurs types d'alginates sont rencontrés, avec des propriétés rhéologiques différentes en fonction des proportions de G et M. De ce fait, la composition de l'alginate n'est pas uniforme le long du thalle, et les crampons et le stipe sont plus riches en G que la lame (Haug et al., 1974).

#### 1.5.1.1 Cycle de vie et culture

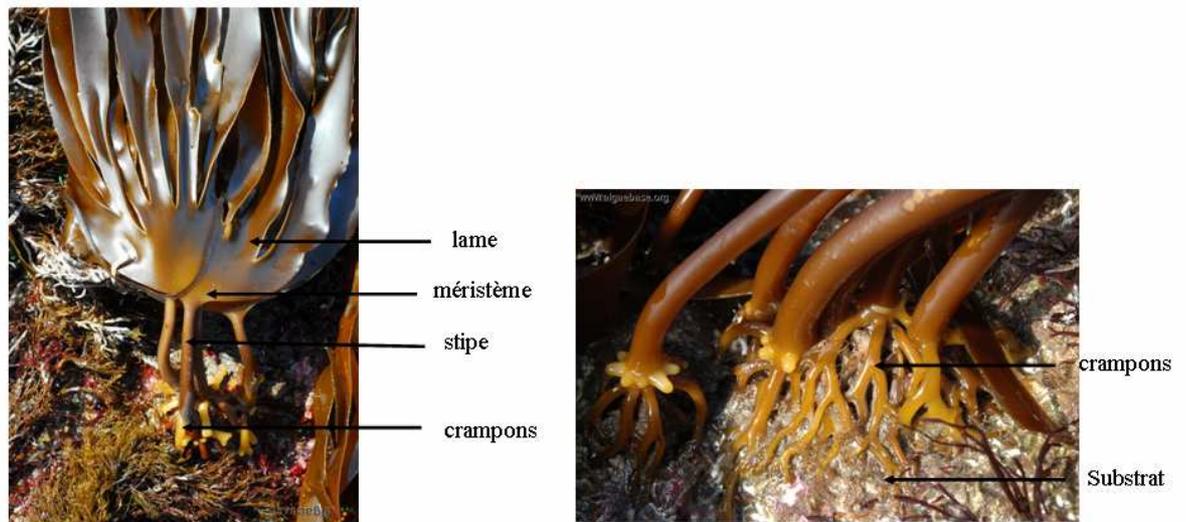
L'algue brune *L. digitata* (Hudson) J.V. Lamouroux présente un cycle de vie digénétique hétéromorphe (Figure 5) qui consiste en une phase haploïde microscopique et filamenteuse, le gamétophyte, et en une phase diploïde macroscopique, le sporophyte, qui peut atteindre jusqu'à 2 m.



**Figure 5:** Cycle de vie de *Laminaria digitata*.

Le sporophyte diploïde fertile porte des sporanges (sores) qui produisent des méiospores mâles et femelles. Ces derniers germent et se développent en gamétophytes microscopiques qui vont produire des gamètes. Le zygote résultant de la fusion des gamètes se développe en sporophyte.

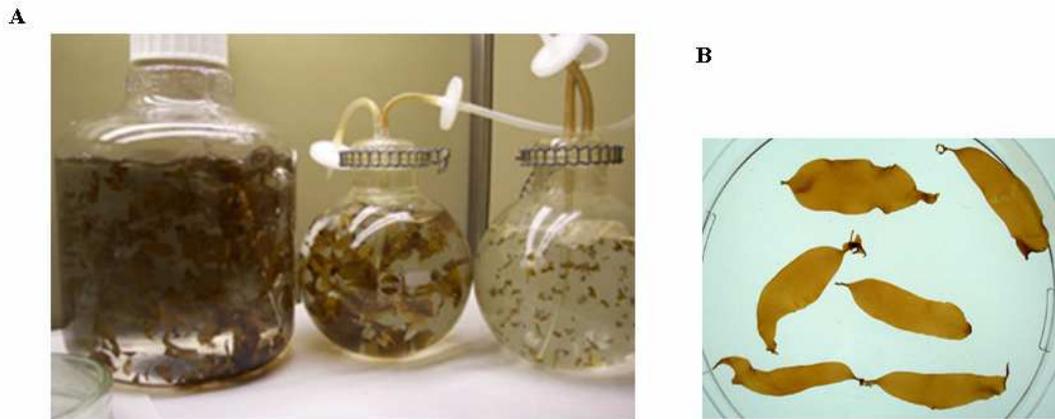
La croissance du sporophyte s'effectue à partir d'un méristème situé à la base de la lame avec un pic de croissance au printemps. La période de reproduction atteint son apogée à l'automne, mais les périodes exactes varient en fonction des espèces et de leur localisation géographique (Bolton and Luning, 1982). Le sporophyte est fixé au substrat rocheux par l'intermédiaire de crampons, puis un stipe cylindrique relativement flexible permet le maintien de la lame où se déroule la plupart du processus de photosynthèse et de reproduction (Figure 6).



**Figure 6: *Laminaria digitata* dans son environnement naturel.**

Photographies tirées de algaebase ([www.algaebase.org](http://www.algaebase.org))

Cette algue est cultivée au laboratoire sous forme de jeunes sporophytes (Figure 7). Le cycle de vie complet n'est pas réalisé au laboratoire en raison de l'impossibilité d'obtenir des sporophytes fertiles, c'est-à-dire portant des sporanges (sores). En effet les sporophytes deviennent fertiles au bout de plusieurs années et leur taille est alors incompatible avec des cultures de laboratoire. Les parties du sporophyte portant les sores contenant les méiospores sont donc prélevées dans le milieu naturel et incubées dans des cristallisoirs. Les spores sont ensuite relarguées, se fixent aux parois de verre et se développent en gamétophytes. Les gamétophytes, microscopiques, produisent des gamètes mâles et femelles qui fusionnent pour donner des zygotes qui se fixent à leur tour et se développent en sporophytes. Après quelques semaines, les sporophytes sont transplantés dans des ballons de cultures, ils atteignent 10 cm pour environ 1g en 6 à 8 mois.

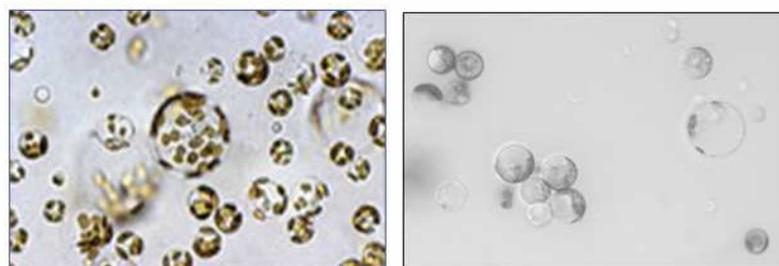


**Figure 7: Sporophytes de *Laminaria digitata* cultivés au laboratoire.**

(A) Les sporophytes sont cultivés dans des ballons d'eau de mer enrichie en nutriments, sous un bullage constant. (B) Jeunes sporophytes après quelques mois de culture. Photographies D. Scornet.

#### 1.5.1.2 Ressources génomiques

La taille du génome haploïde de *L. digitata* est estimée à 640 millions de paires de bases (Mb) (Legall et al., 1993) réparties en 31 chromosomes (Lewis, 1996). Deux banques d'étiquettes de séquences transcrites (EST) ont été réalisées au laboratoire pour analyser d'une part les variations d'expression de gènes au cours de l'alternance des générations (Crépineau, 2000), et d'autre part pour identifier des gènes potentiellement impliqués dans la réponse aux stress et dans la synthèse de paroi (Roeder et al., 2005). La première banque a permis de générer 412 ESTs dans la phase gamétophytique et 493 dans la phase sporophytique, correspondant à 604 transcrits différents. Cette étude a montré par exemple, qu'un gène de bromopéroxydase est majoritairement exprimé dans le sporophyte. La deuxième banque a été produite à partir d'ARN extraits de protoplastes à différents stades de régénération. Les protoplastes sont des cellules rondes, isolées et sans paroi (Figure 8).



**Figure 8: Protoplastes de *Laminaria digitata*.**

Photographies D. Scornet, vue en microscopie optique, grossissement inconnu.

De plus, la production de protoplastes entraîne la formation d'EAO (Benet et al., 1997) que l'on peut mettre en relation avec la digestion de la paroi qui libère une grande quantité d'oligogulonates. Les protoplastes correspondent donc à des cellules qui sont soumises à des stress de type oxydatif, osmotique et mécanique. L'analyse des 1985 ESTs de protoplastes a montré qu'un grand nombre de gènes de stress était induit dans les protoplastes, notamment des protéines heat shock (HSP-70, HSP-90), des bromopéroxydases, des glutathion S-transférases et des thiorédoxines.

Malgré son intérêt scientifique, sa pertinence écologique et son impact économique, *L. digitata* ne peut pas constituer un modèle de référence pertinent pour les algues brunes. En effet, son génome est très grand, sa culture n'est pas maîtrisée au laboratoire, son cycle de reproduction est très long, ce qui est préjudiciable au développement des approches de génétique.

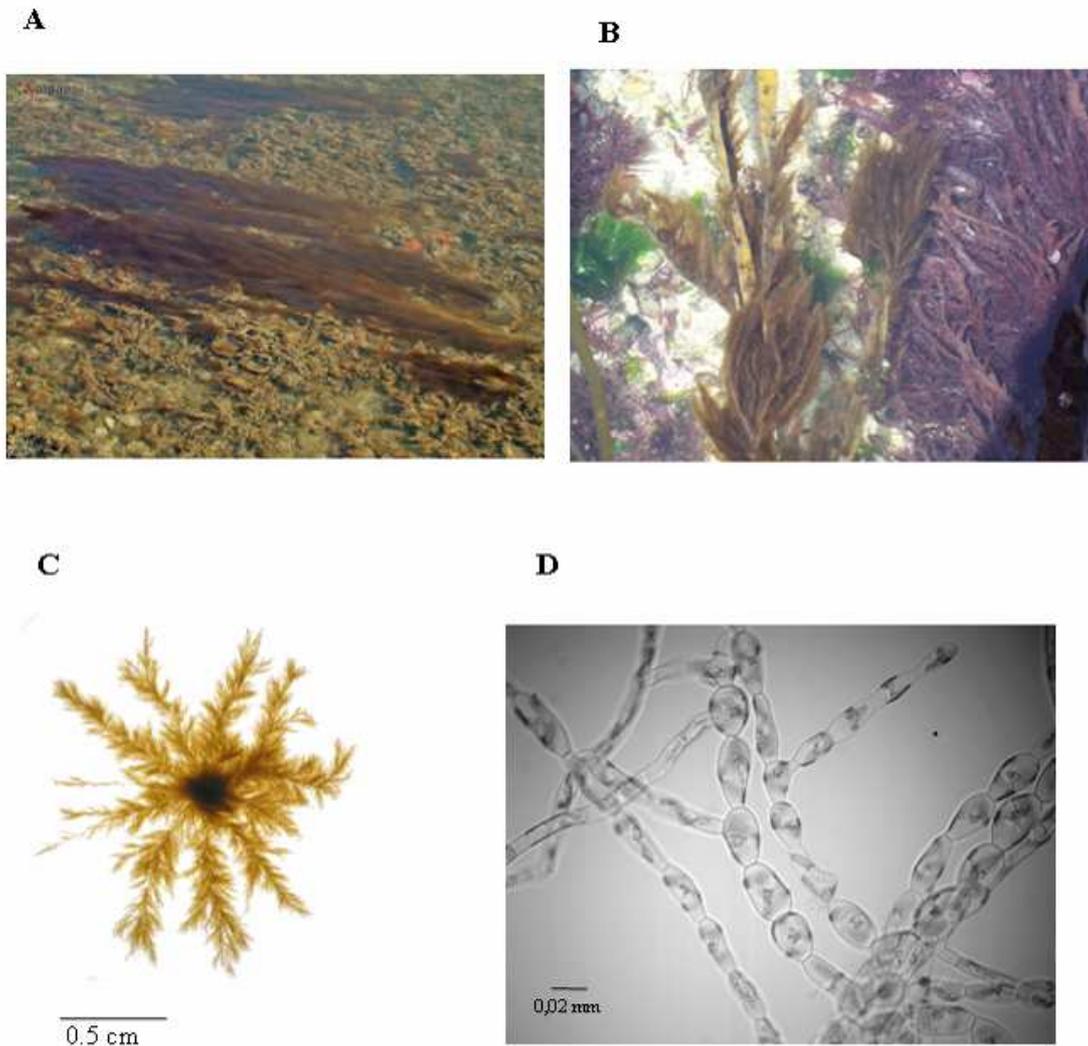
Le choix de l'algue filamenteuse *E. siliculosus* comme modèle biologique des algues brunes s'est imposé après un tour d'horizon des différentes espèces, de leur intérêt scientifique, et de leurs capacités à pouvoir être travaillées au laboratoire (Peters et al., 2004a).

### 1.5.2 [Ectocarpus siliculosus](#)

Les Ectocarpales appartiennent à la classe des Phaeophyceae et sont phylogénétiquement proches des *Laminariales* (Rousseau and de Reviers, 1999; Kawai et al., 2007). Le genre *Ectocarpus* regroupe 103 espèces, mais ce nombre est probablement surestimé tant l'identification des différentes espèces d'*Ectocarpus*, basée principalement sur des critères morphologiques, est rendue difficile par la plasticité des caractères examinés.

Parmi les espèces d'*Ectocarpus*, *Ectocarpus siliculosus* (Dillwyn) Lyngbye est une espèce cosmopolite, présente dans toutes les régions tempérées, dans l'Antarctique, mais absente des zones tropicales. Cette espèce se rencontre dans les milieux marins mais aussi dans les eaux de faible salinité (mer Baltique), et a même été retrouvée dans une rivière en Australie (West and Kraft, 1996). *E. siliculosus* a été identifié aussi bien dans des cuvettes situées en haut de la zone intertidale, qu'au niveau de la zone sublittoral. Il peut être fixé sur des substrats abiotiques (rochers, bois, plastiques, coques de bateaux), sur des macroalgues comme épiphyte, ou bien flottant librement (Russell and Morris, 1970; Russell and Bolton, 1975; Russell and Velkamp, 1984). *E. siliculosus* est une algue filamenteuse qui atteint une taille de 30 cm dans le milieu naturel, et qui est fertile au laboratoire pour des tailles allant de

1 à 3 cm (Figure 9). Les connaissances acquises sur cet organisme ont fait l'objet d'une revue récemment publiée au laboratoire (Charrier et al., 2008).



**Figure 9: Planche photographique d'*Ectocarpus siliculosus*.**

(A) *E. siliculosus* fixé sur un substrat rocheux dans son milieu naturel (photographie Algaebase).

(B) *E. siliculosus* en épiphyte sur l'algue brune *Himanthalia elongata* (photographie A. Ritter).

(C) Vue microscopique de la forme étoilée, caractéristique des cultures non fixées (D. Scornet).

(D) Vue microscopique des filaments formés de cellules rondes et allongées (PO de Franco).

#### 1.5.2.1 Cycle de vie

Le cycle de vie est digénétique isomorphe (légèrement hétéromorphe) et présente également une phase de reproduction asexuée (Figure 10). Il est maîtrisé au laboratoire.

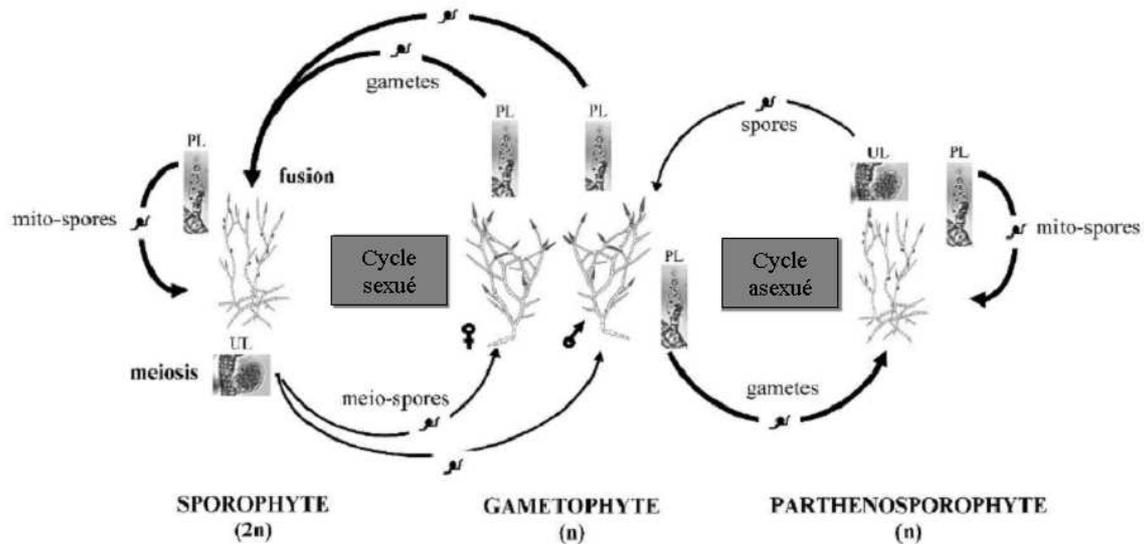


Figure 10: Cycle de vie d'*Ectocarpus siliculosus*, d'après Charrier et al. (2008).

Les gamètes mâles et femelles sont morphologiquement identiques (isogamie) mais diffèrent par leur comportement et leur physiologie. Les gamètes femelles se fixent rapidement sur un substrat et produisent une phéromone qui attire les gamètes mâles. La fusion des gamètes produit un zygote qui se développe en sporophyte diploïde. Les gamètes n'ayant pas fusionné peuvent se développer de manière parthénogénétique, formant un parthénosporophyte haploïde morphologiquement identique à un sporophyte diploïde. Le sporophyte diploïde produit des méiospores (par méiose) dans des organes appelés sporanges uniloculaires. Les méiospores se développent en gamétophytes haploïdes mâles ou femelles (dioïque). Deux différences majeures existent entre sporophytes et gamétophytes; tout d'abord, les méiospores germent de manière asymétrique pour former un rhyzoïde et un filament dressé. De plus, le thalle du gamétophyte est plus ramifié que celui du sporophyte. Les gamétophytes produisent des gamètes au sein de gamétanges pluriloculaires. Le sporophyte et le parthénosporophyte peuvent se reproduire de manière asexuée en produisant des mitospores au sein de sporanges pluriloculaires.

#### 1.5.2.2 Ressources génomiques

*E. siliculosus* est un modèle intéressant pour développer des approches de génétique et de génomique. Ses caractéristiques sont : une taille réduite qui permet de réaliser la totalité du cycle de vie dans des boîtes de Petri (Muller et al., 1998), sa grande fertilité, sa croissance rapide (le cycle de vie est réalisé en trois mois environ), la facilité avec laquelle les croisements génétiques peuvent être réalisés, et finalement, la faible taille de son génome (200 Mb). Le nombre de chromosomes est estimé à 25 (Peters et al., 2004b).

Le séquençage du génome de cette algue a été réalisé à partir de la souche Es32 qui est issue de la méiose d'un sporophyte collecté en 1988 à San Juan de Marcona au Pérou (Peters et al., 2008). Le Génoscope a réalisé le séquençage aléatoire global (whole-genome shotgun) à hauteur de 10 équivalents génomiques, soit un volume d'environ 4 300 000 lectures, à partir de plusieurs banques comprenant des inserts de taille différente (3 et 10 Kb) (<http://www.genoscope.cns.fr/spip/Ectocarpus-siliculosus.html>).

En parallèle, 91041 ADNc ont été séquencés à partir de banques EST correspondant à différents stades du cycle de vie et à des sporophytes stressés: sporophytes immatures (non fertiles) (63388 ESTs), gamétophytes immatures (17200 ESTs), sporophytes matures avec sporanges pluriloculaires et uniloculaires (3695 ESTs), gamétophytes matures avec gamétanges pluriloculaires (2889 ESTs), et sporophytes immatures soumis à un stress hypersalin ou incubés en présence de peroxyde d'hydrogène (869 ESTs).

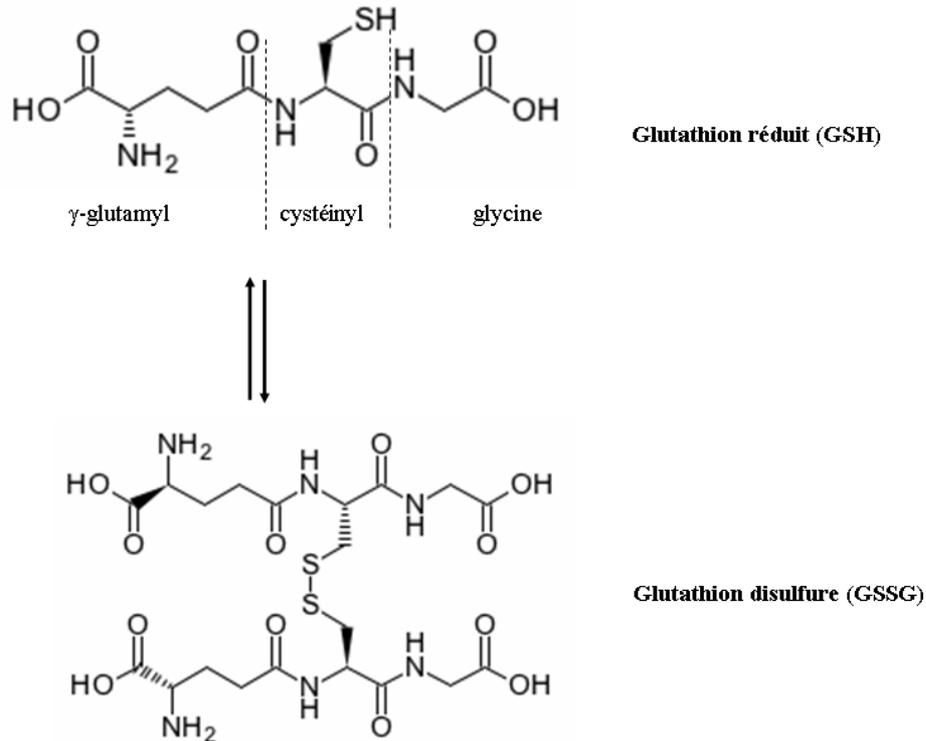
*L. digitata* et *E. siliculosus* sont deux modèles d'algues brunes complémentaires. Chez *L. digitata*, les mécanismes de réponse au stress ont été bien étudiés et illustrent l'originalité et l'importance de cet organisme dans l'écosystème littoral. *E. siliculosus*, qui présente en apparence une organisation plus simple, remplit les critères d'un bon modèle biologique pour son étude en laboratoire, mais peu de données ont été acquises quant aux mécanismes de réponse au stress. Mes travaux de thèse ont donc combiné les deux modèles.

## 2. Le glutathion

---

Le glutathion (GSH) est un tripeptide formé par l'association de 3 acides aminés (glutamate, cystéine, glycine) pour former le L- $\gamma$ -glutamyl-L-cystéinyglycine. Présent chez tous les organismes, c'est le thiol libre le plus répandu dans les cellules (Dickinson and Forman, 2002). Il est directement ou indirectement impliqué dans de nombreux processus biologiques tels que la synthèse des protéines et des acides nucléiques, le transport cellulaire, l'activité de plusieurs enzymes, le métabolisme secondaire et la protection cellulaire. L'importance du glutathion est reflétée par les nombreuses publications qui décrivent son rôle dans les mécanismes d'immunité, de cancer, de métabolisme des drogues, de vieillissement, et de protection contre les xénobiotiques. Ce chapitre introductif présente l'état des connaissances sur le métabolisme du glutathion et notamment son rôle dans les mécanismes de gestion du stress par les cellules.

En chimie organique, un thiol est un composé organique comportant un groupement sulfhydryle –SH attaché à un atome de carbone. Ce sont en général des composés qui ont une forte odeur. Deux groupements thiols peuvent se condenser pour former un pont disulfure. Les exemples les plus courants de thiols sont le coenzyme A, le glutathion et la cystéine. Les composés qui contiennent un groupement thiol sont généralement au centre de nombreuses réactions biochimiques. Les ponts disulfures jouent un rôle important dans la structure tertiaire des protéines, et les cystéines constituent des centres réactifs qui sont la cible de nombreuses drogues. Les molécules qui contiennent une cystéine comptent parmi les composés les plus facilement métabolisables, notamment via la formation de ponts disulfures. Le glutathion (GSH) qui possède une cystéine, et les thiorédoxines, qui sont des petites protéines avec deux cystéines dans leur site actif, ont généralement des rôles complémentaires voire redondants dans la protection cellulaire. Dans la famille des protéines contenant un motif thiorédoxine, les thiorédoxines constituent les protéines les plus courtes, et jouent un rôle dans la réponse au stress oxydant, le repliement des protéines, et la transduction de signaux.



**Figure 11: Structures du glutathion.**

Le glutathion existe sous deux formes chimiques (Figure 11), la forme disulfure (GSSG), minoritaire, et la forme réduite (GSH) qui représente 98 à 99 % du glutathion total. Le glutathion participe de façon prépondérante aux mécanismes de défense cellulaire. La fonction sulfhydryle (-SH) est à l'origine de sa grande réactivité et de son puissant pouvoir réducteur. La concentration intracellulaire en glutathion est considérée par certains auteurs comme un véritable marqueur de l'état de santé d'un individu ou de l'état physiologique d'une cellule. Chez les mammifères, selon les espèces et les tissus, la concentration en glutathion varie de 2 à 10 mM (Wu et al., 2004). La majorité du glutathion (85 à 90 %) se trouve dans le cytosol, le reste étant localisé dans les mitochondries, le noyau et les péroxysomes (Lu, 2000). Le glutathion est impliqué dans la formation des prostaglandines et des leucotriènes (Wang and Ballatori, 1998; Lam and Austen, 2002; Murphy and Zarini, 2002), et sert aussi de donneur d'électrons dans un grand nombre de réactions enzymatiques (Dickinson and Forman, 2002). Ainsi, le glutathion est un co-facteur utilisé lors de la réduction des espèces activées de l'oxygène et des lipides hydroperoxydés catalysée par les glutathion peroxydases (Brigelius-Flohe, 1999) et les glutathion S-transférases (GST) (Yang et al., 2001). De plus, le glutathion joue un rôle majeur dans la réduction des intermédiaires réactifs dérivés des arylamines (Turesky, 2004), et dans la conjugaison d'intermédiaires réactifs pour former des composés S-glutathionylés (Evans and Baillie, 2005). Bien que

certaines intermédiaires réactifs se conjuguent spontanément au GSH, la majeure partie de ces réactions est catalysée par les GST. De ce fait, la structure des conjugués est dépendante de la régio-sélectivité des GST impliquées dans la formation de ces composés (Evans et al., 2004; Hayes et al., 2005).

Enfin, des polymères constitués à partir du glutathion, les phytochélatines, servent à séquestrer des métaux lourds comme le cuivre, le cadmium, ou le zinc (Pawlik-Skowronska et al., 2007).

La réponse d'un organisme à un stress implique généralement un changement dans le contenu cellulaire en glutathion. Il est à la fois consommé dans des réactions qui éliminent des composés toxiques, et synthétisé, soit *de novo*, soit par la réduction du glutathion disulfure.

## 2.1 Métabolisme

Alton Meister, en 1983, a démontré que le glutathion participe au cycle  $\gamma$ -glutamyl qui permet l'entrée ATP-dépendante des acides aminés dans la cellule grâce à la synthèse et à la dégradation du GSH (Meister and Anderson, 1983). La synthèse du glutathion est liée au métabolisme des acides aminés glutamate, cystéine et glycine. Elle s'effectue à un niveau basal dans les cellules et est régulée en fonction de facteurs environnementaux. Les différentes réactions du métabolisme du glutathion sont présentées dans la Figure 12.

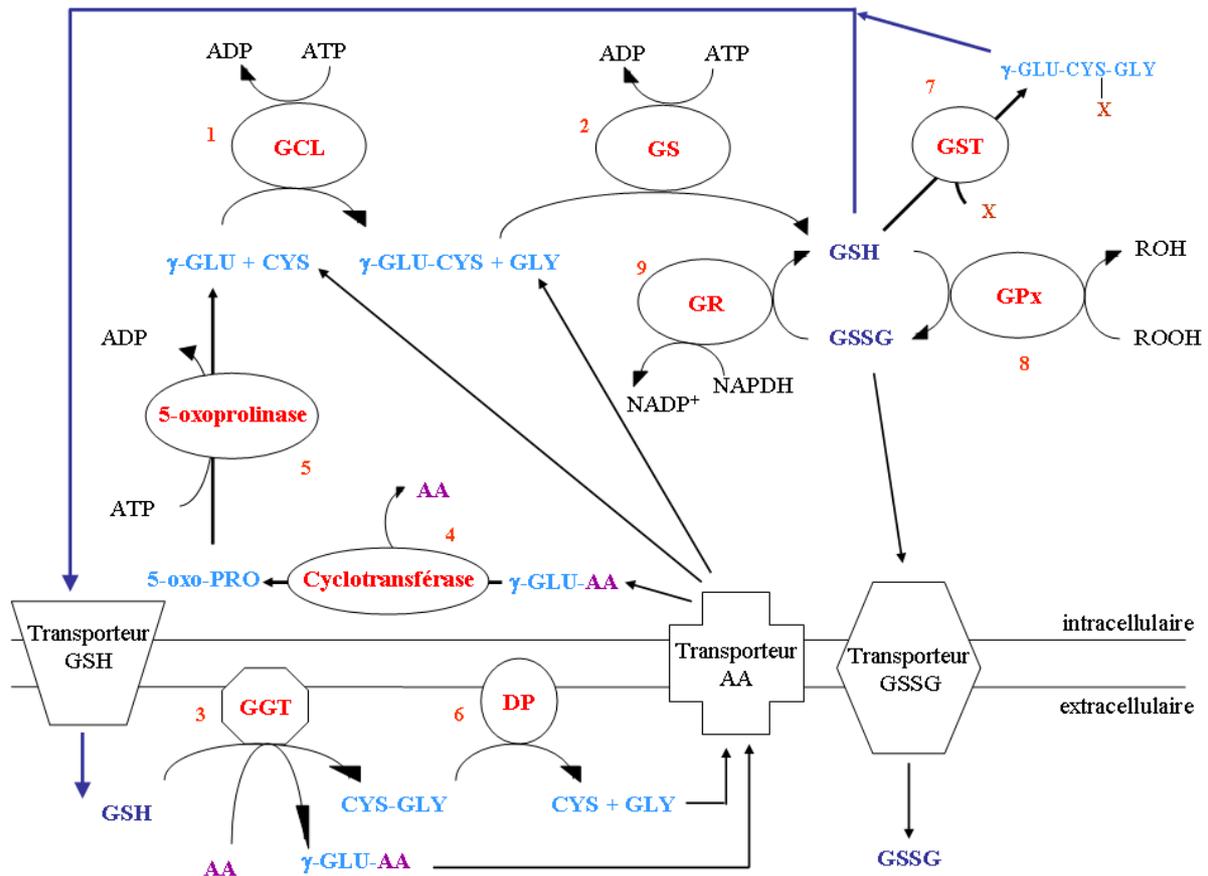


Figure 12: Métabolisme du glutathion.

Le GSH est synthétisé dans le cytosol par l'action consécutive de la glutamate cystéine ligase, GCL (également nommée  $\gamma$ -glutamylcystéine synthétase) (Figure 12-réaction 1) et de la glutathion synthétase, GS (réaction 2). La réaction 1 est rétro inhibée par le glutathion. La dégradation du GSH (et des composés S-glutathionylés) est essentiellement extracellulaire et nécessite donc le transport du glutathion à travers la membrane. Elle est assurée par la  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase, GGT, localisée sur la membrane externe de la cellule, qui catalyse le transfert du groupement  $\gamma$ -glutamyl sur un accepteur (réaction 3). Ce dernier peut être un acide aminé, AA (cystéine, glutamine, méthionine), l'eau ou le GSH lui-même. Les acides aminés  $\gamma$ -glutamylés formés par les  $\gamma$ -glutamyl transpeptidases sont ensuite à nouveau transportés dans le cytosol où ils sont pris en charge par les  $\gamma$ -glutamyl cyclotransférases (réaction 4). Ces dernières produisent de la 5-oxoprolinone et l'acide aminé initial. La conversion de 5-oxoprolinone en L-glutamate est une réaction dépendante de l'ATP, catalysée par la 5-oxoprolinase (réaction 5). La molécule de cystéinyglycine formée par l'action de la transpeptidase (réaction 3) est clivée en cystéine et en glycine par une peptidase (réaction 6).

Ces six réactions constituent le cycle du  $\gamma$ -glutamyl qui permet la synthèse et la dégradation du glutathion.

Deux de ces enzymes ont également un rôle dans le métabolisme des composés S-glutathionylés formés de manière non enzymatique par la conjugaison spontanée entre le GSH et des composés électrophiles, ou par l'activité des glutathion S-transférases, GST (réaction 7). Les composés glutathionylés sont transportés hors de la cellule où le groupe  $\gamma$ -glutamyl est éliminé par l'action de la  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase. Les composés S-cystéinyglycinylés résultants sont clivés par une dipeptidase formant ainsi des composés S-cystéinylés, rendus moins réactifs par une réaction d'acétylation formant des acides mercapturiques.

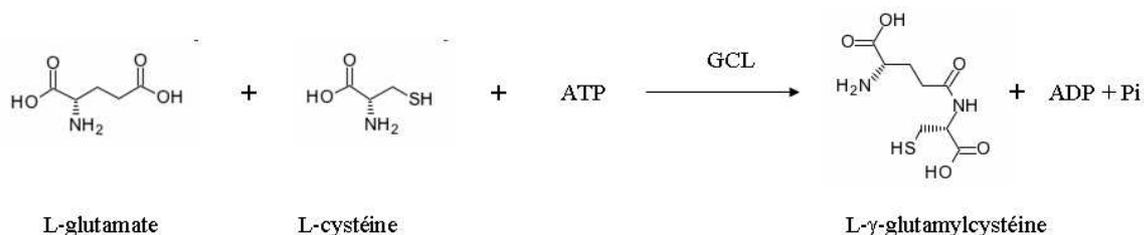
Le glutathion réduit est oxydé en GSSG par l'intermédiaire des glutathion peroxydases qui catalysent ainsi la réduction du peroxyde d'hydrogène et d'autre peroxydes (réaction 8). Un grand nombre de publications démontre cependant que les glutathion S-transférases est également capables de catalyser ce type de réaction. La réduction du GSSG en GSH est catalysée par les glutathion réductases en utilisant le pouvoir réducteur du NADPH (réaction 9).

Après avoir vu comment fonctionne le métabolisme du glutathion, nous allons nous intéresser un peu plus particulièrement aux enzymes impliqués. C'est en suivant cette démarche que le métabolisme du glutathion a été annoté dans le génome d'*Ectocarpus*.

## 2.2 Les enzymes du cycle $\gamma$ -glutamyl

### 2.2.1 Synthèse du glutathion

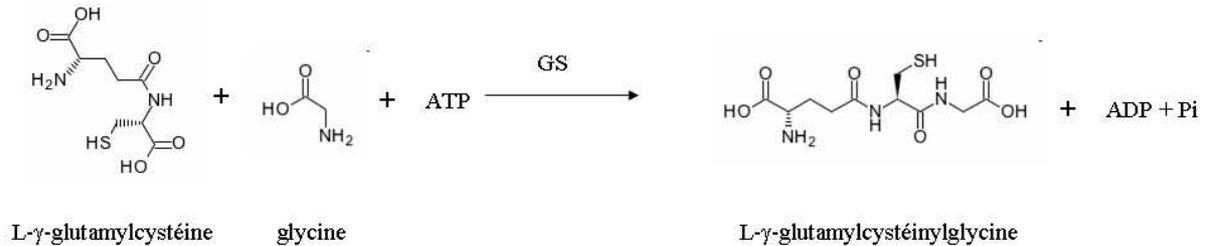
La synthèse du glutathion fait intervenir deux enzymes ATP-dépendantes. La première enzyme est la glutamate-cystéine ligase (GCL, E.C.6.3.2.2), également nommée  $\gamma$ -glutamylcystéine synthétase, et catalyse la réaction suivante :



Chez les mammifères, GCL est un hétérodimère constitué d'une petite sous-unité régulatrice (GCLM) et d'une grande sous-unité catalytique (GCLC) (Seelig and Meister, 1985). GCLC présente une taille de 73 kDa et possède la totalité du site catalytique nécessaire à l'activité GCL, et le site de rétro inhibition par le glutathion. GCLM présente une taille de 31 kDa et

possède une activité régulatrice lorsqu'elle est associée à GCLC en augmentant la constante d'inhibition ( $K_i$ ) du GSH, réduisant ainsi la rétro inhibition de la grande sous-unité (Choi et al., 2000). En revanche, chez les plantes aucun gène codant pour la sous-unité régulatrice n'a été identifié à ce jour (Foyer and Noctor, 2005).

La seconde enzyme est la glutathion synthétase (GS, E.C.6.3.2.3) qui catalyse la réaction suivante:

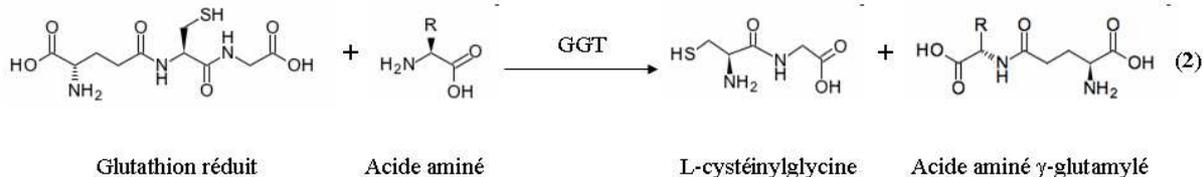
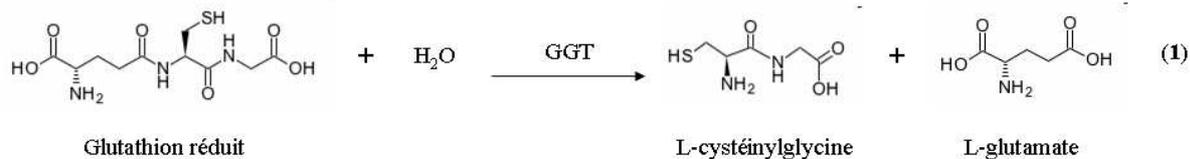


Cette enzyme, active sous la forme d'un homodimère de 118 kDa, catalyse l'addition d'une glycine sur le L-γ-glutamylcystéine produit par la GCL pour former le glutathion.

Dans le génome humain, les gènes codant pour GCL et GS sont présents en une seule copie (Dickinson and Forman, 2002). Etant donné l'importance du glutathion dans le métabolisme cellulaire, les gènes codant pour les enzymes de synthèse sont fortement régulés. Chez *Arabidopsis thaliana*, GCL et GS sont également codées par un seul gène chacune, et la présence de peptide signaux suggère que la protéine GCL est plutôt localisée dans le chloroplaste tandis que GS est majoritairement cytosolique (Foyer and Noctor, 2005).

### 2.2.2 Dégradation du glutathion

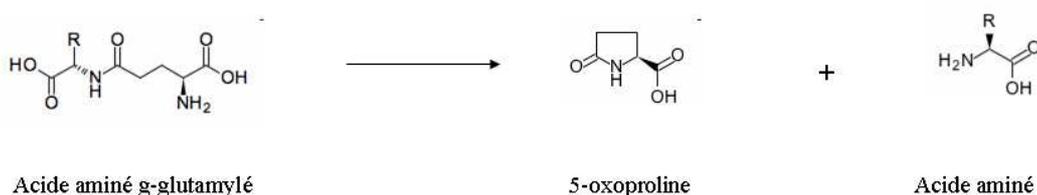
Le glutathion est un tripeptide particulier car il présente une liaison amide entre l'amine alpha de la cystéine et le groupement carboxyle (gamma) du radical glutamate. Une liaison peptidique dite "classique" s'opère entre le groupement carboxyle du carbone alpha d'un acide aminé et le groupement amine du carbone alpha de l'autre acide aminé. De ce fait, la liaison peptidique entre le glutamate et la cystéine du glutathion n'est pas clivable par les protéases intracellulaires (Stark et al., 2003). La dégradation est donc initiée par la γ-glutamyl transpeptidase (GGT). Cette aminopeptidase (E.C.3.4.11.2) peut utiliser plusieurs substrats.



Tout d'abord, elle peut hydrolyser le glutathion r\u00e9duit pour former du glutamate et un dipeptide de cyst\u00e9nylglycine (1). Deuxi\u00e8mement, elle peut transf\u00e9rer le groupement  $\gamma$ -glutamyl vers un accepteur (2). Les isom\u00e8res de cystine (dipeptide de cyst\u00e9ines li\u00e9es par un pont disulfure) et les m\u00e9thionines sont g\u00e9n\u00e9ralement de bons accepteurs du groupement  $\gamma$ -glutamyl. Enfin, cette enzyme est capable de r\u00e9aliser une auto-transpeptidation qui est un transfert du groupement  $\gamma$ -glutamyl vers le GSH, formant ainsi du  $\gamma$ -glutamyl-glutathion. Le GSH, le GSSG et les compos\u00e9s S-gluthionyl\u00e9s sont les substrats de cette enzyme.

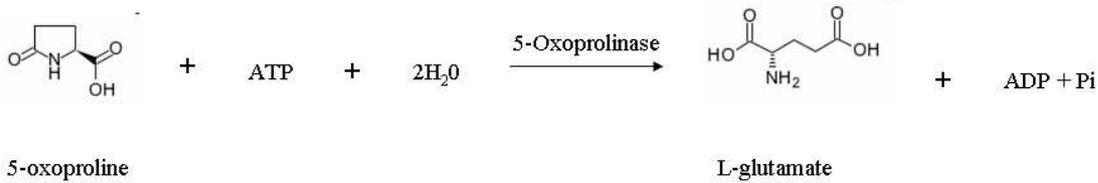
Cette enzyme est particuli\u00e8rement importante car elle participe au transport des acides amin\u00e9s. En effet, la  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase est localis\u00e9e sur la face externe des membranes cellulaires et le glutathion est transport\u00e9 \u00e0 l'ext\u00e9rieur des cellules o\u00f9 a lieu le transfert du groupement  $\gamma$ -glutamyl sur un acide amin\u00e9. Le dipeptide de cyst\u00e9nylglycine et l'acide amin\u00e9  $\gamma$ -glutamyl\u00e9 form\u00e9s sont ensuite transport\u00e9s vers le milieu intracellulaire.

La  $\gamma$ -glutamyl cyclotransf\u00e9rase (E.C.2.3.2.4) convertit l'acide amin\u00e9  $\gamma$ -glutamyl\u00e9 en 5-oxoproline et en acide amin\u00e9 correspondant au cours de la r\u00e9action suivante:



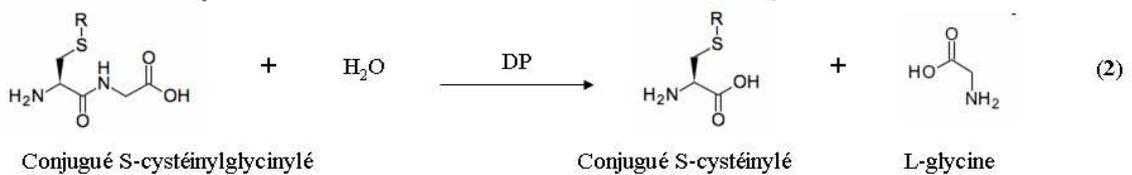
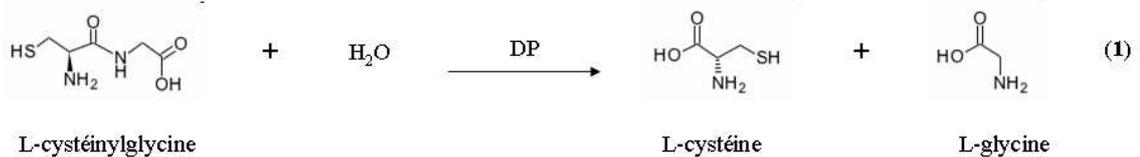
Cette enzyme soluble est tr\u00e8s active envers les d\u00e9riv\u00e9s  $\gamma$ -glutamyl\u00e9s de glutamine, d'alanine, de cyst\u00e9ine, de cystine et de m\u00e9thionine (Meister and Anderson, 1983).

La 5-oxoprolinase (E.C.3.5.2.9) est une enzyme ATP d\u00e9pendante qui clive la 5-oxoproline en glutamate dans la r\u00e9action suivante:



Cette réaction nécessite l'énergie de l'ATP car la liaison amide de la 5-oxoproline est très stable.

Une dipeptidase (DP) (E.C.3.4.11.2) intracellulaire ou liée à la membrane externe (membrane-alanyl-aminopeptidase) catalyse la dégradation du dipeptide cystéinyglycine dans les réactions suivantes:

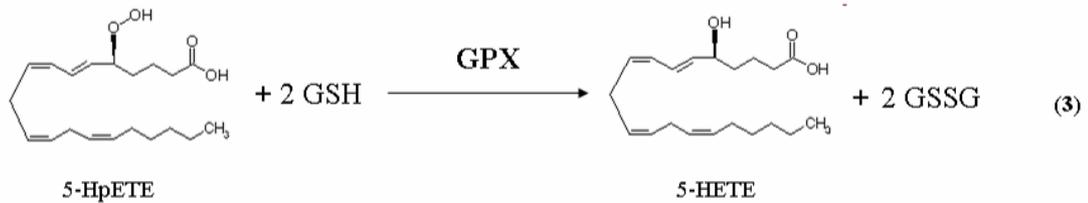
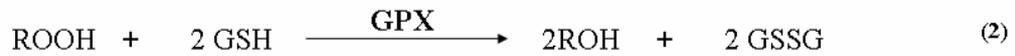
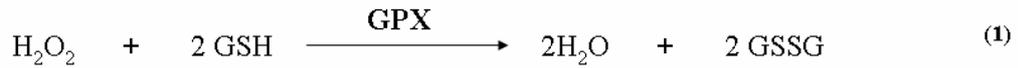


Cette enzyme assure la dégradation du L-cystéinyglycine en cystéine et glycine. Ces acides aminés sont alors réintroduits dans le cycle de synthèse des protéines et du glutathion. L'aminopeptidase catalyse également la dégradation de conjugués S-cystéinyglycinylé issus de l'activité des glutathion S-transférases et de la  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase.

## 2.3 Oxydo-réduction du glutathion

### 2.3.1 Glutathion peroxydases

Les glutathion peroxydases (GPx: EC.1.11.1.9 et EC.1.11.1.12) catalysent la dégradation du peroxyde d'hydrogène (réaction 1) et des hydroperoxydes organiques formés par l'oxydation des acides gras (réactions 2 et 3), en utilisant le glutathion comme donneur d'électrons (Margis et al., 2008).



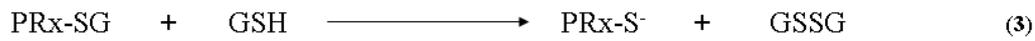
Chez les animaux, les GPx sont des sélénoprotéines qui varient en fonction de leur spécificité pour les hydroperoxydes (Brown et al., 2000; Herbette et al., 2007). Chez les mammifères, il existe quatre classes majeures de GPx dépendantes du sélénium: GPx1 est retrouvée au niveau du cytoplasme, du noyau et de la mitochondrie, GPx2 est une forme cytosolique, GPx3 est extracellulaire, et GPx4 est liée aux membranes cellulaires où elle catalyse la régénération des hydroperoxydes de phospholipides.

Les GPx[1-3] sont actives sous forme d'homotétramères d'environ 85 kDa tandis que GPx4 l'est sous forme d'un monomère de 22 kDa environ. Deux autres isoenzymes, GPx5 et GPx6, identifiées chez les mammifères, sont proches de GPx3. Toutes ces glutathion peroxydases possèdent un atome de sélénium dans leur site actif, très fortement lié à la chaîne peptidique car incorporé sous forme de sélénocystéine dans la séquence primaire: le soufre de la cystéine est remplacé par le sélénium selon un processus complexe où un codon TGA (codon stop) va permettre l'incorporation de cet acide aminé à un endroit strictement déterminé.

Une autre glutathion peroxydase de phospholipides hydroperoxydés, sans sélénocystéine, a également été identifiée chez les mammifères et constitue la septième isoenzyme. Cette enzyme présente une cystéine dans son site catalytique et joue un rôle important dans l'atténuation du stress oxydant généré par le métabolisme des acides gras polyinsaturés (Utomo et al., 2004).

Les peroxyrédoxines (E.C. 1.11.1.15) sont des protéines capables de réduire le peroxyde d'hydrogène en utilisant le glutathion ou d'autres thiols comme donneur d'électron. Ces enzymes possèdent une cystéine sous forme thiolate (-S<sup>-</sup>) à la place de l'atome de sélénium

dans leur site actif, leur permettant ainsi la formation de ponts disulfures. La séquence des réactions est la suivante:



Chez les plantes, les glutathion peroxydases sont des peroxyrédoxines qui se régénèrent à partir des thiorédoxines au lieu d'utiliser le glutathion ou les glutarédoxines (Navrot et al., 2006).

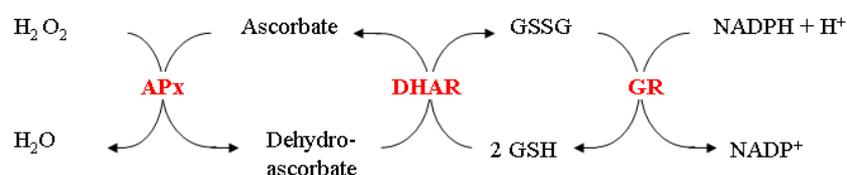
### 2.3.2 Glutathion réductase

Le glutathion oxydé (GSSG), plus justement appelé glutathion disulfure, est réduit en GSH par l'action de la glutathion réductase (GR, E.C.1.8.1.7) en utilisant le pouvoir réducteur du NADPH, lors de la réaction suivante:



Cette réaction est irréversible, ce qui explique pourquoi le glutathion disulfure, GSSG, constitue généralement moins de 1% du glutathion total. L'augmentation du pool de GSSG au cours d'un stress oxydant est généralement transitoire tant l'action des glutathion réductases est rapide.

Les glutathion réductases sont également impliquées dans la régénération du GSH oxydé par l'activité du couple dehydro-ascorbate réductase (DHAR) / ascorbate peroxydase (APx) dans une suite de réactions qui permet de réduire le peroxyde d'hydrogène:

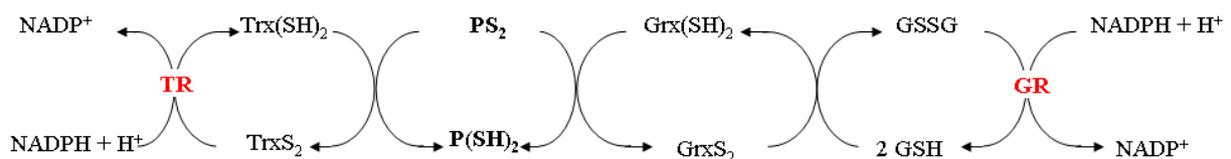


La concentration cellulaire en GSSG est également régulée par des transporteurs ATP-dépendants qui déplacent le glutathion disulfure vers le milieu extracellulaire (Suzuki and Sugiyama, 1998). Au cours d'un stress oxydant, le GSH est rapidement utilisé, entraînant une augmentation du pool de GSSG. Dans ces conditions, un pont disulfure peut être formé entre le glutathion disulfure et le groupement sulfhydryle d'une protéine, produisant alors une protéine S-glutathionylée (Dalle-Donne et al., 2007):



La glutathionylation des protéines est une modification post-traductionnelle des résidus cystéine qui engagent un pont disulfure avec le groupement thiol du glutathion (Ghezzi and Di Simplicio, 2007). Ce processus est généralement associé au stress engendré par les espèces activées de l'oxygène et par l'oxyde nitrique, mais apparaît également dans des conditions cellulaires normales (Townsend, 2007). La glutathionylation des protéines semble jouer un rôle dans la médiation des signaux cellulaires au même titre que la phosphorylation, et les glutarédoxines sont les acteurs de la dé-glutathionylation (Shelton et al., 2005).

L'état réduit des cystéines libres des protéines est généralement la cible des espèces activées de l'oxygène qui génèrent alors la formation de ponts disulfures non spécifiques. L'état rédox des protéines est contrôlé par l'action des glutarédoxines (Grx) et des thiorédoxines (Trx) dans le système suivant:



Un taux élevé de glutathion réduit est nécessaire pour l'activité des protéines afin d'éviter la formation de ponts disulfures non spécifiques qui engendrent l'agrégation et l'inactivation des protéines. Les cystéines des protéines sont maintenues à l'état réduit  $\text{P}(\text{SH})_2$  par l'oxydation du groupement thiol des thiorédoxines d'une part et des glutarédoxines d'autre part. Les thiorédoxines sont maintenues à l'état réduit par l'activité NADPH dépendante des thiorédoxines réductases (TR). Les glutarédoxines sont maintenues à l'état réduit grâce au glutathion réduit, oxydé en glutathion disulfure, et à nouveau réduit par l'activité des glutathion réductases (GR).

## 2.4 Conjugaison du glutathion

### 2.4.1 Composés exogènes

Le glutathion intervient dans le métabolisme et la détoxification de composés exogènes toxiques, couramment appelés xénobiotiques. Ainsi, il forme des conjugués avec une grande variété de composés électrophiles, soit de manière non-enzymatique lorsque ces composés sont très réactifs, soit par l'action des glutathion S-transférases (GST). Le glutathion est par exemple conjugué avec des herbicides tels que l'atrazine (Figure 13), le fluorodifène, le métolachlore ou l'alachlore chez les plantes terrestres (Lamoureux and Rusness, 1986; Hatton et al., 1995). De même, la fosfomycine est glutathionylée chez les bactéries résistantes à cet antibiotique (Arca et al., 1988) (Figure 13).

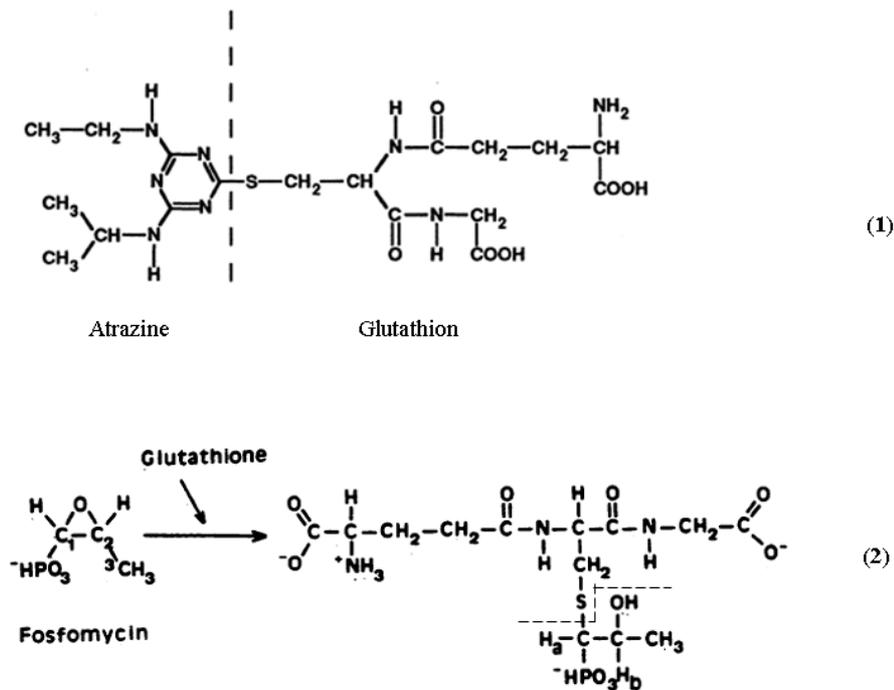
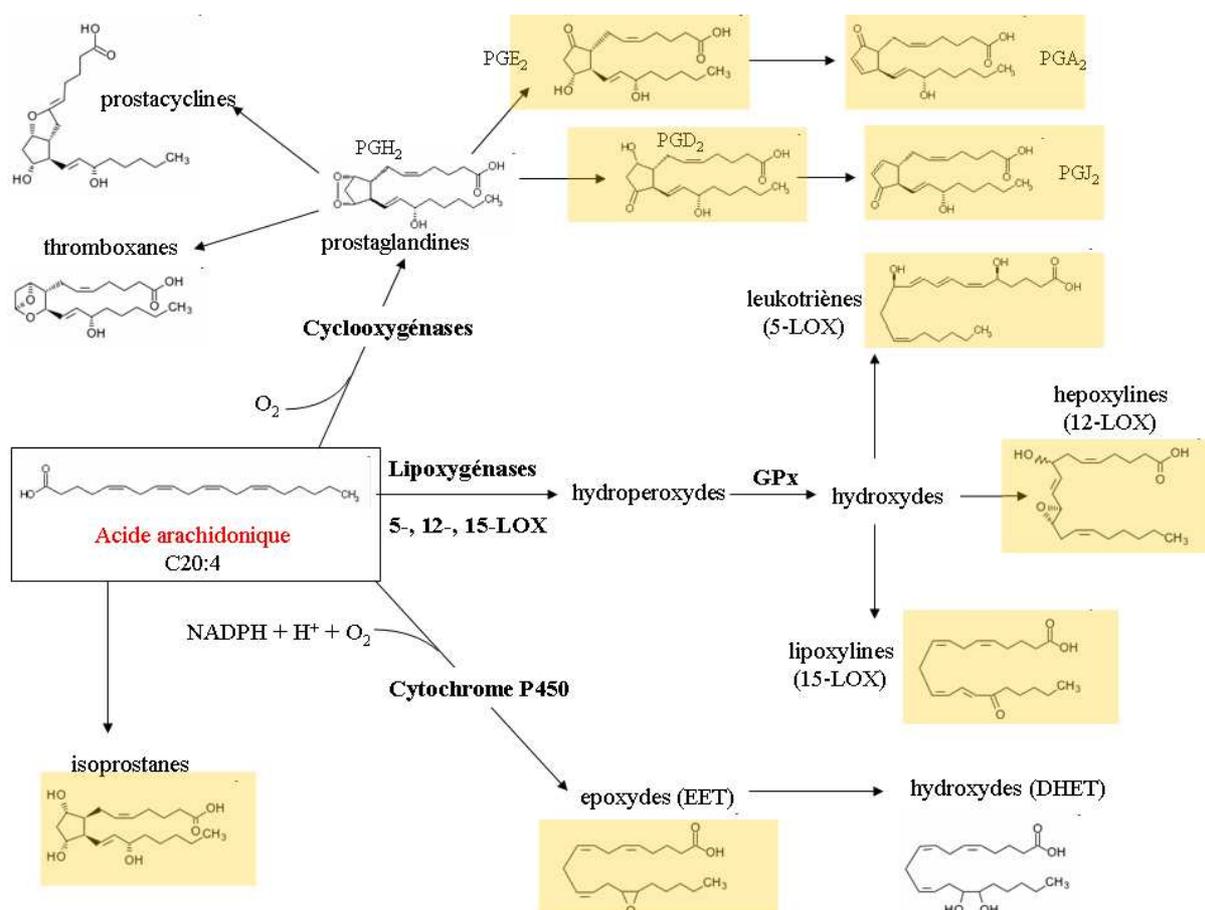


Figure 13: Conjugaison du glutathion et de l'atrazine (1) et de la fosfomycine (2).

## 2.4.2 Composés endogènes

### 2.4.2.1 Les eicosanoïdes

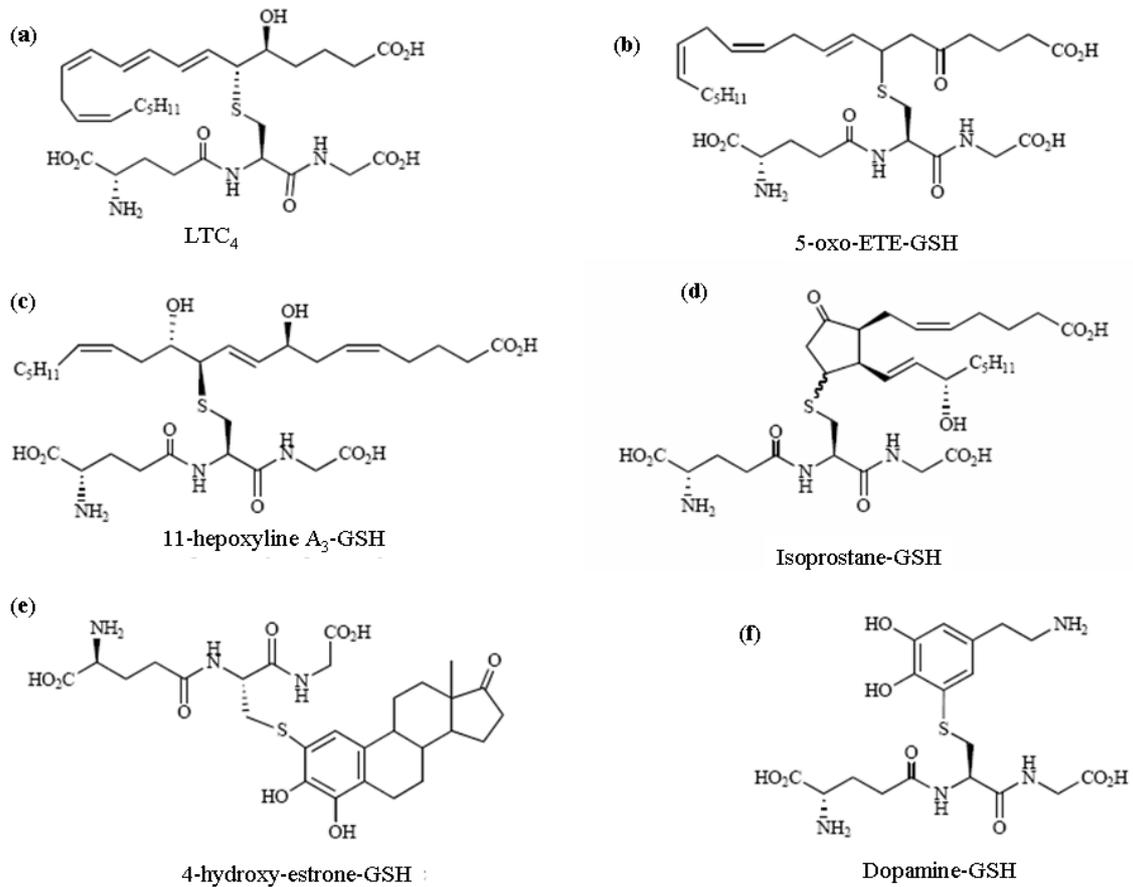
De nombreux eicosanoïdes électrophiles contenant des cétones  $\alpha,\beta$ -insaturées sont générés lors du métabolisme oxydatif de l'acide arachidonique (Murphy and Zarini, 2002) (Figure 14).



**Figure 14: Métabolisme oxydatif de l'acide arachidonique.**

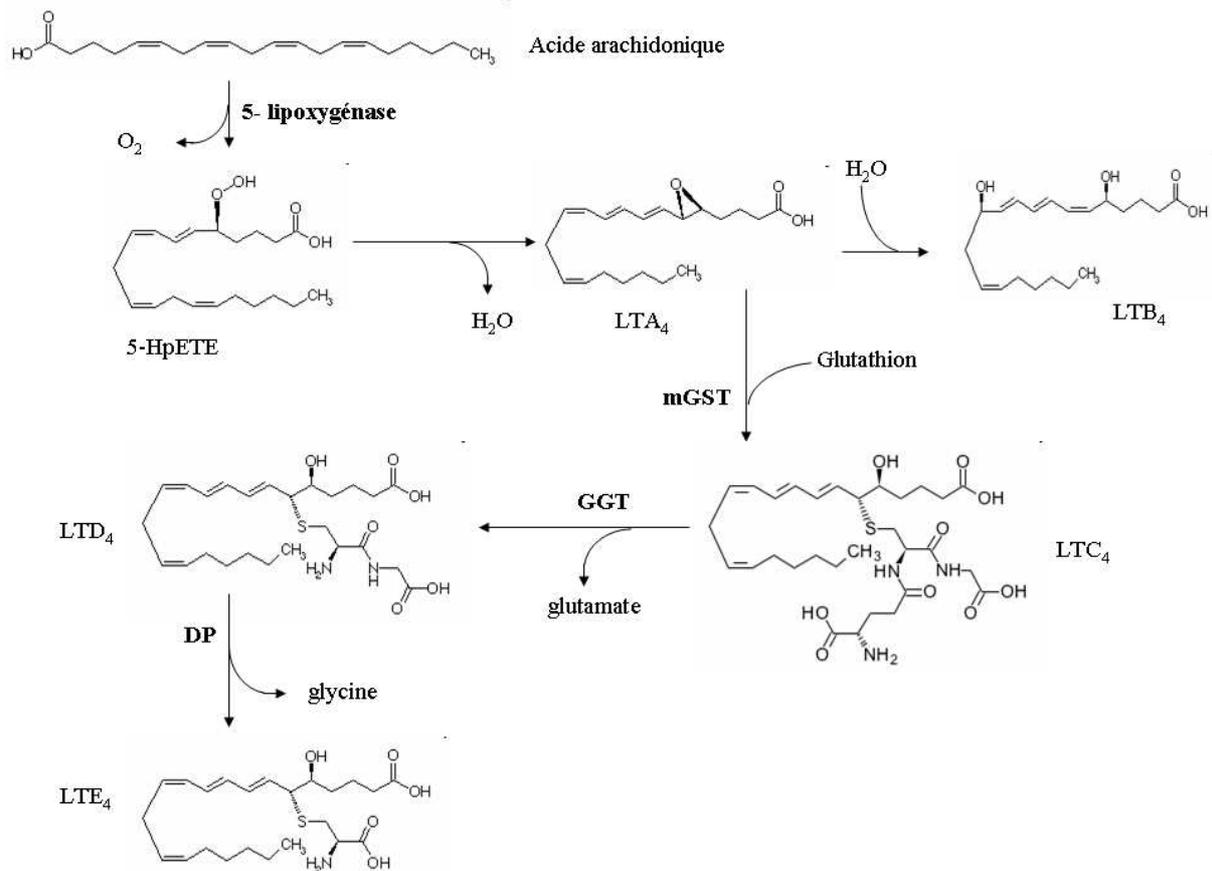
Les composés mis en évidence par le fond orange sont susceptibles d'être conjugués au glutathion.

Un certain nombre d'entre eux sont d'excellents substrats pour la conjugaison du glutathion par les GST. Ainsi, des conjugués ont été identifiés pour des molécules dérivées de l'acide arachidonique par l'activité 5-LOX (5-oxo-ETE LTC<sub>4</sub>, Figure 15a,b), 12-LOX (hepoxiline A3, Figure 15c), 15-LOX (15-oxo-ODE), cyclooxygénase (PGA<sub>1</sub>, PGA<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>, PGI<sub>2</sub>), et cytochrome P450 (14,15-EET). Des conjugués d'isoprostanes, molécules formées par l'oxydation non-enzymatique de cet AGPI, ont également été détectés (Figure 15d).



**Figure 15: Exemple de composés endogènes conjugués au glutathion, d'après Blair (2006).**

Les leucotriènes sont un exemple de composés endogènes synthétisés par la conjugaison du glutathion. Les leucotriènes A<sub>4</sub> sont conjugués au glutathion par l'action d'une GST microsomale, formant ainsi les leucotriènes C<sub>4</sub>. Les leucotriènes D<sub>4</sub> et E<sub>4</sub> sont ensuite générés par l'action consécutive des  $\gamma$ -glutamyl transpeptidases et des aminopeptidases. Ces molécules dérivées de l'acide arachidonique sont largement impliquées dans la réponse inflammatoire chez les animaux (Funk, 2001) (Figure 16).



**Figure 16: Biosynthèse des leucotriènes en relation avec le métabolisme du glutathion.**

De même, au cours d'un stress oxydant, l'acide arachidonique, provenant de l'action des phospholipases membranaires, est converti par une 15-LOX en 15-HpETE qui se décompose spontanément en 4-hydroperoxy-2(E)-nonenal (HpNE). Ce dernier est un précurseur des aldéhydes 4-hydroxy-2(E)-nonenal (4-HNE) et 4-oxo-2(E)-nonenal (ONE). Le 4-HNE est glutathionylé par l'activité d'une GST et successivement transformé jusqu'à la formation d'un acide mercapturique (Figure 17)

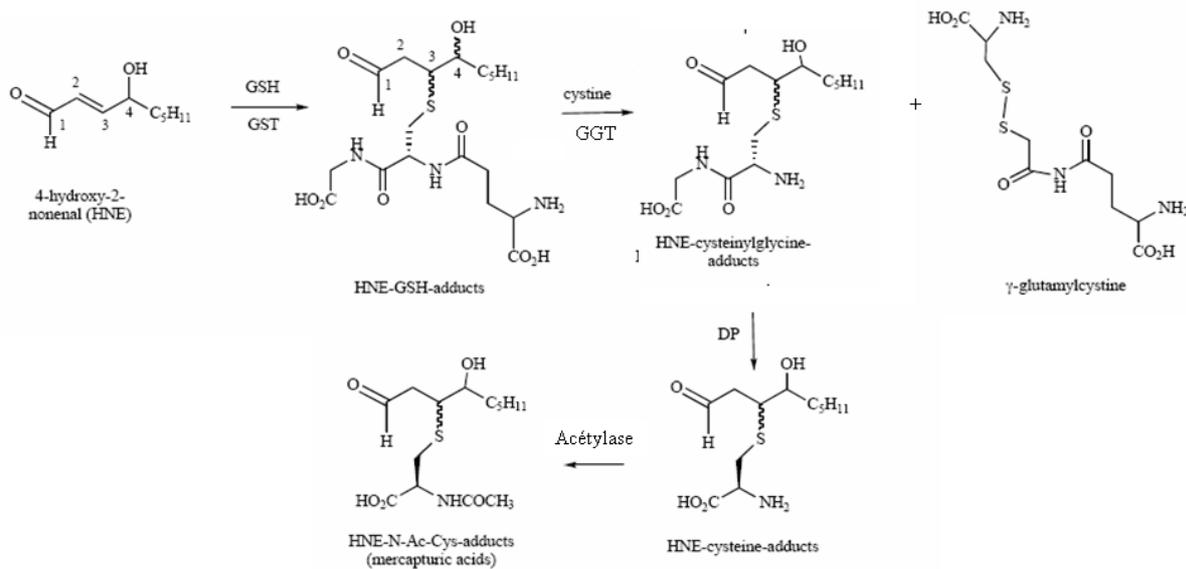


Figure 17 : Détoxification du 4-HNE en relation avec le métabolisme du glutathion.

#### 2.4.2.2 Autres métabolites conjugués

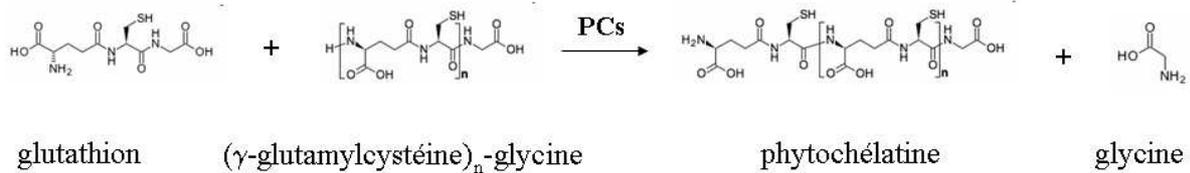
Les molécules glutathionylées sont généralement converties en acide mercapturique par une série de réactions initiées par la  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase qui transfère le groupement  $\gamma$ -glutamyl vers un accepteur. En effet, le conjugué de cystéinylglycine restant est converti à son tour par l'action d'une peptidase en une glycine et un conjugué cystéinylé qui est ensuite N-acétylé pour former un acide mercapturique (Blair, 2006).

Ainsi, la conjugaison du glutathion a été observée sur des molécules de dopamine (Figure 15f). Lorsque ce neurotransmetteur de la famille des catécholamines est glutathionylé, il est rapidement métabolisé dans les cellules du cerveau de rat en dopamine S-cystéinylé et en un acide mercapturique qui semble avoir un rôle dans la mort cellulaire des neurones lors de la maladie de Parkinson.

Les oestrogènes et leurs dérivés oxydés, les catéchol oestrogènes, sont des hormones stéroïdiennes dont l'implication dans le développement des cancers du sein a été mise en évidence (Hachey et al., 2003). L'administration de 4-hydroxyo-estradiol entraîne la formation de conjugués de 4-hydroxy-estrone (Figure 15e) chez le hamster (Todorovic et al., 2001).

## 2.5 Les phytochélatines, un polymère de GSH

Les phytochélatines sont des oligopeptides de structure  $(\text{GLU-CYS})_n\text{-GLY}$  avec  $n$  compris entre 2 et 11. Ils sont synthétisés à partir du glutathion par une dipeptidyltransférase nommée phytochélatine synthase (Beck et al., 2003) (PCs: E.C.2.3.2.15) selon la réaction suivante:



Les phytochélatines sont impliquées dans l'homéostasie et la détoxification des métaux chez les plantes supérieures, les algues, et certains champignons et lichens (Zenk, 1996; Pawlik-Skowronska et al., 2007). Ces molécules plus ou moins longues sont capables de chélater les métaux grâce aux groupements thiol de leurs cystéines.

## 2.6 Modifications du pool de glutathion en fonction de facteurs environnementaux

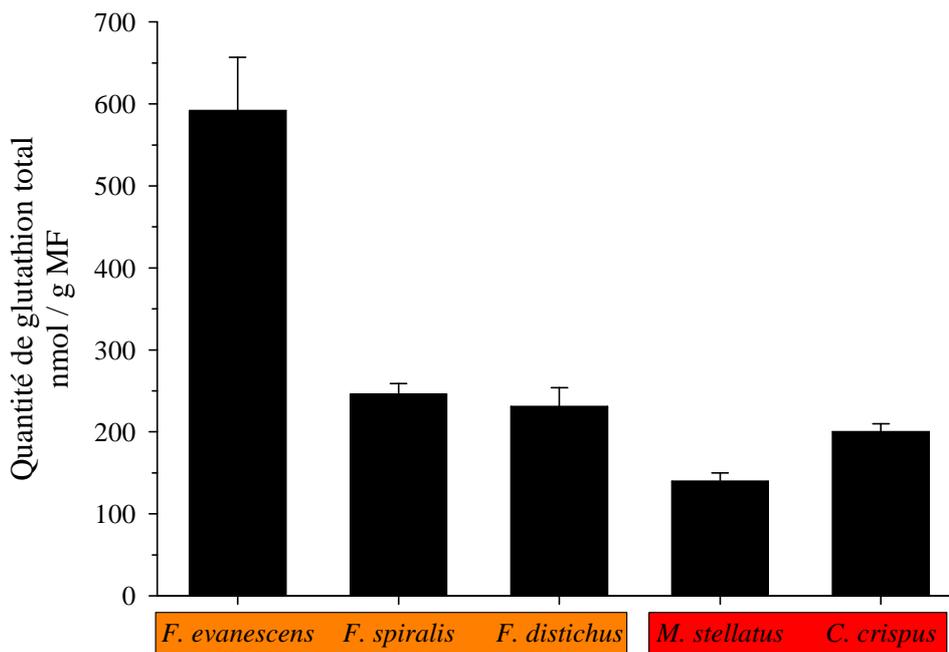
Un grand nombre de paramètres et de molécules modifient le contenu intracellulaire en glutathion. Ainsi, la concentration de GSH est augmentée chez les mammifères lors de traitements par les métaux lourds comme le mercure (Woods and Ellis, 1995), par des concentrations élevées en glucose (Urata et al., 1996), et de fortes températures (Kondo et al., 1993). De même, la présence d'espèces activées de l'oxygène et de l'azote, notamment le peroxyde d'hydrogène et l'oxyde nitrique, induisent une augmentation de la quantité de glutathion (Rahman et al., 1996; Moellering et al., 1999). Certains composés endogènes modifient le pool de GSH tels que la 15-deoxy-prostaglandine  $J_2$  (Levonen et al., 2001), le 4-HNE (Liu et al., 1998; Dickinson and Forman, 2002) et quelques lipoprotéines oxydées (Moellering et al., 2002), en augmentant l'activité des enzymes de synthèse. Chez les plantes, le GSH s'accumule en réponse à un stress salin (Gossett et al., 1996; Shalata and Tal, 1998), en présence de métaux lourds comme le cadmium ou le cuivre (Chen and Goldsbrough, 1994; Xiang and Oliver, 1998), ou à basses températures (Walker and McKersie, 1993; Kocsy et al., 2000). En revanche, l'infection par des pathogènes diminue massivement la quantité de glutathion intracellulaire (Kuzniak and Sklodowska, 2001).

Le contenu intracellulaire de glutathion est équilibré entre synthèse et utilisation. L'épuisement du GSH intervient via les réactions de conjugaison des GST et l'activité des

glutathion peroxydases. Ces activités enzymatiques sont bénéfiques pour la cellule puisqu'elles induisent l'élimination de composés toxiques, mais cela dépend du glutathion réduit qui doit être renouvelé. Bien que le glutathion disulfure généré par les glutathion peroxydases soit réduit par les glutathion réductases au dépend du NADPH, une grande partie du glutathion est synthétisé *de novo* (Dickinson and Forman, 2002).

## 2.7 Le glutathion chez les algues

Chez les algues, un nombre limité d'études fait référence au contenu cellulaire en glutathion et à l'activité d'enzymes ayant un rôle dans la protection cellulaire contre les dérivés de l'oxygène. Ainsi, Collén et Davison, en 1999, ont déterminé la teneur en glutathion chez différentes espèces d'algues ayant pour habitat la zone intertidale (Collén and Davison, 1999c). Les valeurs obtenues sont du même ordre de grandeur chez toutes les espèces considérées (Figure 18).



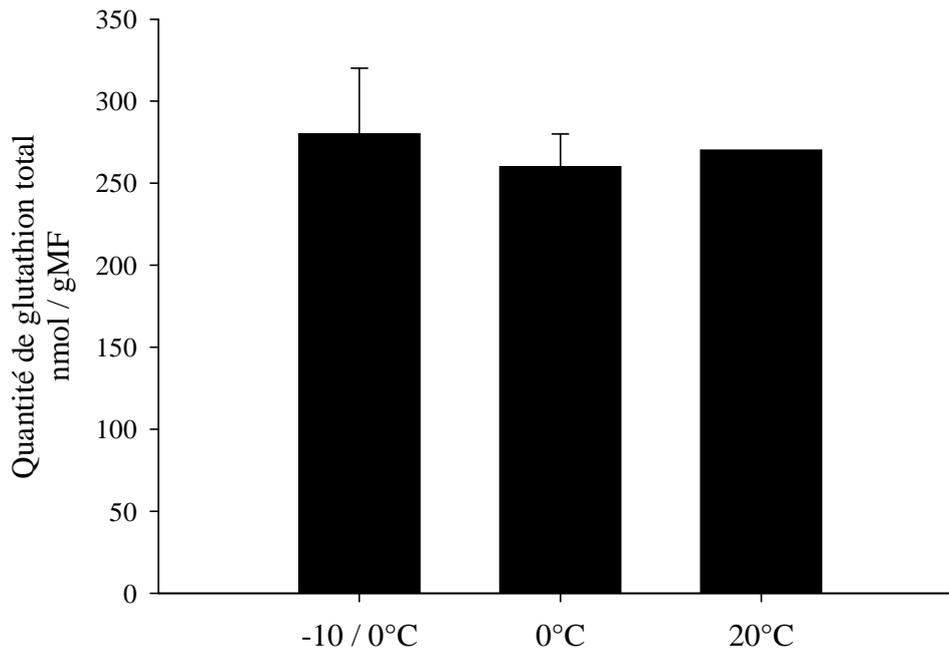
**Figure 18:** Contenu en glutathion cellulaire mesuré dans différentes espèces d'algues brunes et rouges.

Les concentrations de glutathion total ont été déterminées dans des algues prélevées sur l'estran (d'après Collén and Davison, 1999 a et b).

*Fucus spiralis* et *Fucus distichus*, ainsi que *C. crispus*, contiennent environ 200 nmoles de GSH par gramme de masse fraîche. *Fucus evanescens* présente une teneur en glutathion trois fois plus importante et *Mastocarpus stellatus* dispose de 150 nmoles de GSH par gramme de masse fraîche. Parmi les espèces de *Fucus*, *F. spiralis* est l'espèce la plus tolérante, c'est-à-dire qu'elle dispose, selon les auteurs, d'un système de réponse au stress

oxydant plus efficace. Il ne semble donc pas y avoir de lien entre une forte teneur en glutathion et une tolérance accrue. De même, *M. stellatus* est plus résistant à la dessiccation et aux basses températures que *C. crispus*, alors que les deux algues présentent un contenu en glutathion équivalent.

Les mêmes auteurs ont comparé les teneurs en glutathion chez *Fucus vesiculosus* en fonction de différentes températures de culture (Collén and Davison, 1999a)(Figure 19).



**Figure 19: Concentrations de glutathion cellulaire mesurées chez *Fucus vesiculosus* cultivé à différentes températures.**

La condition -10/0°C correspond à une culture à 0°C avec 3h d'émersion quotidiennes à -10°C, d'après Collén and Davison, 1999.

Bien que la production d'espèces actives de l'oxygène soit plus importante dans les cultures à 20°C qu'à 0°C ou -10/0°C, le contenu en glutathion n'est pas modifié, suggérant ainsi que le glutathion ne varie pas en fonction du stress thermique et de la présence d'EAO intracellulaires chez *Fucus vesiculosus*. En revanche, un lien a été établi entre de fortes concentrations cellulaires en métaux et de fortes concentrations en GSH et en phytochélatines chez des *Fucus vesiculosus* collectés dans un site pollué par les métaux (Pawlik-Skowronska et al., 2007). Le glutathion semble donc impliqué dans les mécanismes de tolérance aux métaux chez les algues, comme c'est le cas chez les plantes.

Le glutathion est une molécule vitale pour la survie cellulaire. Par son cycle de synthèse et de dégradation, il permet le transport des acides aminés entre les cellules. Par sa conjugaison, il permet la formation d'hormones et de molécules de signalisation, ainsi que la détoxification de composés toxiques. Sa synthèse est extrêmement bien régulée dans les cellules pour éviter sa déplétion ou son accumulation qui aurait des effets néfastes sur l'équilibre fonctionnel des cellules. Présent chez les algues brunes, ce métabolite est le principal substrat des glutathion-S-transférases.

## 3. Les glutathion S-transférases

---

### 3.1 Historique

Les glutathion S-transférases (GST) sont les principaux acteurs du métabolisme des composés électrophiles au sein de la cellule. Ces enzymes fournissent une protection contre des substances endogènes ou xénobiotiques à caractère génotoxique et cancérigène. Les GST ont été découvertes en 1961 suite à la mise en évidence, dans des extraits de foie de rat, de la conjugaison enzymatique du glutathion avec des composés aromatiques halogénés, le sulfobromophthaléine et les chloro-nitrobenzènes (Booth et al., 1961). Ces enzymes ont été originellement nommées GSH S-aryltransférases. D'autres enzymes catalysant la conjugaison du glutathion sur des époxydes et des alkyl halides ont été désignées comme epoxide S-transférases et alkyl halides transférases, et ainsi de suite en fonction du substrat identifié. En 1974, Clark et ses collaborateurs ont mis en évidence que le 1,2-chloro-4-dinitrobenzène (CDNB) était un substrat partagé par plusieurs enzymes, démontrant ainsi l'inadaptabilité de la nomenclature des GST. En effet, de nombreuses GST sont capables d'agir sur les mêmes substrats. Les noms originaux ont donc été abandonnés et remplacés par une nomenclature à trois lettres (Habig et al., 1974).

L'E.C.I.U.B.M.B. (Enzyme Commission of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology) a établi le nom systématique: "RX: glutathione R-transferase E.C.2.5.1.18". Cette commission a également recommandé d'utiliser l'appellation glutathion transférase, sans le préfixe S (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/>). Couramment utilisé, glutathion S-transférase est un non-sens puisque ce n'est pas l'atome de soufre qui est transféré mais le groupement glutathionyl GS<sup>-</sup>. Cependant, la plupart des réactions catalysées par ces enzymes sont des additions nucléophiles voire des substitutions plus que des transferts. Le terme exact devrait être lyase et non transférase, de même que certaines GST sont en fait des isomérases (Fernandez-Canon and Penalva, 1998; Johansson and Mannervik, 2001). Malgré ces différences d'activité enzymatique, l'acronyme GST doit être employé.

Plusieurs superfamilles de GST sont traditionnellement reconnues:

- Les GST cytosoliques (ou solubles), majoritairement identifiées dans le cytoplasme mais également dans le noyau, les mitochondries et les péroxysomes.
- Les GST microsomales appartenant à la superfamille des MAPEG (Membrane Associated Proteins in Eicosanoids and Glutathione metabolism).

- Les GST Kappa identifiées dans les mitochondries et les peroxyosomes.

D'autres familles de protéines partagent des similitudes structurales avec les GST. C'est le cas des glutarédoxines (Xia et al., 2001; Collinson and Grant, 2003), des canaux à chlore intracellulaires (CLIC) (Dulhunty et al., 2001; Harrop et al., 2001; Cromer et al., 2002), des déhydroascorbates réductases (DHAR) (Dixon et al., 2002a), des glutathion peroxydases à sélénocystéine (Epp et al., 1983), des isomérases de ponts disulfures (DsbA) bactériennes (Martin et al., 1993) et du facteur d'élongation eEF1B $\gamma$  (Jeppesen et al., 2003).

### 3.2 Fonction des GST dans la cellule: variations autour d'un mécanisme général

#### 3.2.1 Principe de la réaction de conjugaison

La réaction de conjugaison, catalysée par les GST, est réalisée entre le glutathion et un second substrat.



R-X représente un substrat électrophile, c'est à dire un composé chimique déficient en électrons et donc susceptible d'attirer ceux-ci. Le contraire d'électrophile est nucléophile. Chimiquement, cette réaction correspond à une attaque nucléophile sur un composé électrophile. Elle consiste en l'attaque d'un anion ou d'une molécule présentant un doublet libre sur un atome de carbone appauvri en électron. Le doublet libre du réactif nucléophile cherche à engager une liaison dative avec l'atome de carbone attaqué. Deux cas sont alors envisagés: la substitution nucléophile, et l'addition nucléophile sur le groupement carbonyle. Lors de la substitution nucléophile, la fixation par liaison dative du réactif nucléophile sur l'atome de carbone attaqué exige le départ nucléofuge du substituant initial. Un départ nucléofuge est un départ au cours duquel le doublet de la liaison rompue s'arrache à l'atome de carbone et part avec l'ancien substituant (Figure 20)

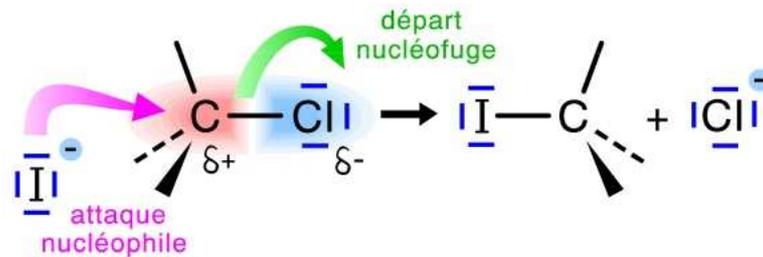


Figure 20: Mécanisme de la substitution nucléophile.

Cette réaction est notamment réalisée lors de la conjugaison du glutathion et du CDNB, où l'anion thiolate ( $\text{GS}^-$ ) attaque le carbone porteur du groupement halogéné  $\text{Cl}^-$ . La formation de l'anion thiolate libère un atome d'hydrogène qui est combiné à l'atome de chlore libéré lors de l'attaque nucléophile, générant ainsi un conjugué GS-DNB et une molécule de chlorure d'hydrogène  $\text{HCl}$  (Figure 21).



Figure 21: Conjugaison du glutathion (GSH) et du 1-chloro-2,4-dinitrobenzène (CDNB).

En revanche, lors de l'addition nucléophile sur le groupement carbonyle, la fixation par liaison dative du réactif nucléophile sur l'atome de carbone du groupement carbonyle exige la rupture de la composante  $\pi$  de la double liaison (Figure 22).

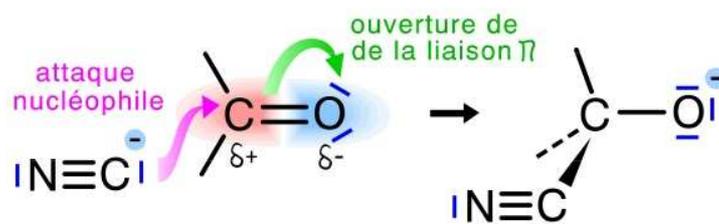


Figure 22: Mécanisme de l'addition nucléophile

Cette réaction a notamment lieu au cours des réactions d'isomérisation catalysées par les GST. Dans ce cas, il se forme un composé glutathionylé transitoire qui permet le déplacement d'électrons et l'isomérisation des substrats.

### 3.2.2 Les GST, des enzymes du métabolisme de détoxification active de composés xénobiotiques

Le terme détoxification recouvre l'ensemble des biotransformations que subissent certains composés exogènes ou endogènes en vue de leur élimination par l'organisme. Ces composés possèdent un caractère hydrophobe. Les biotransformations caractéristiques de la détoxification auront une double conséquence: d'une part, rendre plus soluble dans l'eau des structures hydrophobes; d'autre part, leur faire perdre leurs activités biologiques. Ce processus se décompose en trois phases (Figure 23).

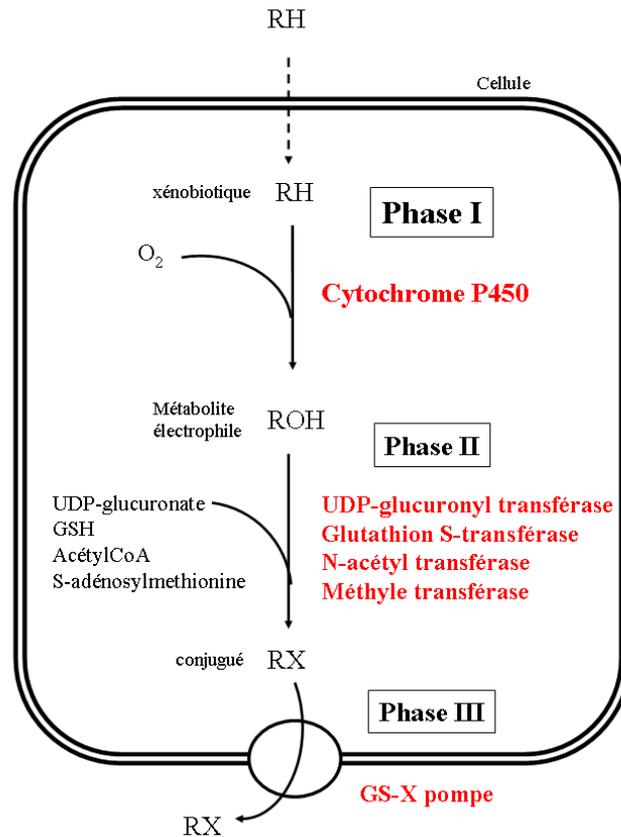


Figure 23: Biotransformation des xénobiotiques.

### 3.2.3 Phase I:

Les réactions de phase I permettent l'inactivation des composés toxiques et font intervenir majoritairement des réactions d'oxydation, de réduction, et d'hydrolyse.

La biotransformation de nombreux produits chimiques impliquent de nombreux processus oxydatifs. Un très grand nombre de réactions d'oxydation est catalysé par des cytochromes P450. Ces enzymes sont généralement localisées dans le réticulum endoplasmique lisse, mais sont aussi rencontrées dans les mitochondries et dans l'enveloppe nucléaire. Les CYP450 sont des protéines globulaires fortement ancrées dans la membrane et qui ont accès aux substrats lipophiles et hydrophiles. Les différentes familles de CYP450 peuvent être divisées en deux groupes: celles impliquées dans la détoxification de xénobiotiques, et celles impliquées dans la synthèse de composés endogènes (stéroïdes, leucotriènes). D'autres oxydations de composés toxiques sont catalysées par des oxydoréductases non microsomales localisées dans les mitochondries (monoamine oxydase, aldéhydes déshydrogénase).

Les composés toxiques peuvent aussi être réduits par des réductases. De nombreux composés tels que les esters, les amides et les composés phosphorés contiennent par ailleurs des liaisons sensibles à l'hydrolyse. Ces réactions sont généralement catalysées par des estérases non spécifiques et des amidases.

### 3.2.4 Phase II:

Lors de la phase II, les molécules toxiques ou les métabolites intermédiaires de la phase I subissent une conjugaison. L'association avec un transporteur polaire endogène permet la génération de conjugués plus hydrosolubles et donc plus facilement excrétés. Ces réactions ont lieu sur des molécules possédant des fonctions alcools ou acides.

On distingue plusieurs types de réaction suivant la nature de la molécule polaire à laquelle est conjugué le métabolite à désactiver: glutathion, acétate, cystéine, sulfate, glycine, glucuronates.

La glucuronoconjugaison, catalysée par des UDP-glucuronyltransférases, est la réaction la plus courante. L'enzyme, localisée dans le réticulum endoplasmique, utilise l'acide UDP- $\beta$ -glucuronique comme substrat de conjugaison. Cinq classes de produits chimiques sont capables de former des conjugués avec l'acide glucuronique: les alcools aliphatiques ou aromatiques, les acides carboxyliques, les composés soufrés, et les amines.

La mercaptoconjugaison est catalysée par les glutathion S-transférases qui utilisent le glutathion comme substrat de conjugaison. L'enzyme catalyse l'addition du groupement thiol du glutathion sur les électrophiles hydrophobes à éliminer. Le système est très impliqué dans la détoxification des radicaux libres, des époxydes, et des halogénés.

L'acétylation implique le transfert des groupements acétyles sur des amines aromatiques primaires, des hydrazines, des sulfonamides, et certaines amines aliphatiques primaires. La réaction est catalysée par des N-acétyltransférases en présence d'acétyl-CoA. Il peut également y avoir conjugaison de l'acétyl-CoA avec des acides aminés tels que la glycine et la glutamine déjà conjugués.

Les réactions de méthylation sont catalysées par des méthyltransférases, le substrat de conjugaison étant la S-adénosylméthionine. Elles ne représentent pas la voie majoritaire de biotransformation des xénobiotiques en raison de la plus grande disponibilité en acide UDP- $\beta$ -glucuronique dans les cellules pour former des glucuronides, et aussi car les produits méthylés ne sont pas nécessairement plus hydrosolubles.

Enfin, la sulfoconjugaison est catalysée par des sulfotransférases en présence de 3-phosphadénosine 5'-phosphosulfate. Les groupements fonctionnels conjugués sont les phénols, les alcools aliphatiques et les amines aromatiques.

### 3.2.5 Phase III:

Le composé glutathionylé formé en phase II est trop hydrophile pour diffuser librement à travers la membrane plasmique.

Chez les plantes supérieures, les métabolites hydrosolubles de la phase I et II sont stockés dans la vacuole ou éliminés de la cellule. Chez les mammifères, ils sont excrétés par voie biliaire ou urinaire, ceci en fonction de leur taille. La phase III consiste donc en l'excrétion unidirectionnelle du xénobiotique qui ne peut pas re-traverser la membrane. Au final, le composé est éliminé de l'organisme sous forme d'acide mercapturique (Sheehan et al., 2001). L'expulsion des produits de détoxification en dehors du cytoplasme peut se faire par l'intermédiaire de transporteurs membranaires.

Parmi ces transporteurs, les membres de la famille multigénique des protéines ABC (ATP Binding Cassette) ont un rôle majeur dans le transport de nombreux substrats à travers les membranes biologiques. Ces protéines sont retrouvées chez les bactéries, les champignons, les plantes et les animaux (Sanchez-Fernandez et al., 2001; Martinoia et al., 2002). La plupart sont des transporteurs actifs qui hydrolysent l'ATP comme source d'énergie. Les protéines ABC sont impliquées dans la résistance aux herbicides, aux pesticides et aux métaux lourds, mais aussi dans la croissance et le développement des plantes (Martinoia et al., 2002). La pompe à glutathion (GS-X pump) est la principale ATPase membranaire impliquée dans le transport des composés glutathionylés (Ishikawa, 1992). Chez l'homme, elle fait partie de la famille des MRP (Multidrug Resistance-associated Protein)

### **3.2.6 Adressage pour le transport transmembranaire**

La conjugaison du glutathion par les GST permet d'étiqueter un grand nombre de substrats endogènes qui, comme les composés xénobiotiques, sont alors reconnus par la pompe à glutathion. La conjugaison du glutathion est une étape essentielle de la synthèse des leucotriènes chez les animaux. Leurs activités biologiques extracellulaires nécessitent un transport par la pompe à glutathion (Samuelsson, 1983; Funk, 2001).

Chez les plantes, un certain nombre de métabolites secondaires, notamment les phenylpropanoïdes, sont phytotoxiques lorsqu'ils s'accumulent dans la cellule qui les produit. De ce fait, l'adressage de ces composés dans la vacuole ou vers le milieu extracellulaire est vital (Sandermann, 1992). Ainsi, le transport des anthocyanines dans la vacuole nécessite la conjugaison du glutathion par les GST.

### **3.2.7 Protection contre les dommages du stress oxydant**

L'oxydation de composés endogènes à la suite d'un stress oxydant, initié notamment par les radicaux hydroxyles, génère des composés hautement cytotoxiques. Les plus courants sont les peroxydes de lipides membranaires, tels que les hydroxy-aldéhydes, et les produits de l'oxydation de l'ADN. Ces composés sont conjugués au glutathion chez les plantes et les

animaux, par l'intermédiaire des GST, permettant ainsi leur élimination (Bartling et al., 1993; Berhane et al., 1994). Certaines GST possèdent également une activité peroxydase qui permet de détoxifier directement ces composés toxiques.

### **3.2.8 Activité ligandine: fixation non-enzymatique et transport intracellulaire**

En plus de leur activité catalytique, certaines GST servent de protéine de transport (ligandine) et permettent le déplacement intracellulaire de stéroïdes, de bilirubine, d'hèmes, et de sels biliaire dans les cellules animales (Listowsky et al., 1988). Les composés sont alors fixés à un autre site que le site catalytique. Chez les plantes, certaines GST sont impliquées dans le transport de l'auxine (Jones, 1994). Cette fixation non-enzymatique pourrait permettre le stockage temporaire de l'hormone et la modulation de son activité.

## **3.3 Les GST cytosoliques**

### **3.3.1 Classification**

Cette famille de GST identifiée chez tous les organismes aérobies est la plus abondante, comptant parfois plus d'une dizaine de membres dans certaines espèces. Les GST cytosoliques sont classées en fonction de plusieurs critères. Ainsi, deux GST appartiennent à la même classe si elles partagent plus de 40 % d'identité (Hayes et al., 2005). Moins de 25 % d'identité séparent les classes chez les mammifères, et moins de 20% séparent les classes de GST chez les plantes. Cette méthode est la plus utilisée et prévaut notamment pour toutes les analyses phylogénétiques. Lorsque les pourcentages d'identité sont compris entre 25 et 40 %, d'autres techniques sont employées pour affiner la classification, comme par exemple la structure des gènes, c'est-à-dire le nombre, la taille et la position des introns et des exons, ou les propriétés immunologiques et enfin l'activité enzymatique.

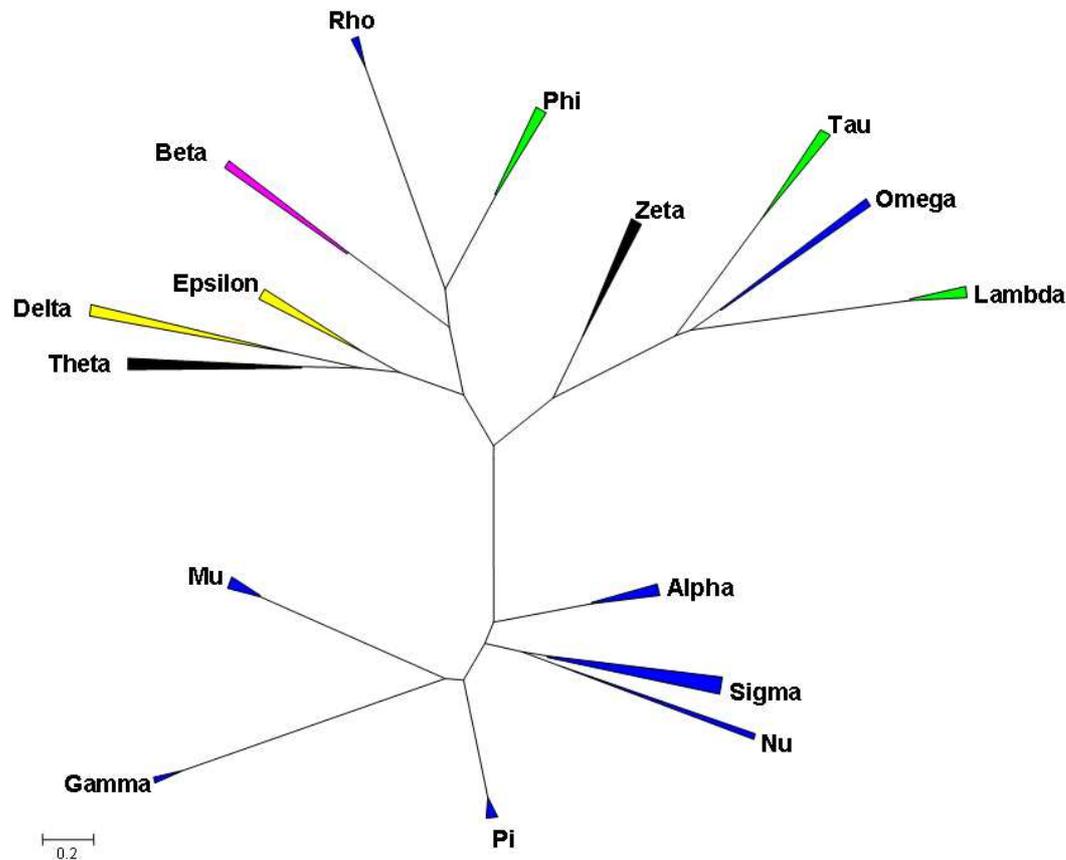
A ce jour, les GST cytosoliques sont réparties en 16 classes majeures (Tableau 1).

**Tableau 1: les différentes classes de glutathion S-transférases cytosoliques et leur répartition majeure dans les différentes lignées du vivant.**

Classe	Symbole	Origine
Theta	T	Animaux, plantes terrestres, et bactéries
Zeta	Z	Animaux et plantes terrestres
Sigma	S	Animaux, algues rouges et brunes <sup>1</sup>
Omega	O	Animaux
Alpha	A	Mammifères
Mu	M	Mammifères
Pi	P	Mammifères
Rho	R	Poissons
Delta	D	Insectes
Epsilon	E	Insectes
Tau	U	Plantes terrestres
Phi	F	Plantes terrestres
Lambda	L	Plantes terrestres
Beta	B	Bactéries
Gamma	G	Champignons
Nu	N	Nématodes

<sup>1</sup> L'existence des GST sigma a été démontrée chez les mammifères, les insectes, certains parasites multicellulaires et récemment chez les algues rouges et brunes (Hervé et al., 2008).

Les mammifères possèdent des GST appartenant à des classes qui leur sont spécifiques (Alpha, Mu et Pi), mais aussi des GST rencontrées chez d'autres organismes, comme les Theta, Zeta, Sigma et Omega. Les GST de plantes se regroupent au sein des classes spécifiques Phi, Tau et Lambda et des classes communes Theta et Zeta. Six classes sont reconnues chez les insectes: Delta et Epsilon qui sont spécifiques, puis Theta, Zeta, Sigma et Omega. Chez les bactéries, la situation est moins évidente et seule la classe Beta est pour l'instant caractérisée. D'autres classes spécifiques ont été identifiées. Ainsi, la classe Rho n'est présente que chez les poissons (Konishi et al., 2005), la classe Nu ne regroupe que des protéines de nématodes (Campbell et al., 2001; Schuller et al., 2005), et la classe gamma n'est présente que chez les champignons et notamment *Cunninghamella elegans* (Cha et al., 2002). L'arbre phylogénétique des GST eucaryotes fait apparaître un clivage entre un groupe de GST uniquement présent chez les animaux et les champignons (Alpha, Mu, Pi, Sigma, Nu et Gamma), et deux autres groupes plus proches comprenant des GST communes et spécifiques (Figure 24).



**Figure 24: Arbre phylogénétique illustrant les relations unissant les différentes classes de GST cytosoliques.**

Les GST sont regroupées par classes. Les triangles noirs indiquent que les classes sont communes à plusieurs lignées, les bleus qu'elles sont spécifiques des animaux (exception faite de la classe Sigma, voir texte), les verts qu'elles sont spécifiques de la lignée verte, les jaunes qu'elles sont spécifiques des insectes et le rose qu'elles sont spécifiques des bactéries.

Presque toutes les GST cytosoliques sont actives sous forme de dimère, soit de sous-unités identiques (homodimère), soit différentes (hétérodimère). Cependant, l'hétérodimérisation ne s'effectue qu'entre des GST de même classe. Les monomères de classes différentes sont incapables de s'associer en raison de l'incompatibilité des résidus situés à l'interface protéine-protéine. La classe Lambda est active sous forme monomérique (Dixon et al., 2002b), mais ne possède pas d'activité de conjugaison dépendante du glutathion sur les substrats classiquement utilisés. Cette classe est néanmoins considérée comme GST sur la base des structures protéiques et de par son activité thiol transférase.

### 3.3.2 Nomenclature

La très grande taille de la famille des GST nécessite un système de nomenclature adapté. Les classes sont désignées par une lettre grecque Alpha, Pi, Theta, etc., et les abréviations A, P, T et ainsi de suite. Le nom de chaque membre est déterminé par un chiffre

arabe, et les dimères de sous-unités différentes sont nommés en fonction de leur composition. Pour distinguer les GST provenant d'espèces différentes, la première lettre du nom de genre et la première lettre du nom d'espèce sont placées avant l'acronyme GST. Par exemple, HsGSTA1-2 désigne une GST d'*Homo sapiens* de la classe Alpha composée des sous-unités 1 et 2.

### 3.3.3 Organisation génomique

Le nombre croissant de génomes séquencés et les analyses bioinformatiques ont permis d'annoter un grand nombre de familles de GST, et de construire des cartes de localisation physique des gènes correspondants. Le nombre de GST par génome est variable selon les espèces, et la répartition au sein de chaque classe indique que dans chaque génome, les GST des classes spécifiques sont toujours plus abondantes que les GST communes.

**Tableau 2: Répartition des GST cytosoliques dans certains génomes séquencés.**

Organisme	Nombre de GST cytosoliques	Classes représentées
<i>Homo sapiens</i> <sup>1</sup>	17	Alpha (5), Mu (5), Pi (1), Omega (2), Sigma (1), Theta (2), Zeta (1)
<i>Aedes aegypti</i> <sup>2</sup>	26	Delta (10), Epsilon (8), Omega (1), Sigma (2), Theta (4), Zeta (1)
<i>Drosophila melanogaster</i> <sup>3</sup>	36	Delta (11), Epsilon (14), Omega (4), Sigma (1), Theta (4), Zeta (2)
<i>Anopheles gambiae</i> <sup>4</sup>	24	Delta (12), Epsilon (8), Omega (1), Sigma (1), Theta (2), Zeta (1)
<i>Arabidopsis thaliana</i> <sup>5</sup>	48	Phi (13), Tau (28), Lambda (2), Theta (3), Zeta(2)
<i>Oryza sativa</i> <sup>6</sup>	61	Phi (16), Tau (40), Theta (2), Zeta(3)

D'après <sup>1</sup>(Nebert and Vasiliou, 2004); <sup>2</sup>(Lumjuan et al., 2007); <sup>3</sup>(Tu and Akgul, 2005); <sup>4</sup>(Ding et al., 2003); <sup>5</sup>(Wagner et al., 2002); <sup>6</sup>(Soranzo et al., 2004).

La plupart des GST cytosoliques forment des clusters physiques de gènes dans les génomes, les gènes étant proches les uns des autres et regroupés par classe. Ainsi, les gènes des GST Alpha, Mu et Theta humaines (Morel et al., 2002) et la classe Pi chez la souris (Henderson et al., 1998) sont localisés sur des portions spécifiques du génome. Chez les insectes aussi, les GST Delta forment un bloc compact de gènes (Ding et al., 2003). Les génomes complets d'*Arabidopsis thaliana* et d'*Oryza sativa* fournissent un état des lieux des GST chez les dicotylédones et les monocotylédones. Chez *A. thaliana*, 34 GST sont regroupées en clusters spécifiques de chaque classe. Ainsi, sept gènes de GST Tau sont localisés en tandem sur un fragment de 14 kb du chromosome 2 (Lin et al., 1999). Les gènes isolés représentent moins de 30 % des gènes de GST (Dixon et al., 2002b). Chez le riz, seules

15 GST sont isolées dans le génome, soit moins de 25 %. Les 46 autres gènes forment des groupes de taille variable. Le cluster le plus important regroupe 23 GST de la classe Tau sur un fragment génomique de 239 kb du chromosome 10 (Soranzo et al., 2004).

La présence quasi systématique de clusters de gènes de GST dans les génomes de plantes et d'animaux révèle des mécanismes évolutifs communs permettant la génération d'un grand nombre de copies de gènes de GST.

### **3.3.4 Structure tridimensionnelle des GST**

L'apport des informations structurales a eu un profond impact sur la connaissance des mécanismes catalytiques des GST, des bases moléculaires de leur capacité de détoxification de composés électrophile endogènes ou xénobiotiques, et de leur évolution.

Les GST cytosoliques sont, d'une manière générale, biologiquement actives sous la forme d'un dimère, constitué de sous-unités dont le poids moléculaire est compris entre 23 et 30 kDa (soit 200-250 acides aminés).

A ce jour, une douzaine de structures cristallines ont été résolues à partir de GST de plantes, d'animaux et de bactéries. Leur analyse démontre clairement que toutes les GST partagent un fort degré de conservation dans leur architecture tri-dimensionnelle, présentant des repliements similaires et une même organisation dimérique, alors que les séquences sont elles très divergentes (Figure 25).

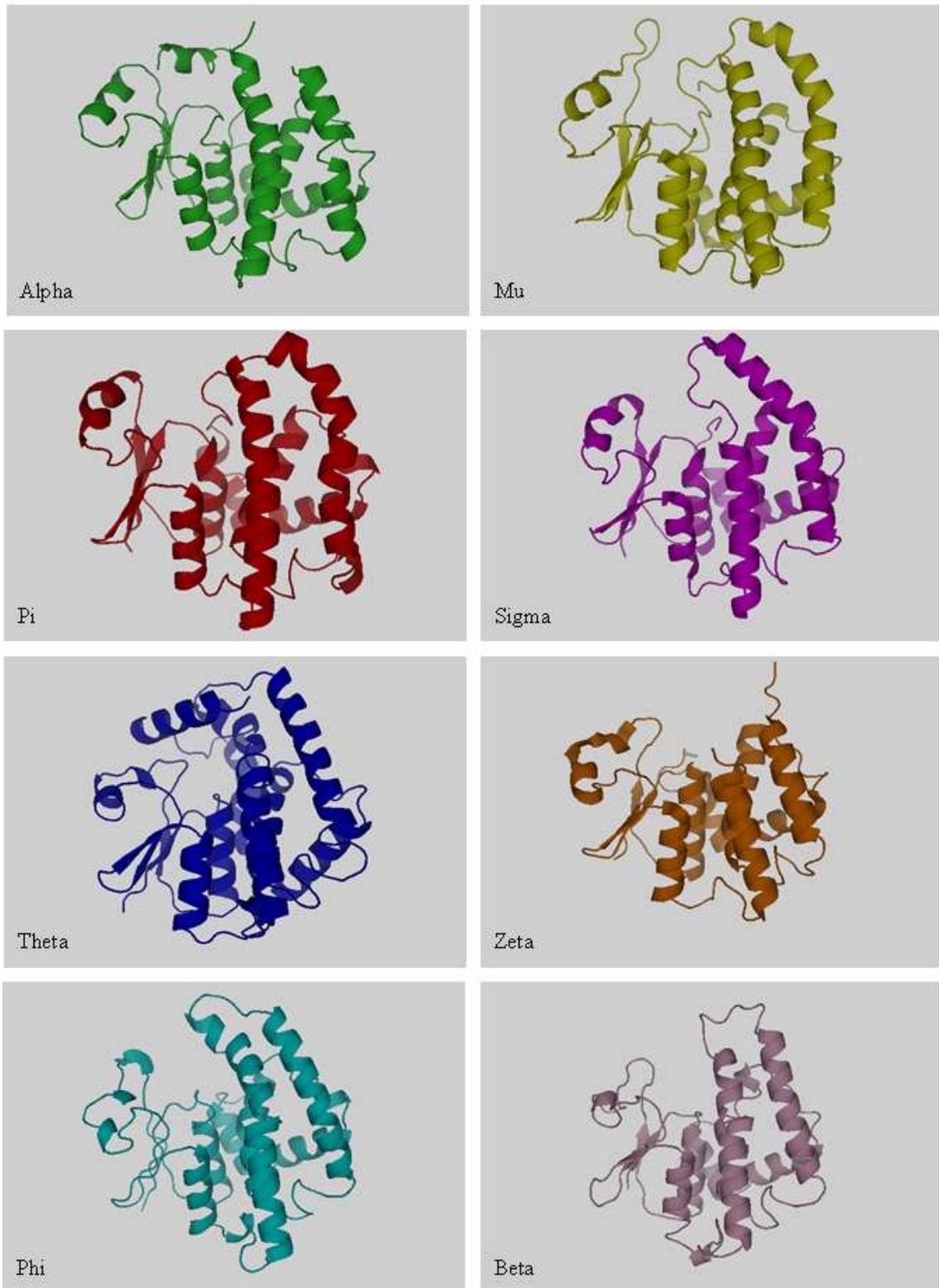


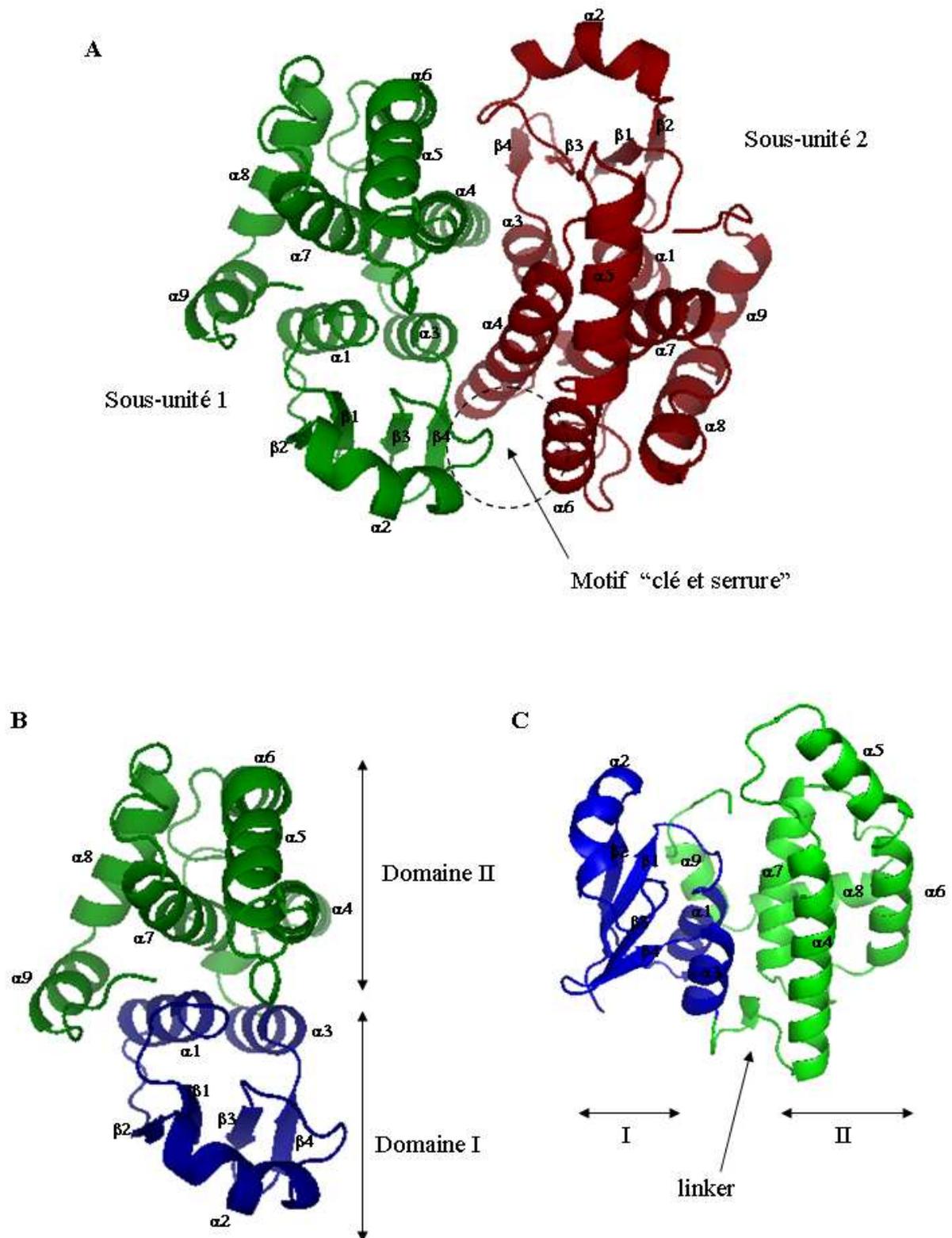
Figure 25: Représentation tri-dimensionnelle des sous-unités de différentes classes de GST.

Chaque sous-unité est composée de deux domaines distincts: un domaine N-terminal (domaine I), constitué de brins  $\beta$  et d'hélices  $\alpha$ , et un domaine C-terminal (domaine II) composé uniquement d'hélices  $\alpha$  (Figure 26B).

#### **3.3.4.1 Le domaine I: un motif thioredoxine**

Le domaine N-terminal adopte un repliement typique du motif thioredoxine ( $\beta\alpha\beta\alpha\beta\beta\alpha$ ), qui est constitué de deux motifs structuraux:  $\beta_1\alpha_1\beta_2$  en N-terminal et  $\beta_3\beta_4\alpha_3$  en C-terminal, reliés par une longue boucle contenant une hélice  $\alpha$  ( $\alpha_2$ ). Ensemble, les deux régions forment un feuillet  $\beta$  de trois brins  $\beta$  parallèles ( $\beta_1\beta_2\beta_4$ ) et d'un brin  $\beta$  anti-parallèle ( $\beta_3$ ), pris en sandwich entre l'hélice  $\alpha_2$  d'un côté et les hélices  $\alpha_3$  et  $\alpha_4$  de l'autre. L'hélice  $\alpha_2$  et le brin  $\beta_3$  sont reliés par une boucle contenant une proline, très conservée dans toutes les classes de GST. Cette proline n'est pas un résidu catalytique mais est nécessaire au maintien de la structure protéique indispensable à l'activité de la GST (Allocati et al., 1999).

Le repliement caractéristique du motif thioredoxine est retrouvé non seulement dans le domaine N-terminal des GST mais également dans pas moins de douze familles de protéines différentes: les thioltransférases (incluant les thiorédoxines et les glutarédoxines), les glutathion peroxydases, les isomérases de ponts disulfures (protein disulphide isomerase-like), les calséquestrines, les protéines disulphide-bond formation facilitator DsbA, les phosphatases, le domaine N-terminal des protéines ERP29 du réticulum endoplasmique, la protéine U5-15kD du spliceosome, le domaine C-terminal des protéines disulphide-bond isomerase DsbC, les ferrédoxines 2Fe-2S thioredoxines-like et l'arsenate réductase ArsC (Nathaniel et al., 2003).



**Figure 26: Représentation de la structure tridimensionnelle de la GST Sigma de rat.**

La GST Sigma de rat est l'homologue de la prostaglandine D2 synthase, RnPGDS, dont la structure a été établie par Kanaoka et al., 1997 (PDB: 1PD2). (A) Vue du dimère par-dessus, une des sous-unités est colorée en vert, l'autre en rouge. Vue du monomère par-dessus (B) et latérale (C). Le motif thiorédoxine est coloré en bleu en B et C. Le nom des éléments de structure secondaire est indiqué sur la figure.

### 3.3.4.2 Le domaine II

Ce domaine est constitué par un nombre variable d'hélices  $\alpha$  (4 à 7) positionnées en aval du motif thiorédoxine et connectées à ce dernier par une courte séquence d'environ 10 acides aminés (Figure 26B).

### 3.3.4.3 Site de dimérisation

Les GST sont actives sous une forme dimérique ne regroupant que des sous-unités appartenant à la même classe. Pour toutes les GST, les deux sous-unités sont reliées selon un axe de symétrie radiale (Figure 26A). L'interaction principale a lieu entre le domaine I d'une sous-unité et le domaine II de l'autre. Différents types d'interaction sont alors impliqués dans le maintien de la structure quaternaire. Chez les enzymes de classe Theta, Sigma, Beta et Tau, les interactions sont plutôt de type hydrophiles, tandis qu'elles sont plutôt hydrophobes dans les classes Alpha, Mu, Pi, Omega et Phi.

L'interaction hydrophobe des classes Alpha, Mu et Pi est caractérisée par un repliement de type "clé et serrure" ("lock and key", également appelé "ball and socket"). L'interaction s'établit par la chaîne latérale d'une phénylalanine ("ball"), F52 dans la classe Alpha, F57 dans la classe Mu, et F47 dans la classe Pi, appartenant à la boucle formée entre l'hélice  $\alpha_2$  et le brin  $\beta_3$  du domaine I. Cette boucle est dirigée vers la poche hydrophobe (socket) localisée entre les hélices  $\alpha_4$  et  $\alpha_5$  du domaine II (Armstrong, 1997).

Ce type de motif est absent dans les GST Sigma de calmar (Ji et al., 1995), mais présent dans les GST sigma de rat (Kanaoka et al., 1997), et d'insectes (Agianian et al., 2003). Le résidu "clé" de la GST sigma de rat est F48 (entre  $\alpha_2$  et  $\beta_3$ ), et la poche hydrophobe constituant la "serrure" est formée par V91, T94 (dans  $\alpha_4$ ), L127, D130, L131, Y134 et F141 (dans  $\alpha_6$ ) (Figure 26A).

On trouve également une variante de ce motif, appelée "key and lock clasp", chez d'autres GST d'insectes (Wongsantichon and Ketterman, 2006). Dans ce cas, le résidu aromatique formant la clé (key) s'insère dans une poche hydrophobe d'une autre sous-unité, tout en faisant également partie de la poche hydrophobe dans laquelle s'insère le résidu aromatique clé de l'autre sous-unité.

Chaque sous-unité, qui possède son propre site catalytique, est théoriquement indépendante. Cependant, à quelques exceptions près, les GST ne sont actives que sous la forme d'un dimère et aucun monomère de GST catalysant des réactions de conjugaison n'a pu être identifié. Une étude récente sur une GST de la classe Pi a montré que les sous-unités

fonctionnaient en synergie (Hegazy et al., 2004). Ainsi, par mutagenèse dirigée, les auteurs ont remplacé le résidu "clé" tyrosine 50 par une alanine (Y50A) et ont généré un homodimère mutant (Y50A/Y50A). L'activité enzymatique de la protéine mutante sur le substrat généraliste CDNB est alors négligeable par rapport à celle de la protéine sauvage. De même, l'hétérodimère présente une activité 27 fois plus faible que celle de l'homodimère sauvage alors que l'on aurait attendu une réduction par un facteur 2 si les deux sous-unités travaillaient indépendamment. Ces observations ont permis aux auteurs de suggérer que la structure du dimère stabilise la structure tertiaire de chaque sous-unité et influence donc ses capacités catalytiques.

#### 3.3.4.4 Fixation des substrats

Pour comprendre le fonctionnement des GST, il est nécessaire de comprendre comment l'enzyme reconnaît et active le glutathion pour réaliser une attaque nucléophile, et aussi comment elle reconnaît spécifiquement le substrat électrophile.

Il existe deux sites de fixation par sous-unité. D'une part, un site de fixation du glutathion (site G) comportant essentiellement des résidus du domaine I. D'autre part, le site de fixation du substrat hydrophobe (site H), est principalement formé par des résidus non polaires du domaine II. Les deux sites G et H forment ensemble le site catalytique de l'enzyme (Figure 27).

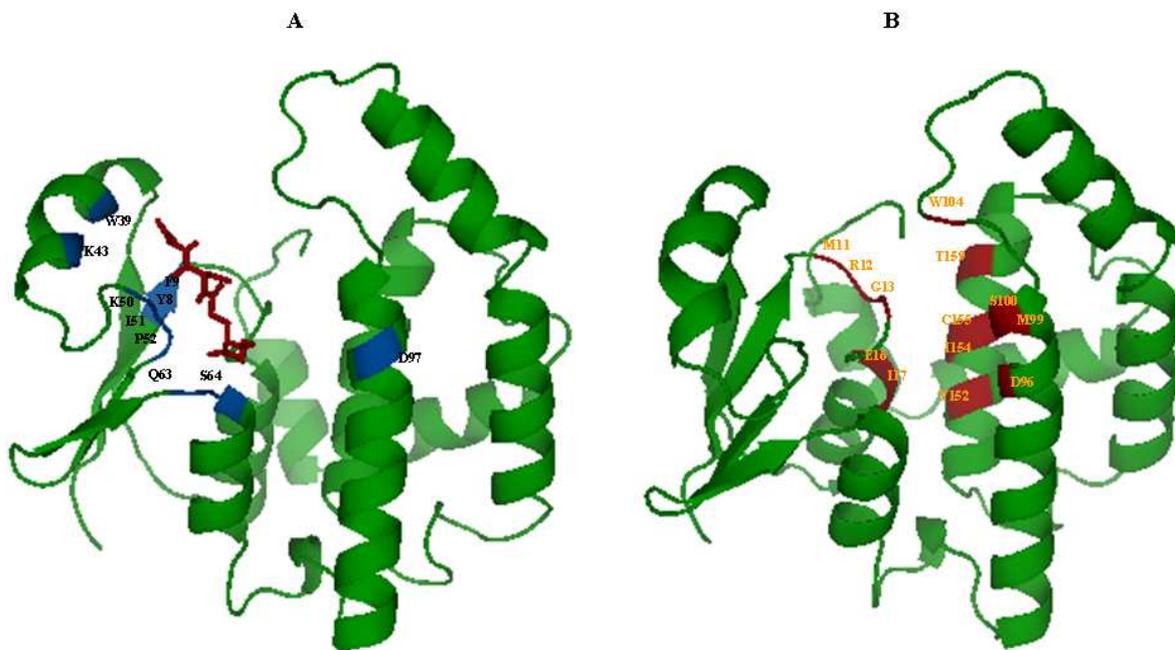
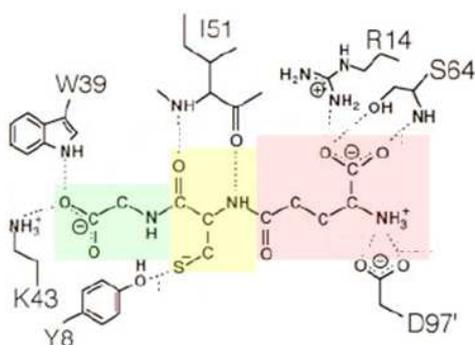


Figure 27: Mise en évidence des sites de fixation des substrats de la GST Sigma de rat, d'après Kanaoka et al., 1997.

(A) Les résidus du site G impliqués dans la fixation du glutathion sont colorés en bleu. Le glutathion est représenté en rouge. (B) Les résidus du site H potentiellement impliqués dans la fixation de la prostaglandine H2 sont colorés en orange.

#### 3.3.4.4.1 Fixation du glutathion: site G

Le glutathion est lié aux GST dans une conformation étendue, en présentant son résidu  $\gamma$ -glutamyl vers l'interface du dimère. Le groupe cystéinyl porteur de l'atome de soufre est dirigé vers la sous-unité qui le fixe et le résidu glycyle est quant à lui dirigé vers la surface de l'enzyme. Le glutathion est ancré dans la protéine par l'intermédiaire d'une douzaine d'interactions électrostatiques, utilisant tous les donneurs et les accepteurs de liaisons hydrogènes du peptide (Figure 28).



**Figure 28: Interactions entre le glutathion et le site G de 1PD2, d'après Kanaoka et al., 1997.**

Le groupement glycyl du glutathion est mis en évidence par un fond vert, le groupement cystéinyl en jaune et le groupement glutamyl en rouge.

L'orientation du glutathion dans la protéine est conservée dans toutes les classes d'enzymes et seuls les résidus impliqués dans les liaisons hydrogènes varient.

Le domaine I (thioredoxine) est relativement bien conservé et porte des résidus essentiels pour la fixation du glutathion et la catalyse enzymatique. Par exemple, la tyrosine 7 est très conservée dans les classes Alpha, Mu, Pi et Sigma, et joue le même rôle que la sérine 17 des classes ubiquistes Theta et Zeta ou des classes spécifiques Phi et Tau. Le groupe hydroxyl (OH) des résidus tyrosine et sérine permet de créer une liaison hydrogène avec le groupement thiol (SH) du glutathion, formant et stabilisant ainsi un anion thiolate ( $GS^-$ ). Cet anion est hautement réactif et est la cible d'une attaque nucléophile par un substrat électrophile (Dirr et al., 1994; Armstrong, 1997). Le rôle essentiel de ces acides aminés dans la catalyse enzymatique a été confirmé par mutagenèse dirigée: mutation de la tyrosine 7 d'une GST porcine de classe Pi (Dirr and Reinemer, 1991), de la sérine 11 d'une GST humaine de classe Theta (Tan et al., 1996), de la sérine 9 d'une GST delta d'insecte (Caccuri

et al., 1997), et de la sérine 17 d'une GST Zeta d'*A. thaliana* (Thom et al., 2001). Pour chacun des mutants, l'activité catalytique des enzymes a été perdue.

Certaines classes de GST ont une cystéine à la place du résidu tyrosine ou sérine. Cette cystéine induit la formation d'un pont disulfure avec le glutathion au lieu d'un anion thiolate. Cette propriété est partagée par les classes Omega, Beta, Lambda, la famille des DHAR, ainsi que par les glutarédoxines et la famille des CLICs. Toutes ces enzymes n'ont qu'une très faible ou pas d'activité de conjugaison du glutathion, et sont plutôt impliquées dans des réactions rédox. Ainsi, à l'instar des glutarédoxines, les GST Omega possèdent une activité de transfert de groupement thiol (SH) à partir du glutathion et peuvent également catalyser la réduction du déhydroascorbate. Il est intéressant de noter que les GST de classe Lambda, les glutarédoxines et les enzymes des familles DHARs et CLICs sont actives sous forme d'un monomère, tandis que les GST Omega et Beta sont des dimères.

#### ***3.3.4.4.2 Fixation du second substrat: site H***

Contrairement au domaine I, le domaine II présente de grandes divergences dans sa séquence et sa topologie. Ce sont ces variations qui créent la diversité des substrats hydrophobes potentiels.

Dans la plupart des dimères de GST, on observe, à l'interface des deux sous-unités, une gorge profonde en forme de V et accessible pour les solvants. Les différences d'ouverture de la gorge et la polarité des résidus du site H contribuent à la spécificité de substrat. Par exemple, les GST Omega sont capables de fixer des molécules partiellement hydrophiles et de taille assez importante, telles que des protéines (Board et al., 2000). Etant donné la présence d'une cystéine comme résidu actif du site G, il est probable que les GST Omega aient un rôle dans la réduction des ponts disulfures inter-protéiques formés lors d'un stress oxydant. Ces GST empêcheraient ainsi l'aggrégation des protéines en conditions de stress.

#### **3.3.4.5 Des résidus responsables de la diversification fonctionnelle**

Grâce à la biologie structurale, il est également possible de faire le lien entre la structure et la fonction des protéines. En définissant le rôle spécifique de certains acides aminés au sein de la séquence protéique, ces études ont révélé les principes gouvernant la chimie de la réaction et la spécificité de substrat, et permis de déduire les bases moléculaires de la diversification fonctionnelle de GST, y compris pour celles appartenant à une même classe. La connaissance de ces mécanismes a des applications intéressantes car elle fournit un excellent support pour manipuler la fonction originale des enzymes.

La classe Alpha des GST humaines est un exemple pertinent de diversification fonctionnelle. Sur les cinq protéines présentes chez l'homme, quatre (GSTA1-1, GSTA2-2, GSTA3-3, GSTA4-4) ont été bien caractérisées. Bien que ces enzymes partagent une forte homologie de séquence, et la présence d'une hélice ( $\alpha 9$ ) C-terminale repliée vers le domaine N-terminal contribuant à la fixation du glutathion et d'un substrat électrophile, la chimie catalytique et l'affinité des substrats sont différentes. En particulier, GSTA1-1 présente une forte activité catalytique sur le CDNB mais est très peu efficace avec des substrats de type carbonyles. A l'inverse, GSTA4-4 a évolué vers une spécificité pour les carbonyles insaturés et présente une activité 200 fois plus élevée que GSTA1-1 sur le 4-HNE (Bruns et al., 1999). La comparaison des deux enzymes indique que la spécificité de substrats est essentiellement due à la poche de fixation dont la forme et les caractéristiques sont déterminées par des acides aminés localisés dans les éléments de structure environnants. Ces derniers sont la boucle entre  $\beta 1$  et  $\alpha 1$ , la partie C-terminale de l'hélice  $\alpha 4$ , et la partie C-terminale de l'hélice  $\alpha 9$ .

Les deux autres enzymes GSTA2-2 et GSTA3-3 présentent 89 % d'identité au niveau protéique et possèdent des activités comparables sur le CDNB. Cependant, GSTA2-2 est très efficace dans la réduction du cumène hydroperoxyde, mais présente une activité isomérase négligeable sur les stéroïdes tels que le  $\Delta^5$ -androstène-3,17-dione (AD), alors que c'est l'inverse pour GSTA3-3 (Pettersson et al., 2002). L'activité peroxydase de GSTA2-2 nécessite l'attaque nucléophile du groupement thiolate du glutathion tandis que ce même groupement thiolate sert de base au cours de l'isomérisation de l'AD par GSTA3-3.

Le dénominateur commun de ces deux réactions est l'atome de soufre du glutathion chargé négativement qui sert de base de Lewis pour, dans un cas, réagir avec un acide de Lewis sous la forme de l'oxygène électrophile de l'hydroperoxyde et, dans l'autre cas, pour réagir avec le proton acide du carbone 4 de AD. Cependant, la différence majeure réside dans le fait que la réduction de l'hydroperoxyde nécessite l'oxydation du glutathion, tandis qu'il n'est pas consommé dans la réaction d'isomérisation et sert de cofacteur dans le site actif de l'enzyme.

Parmi les 25 acides aminés divergents entre les protéines GSTA2-2 et GSTA3-3, 5 sont suffisants pour expliquer les spécificités catalytiques. Deux de ces résidus sont situés dans la boucle entre  $\beta 1$  et  $\alpha 1$  (position 1à et 12), un dans la partie C-terminale de l'hélice  $\alpha 4$  (position 111), et deux dans la partie C-terminale de l'hélice  $\alpha 9$  (position 208 et 216). Ces exemples démontrent comment la mutation de quelques acides aminés à des positions bien précises,

notamment dans le site H, peuvent jouer un rôle crucial dans l'évolution des enzymes et générer de nouvelles activités.

### **3.4 Les différentes classes de GST cytosoliques et leurs principales fonctions**

Les fonctions des GST cytosoliques sont très diverses entre et au sein des classes. Au cours de l'évolution, des changements dans la séquence et la structure des GST ont permis une diversification fonctionnelle en terme de spécificité de substrat, d'activité catalytique et de chimie de réaction. Ainsi, le panel actuel des GST comprend des enzymes qui catalysent des conjugaisons, des réductions et des isomérisations, mais également des protéines qui agissent de manière non-enzymatique comme ligandines ou modulateurs de la transduction de signaux. Les approches pour élucider la fonction des GST sont multiples et incluent notamment la création et l'analyse de protéines recombinantes mutées, des tests enzymatiques sur des classes de substrats variés, et l'analyse de profils d'expression de gènes dans différents tissus, divers stades de développement ou bien selon les conditions environnementales. Les GST sont largement étudiées pour leurs capacités à détoxifier des drogues à usage thérapeutique, et un grand nombre d'études font le lien entre polymorphisme des GST et prédispositions aux cancers (Ketterer, 2001).

#### **3.4.1 Theta**

Les GST de la classe Theta sont rencontrées chez un grand nombre d'espèces différentes. La plupart de ces enzymes ne possède pas d'activité transférase. A l'exception d'une GST Theta humaine possédant une activité de type sulfatase (Flanagan et al., 1999), la plupart des GST Theta sont généralement actives en tant que peroxydases.

#### **3.4.2 Zeta**

Cette classe de GST est présente chez un large spectre d'organismes, dont les plantes et les mammifères. Les séquences sont très conservées au sein de cette classe, même entre espèces éloignées. Ainsi, les séquences de GST Zeta humaines partagent 38 % d'identité avec les séquences d'œillet (*Dianthus carophyllus*), et 49 % avec les séquences du nématode *C. elegans*. L'enzyme humaine présente une faible activité de conjugaison avec le CDNB et l'acide éthacrinique, une modeste activité peroxydase avec le cumène hydroperoxyde ou le t-butyl hydroperoxyde, et est impliquée dans la détoxification de l'acide dichloroacétique, cancérigène, en acide glyoxylique (Board et al., 1997).

Les GST de la classe Zeta de plantes et d'animaux sont identiques aux maleylacétate isomérasases, enzymes de la voie de dégradation de la tyrosine. Elles convertissent le maleylacétoacétate en fumarylacétoacétate, et le maleylacétone en fumarylacétone (Figure 29), qui est l'avant dernière réaction dans la dégradation de la tyrosine (Frova, 2006).

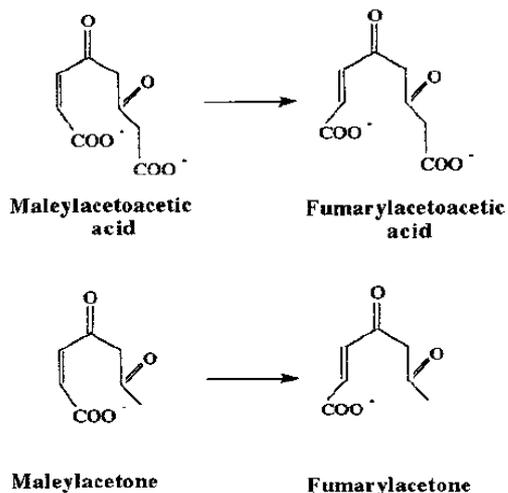


Figure 29: Isomérisation du maleylacétoacétate par les GST Zeta.

### 3.4.3 Tau

Parmi les quatre classes de GST présentes chez les végétaux terrestres, la classe Tau est la plus abondante. Chez *Arabidopsis* et le maïs, 28 gènes ont été identifiés, alors que 20 et 40 l'ont été respectivement chez le soja et le riz (McGonigle et al., 2000; Wagner et al., 2002; Soranzo et al., 2004). Les GST Tau catalysent des réactions de conjugaison sur les substrats classiques, mais également sur des herbicides tels que l'atrazine, le metolachlor, le fluorodifen et les thiocarbamates (Edwards and Dixon, 2005). Ces GST semblent donc être impliquées dans la protection cellulaire, jouant un rôle dans la tolérance aux stress environnementaux (Edwards et al., 2000). Certaines GST de cette classe, comme le gène *BZ2* du maïs, catalysent la conjugaison du glutathion sur les anthocyanes, permettant leur importation dans la vacuole par des transporteurs de la famille ABC (Edwards et al., 2000) (Figure 30).

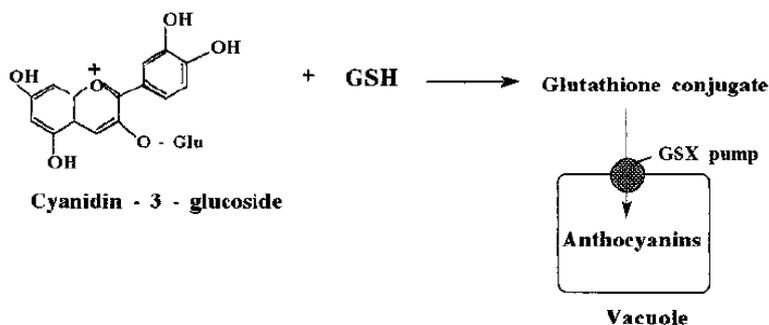


Figure 30: Séquestration des anthocyanines par la classe Tau.

#### 3.4.4 Phi

La classe Phi regroupe uniquement des GST de plantes. Comme les GST de la classe Tau, ces enzymes présentent des activités peroxydases et transférases, notamment sur les herbicides (Marrs, 1996). De plus, les GST de la classe Phi sont induites en réponse à l'auxine et l'enzyme AtGSTF2 est capable de fixer non-enzymatiquement cette hormone. Cette protéine serait donc impliquée non seulement dans la réponse au stress, mais également dans la croissance et le développement (Smith et al., 2003).

#### 3.4.5 Lambda

La classe Lambda est spécifique des plantes et regroupe des GST de structure monomérique ne possédant ni activité transférase, ni activité peroxydase, mais catalysant une activité thiol transférase. Ces protéines seraient donc impliquées dans la modulation de l'état redox des groupements thiols des protéines. Les gènes de cette classe sont co-induits, chez le maïs et le sorgho, avec les gènes des classes Phi et Tau, suite à une exposition à des phytoprotecteurs qui sont des composés chimiques augmentant la tolérance aux herbicides (Dixon et al., 2002a).

#### 3.4.6 Delta

La classe Delta, spécifique des insectes, est la plus abondante dans ces organismes. L'expansion de la classe Delta chez les insectes a eu lieu après la séparation entre les lignées aboutissant aux drosophiles et aux moustiques, il y a environ 250 millions d'années (Ranson and Hemingway, 2005). L'accroissement de cette classe dans les différentes familles d'insectes suggère qu'elle est impliquée dans l'adaptation des insectes à leurs niches écologiques, notamment dans la détoxification de xénobiotiques environnementaux. De plus, des niveaux élevés d'activité peroxydase catalysée par des GST Delta sont corrélés avec la résistance des insectes aux grandes classes d'insecticides (Tang and Tu, 1994; Vontas et al., 2002).

#### 3.4.7 Epsilon

La classe Epsilon est spécifique des insectes, et compte de nombreux membres au sein de chaque espèce. La plupart de ces enzymes ont une activité sur le substrat généraliste CDNB et sont impliquées dans la détoxification des insecticides (Sun et al., 2001; Ortelli et al., 2003). Une GST Epsilon est particulièrement efficace pour catalyser la déhydrochlorination du DDT, et son expression est particulièrement élevée dans une souche d'*A. gambiae* résistante au DDT (Ding et al., 2003). De plus, certaines GST Epsilon de moustique ont une activité peroxydase et seraient impliquées dans la protection contre les

effets secondaires du stress oxydant (Ding et al., 2003; Ortelli et al., 2003; Lumjuan et al., 2007).

#### **3.4.8 Omega**

Les GST de la classe Omega sont présentes dans une grande variété d'organismes, dont les levures, les mammifères, les nématodes, et les insectes (Board et al., 2000; Garcera et al., 2006). Ces enzymes possèdent peu ou pas d'activité de conjugaison avec les substrats classiques, mais agissent de manière significative en tant que thiol transférase, à l'instar des glutarédoxines (Garcera et al., 2006). Ceci est notamment dû à la présence d'une cystéine dans le site catalytique. Les GST Omega pourraient alors agir comme des modulateurs de l'environnement redox des protéines et ainsi réguler leur activité.

#### **3.4.9 Rho**

Cette classe de GST n'est présente que chez les poissons et chez certaines microalgues vertes (Konishi et al., 2005). Les gènes ont une structure à 6 exons et 5 introns. L'expression des gènes de GST Rho semble restreinte au caecum hépatique, sorte de foie primitif chez l'amphioxus *Branchiostoma belcheri*, et au foie chez *Micropterus salmoides* où elles pourraient détoxifier le 4-HNE (Doi et al., 2004).

#### **3.4.10 Bêta**

Les GST de bactéries forment une classe nommée Beta. Certains membres sont impliqués dans la résistance à la fosfomycine (Arca et al., 1988), dans les mécanismes de déhalogénéation du dichloromethane (Kohlerstaub and Leisinger, 1985), et dans la dégradation d'hydrocarbures aromatiques polycycliques (LloydJones and Lau, 1997).

#### **3.4.11 Alpha**

Les GST Alpha sont présentes uniquement chez les mammifères. Les membres de cette classes sont capables d'activités transférases et peroxydases (Hayes et al., 2005). De plus, une des GST Alpha humaine est impliquée dans la synthèse d'une hormone stéroïdienne, en catalysant l'isomérisation de  $\Delta^5$ -androstène-3,17-dione en  $\Delta^4$ -androstène-3,17-dione (Figure 31).

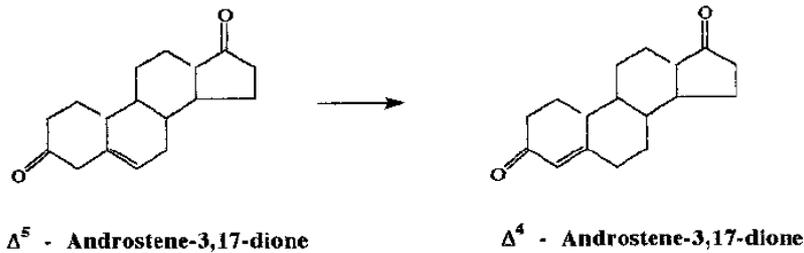


Figure 31: Exemple d'isomérisation de stéroïdes par les GST Alpha, d'après Sheehan et al., 2001.

### 3.4.12 Mu

Les GST de la classe Mu sont spécifiquement rencontrées chez les mammifères. Chez l'homme, certaines enzymes de cette classe possèdent des activités de conjugaison des époxydes, tandis que d'autres ont des capacités d'isomérisation de  $\text{PGH}_2$  en  $\text{PGE}_2$ . Cependant, l'activité la plus originale de cette classe est l'inhibition de l'ASK1 (Apoptosis Stress-related Kinase), kinase impliquée dans la régulation de l'apoptose chez la souris (Cho et al., 2001). ASK1 est une MAPKKK, qui active la kinase JNK (c-Jun N-terminal Kinase) et la voie de signalisation de p38. L'inhibition qui a lieu dans les conditions normales est due à l'interaction physique de la GST Mu avec ASK1, qui est indépendante de l'activité de conjugaison du glutathion. Les deux protéines se dissocient consécutivement à un stress par la température, activant ainsi la kinase (Dorion et al., 2002).

### 3.4.13 Pi

Comme les classes Alpha et Mu, la classe Pi est spécifique des mammifères. En plus des activités de conjugaison, les GST Pi sont capables d'isomériser l'acide 13-cis rétinolique en plusieurs formes d'acide trans-rétinolique (Chen and Goldsbrough, 1994) (Figure 32). Comme pour les GST Mu, l'activité la plus remarquable des enzymes de cette classe est l'inhibition de la kinase JNK (Monaco et al., 1999). La GST se fixe à la kinase, l'empêchant de phosphoryler le facteur de transcription c-Jun. La dissociation des deux protéines est occasionnée par un stress oxydant.

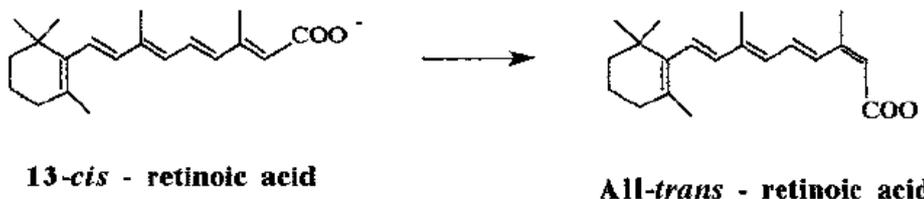


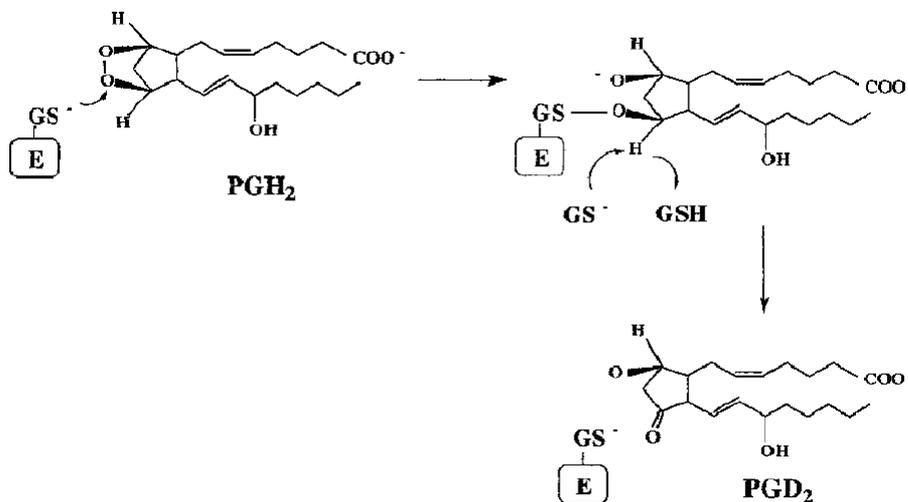
Figure 32: Isomérisation de l'acide rétinolique par les GST pi d'après Sheehan et al., 2001.

### 3.4.14 Sigma

La classe Sigma a été désignée en 1992 sur la base d'un alignement de 71 séquences provenant de vertébrés, d'invertébrés et de procaryotes (Buetler and Eaton, 1992). Cette classe

inclut des séquences de calamar qui présentent plus de 40% d'identité avec la protéine S-cristalline des céphalopodes, une protéine majeure de l'œil (Tomarev et al., 1992; Tomarev et al., 1993). La protéine S-cristalline aurait évolué à partir de la duplication d'un gène de GST sigma ancestral (Piatigorsky, 2003). Une seule GST de type Sigma est généralement identifiée dans les organismes explorés.

Les GST Sigma semblent impliquées dans le métabolisme des dérivés oxygénés des acides gras. Ainsi, une GST Sigma, purifiée à partir du nématode parasite *Ascaridia galli*, fonctionne en tant que prostaglandine-H E isomérase dépendante du glutathion (Meyer et al., 1996). Il est probable que cette enzyme catalyse la synthèse endogène de prostaglandine E chez les parasites multicellulaires. Chez les vertébrés, des homologues appartenant également à la classe Sigma et présentant une activité prostaglandine D synthase ont été identifiés chez le rat, l'homme et le poulet (Thomson et al., 1998; Urade and Hayaishi, 2000) (Figure 33).



**Figure 33: Isomérisation de PGH<sub>2</sub> en PGD<sub>2</sub> catalysée par les GST Sigma de vertébrés, d'après Sheehan et al., 2001.**

Un gène codant pour une PGD synthase, présentant plus de 95 % d'homologie avec les GST Sigma de vertébrés, a été identifié chez *Ciona intestinalis* (phylum des chordés) (Rowley et al., 2005).

La classe Sigma est également rencontrée chez les insectes et semble jouer un rôle dans la détoxification des produits de peroxydation des lipides, comme le 4-HNE (Singh et al., 2001; Agianian et al., 2003). Cette classe de GST est donc partagée par des organismes appartenant à des embranchements différents (deutérostomiens et protostomiens) de la division des opisthochontes.

### 3.4.15 Gamma

La classe Gamma a été découverte à partir de séquences du zygomycète *Cunninghamella elegans* (Cha et al., 2002). Ces enzymes présentent des activités transférases et peroxydases, mais aucun substrat spécifique n'a été déterminé. Alors que la plupart des GST de champignons (levures et phytopathogènes) est proche de la classe Theta (Pemble and Taylor, 1992), la classe Gamma semble avoir évolué à partir de l'ancêtre commun des GST de classes animales Alpha, Mu et Pi.

### 3.4.16 Nu

Les GST de la classe Nu sont spécifiques des nématodes et ont été principalement identifiées chez *Caenorhabditis elegans*, *Haemonchus contortus*, *Heligmosomoides polygyrus* et *Ascaris*. La classe la plus proche de ces GST est la classe Sigma avec laquelle elles partagent un peu moins de 30% d'identité (Ketterer, 2001). Ces protéines semblent jouer un rôle dans la fixation non enzymatique des hèmes exogènes qui sont ensuite incorporés dans les hémoprotéines chez les nématodes parasites. Le génome de *C. elegans* ne contient pas d'orthologues des protéines de fixation des hèmes, et la classe Nu aurait donc évolué pour jouer ce rôle de ligandine (Perally et al., 2008).

## 3.5 Evolution des GST cytosoliques

Les premières analyses de l'évolution des GST cytosoliques étaient principalement basées sur la comparaison des identités de séquences. De ce fait, considérant la présence ubiquiste de la classe Theta, depuis les bactéries aérobies jusqu'aux eucaryotes supérieurs, cette classe fut considérée comme l'ancêtre commun des GST cytosoliques. Il a été suggéré que les GST constituant cette classe seraient apparues avant la séparation des procaryotes et des eucaryotes, avec un rôle dans la détoxification de l'oxygène. Les GST spécifiques des plantes et des mammifères auraient alors évolué par duplication d'un gène de GST Theta, qui aurait eu lieu avant l'apparition des animaux et des champignons (Pemble and Taylor, 1992). Cependant, la forte similarité des structures tridimensionnelles, non seulement entre les GST cytosoliques, mais aussi avec un certain nombre d'autres familles de protéines, a suggéré de considérer l'évolution des GST dans un contexte plus large, en relation avec l'évolution du motif thiorédoxine.

Un grand nombre de protéines possèdent un motif thiorédoxine et certaines partagent des activités similaires. Par exemple, les thiorédoxines, les glutarédoxines et les DsbA sont toutes des protéines rédox qui catalysent la réduction de ponts disulfures, tandis que les

glutathion peroxydases et les peroxyrédoxines sont spécialisées dans la réduction des peroxydes (Martin et al., 1993; Copley et al., 2004). D'autres ont évolué vers des fonctions différentes : les calséquestrines fixent le calcium, les CLICs forment des canaux ioniques, les DHARs réduisent le dehydroascorbate, et eEF1B $\gamma$  est un facteur de la synthèse protéique.

Les GST ont évolué en deux phases. La première fait intervenir des événements anciens liés à la famille des thiorédoxines, et la deuxième correspond à l'apparition et à la diversification des différentes classes de GST (Figure 34).

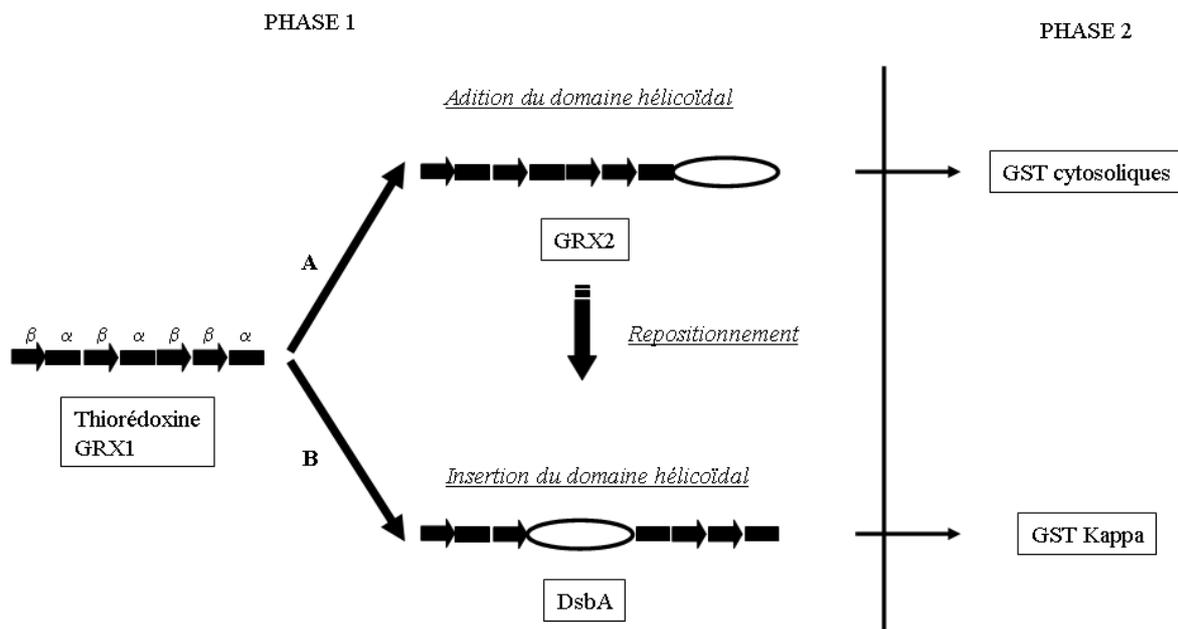


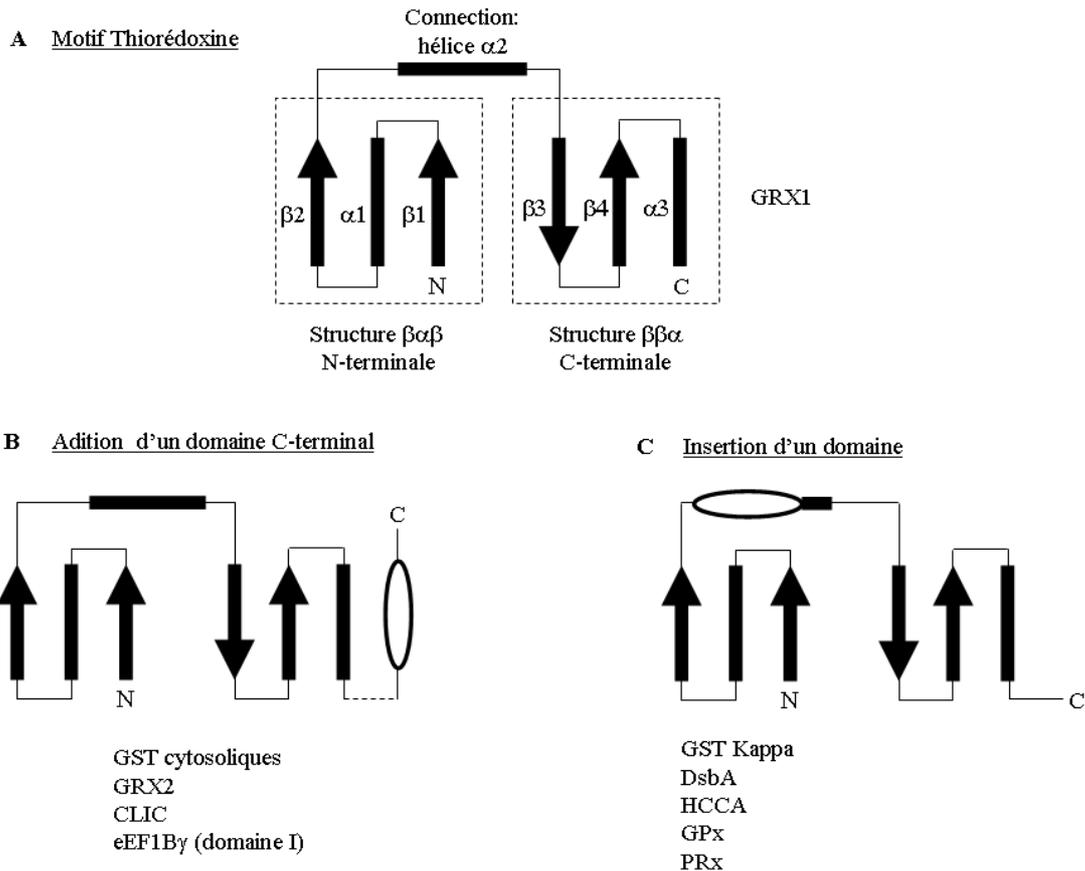
Figure 34: Phase 1 du modèle d'évolution des GST, d'après Frova, 2006.

### 3.5.1 Phase 1

Un large consensus est établi autour du fait que les thiorédoxines et les glutarédoxines sont les ancêtres des GST cytosoliques actuelles, des GST Kappa et des protéines à motif thiorédoxine. Le repliement typique des thiorédoxines adopte une topologie compacte  $\beta\alpha\beta\alpha\beta\beta\alpha$ . Un certain nombre de protéines exhibant ce repliement présentent un motif catalytique CXXC dans la boucle contenue entre le second brin  $\beta$  et la seconde hélice  $\alpha$ . La perte ou la dégradation de ce motif est associée avec la divergence fonctionnelle des homologues de thiorédoxines.

Le principal événement de la phase 1 est le recrutement d'un domaine uniquement composés d'hélices  $\alpha$ , soit en position C-terminale et donnant naissance aux GST cytosoliques, soit inséré dans le motif thiorédoxine et générant ainsi les GST Kappa et les

DsbA. Les glutathion peroxydases et les peroxyredoxines ont également une insertion au même endroit que les GST Kappa, mais pas d'un domaine uniquement hélicoïdal (Figure 35).



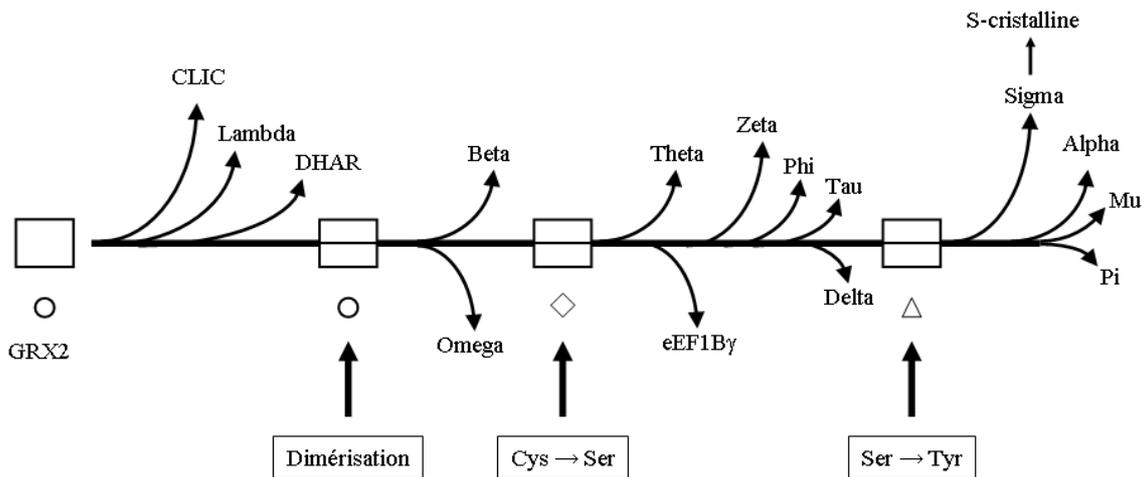
**Figure 35: Schéma des structures secondaires du motif thiorédoxine et des variantes évolutives, d'après Frova, 2006.**

Les brins  $\beta$  sont représentés par des flèches et les hélices  $\alpha$  par des rectangles. Les structures secondaires N-terminales et C-terminales du motif thiorédoxine de la protéine GRX1 sont encadrés par des pointillés (A). Dans (B) et (C), le domaine supplémentaire est représenté par une forme ovale. L'échelle n'est pas respectée. Les protéines qui possèdent ces différentes structures sont indiquées sous les schémas. La ligne pointillée de la figure (B) représente le motif de liaison entre le domaine I et le domaine II.

Sur la base de motifs structuraux, certains auteurs (Ladner et al., 2004; Robinson et al., 2004) ont proposé que les GST cytosoliques et les GST Kappa ont évolué indépendamment à partir des glutarédoxines par deux voies parallèles A et B (Figure 34). Ce modèle remplace celui de Armstrong (1997) et de Sheehan (2001) dans lesquels les GST Kappa avaient évolué à partir des GST cytosoliques Theta.

Dans la Figure 34, les phases 1 et 2 sont situées à gauche et à droite d'une frontière hypothétique. Toutes les enzymes situées à gauche présentent une activité thiol transférase avec une cystéine comme principal résidu du site actif. A contrario, les GST Kappa et cytosoliques, situées à la droite de cette frontière imaginaire, ont une sérine comme résidu

catalytique, ne forment pas de ponts disulfures avec le glutathion, et catalysent des réactions de conjugaison plutôt que d'oxydo-réduction. La glutarédoxine 2 (GRX2) d'*E. coli* et la DsbA bactérienne sont les intermédiaires les plus probables au sein de ces deux voies évolutives. Une autre hypothèse suggère l'évolution de DsbA à partir d'un repositionnement du domaine hélicoïdal de GRX2 de la partie C-terminale vers une position plus interne (Ladner et al., 2004).



**Figure 36: Phase 2 du modèle d'évolution des GST, d'après Frova, 2006.**

Les flèches indiquent les étapes critiques de l'évolution des GST: une dimérisation et deux modifications des résidus catalytiques. Les ronds indiquent la présence d'une cystéine dans le site de fixation du GSH, le losange représente une sérine et le triangle une tyrosine.

### 3.5.2 Phase 2

La Figure 36 décrit l'évolution des protéines de la voie A de la phase 2. Les CLIC, DHAR et les GST Lambda ont conservé la structure monomérique de la glutarédoxine 2 d'*E. coli* (GRX2). Ensuite, une étape de dimérisation a eu lieu, les GST Beta et Omega étant actives sous forme de dimère. Jusqu'à ce stade, les protéines présentent une cystéine comme résidu catalytique principal et les enzymes possèdent très peu ou pas d'activité de conjugaison du glutathion. À l'exception des CLIC, qui sont spécialisées dans la formation de canaux ioniques, toutes ces enzymes partagent une activité thiol transférase ou déhydroascorbate réductase. Elles forment donc un groupe à part des autres GST cytosoliques et il est fort probable que ces protéines aient évolué très tôt. Cependant, l'ordre exact d'apparition reste hypothétique.

Le second événement majeur est le changement d'une cystéine pour une sérine dans le site catalytique de fixation du glutathion. Parmi les GST de type "sérine", les classes Theta, Zeta et eEF1Bγ sont présentes chez tous les eucaryotes. Il semble donc que ces protéines aient évolué très tôt, et la classe Theta, également présente chez les bactéries, constitue

certainement leur ancêtre commun. Le rôle du domaine GST d'eEF1B $\gamma$  est de réguler l'assemblage des sous-unités du facteur d'élongation protéique en utilisant le glutathion et son pouvoir réducteur (Koonin et al., 1994). L'évolution des classes Phi, Tau et Delta semble être plus récente. En effet, ces classes sont uniquement présentes chez les plantes ou les insectes. De plus, elles comptent un grand nombre de séquences fréquemment regroupées sur de petites portions de génome, et les forts pourcentages de similarité au sein de ces classes sont des preuves d'événements de duplication récents.

Un second changement de résidu catalytique dans le site G marque une nouvelle étape dans l'évolution des GST. La sérine est remplacée par une tyrosine, ce qui a conduit à l'apparition des classes Alpha, Mu, Pi et Sigma. Cette étape est très largement supportée par les analyses phylogénétiques (Board et al., 1997). La présence des GST Sigma à la fois chez les vertébrés et les invertébrés suggère que cette classe a évolué avant les classes Alpha, Mu et Pi, spécifiques des mammifères.

Chez les céphalopodes, il existe deux GST Sigma. L'une est classique avec une capacité de conjugaison du glutathion, l'autre, appelée S-cristalline, est une protéine majeure de l'œil et n'a pas d'activité enzymatique (Tomarev et al., 1993). La protéine S-cristalline a évolué par la duplication d'une GST Sigma, et l'insertion de 11 résidus entre les hélices  $\alpha_4$  et  $\alpha_5$ , ce qui empêche toute activité enzymatique (Sheehan et al., 2001).

En revanche, chez les vertébrés et les invertébrés, notamment les insectes et les parasites multicellulaires, les GST de la classe Sigma ont acquis des fonctions spécialisées dans le métabolisme des acides gras et principalement des prostaglandines (Sheehan et al., 2001).

Dans la voie B de la phase 1 de l'évolution des GST (Figure 34), il y a un saut évolutif non résolu entre les DsbA et les GST Kappa. En effet, les DsbA sont des protéines bactériennes monomériques présentant une cystéine dans leurs sites catalytiques, tandis que les GST Kappa sont essentiellement des protéines eucaryotes dimériques dont le principal résidu catalytique est une sérine. Les similitudes entre les GST Kappa et Theta au niveau de la structure dimérique et du résidu catalytique suggère une histoire évolutive commune. Cependant, le faible taux d'identité entre les structures primaires (19%) (Li et al., 2005), et la position du domaine hélicoïdal, sont en opposition avec cette hypothèse. Il est possible que la dimérisation et le changement de résidu catalytique soient apparus deux fois au cours de l'évolution.

Les classes ubiquistes Theta, Zeta, Omega et Sigma sont généralement représentées par quelques membres dans chaque espèce, indiquant que ces gènes ont subi peu de duplications ou que la plupart des copies ont été perdues. Les protéines de ces classes partagent généralement des degrés d'identité assez élevés entre les espèces alors même que leur spéciation est ancienne. L'origine monophylétique des classes Theta et Zeta, précédant la divergence entre les plantes et les animaux, est en accord avec la conservation de la structure des gènes, le type de résidu catalytique, et la fonction de ces enzymes chez tous les eucaryotes (Dixon et al., 1998; Frova, 2003). Les GST spécifiques d'un certain taxon sont beaucoup plus nombreuses que les GST communes à plusieurs lignées pour un organisme donné. Ceci indique que l'expansion et la diversification des GST dans les différentes lignées évolutives est plutôt récente, alors que les enzymes ont une origine plus ancienne. L'analyse phylogénétique des GST de plantes montre que les classe Phi et Tau ont évolué suite à un grand nombre de duplications après la divergence des monocotylédones et des dicotylédones, il y a 200 millions d'années environ (Soranzo et al., 2004).

Le fort taux d'évolution des classes de GST spécifiques reflète une réponse adaptative aux contraintes de l'environnement. Ces classes de GST sont en général impliquées dans la détoxification des xénobiotiques, plus spécifiquement en catalysant les réactions de phase II chez les plantes et les animaux. Ce métabolisme de détoxification repose sur un système efficace capable de reconnaître et de prendre en charge un grand nombre de composés toxiques. Ainsi, au cours de l'évolution, la nécessité de faire face à de nouveaux composés toxiques s'est traduite par l'augmentation du nombre de gènes de GST par duplication, puis par une diversification des spécificités de substrats et des activités enzymatiques. Le site de fixation du GSH, atout principal des GST, est conservé, et les modifications de séquences ont eu lieu principalement au niveau du site d'attachement du second substrat (Frova, 2006). En d'autres termes, le site G est conservé tandis que le site H est hypervariable.

### 3.6 GST Kappa

La découverte de cette famille particulière date de 1991, lorsqu'une GST a été purifiée à partir de mitochondries de cellules de foie de rat (Harris et al., 1991). Cette protéine fut d'abord classée parmi les GST Theta sur la base de sa séquence N-terminale. Cependant, l'analyse approfondie des séquences nucléiques et protéiques a fait émerger des différences majeures avec les autres GST de mammifères, entraînant alors la création d'une nouvelle classe, nommée Kappa (Pemble et al., 1996).

Les caractéristiques de cette nouvelle famille de GST ont été établies suite à la caractérisation moléculaire et biochimique d'une enzyme de souris (Jowsey et al., 2003) et d'une enzyme humaine (Morel et al., 2004; Robinson et al., 2004). Ces résultats ont ensuite été complétés par la détermination des structures tridimensionnelles des protéines de rat et d'homme (Ladner et al., 2004; Li et al., 2005). Il existe un seul gène de GST Kappa dans chaque espèce de mammifère étudiée, et les séquences protéiques murines et humaines sont très similaires, tant au niveau de l'identité de séquences (70%), qu'au niveau de la structure des gènes, qui contiennent tous huit exons et sept introns à des positions bien définies (Jowsey et al., 2003; Morel et al., 2004). Des séquences similaires ont été identifiées dans des banques d'EST de taureau *B. taurus*, de cochon *S. scrofa*, de poule *G. gallus*, de xénope *X. laevis*, du nématode *C. elegans* et chez les bactéries (Vuilleumier, 1997; Morel et al., 2004). La présence des GST Kappa dans des espèces et des phyla éloignés suggère un rôle fondamental et des fonctions biologiques conservées. Cependant, la classe Kappa n'a jamais été identifiée dans un organisme photosynthétique.

### **3.6.1 Fonctions**

Les GST Kappa présentent une activité de conjugaison dépendante du glutathion sur des substrats modèles, partageant ainsi des caractéristiques avec les GST cytosoliques. Les gènes des GST Kappa sont exprimés dans une grande variété de tissus (Jowsey et al., 2003) et les protéines sont généralement localisées dans les mitochondries. De plus, il a été montré que la GST Kappa humaine est également localisée dans les péroxysomes (Morel et al., 2004). Étant donné que les mitochondries et les péroxysomes sont impliqués dans le métabolisme des lipides, et représentent des organites cellulaires où de grandes quantités d'espèces activées de l'oxygène sont générées, les GST Kappa pourraient être des acteurs de la  $\beta$ -oxydation des acides gras et de la détoxification des lipides peroxydés.

### **3.6.2 Structure**

La comparaison des séquences d'acides aminés montrent que les GST Kappa ne partagent pas d'homologies significatives avec les GST cytosoliques, mais sont proches des DsbA d'*E. coli* et des HCCA (2-hydroxychromène-2-carboxylate isomérase) bactériennes impliquées dans l'oxydo-réduction glutathion dépendante du naphthalène (Ladner et al., 2004; Robinson et al., 2004). De plus, la structure secondaire des GST Kappa est plus proche de celle des DsbA et des HCCA que de celle des autres GST cytosoliques. Chez les GST cytosoliques, le domaine II hélicoïdal est situé en aval du motif thiorédoxine, alors qu'il est inséré entre les structures  $\beta\alpha\beta$  N-terminales et  $\beta\beta\alpha$  C-terminales du motif thiorédoxine des

GST Kappa, des DsbA et des HCCA. (Figure 35). Cependant, l'alignement des éléments de structure secondaire du motif thiorédoxine des GST Kappa et des GST cytosoliques est possible. Dans ce cas, la GST Kappa humaine est plus proche des GST Theta humaine que de n'importe quelle autre GST cytosolique et DsbA (Li et al., 2005). De plus, les GST Kappa humaine et de rat sont dimériques, comme les GST Theta, et ont un site de dimérisation similaire (Ladner et al., 2004; Li et al., 2005).

### 3.7 GST microsomales

Les GST microsomales (mGST) représentent une superfamille d'enzymes récemment reconnues pour leurs implications dans la détoxification cellulaire, mais aussi dans le métabolisme de l'acide arachidonique. Cette superfamille a été appelée MAPEG pour *Membrane Associated Protein in Eicosanoid and Glutathione metabolism* et regroupe des protéines identifiées chez les plantes, les animaux, les champignons et les bactéries (Jakobsson et al., 1999).

#### 3.7.1 Fonctions

La plupart des MAPEG est impliquée dans la synthèse des eicosanoïdes, prostaglandines et leucotriènes, catalysant des réactions de conjugaison ou d'isomérisation dépendantes du glutathion. Cependant, la première GST microsomale identifiée, la MGST1 humaine (Morgenstern et al., 1982) ne présente pas de telles activités mais catalyse des réactions plus typiques des GST cytosoliques. Cette enzyme conjugue du GSH sur des aryles halogénés, dont le CDNB, et sur une variété d'hydrocarbures insaturés polyhalogénés (Andersson et al., 1994). En plus de cette activité transférase, MGST1 catalyse également la réduction glutathion-dépendante d'hydroperoxydes organiques, d'hydroperoxydes d'acides gras et d'hydroperoxydes de phospholipides (Morgenstern and Depierre, 1983; Mosialou et al., 1995). Suite à ces observations, MGST1 est considérée comme étant essentiellement une enzyme de détoxification cellulaire des composés toxiques et des métabolites produits à la suite d'un stress oxydant.

D'autres MAPEG ont ensuite été identifiées, et nommées leucotriènes C<sub>4</sub> synthase (LTC<sub>4</sub>S), Five-lipoxygenase activating protein (FLAP) et prostaglandine E synthase 1 (PGES1). FLAP est une protéine non catalytique qui se fixe de manière non-enzymatique à l'acide arachidonique et permet l'activation des 5-lipoxygénases (5-LOX), enzymes qui catalysent la conversion de l'acide arachidonique en leucotriène A<sub>4</sub> (LTA<sub>4</sub>). FLAP est aussi impliquée dans la synthèse du leucotriènes B<sub>4</sub> en association avec une LTA<sub>4</sub> hydrolase

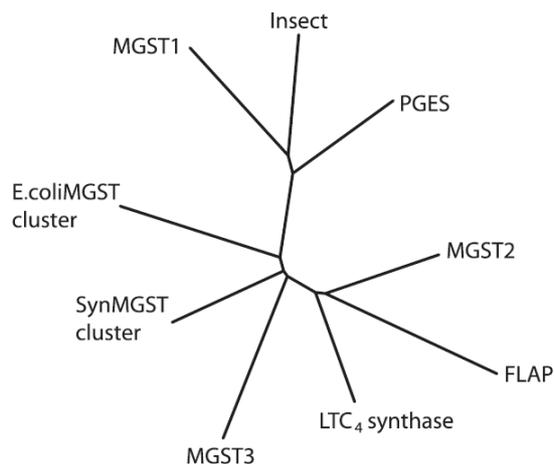
(mandal, 2004). LTC<sub>4</sub>S possède une activité GST et catalyse la synthèse du leucotriène C<sub>4</sub> à partir de LTA<sub>4</sub> et de glutathion réduit. PGES1, initialement nommée MGST1-L1 à cause de son homologie avec MGST1, catalyse l'isomérisation dépendante du glutathion de PGH<sub>2</sub> en PGE<sub>2</sub>. Cette enzyme présente peu ou pas d'activité GST avec le CDNB, mais est capable de peroxyder le cumène hydroperoxyde et d'autres substrats (Thoren et al., 2003).

Deux autres MAPEG ont été découvertes par l'analyse de banques EST humaines et ont été nommées MGST2 et MGST3 (Jakobsson et al., 1996; Jakobsson et al., 1997). Le clonage, la purification et la caractérisation de ces gènes ont permis de mettre en évidence que les enzymes correspondantes catalysent la conjugaison du glutathion et du LTA<sub>4</sub> pour former du LTC<sub>4</sub>. Cependant, lorsque le CDNB est utilisé comme substrat, l'activité GST est détectée chez MGST2 et pas chez MGST3. Par contre, les deux enzymes possèdent une activité peroxydase et catalysent la réduction glutathion-dépendante du 5-HpETE en 5-HETE. D'après ces activités catalytiques, MGST2 et MGST3 semblent aussi jouer un rôle dans la détoxification de xénobiotiques et la protection cellulaire contre les dommages oxydatifs. MGST3 est à ce jour la seule famille de MAPEG contenant des protéines d'origine végétale. Ainsi, une séquence de MGST3 d'*A. thaliana* a été clonée mais, à l'inverse de la MGST3 humaine, cette enzyme est active sur le CDNB et ne présente pas d'activité peroxydase sur le cumène hydroperoxyde (Bresell et al., 2005).

Deux groupes de bactéries, les pourpres et les cyanobactéries, produisent et maintiennent des niveaux significatifs de glutathion (Fahey and Sundquist, 1991). Ces bactéries contiennent des MAPEG qui n'appartiennent à aucun des groupes déjà cités. Les protéines présentent une activité transférase et pourraient donc être impliquées dans la détoxification.

### **3.7.2 Evolution**

Les relations phylogénétiques unissant les MAPEG ont été retracées en incluant les séquences disponibles dans les génomes complets, dont ceux de bactéries et d'insectes (Bresell et al., 2005).



**Figure 37: Arbre schématique de l'évolution des MAPEG.**

Cet arbre regroupe les 6 familles de MAPEG connues et trois autres groupes formés à partir de séquences provenant d'insectes (Insect), d'*E. coli* (E.coliMGST cluster) et de *Synechocystis* (SynMGST cluster).

Un sous-groupe majeur composé de MGST1, PGES et des GST microsomales d'insectes est visible dans la partie haute de l'arbre. Ces classes partagent un ancêtre commun, ce qui est compatible avec le chevauchement de leurs activités enzymatiques. La situation est identique pour un autre sous-groupe, situé dans la partie basse de l'arbre, comprenant MGST2, FLAP et LTC<sub>4</sub> synthase. MGST3 forme une branche à part, de même que les clusters de *Synechocystis* et d'*E. coli*.

Parmi les MAPEG, des séquences de poissons sont présentes dans les six branches (MGST1, MGST2, MGST3, PGES, FLAP et LTC<sub>4</sub>S), ce qui suggère que l'origine de ces familles est antérieure à l'émergence des vertébrés. Aucune MAPEG n'a été identifiée chez les Archae, ce qui est cohérent avec l'absence de glutathion dans ces organismes.

Les GST cytosoliques et les MAPEG sont très différentes, notamment au niveau de leurs séquences primaires (moins de 10 % d'identité), mais aussi dans leurs structures tri-dimensionnelles. Une même origine pour ces deux familles est donc exclue, et certaines activités communes doivent être dues à des phénomènes de convergences évolutives, en relation sans doute avec les caractéristiques biochimiques du glutathion.

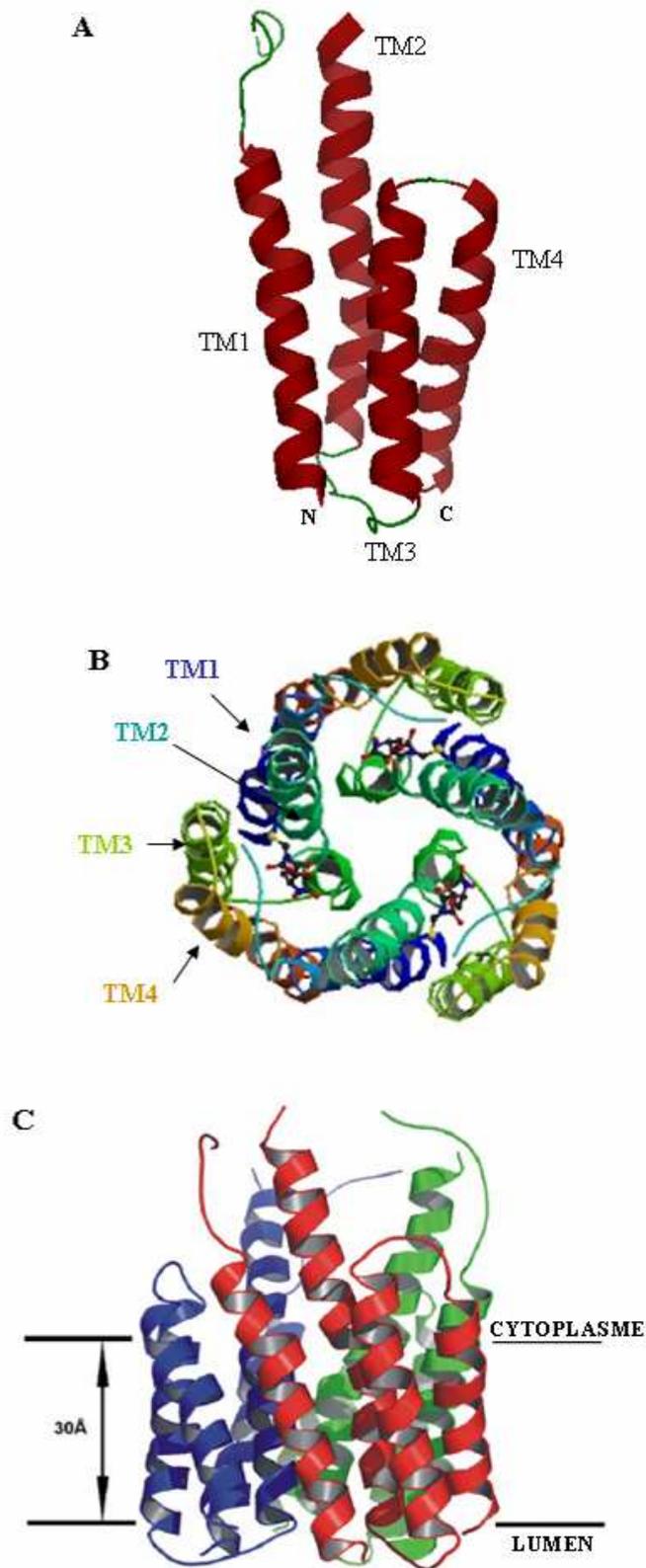
### **3.7.3 Structure des GST microsomales**

Les GST microsomales ont une taille moyenne de 150 acides aminés. Ce sont des protéines transmembranaires, les parties amino et carboxy terminales étant situées dans le lumen, tandis que les sites de fixation du GSH et du substrat sont situés au sein de boucles localisées dans le cytosol (Lam and Austen, 2002; Busenlehner et al., 2004) (Figure 38A). Le nombre de domaines transmembranaires initialement établi à trois (Jakobsson et al., 1996;

Lam et al., 1997) a été corrigé à quatre après ré-interprétation des profils d'hydropathie (Schmidt-Krey et al., 2000; Schmidt-Krey et al., 2004), et confirmé par la résolution d'un cristal de MGST1 (Holm, 2006).

La structure quaternaire des MAPEG semble indiquer que les enzymes forment un homotrimère (Schmidt-Krey et al., 2000). A l'inverse des GST cytosoliques, les multi-mères de MGST1 humaine et de rat ne fixent qu'une seule molécule de glutathion, indiquant donc que les monomères ne sont pas indépendants, mais interagissent pour former le site actif de l'enzyme (Sun and Morgenstern, 1997; Lengqvist et al., 2004; Holm et al., 2006) (Figure 38B). Les structures de LTC<sub>4</sub>S et PGES1 adoptent également un repliement en homotrimère (Thoren et al., 2003; Schmidt-Krey et al., 2004). L'analyse de mutants de délétion ou de substitution de LTC<sub>4</sub>S ont permis d'identifier un domaine C-terminal (résidus 114-150) indispensable pour l'oligomérisation et l'activité enzymatique (Lam et al., 1997; Svartz et al., 2003), suggérant ainsi que la trimérisation induit une stabilité structurale et catalytique de l'enzyme.

La protéine FLAP existe sous forme de monomère, de dimère et de trimère (Mandal et al., 2004). De plus, il semblerait que les sous-unités de FLAP et LTC<sub>4</sub>S peuvent s'associer en hétérodimère ou trimère. La structure quaternaire des protéines MGST2 et MGST3 n'est pas connue.



**Figure 38: Structure tridimensionnelle de MGST1.**

(A) Vue latérale, face cytoplasmique vers le haut, du monomère de MGST1. (B) homotrimère, vue de la face cytoplasmique. Les quatre hélices d'un même monomère sont indiquées. (C) Position approximative du cœur hydrophobe de l'homotrimère dans la membrane. D'après Holm (2006).

### 3.8 Activités GST in vitro

La mesure de l'activité enzymatique des GST peut être effectuée à partir d'un extrait brut, d'une protéine purifiée ou bien d'une protéine recombinante. Une large gamme de substrat est traditionnellement utilisée, permettant d'étudier la spécificité, les paramètres cinétiques et la sensibilité à des inhibiteurs.

#### 3.8.1 Substrats

Il est possible de mesurer par spectrophotométrie l'activité de conjugaison sur des composés aromatiques halogénés tels que les dérivés du dinitrobenzène ou le chlorure de para-nitrobenzoyle (Tableau 3), sur des carbonyles insaturés comme l'acide éthacrinique, le *trans*-4-phenyl-3-buten-2-one, ou sur des aldéhydes tels que le 4-HNE et le *trans*-2-nonenal. Les composés conjugués absorbent à des longueurs d'ondes spécifiques. Le test le plus courant s'effectue avec le 1-chloro-2, 4-dinitrobenzène (CDNB) dont le conjugué absorbe à 340 nm.

L'activité peroxydase des GST est généralement mesurée par couplage avec l'activité d'une glutathion réductase NADPH dépendante. Les substrats les plus couramment utilisés sont le cumène hydroperoxyde, le t-butyl hydroperoxyde, et d'autres hydroperoxydes organiques (Tableau 4).

Ces substrats sont dits généralistes car un grand nombre de GST est capable de les prendre en charge avec des affinités plus ou moins importantes. Cependant, les substrats spécifiques des GST sont mis en évidence par d'autres approches. Par exemple, la mesure de l'activité GST sur l'atrazine s'effectue à partir d'un mélange réactionnel contenant de l'atrazine marqué au  $^{14}\text{C}$ , du glutathion et l'échantillon d'enzyme. La conjugaison du glutathion rend soluble l'atrazine qui peut donc être séparé par chromatographie sur couche mince (CCM). La quantité de produit est ensuite estimée et comparée avec celle obtenue à partir d'un mélange réactionnel contenant un extrait enzymatique dénaturé (Diesperger and Sandermann, 1979; Thomson et al., 1998; Pflugmacher et al., 2000). De la même manière, l'activité prostaglandine D2 synthase de GST Sigma est mesurée en incubant un extrait enzymatique et de l'acide arachidonique radiomarqué convertit en PGH<sub>2</sub> par une COX commerciale. Les produits radiomarqués formés au cours de la réaction sont ensuite élués par CCM et comparés avec la migration de standards commerciaux (Meyer et al., 1996).

**Tableau 3: Substrats généralement utilisés pour la détermination de l'activité de conjugaison des GST.**

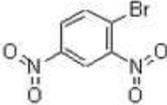
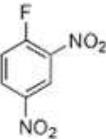
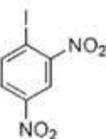
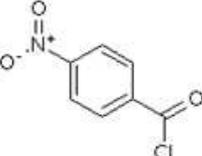
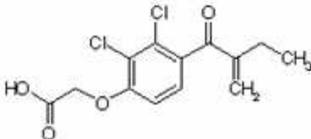
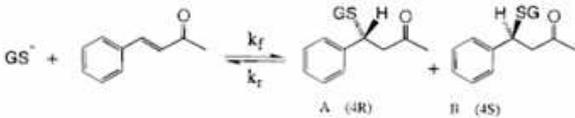
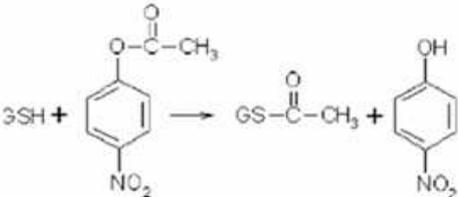
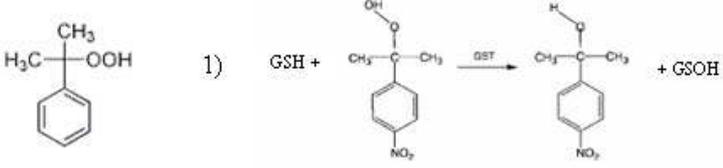
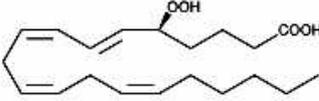
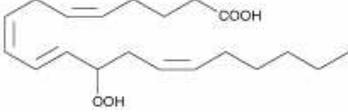
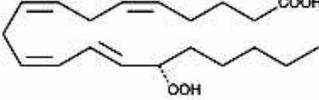
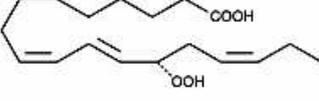
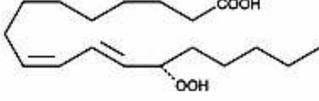
Substrat et Absorbance du conjugué	Réaction
1-chloro-2,4-dinitrobenzène (CDNB) – 340 nm	 $\text{GSH} + \text{Cl-C}_6\text{H}_3(\text{NO}_2)_2 \xrightarrow{\text{GST}} \text{GS-C}_6\text{H}_3(\text{NO}_2)_2 + \text{HCl}$
1-bromo-2,4-dinitrobenzène (CDNB) – 340 nm	
1-fluoro-2,4-dinitrobenzène (CDNB) – 340 nm	
1-iodo-2,4-dinitrobenzène (CDNB) – 354 nm	
Chlorure de <i>para</i> nitrobenzoyle (pNBC) – 310 nm	
Acide éthacrinique – 270 nm	
<i>trans</i> 4-phenyl-3-buten-2-one 290 nm	 $\text{GS}^{\cdot} + \text{trans-4-phenyl-3-buten-2-one} \xrightleftharpoons[k_r]{k_f} \text{A (4R)} + \text{B (4S)}$
<i>para</i> -nitrophenyl acétate 400 nm	 $3\text{SH} + \text{p-Nitrophenyl acetate} \rightarrow \text{GS-C(=O)-CH}_3 + \text{p-Nitrophenol}$

Tableau 4: Substrats généralement utilisés pour la mesure de l'activité peroxydase des GST.

Substrat	Réaction
Cumène hydroperoxyde	<p>1) </p> <p>2) <math>GSOH + GSH \longrightarrow GSSG + H_2O</math></p> <p>3) <math>NADPH + H^+ + GSSG \xrightarrow{GR} NADP^+ + 2GSH</math> Absorbance 340nm</p>
t-butyl hydroperoxyde	
5-HpETE	
12-HpETE	
15-HpETE	
13-HpOTE	
13-HpODE	

### 3.8.2 Inhibiteurs

De nombreuses molécules sont capables d'inhiber l'activité des GST *in vitro*. Ces composés couvrent une large gamme de structures chimiques et sont d'origines variées. Parmi ces composés, on retrouve des acides biliaires comme l'acide chénodéoxycholique (Hayes and Mantle, 1986), et des composés polyphénoliques des plantes tels que l'acide tannique ou la quercétine (Zhang and Das, 1994) (Figure 39). En principe, chaque substrat spécifique d'une GST peut potentiellement constituer un inhibiteur compétitif pour une autre isoenzyme. De même, les composés qui se fixent sur le site G entrent en compétition avec le glutathion. En ce sens, le S-hexylglutathione et le Cibacron blue sont des inhibiteurs très puissants car ils encombrant très largement le site G et le site H (Mulder and OuwerkerkMahadevan, 1997).

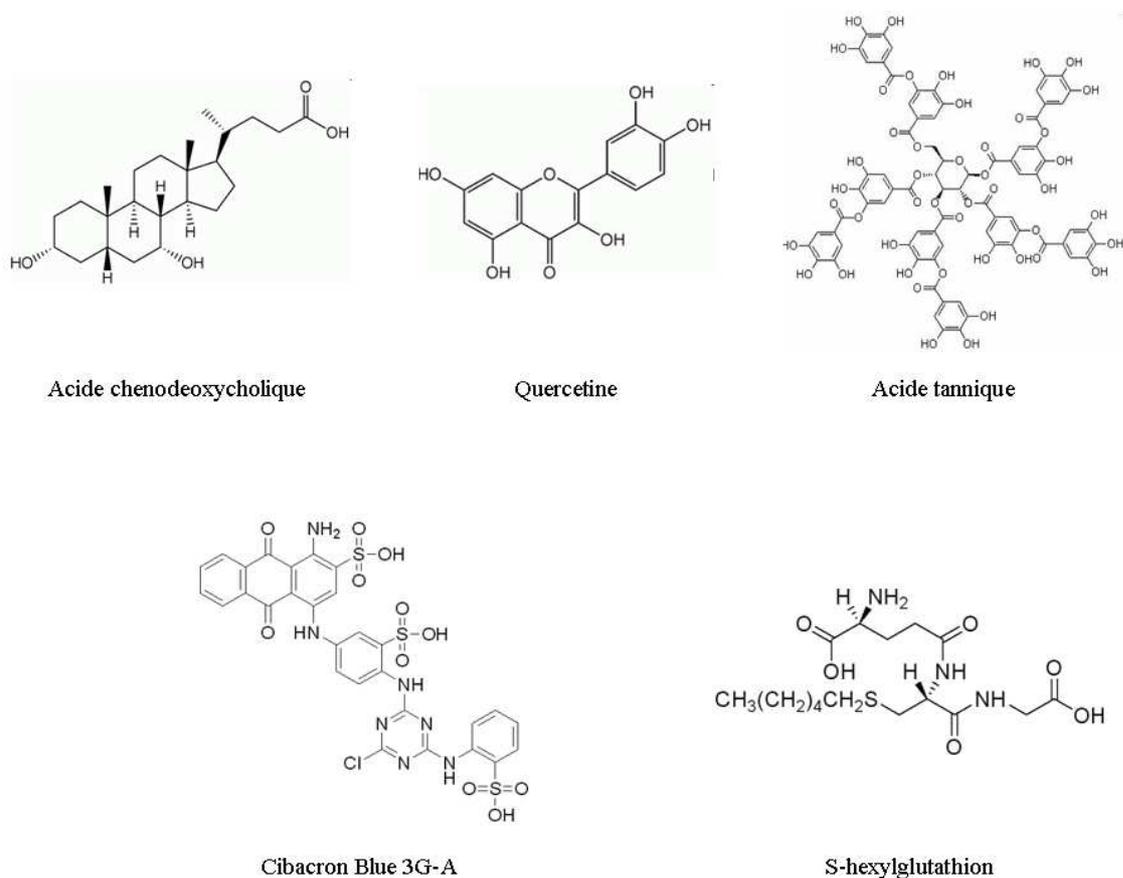


Figure 39: Exemples d'inhibiteurs de l'activité des glutathion S-transférases.

### 3.9 Les GST chez les algues

Relativement peu de données sont disponibles sur les glutathion S-transférases chez les macroalgues marines. Les GST, par leur rôle dans la protection cellulaire, ont été considérées comme des marqueurs biologiques du stress et utilisées pour évaluer les niveaux

de pollution des écosystèmes marins. Un nombre limité de travaux décrit la mesure d'activités enzymatiques de GST chez les macroalgues.

### 3.9.1 Des marqueurs biologiques

Les macroalgues, comme tous les organismes vivants, sont capables de prendre en charge et de métaboliser les xénobiotiques. Les plantes et les algues sont généralement considérées comme le "foie vert" (par analogie au poumon vert) des écosystèmes pour leurs rôles dans la biotransformation de ces composés (Tang et al., 1998; Pflugmacher et al., 2000; Lei et al., 2003). De la même manière que chez les animaux et les plantes, l'activité enzymatique GST chez les algues (*Scenedesmus obliquus*, *Ulva lactuca* et *Cyclotella meneghiniana*) et les plantes aquatiques (*Lemna minor*, *Nuphar lutea*) est augmentée en présence de polluants environnementaux tels que les herbicides oxyfluorfen et diuron, ou les hydrocarbures aromatiques polycycliques (Schrenk et al., 1998; Geoffroy et al., 2002). De plus, Pflugmacher et al. (2000) ont déterminé l'activité enzymatique GST sur 59 espèces de plantes et de macroalgues, dont quelques espèces marines (Tableau 5).

**Tableau 5: Activités GST mesurées sur des extraits d'algues, d'après Pflugmacher et al., 1999 et Cairrao et al., 2004.**

	Activité GST sur extraits bruts (nmol.min <sup>-1</sup> .mg <sup>-1</sup> )						Site propre	Sites pollués
	CDNB	IDNB	DCNB	pNBC	EPNP	Atrazine		
<i>Ascophyllum nodosum</i>	40	12	3	10	0	0		
<i>Laminaria digitata</i>	1	17	6	5	4	3		
<i>Laminaria hyperborea</i>	5	22	3	2	1	2		
<i>Laminaria saccharina</i>	3	4	0,5	1	0	50		
<i>Fucus serratus</i>	0	7	2	1	1	0		
<i>Fucus vesiculosus</i>	3	10	1	1	1	0	300	350-600
<i>Fucus spiralis</i>	0	2	0,5	3	0,5	0	150	350-750
<i>Fucus ceranoides</i>							200	350-700
<i>Chondrus crispus</i>	1	3	0,5	30	1	0		

L'activité la plus forte pour chaque substrat est surlignée en gris. Les activités GST sur des *Fucus* collectés dans des sites pollués et non pollués ont été réalisées en utilisant le CDNB comme substrat. CDNB, 1-chloro-2,4-dinitrobenzène; IDNB, 1-iodo-2,4-dinitrobenzène; DCNB, 1,2-dichloro-4-nitrobenzène; EPNP, 1,2-époxy-3-(4-nitrophenoxy)-propane.

Les auteurs ont enregistré la plus forte activité GST en présence de CDNB chez l'algue brune *Ascophyllum nodosum*. Lorsque ils ont utilisé le iodo-dinitrobenzène, ils ont enregistré l'activité la plus élevée chez des espèces de Laminaires (*L. digitata*, *L. hyperborea*). *Laminaria saccharina* est la seule macroalgue présentant une activité importante de conjugaison de l'atrazine. L'activité GST la plus élevée a été mesurée en présence de pNBC chez l'algue rouge *Chondrus crispus*. Cependant, les auteurs précisent que les extractions de

protéines et les tests d'activité enzymatique n'ont pas été optimisés pour chaque espèce et la plupart des résultats doivent être considérés comme des valeurs minimales.

Une étude plus récente a exploité l'activité GST chez des espèces de *Fucus* pour discriminer différents sites de la côte nord-ouest du Portugal selon leurs niveaux de pollution (Cairrao et al., 2004) (Tableau 5). D'une manière générale, l'activité GST est plus faible dans les échantillons provenant de sites non-pollués que dans les sites soumis aux effluents industriels et urbains. L'activité GST la plus forte ( $750 \text{ nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ ) a été enregistrée pour des échantillons de *Fucus spiralis* prélevés dans une zone portuaire où la contamination par des hydrocarbures aromatiques polycycliques dérivés du pétrole est très importante. En comparaison, cette même espèce, dans une zone non contaminée, présente une activité GST d'environ  $130 \text{ nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ , soit six fois plus faible. Par conséquent, les GST d'algues peuvent potentiellement constituer de bons indicateurs de pollution environnementale.

Les preuves moléculaires de l'existence des GST chez les macroalgues sont très récentes. Elles ont été obtenues par deux études de génomique à moyen débit réalisées chez les algues *Chondrus crispus* (Collén et al., 2006) et *Laminaria digitata* (Roeder et al., 2005) en conditions de stress. C'est à partir de ces bases moléculaires que mon projet de thèse a été élaboré.

# **PROBLEMATIQUE**

## 1. Contexte scientifique

---

### 1.1 La recherche de marqueurs moléculaire du stress chez les algues

Afin d'identifier et de caractériser des gènes impliqués dans la réponse aux stress chez l'algue brune *L. digitata*, une banque de 1985 EST a été générée à partir de protoplastes (Roeder et al., 2005). Cette banque, comparée à une banque d'EST générée à partir de sporophytes (Crépineau, 2000) a permis d'établir que les gènes de réponse au stress étaient plus exprimés chez les protoplastes.

Parmi les dix gènes les plus exprimés dans cette banque, les auteurs ont identifié un gène de glutathion S-transférase cytosolique, représenté par 21 séquences. Cette forte représentation suggère un rôle important de ce gène de GST dans la réponse aux stress imposés aux protoplastes. De plus, trois autres gènes de GST cytosoliques ont été identifiés, auxquels correspondent dix, six et quatre EST. Ainsi, 41 séquences parmi les 1985 que compte la banque, soit 2%, codent pour des GST. La recherche d'homologues par blast dans les banques de données a montré que les GST les plus proches des gènes d'algues brunes appartiennent à la classe Sigma (~30% d'identité).

Une approche similaire a été entreprise chez l'algue rouge *C. crispus*, et 2002 EST de protoplastes et 2052 EST de thalle ont été obtenues (Collén et al., 2006). Parmi les gènes moyennement à fortement exprimés dans le protoplaste, les auteurs ont identifié trois GST cytosoliques, représentée par 41, 12 et 2 EST, suggérant un rôle de ces enzymes dans la réponse aux stress chez l'algue rouge. Les plus proches homologues de ces GST appartiennent, comme pour *L. digitata*, à la classe Sigma (~30% d'identité).

Ces deux études successives ont donc montré que chez les macroalgues rouges et brunes, l'expression des gènes de GST est induite au cours du stress généré par la formation de protoplastes. Elles suggèrent également que les GST d'algues brunes et rouges appartiennent à une classe que l'on supposait spécifique des métazoaires, faisant ainsi des GST d'algues les premières enzymes d'organismes photosynthétiques qui appartiendraient à la classe Sigma.

## 1.2 Caractérisation des GST de *C. crispus*

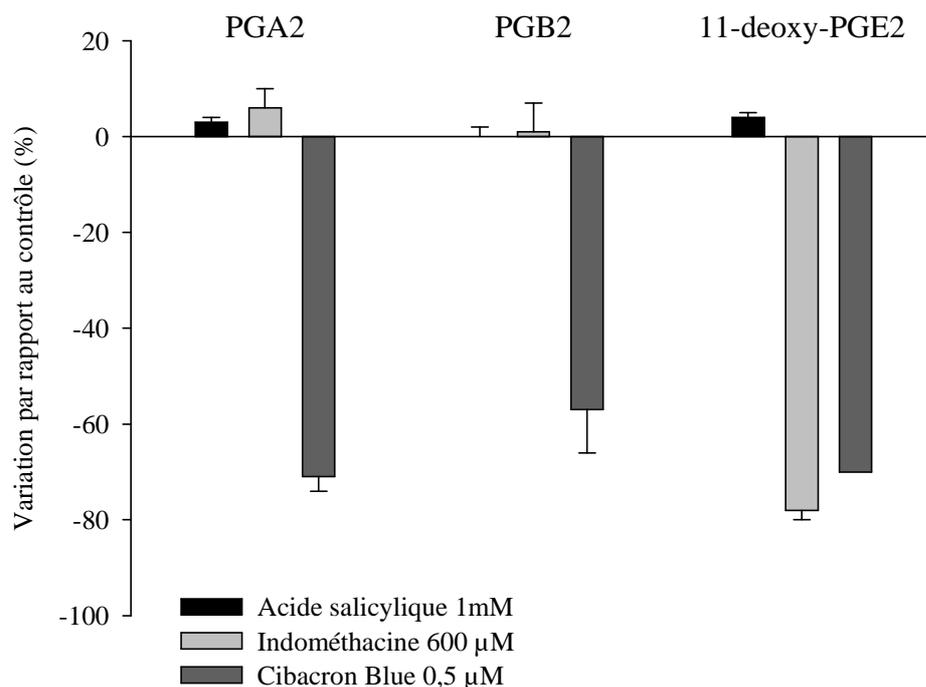
Au cours de sa thèse, Cécile Hervé a, entre autre, caractérisé les GST de *C. crispus* afin d'en évaluer leurs rôles dans la réponse au stress (Hervé, 2006). Chez cette algue, les trois GST cytosoliques ont été nommées CcGST1, CcGST2 et CcGST3. CcGST[1-2] partagent 52 % d'identité entre-elles et environ 30% avec des protéines de la classe Sigma. La structure des gènes établis par comparaison des séquences génomiques et d'ADNc fait apparaître un seul intron et deux exons. Le troisième gène, CcGST3, n'est pas affilié à une classe existante de GST et présente une structure génique sans intron.

En réalisant une étude phylogénétique pour déterminer la classe des GST identifiées dans les protoplastes d'algue rouge, C. Hervé a mis en évidence qu'elles formaient un cluster spécifique des macroalgues et pouvait constituer une nouvelle classe, proche des Sigma.

Des profils d'expression des gènes de GST en conditions de stress ont été déterminés et les trois GST présentent une forte induction en réponse à un traitement par des oxylipines, notamment le méthyle jasmonate, qui induit la synthèse de prostaglandines chez cette algue. Certains herbicides induisent également l'expression de gène, tandis que la présence de métaux lourds n'a pas d'effet.

Afin d'identifier des substrats pour ces enzymes, les protéines CcGST1 et CcGST2 ont été surexprimées et purifiées. Une gamme de substrats généralistes des GST a été testée et a permis de déterminer certains paramètres enzymatiques et d'identifier des inhibiteurs. Les GST de *C. crispus* sont dotées d'une capacité de conjugaison du GSH sur le CDNB, les dérivés du dinitrobenzène, et l'aldéhyde 4-HNE. Elles présentent également une activité peroxydase sur le cumène hydroperoxyde, le t-butylhydroperoxyde et les hydroperoxydes 13-HpOTE et 13-HpODE. Le Cibacron Blue s'est révélé être un inhibiteur très fort de l'activité transférase en agissant à des concentrations de l'ordre du micromolaire.

Faisant l'hypothèse du rôle des GST de *C. crispus* dans la synthèse des prostaglandines, Cécile Hervé a mesuré, par LC-MS, la synthèse de prostaglandines dans des extraits protéiques de *C. crispus* incubés avec différents inhibiteurs puis traitées pendant 45 minutes avec de l'acide arachidonique (Figure 40).



**Figure 40: Inhibition de la synthèse des prostaglandines chez *C. crispus* dans des extraits protéiques incubés en présence d'acide arachidonique, d'après (Hervé et al., 2007).**

Les résultats montrent que la synthèse de PGA<sub>2</sub>, PGB<sub>2</sub> et 11-deoxy-PGE<sub>2</sub> est inhibée par le Cibacron Blue, inhibiteur des GST. En revanche, la synthèse de PGA<sub>2</sub>, PGB<sub>2</sub> n'est pas modifiée par l'acide salicylique et l'indométhacine, tous deux inhibiteurs des cyclooxygénases. Ceci tend donc à prouver que les cyclooxygénases ne sont pas impliquées dans la synthèse de certaines PG, alors que les GST ont un rôle dans la synthèse des prostaglandines chez l'algue rouge *C. crispus*. Ces résultats sont à prendre avec précautions car ils ont été obtenus à partir d'un extrait protéique total et non sur des GST pures.

### 1.3 L'accès à des bases de données

Au sein du Service Informatique et Génomique (SIG) de la Station Biologique de Roscoff, Erwan Corre a mis en place une plateforme d'accès à différentes banques de séquences privées de macroalgues et de microalgues. Ainsi, il est possible d'effectuer des recherches par blast sur des banques d'EST d'algues rouges *Chondrus crispus*, *Porphyra yesoensis*, *Cyanidioschyzon*, *Gracilaria gracilis*, *Gracilaria changii*, *Gracilaria lemaneiformis*, d'algues brunes *Laminaria digitata*, *Laminaria japonica*, *Fucus distichus*, *Fucus serratus*, *Fucus vesiculosus*, *Sargassum binderi*, *Fragilariopsis cylindrus*, *Phaeodactylum tricornutum*, et d'algues vertes *Ostreococcus tauri* et *Ulva linza*.

## 2. Le Projet de thèse

---

Chez les algues brunes, l'activité enzymatique de GST a été enregistrée chez des algues stressées, mais les gènes et les protéines n'ont jamais été caractérisés. L'objectif de mon travail de thèse était donc de réaliser une caractérisation fonctionnelle des GST d'algues brunes pour élucider leurs rôles dans la réponse aux stress.

C'est en parallèle de l'étude des GST de *C. crispus* que j'ai commencé celle des 4 GST de *L. digitata* au cours de mon stage de Master 2. Puis au cours des 3 années de doctorat, j'ai profité de l'émergence d'*E. siliculosus* comme modèle biologique pour accéder aux différentes ressources génomiques, et j'ai enrichi mon étude par l'analyse exhaustive de la famille des GST dans l'espèce modèle. Ma démarche expérimentale a été guidée par les questions suivantes:

### 2.1 Quelle est l'importance du métabolisme du glutathion chez *E. siliculosus* ?

Cette question est la seule pour laquelle *L. digitata* n'a pas été considérée, pour des raisons essentiellement techniques. J'ai en effet réalisé un inventaire exhaustif des gènes impliqués dans le métabolisme du glutathion présent dans le génome d'*Ectocarpus*. Ceci a servi pour l'annotation du génome. J'ai ensuite évalué les teneurs en glutathion dans l'algue et analysé l'impact de stress sur ce métabolisme.

### 2.2 Quelle est la classification des GST d'algues brune ?

L'analyse des banques d'EST de stress de *L. digitata* et *C. crispus* avait suggéré un lien entre les GST cytosoliques d'algues et les GST de la classe Sigma. Cependant, ce résultat n'était soutenu que par des résultats de Blast. Une première analyse phylogénétique a été entreprise par Cécile Hervé à la fin de son doctorat et avait confirmé le lien entre les GST d'algues et d'animaux. Le regroupement des GST d'algues brunes et rouges au sein d'un même cluster avait alors soulevé l'hypothèse d'une classe spécifique des algues. Pour déterminer si les GST cytosoliques appartenaient vraiment à la classe Sigma comme le suggérait l'analyse des séquences identifiées dans les banques d'EST, ou formait une nouvelle classe spécifique des macroalgues marines, j'ai réalisé un inventaire complet des GST au sein des différentes ressources d'algues brunes et je les ai replacées dans un contexte phylogénétique.

De même, j'ai réalisé une étude phylogénétique pour positionner les GST microsomaux d'algues parmi les familles préalablement caractérisées.

### 2.3 Comment les gènes de GST ont-ils évolué au sein du génome d'*E. siliculosus* ?

En réalisant l'inventaire exhaustif des GST dans un génome d'algue, j'ai pu établir les relations entre les gènes paralogues, et par des analyses relativement simples, j'ai pu décrypter des mécanismes évolutifs permettant d'expliquer l'organisation de la famille multigénique des GST chez *E. siliculosus*. Pour cela, je me suis attaché à caractériser les structures des gènes, et dans la mesure du possible, leur localisation dans le génome. J'ai également entrepris la modélisation tridimensionnelle des enzymes pour identifier les principales divergences au niveau des séquences primaires qui pourraient expliquer une potentielle diversification fonctionnelle.

### 2.4 Quels traitements des algues modifient l'expression des gènes de GST?

Souhaitant élucider la fonction des GST, j'ai caractérisé les profils d'expression d'un certain nombre de gènes en réponse à des traitements exogènes pour identifier des conditions qui influencent la transcription des gènes de GST. En faisant la corrélation entre l'expression de gènes et l'effet physiologique des traitements sur les algues, j'ai pu identifier des conditions susceptibles de recruter la fonction des GST.

### 2.5 Quels sont les substrats des GST d'algues brunes et rouges ?

L'étude d'une famille multigénique serait incomplète sans la caractérisation biochimique des protéines correspondantes. J'ai donc entrepris l'expression hétérologue et la purification d'un certain nombre de GST d'*Ectocarpus* et de *Laminaria*. J'ai alors testé leurs activités sur plusieurs substrats. J'ai de plus entrepris l'analyse de l'activité PG synthase des GST de *C. crispus*.

Les résultats de mes travaux sont par conséquent séparés en trois axes. Le premier fait référence au métabolisme du glutathion chez *E. siliculosus* et comprend une partie d'annotation et de physiologie. Le deuxième axe présente essentiellement des travaux d'analyse *in silico* des GST de *L. digitata* et *E. siliculosus*, en décrivant les différentes familles

et leur évolution. Le troisième axe décrypte l'analyse fonctionnelle des GST chez les algues par des approches de biologie moléculaire et de biochimie.

Tous les résultats obtenus sur les GST de *C. crispus* et *L. digitata* sont rassemblés dans l'article:

**"New members of the glutathione transferase family discovered in red and brown algae"**.

Cécile Hervé, Pierre-Olivier de Franco, Agnès Groisillier, Thierry Tonon, Catherine Boyen.  
*Biochemical Journal* (2008) 412, 535-544.

Les résultats obtenus chez *E. siliculosus* sont présentés dans l'article :

**"Whole genome survey of the glutathione transferase family in the brown algal model *Ectocarpus siliculosus*"**.

Pierre-Olivier de Franco, Sylvie Rousvoal, Thierry Tonon, Catherine Boyen.  
*Marine Genomics* (2009) 1, 135-148.

De plus, les ARN extraits des algues traitées ont été utilisés pour l'établissement de gènes de référence dans les analyses de PCR quantitative, publié dans:

**"Normalization genes for expression analyses in the brown algal model *Ectocarpus siliculosus*"**.

Aude Le Bail, Simon Dittami, Pierre-Olivier de Franco, Sylvie Rousvoal, J. Mark Cock, Thierry, Tonon, Bénédicte Charrier.  
*BMC Molecular Biology* 2008, 9:75.

Ces différents articles sont présentés dans la partie Annexes de ce manuscrit.

**MATERIELS**  
**ET**  
**METHODES**

## 1. Matériel biologique

---

### 1.1 Laminaria digitata

Le cycle de vie complet de *L. digitata* n'est pas réalisé au laboratoire en raison de l'impossibilité d'obtenir des sporophytes fertiles, c'est-à-dire portant des sporanges (sores). Les parties du sporophyte, portant les sores contenant les méiospores sont donc prélevées dans le milieu naturel (site de l'île de Sieck et Bloscon). La phase de vie gamétophytique est réalisée dans un cristalliseur.

Les jeunes sporophytes de *L. digitata* sont cultivés dans une chambre climatisée à 13 °C avec une photopériode de 10 heures de lumière et 14 heures d'obscurité, sous un flux lumineux de 20  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{sec}$ . La phase sporophytique du cycle de vie de l'algue est réalisée dans des ballons de 10 L remplis d'eau de mer filtrée à 0,2  $\mu\text{m}$ , autoclavée, puis enrichie en milieu Provasoli (10 mL/L) (Starr and Zeikus, 1993) avec un bullage permanent qui permet à la fois l'oxygénation de l'eau et d'éviter la sédimentation des algues.

La taille du génome diploïde de *L. digitata* est de 1280 Megabases soit 1,40 picogrammes (Legall et al., 1993).

### 1.2 Ectocarpus siliculosus

Le souche d'*E. siliculosus* (Dillwyn) Lyngbye (1819), numéro "32" (Culture Collection of Algae and Protozoa, CCAP 1310/04, origine San Juan de Marcona, Pérou) est cultivée au laboratoire. Le cycle de vie complet de l'algue est réalisé au laboratoire. Les sporophytes et les gamétophytes sont cultivés la plupart du temps en mélange dans des bidons de 10 L remplis d'eau de mer filtrée à 0,2  $\mu\text{m}$  et autoclavée. L'eau de mer est enrichie en éléments nutritifs par l'ajout de milieu Provasoli (10 mL/L). L'oxygénation des cultures est assurée par un flux d'air qui permet également une agitation de la culture, empêchant ainsi sa sédimentation. Le milieu de culture est renouvelé toutes les semaines. Les cultures sont maintenues à une température constante de 13 °C avec une photopériode de 10 heures de lumière et 14 heures d'obscurité. Les variations de température affectent significativement la croissance de ces algues. En effet, des cultures ont été maintenues durant l'été 2007 dans une salle non climatisée, et les variations de température ont été telles (de 13 à 25°C) que beaucoup de biomasse a été perdue à cause d'un taux élevé de mort cellulaire.

La taille du génome diploïde d'*Ectocarpus siliculosus* est de 200 Megabases soit 0,219 picogrammes (Peters et al., 2004a).

La souche d'eau douce numéro "371" (CCAP 1310/196) est également cultivée au laboratoire dans un milieu à 5 % d'eau de mer enrichie en milieu Provasoli.

## **2. Traitements exogènes des sporophytes de *Laminaria digitata* et d'*Ectocarpus siliculosus***

---

### **2.1 Composés chimiques**

La liste des composés chimiques et leurs concentrations finales lors des traitements sont données dans le Tableau 6. Tous les produits sont dilués dans l'eau de mer, à l'exception de l'atrazine qui est diluée dans l'éthanol et des oxylipines qui sont diluées dans le DMSO.

### **2.2 Traitements**

Pour toutes les expériences, de jeunes sporophytes de *L. digitata* (100 mg  $\pm$  10mg) ont été utilisés. Les crampons à l'extrémité du stipe sont sectionnés avant les expériences de traitements ; l'algue ainsi amputée est isolée 2 jours dans une boîte de pétri contenant 5 mL d'eau de mer avant de réaliser les expériences.

Les traitements d'*E. siliculosus* sont effectués sur 150  $\pm$  10 mg de masse fraîche. Cette dernière est constituée d'un mélange de sporophytes et de gamétophytes que l'on ne peut pas différencier à l'œil nu. Les algues sont très légèrement séchées sur un papier absorbant avant d'être pesées, puis elles sont réparties dans des boîtes de pétri contenant 40 mL d'eau de mer pendant au moins 18 heures avant les élicitations.

Pour les expériences de mesure de l'activité GST totale sur extraits bruts et de dosage de glutathion, un gramme d'algue a été élicité pour chaque condition. Les élicitations débutent par l'ajout du composé dans l'eau de culture. Les algues sont ensuite collectées au bout de 3h ou 6h puis séchées sur un papier absorbant et immédiatement congelées dans l'azote liquide. Chaque expérience fait intervenir au moins trois réplicats biologiques.

Tableau 6: Concentration des produits utilisés pour les traitements exogènes.

		Concentration stock	Concentration finale
<i>Laminaria digitata</i>	Eau de mer	100 %	100 %
	DMSO	100 %	0,01 %
	Oligoguluronates	15 mg/mL	150 µg/mL
	CuSO <sub>4</sub>	10 mM	100 µM
	MeJA	10 mM	100 µM
	15-HETE	2,5 mM	25 µM
<i>Ectocarpus siliculosus</i>	Eau de mer	100 %	100 %
	Ethanol	100 %	0,2 %
	DMSO	100 %	0,25 %
	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	4 M	10 mM
	NaN <sub>3</sub>	5,4 g/L	54 mg/L
	Diuron	42 mg/L	42 µg/L
	Atrazine	25 mg/L	55 µg/L
	Glyphosate	40 mM	1 mM
	Round Up® Biovert 360	100 mM	1 mM
	CdCl <sub>2</sub>	4 mM	10 µM
	ZnSO <sub>4</sub>	4 mM	10 µM
	CuSO <sub>4</sub>	4 mM	10 µM
	Fuel lourd <sup>1</sup>	-	0,1 %
	Essence sans plomb 95 <sup>2</sup>	100 %	0,1 %
	MeJA	40 mM	100 µM
	13-HpOTrE	1 mM	5 µM
	15-HEPE	1 mM	5 µM
15-HETE	1 mM	5 µM	
Blessure	Altérations du thalle avec un scalpel		

<sup>1</sup>Ce composé a été préparé à partir d'une galette de pétrole de 15 g issue du naufrage du MSC Napoli et récupérée sur une plage de Carantec en 2007. La masse visqueuse a été incubée dans 40 mL d'eau de mer à 37°C sous agitation pendant 72h. La phase aqueuse a été récupérée et constitue le stock.

<sup>2</sup>L'essence provient du réservoir du zodiac de la station biologique.

### 3. Tests physiologiques

#### 3.1 Mesure du burst oxydatif

La production du peroxyde d'hydrogène chez *L. digitata* induite par les différents éliciteurs est mesurée en utilisant un luminomètre (Berthold, Lumat LB 9507, EG&G Berthold, Evry, France). Cet appareil est doté de deux injecteurs reliés aux solutions de réactifs, que sont le luminol (injection de 50  $\mu\text{l}$  à 0,3 mM) et la Horseraddish peroxydase (injection de 100  $\mu\text{L}$  à 20  $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$  dans 10 mM de tampon phosphate pH 7,8). L'intensité de la luminescence, issue de l'oxydation du luminol par  $\text{H}_2\text{O}_2$  en présence de peroxydase, est mesurée sur des aliquots de 50  $\mu\text{L}$  du milieu d'élicitation. Une gamme étalon d' $\text{H}_2\text{O}_2$  est réalisée et permet de déduire la quantité de peroxyde d'hydrogène produite par l'algue lors de l'élicitation.

#### 3.2 Dosage du glutathion

Le principe de ce dosage est une méthode enzymo-colorimétrique catalysée par la glutathion réductase.

Le groupe sulfhydryle (-SH) du glutathion réduit réagit spontanément avec le DTNB (acide 5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzoïque) et forme un composé jaune, l'acide 5-thio-2-nitrobenzoïque (TNB). Le pont disulfure formé entre le GSH et le TNB est réduit par la glutathion réductase, recyclant ainsi le GSH et produisant d'autant plus de TNB (réaction 1, Figure 41). Le taux de production du TNB est directement proportionnel à la réaction de recyclage, elle-même directement proportionnelle à la quantité de GSH présente dans l'échantillon.

Le GSSG présent dans l'échantillon est réduit en GSH par la glutathion réductase (réaction 2, Figure 1). Cette méthode ne permet donc pas de discriminer les deux formes chimiques du glutathion et c'est le pool de glutathion total qui est ainsi mesuré.

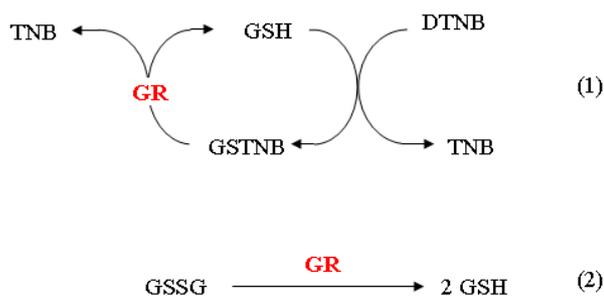


Figure 41. Principe enzymo-colorimétrique du dosage du glutathion.

Les échantillons d'algues congelées sont broyées dans l'azote liquide à l'aide d'un mortier et d'un pilon. La fine poudre obtenue est pesée puis reprise dans 5% (m/v) d'acide sulfosalicylique. Cette étape permet de déprotéiniser l'échantillon. L'extrait est ensuite vortexé et centrifugé 15 min à 5000 g et 4 °C. Le surnageant est collecté et neutralisé avec 1,5 volume de tampon phosphate 500 mM pH 7,5. A ce stade, l'échantillon peut être congelé à -20°C et conservé plusieurs semaines.

La mesure du glutathion est réalisée en incubant, à 37°C, 100 µL de surnageant neutralisé avec 900 µL de mélange réactionnel contenant 100 mM de tampon phosphate pH 7,5, 0,15 mM de NADPH, 60 µM de DTNB dissout dans du DMSO, et 0,66 unité de glutathion réductase. Au bout d'une heure, l'absorbance à 412 nm est mesurée. La valeur obtenue est comparée avec celles obtenues à partir d'une gamme étalon de glutathion réalisée dans les mêmes conditions.

Le calcul permet d'obtenir des valeurs de concentration en glutathion total (GSH et GSSG) exprimées en nanomoles de GSH par gramme de masse fraîche.

## 4. Analyses de biologie moléculaire

---

### 4.1 Oligonucléotides

Les oligonucléotides ont été dessinés à l'aide des logiciels Primer Express et Beacon Designer 5.0 (Premier Biosoft International, USA). Ils sont reportés dans le Tableau 11.

### 4.2 Extraction des acides nucléiques

#### 4.2.1 Extraction des ARN totaux

Pour l'extraction de l'ARN total, un protocole en tubes Eppendorf, adapté pour des quantités inférieures ou égales à 150 mg de masse fraîche d'algue, a été utilisé (Hervé et al., 2006). Les tissus congelés sont broyés en une fine poudre dans l'azote liquide puis repris dans un tampon d'extraction contenant 100 mM Tris-HCl pH7,5, 2 % CTAB, 1,5 M NaCl, 50 mM EDTA, 50 mM DTT à raison de 9 mL/g de masse fraîche. Les ARN sont extraits par séparation de phase en présence de chloroforme, incluant une étape de précipitation des polysaccharides à l'éthanol, puis la phase aqueuse est collectée avant précipitation spécifique des ARN au chlorure de lithium. Les échantillons sont traités à la DNase I selon les instructions du fournisseur (Stratagene, Qiagen, Ambion), afin d'éliminer toute contamination

résiduelle par de l'ADN génomique. Les ARN sont ensuite extraits par deux étapes de phénol-chloroforme et une dernière étape de chloroforme avant d'être précipités par 2,5 volumes d'éthanol 100 % en présence de 0,1 volume d'acétate de sodium 3M.

#### 4.2.2 Extraction de l'ADN génomique d'*E. siliculosus*

Elle a été réalisée en utilisant un protocole de centrifugation sur gradient de chlorure de césium. Pour *L. digitata* comme pour *E. siliculosus*, cette étape a été réalisée par Sylvie Rousvoal.

#### 4.2.3 Southern blot

L'ADN génomique (8 µg) des sporophytes de *L. digitata* a été digéré par plusieurs enzymes de restriction, utilisées en simple (*EcoRI*, *HindIII*, *SalI* et *XhoI*) ou double digestion (*EcoRI* / *HindIII*, *SalI* / *XhoI*), puis séparé par électrophorèse sur gel d'agarose à 0,8 %. L'ADN présent dans le gel est dénaturé pendant 25 min dans 0,25M HCl puis transféré sur une membrane de nylon Hybond N+ (Amersham Pharmacia Biotech) par la méthode de Southern (Southern, 1975) par 0,4M NaOH.

Une sonde de 945 pb pour *LdGST1* a été amplifiée en utilisant les amorces GST8\_1F et GST8\_1R. Une sonde de 618 pb pour *LdGST2* a été amplifiée en utilisant les amorces 5GST78 et 3GST78. Une sonde de 600 pb pour *LdGST3* a été amplifiée en utilisant les amorces 5GST54 et 3GST54. Une sonde de 596 pb pour *LdGST4* a été amplifiée en utilisant les amorces GST19\_1F et GST19\_1R. Les amplifications ont été réalisées en utilisant la banque de protoplastes comme matrice. Ces sondes spécifiques ont ensuite été marquées à la fluorescéine en utilisant le kit Gene Images Random Prime Labeling (Amersham-Biosciences). Le marquage des sondes a été vérifié par Dot blot. L'hybridation a été réalisée en conditions stringentes, sur la nuit à 60 °C. Les lavages ont également été réalisés à 60 °C avec un premier lavage de 15 min avec une solution de 1 × SSC (citrate de sodium), 0,1 % SDS (dodécyl sulfate de sodium), puis un second de 15 min avec une solution de 0,5 × SSC, 0,1 % SDS. La détection de la fluorescence émise a été réalisée en utilisant le kit Gene Images ECF Detection (Amersham-Biosciences) selon les instructions du fournisseur, et à l'aide du TYPHOON 8600 (Molecular Dynamics).

### 4.3 Analyses de l'expression des gènes

#### 4.3.1 Rétro-transcription

L'ARN total, extrait comme décrit précédemment, est quantifié en moyennant les résultats de trois dosages spectrophotométriques, puis est soumis à l'électrophorèse en gel d'agarose pour vérifier son intégrité et l'absence de contamination par de l'ADN génomique.

Deux microgrammes d'ARN totaux sont rétro-transcrits en ADNc simple brin en utilisant le kit Superscript II RT kit (Invitrogen) pour les ARN extraits de *L. digitata*, et 1,4 µg d'ARN totaux avec le kit ImProm-II Reverse Transcription System (Promega) pour les ARN extraits d'*E. siliculosus*, en suivant les instructions des fournisseurs. La qualité des ADNc est ensuite contrôlée par électrophorèse en gel d'agarose. Une PCR en utilisant des oligonucléotides s'hybridant dans un intron permet d'évaluer le niveau de contamination des ADNc par de l'ADN génomique. Les différents échantillons d'ADNc sont dilués à 1 ng/µL pour être analysés par PCR quantitative.

#### 4.3.2 PCR quantitative

Chaque échantillon biologique est analysé 2 fois par PCR quantitative. La quantité du gène d'intérêt présent dans un échantillon est déterminée grâce à une gamme étalon obtenue par dilution de l'ADN génomique. Connaissant la masse du génome des sporophytes de *L. digitata* (1,4 pg) et d'*E. siliculosus* (0,22 pg), et en considérant qu'il n'existe qu'une copie de gène par génome, il est possible de déterminer le nombre de transcrits pour un gène donné, en équivalents génome, présent dans chaque dilution.

Masse d'un génome (g) = nombre de paires de bases x masse d'une pb (g/mol) / Nb Avogadro (mol<sup>-1</sup>)

Masse d'une paire de base = 2 x 330 = 660 g/mol

Nb Avogadro = 6,02 10<sup>23</sup> mol<sup>-1</sup>

**Tableau 7: Gamme étalon d'ADN génomique considérée pour les expériences de PCRq chez *L. digitata*.**

Génome : 640 Mb

Quantité d'ADN génomique par puits (ng)	0,1	0,4	1,6	6,3	25
Nombre de copies (équivalents génome)	140	558	2232	8929	35714

**Tableau 8. Gamme étalon d'ADN génomique considérée pour les expériences de PCRq chez *E. siliculosus*.**

Génome : 200 Mb

Quantité d'ADNg par puits (ng)	13,3	2,2	0,36	0,06	0,01
Nombre de copies (équivalents génome)	121312	20067	3375	547	91

Le mélange réactionnel, 20  $\mu\text{L}$ , est composé de 8  $\mu\text{L}$  de matrice (ADNc à 1 ng/ $\mu\text{L}$ , ou gamme ADNg XX ng/ $\mu\text{L}$ ), 10  $\mu\text{L}$  de SYBR green (ABgene) et 1  $\mu\text{L}$  de chaque oligonucléotide (5  $\mu\text{M}$ ).

La réaction de PCR quantitative est réalisée dans un thermocycleur Chromo4 Detection System (BioRad). Le programme se compose d'une étape de 15 min à 95°C qui libère la polymérase de sa capsule protectrice et qui dénature l'ADN, puis de 40 cycles constitués par une étape de dénaturation de 15 sec à 95°C, suivie d'une étape d'hybridation - élongation de 60 sec à 60°C. Il est terminé par un gradient de température 65°C à 95°C avec un pas 0,3°C toutes les 30 sec qui permet de réaliser une courbe de dissociation.

#### 4.3.2.1 Gènes de référence

Les gènes de références utilisés chez *L. digitata* sont l'actine, la tubuline et la protéine ribosomale RPL36.

Chez *E. siliculosus*, les gènes de références choisis sont le facteur d'élongation 2 alpha (EsEF2a) et la tubuline alpha 2, conformément aux travaux publiés par Lebail et collaborateurs (Le Bail et al., 2008).

#### 4.3.2.2 Calculs

Le calcul des quantités de transcrits accumulées lors d'un traitement est basé sur une gamme étalon d'ADN génomique de quantité connue et sur deux étapes de normalisation.

La gamme étalon d'ADN génomique permet d'établir la relation unissant des quantités connues d'ADN et le nombre de cycles (Ct) de PCR nécessaire pour atteindre une valeur seuil de fluorescence. Ainsi, le nombre de cycles (Ct) de PCR nécessaire pour atteindre cette même valeur seuil dans un échantillon donné peut être corrélé à une quantité d'ADN.

Pour chaque échantillon, un couple d'oligonucléotides s'hybridant dans un intron permet d'évaluer la quantité d'ADN génomique. Cette quantité est retranchée aux valeurs obtenues pour chaque gène d'intérêt et de référence.

La normalisation des résultats s'effectue en deux temps. La première normalisation est le rapport au sein d'un échantillon entre la quantité de transcrits correspondant au gène d'intérêt et la quantité de transcrits correspondant au gène de référence.

$$r_{\text{échantillon}} = (\text{gène d'intérêt}) / (\text{gène de référence})$$

Cette étape de normalisation permet d'éliminer les variations techniques de l'expérience. En effet, les variations de volume lors du pipetage de l'échantillon influencent directement la quantité de matrice utilisée pour la PCR et modifient donc le nombre de cycles Ct et la quantité d'ADN déduite. Cependant, ces variations auront le même effet sur la quantité de matrice du gène de référence et du gène d'intérêt. Le rapport gène d'intérêt sur gène de référence reste donc constant entre les réplicats biologiques d'une condition expérimentale.

La deuxième étape de la normalisation s'effectue par rapport à une condition biologique contrôle.

$$R_{\text{gène d'intérêt}} = r_{\text{échantillon}} / r_{\text{contrôle}}$$

La valeur de première normalisation est rapportée à la moyenne des valeurs de première normalisation dans la condition contrôle. Ce rapport est exprimé en logarithme base 2 pour faciliter la représentation graphique des résultats.

#### 4.3.2.3 Analyses statistiques

Les différences significatives entre les traitements ont été déterminées par le test U non-paramétrique de Mann et Whitney en utilisant le logiciel Statistica 5.1 (Statsoft, Tulsa, US). Toutes les conclusions sont basées sur un seuil de significativité d'au moins 5% ( $p < 0,05$ ).

## 4.4 Séquençage

La réaction de séquence est réalisée dans le mélange réactionnel suivant : 0,5  $\mu\text{L}$  de Big Dye V3.0, 0,75  $\mu\text{L}$  de tampon, 1  $\mu\text{L}$  d'oligonucléotides à 5  $\mu\text{M}$ , et 100 ng d'ADN matrice (qsp 5 $\mu\text{L}$ ). La séquence est amplifiée lors du programme suivant : 2 min de dénaturation à 96°C, puis 50 cycles décomposés en une étape de dénaturation de 30 sec à 96 °C, une étape d'hybridation des amorces de 30 sec à une température variable selon le Tm de l'oligonucléotide, et une étape d'élongation de 4 min à 62 °C. Après amplification, les

réactions de séquences sont prises en charge par le service Genomer de la Station Biologique de Roscoff où elles sont purifiées et analysées dans un séquenceur à capillaires.

## 5. Analyse *in silico* des séquences

### 5.1 Identification de séquences de GST dans les bases de données

Les glutathion S-transférases ont été recherchées dans diverses bases de données publiques et internes. Un accès aux banques d'EST d'algues brunes *Laminaria digitata*, *Laminaria japonica* et *Fucus serratus*; d'algues rouges *Chondrus crispus*, *Gracilaria gracilis* et *Porphyra yezoensis*; et pour les diatomées *Phaeodactylum tricornutum* et *Fragilariopsis cylindrus*, a été mis en place à la Station Biologique de Roscoff par le Dr. Erwan Corre à l'adresse suivante [http://www.sb-roscoff.fr/SIG/blast/blast\\_private.html](http://www.sb-roscoff.fr/SIG/blast/blast_private.html). Des séquences correspondantes à des GST chez l'algue rouge *Gracilaria tenuistipitata* ont été récupérées à partir du site web <http://gracilaria.ib.usp.br/mirror/gracilaria/services/blast/blast.cgi>.

### 5.2 Annotation du génome d'*Ectocarpus siliculosus*

Les gènes d'*E. siliculosus* ont été annotés à partir du site web BOGAS (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/bogas/>), en utilisant les données disponibles dans les banques d'EST, puis dans les différentes versions (3X, 7X, 10X) du génome mises à disposition au fur et à mesure du séquençage.

L'annotation des gènes codant pour des protéines liées au métabolisme du glutathion m'a été confiée et a été réalisée selon le protocole suivant (Figure 42).

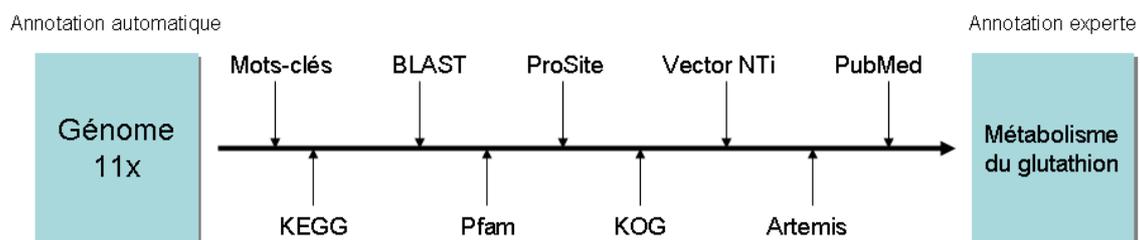


Figure 42: Stratégie employée pour annoter manuellement les gènes impliqués dans le métabolisme du glutathion chez l'algue brune d'*E. siliculosus*.

Une liste des acteurs de ce métabolisme a été dressée à partir de la base de données KEGG. Chaque gène a ensuite été recherché dans le génome d'*Ectocarpus* par BLAST à partir d'un panel d'homologues identifiés chez différentes espèces. Ainsi, des séquences de mammifères (*H. sapiens*, *M. musculus*), d'insectes (*D. melanogaster*, *A. gambiae*), de bactéries (*E. coli*), de levure (*S. cerevisiae*), et de plantes (*A. thaliana*, *O. sativa*, *Z. mays*), codant pour tous les gènes du métabolisme du glutathion, ont servi de requête pour l'analyse par Blast.

Pour l'identification des GST, des protéines appartenant à chacune des familles de GST ont été utilisées comme requête. En parallèle, une recherche avec les mot-clés "glutathione", "transferase", "GST", "GSH", "GSSG" a également été conduite afin d'obtenir une liste la plus exhaustive possible. Les gènes d'*E. siliculosus* ainsi identifiés ont ensuite été eux-mêmes comparés aux séquences présentes dans la banque Swiss-Prot. Lorsque les résultats semblaient concluants (présence de motif conservés, identité de séquence forte, homogénéité des résultats), ces gènes ont servis eux-mêmes de requêtes pour une analyse blast sur les ressources génomiques d'*Ectocarpus*.

L'annotation a été complétée par la nomenclature du gène (système à 3 lettres), suivie d'une description fonctionnelle obtenue à partir de publications, du numéro EC et du numéro KOG. Pour l'annotation des GST, un commentaire concernant la multigénicité a été ajouté, permettant ainsi de retrouver les différents paralogues. Les gènes de glutathion S-transférases faisant l'objet d'une étude approfondie, leur structure a été établie en comparant les séquences génomiques et les séquences ADNc. Lorsque la structure n'avait pas été correctement établie lors de la prédiction automatique des séquences codantes, elle a été modifiée en utilisant le logiciel Artemis.

**Tableau 9. Outils informatiques utilisés pour réaliser l'annotation des gènes potentiellement impliqués dans le métabolisme du glutathion chez d'*E. siliculosus*.**

Utilisation	Outil	Site Web
Annotation	BOGAS	<a href="http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/bogas/">http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/bogas/</a>
	KEGG	<a href="http://www.genome.jp/kegg/kegg2.html">http://www.genome.jp/kegg/kegg2.html</a>
Recherche d'homologies	BLAST	<a href="http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a> <a href="http://www.expasy.org/tools/blast/">http://www.expasy.org/tools/blast/</a>
Description	Pubmed	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=PubMed">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=PubMed</a>
Nomenclature		<a href="http://www.chlamy.org/nomenclature.html">http://www.chlamy.org/nomenclature.html</a>
Numéro EC		<a href="http://www.expasy.ch/enzyme/">http://www.expasy.ch/enzyme/</a>

KOG		<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/COG/grace/kognitor.html">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/COG/grace/kognitor.html</a>
Peptides signaux	SignalP	<a href="http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/">http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/</a>
Structure génique	Artemis	<a href="http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/bogas/">http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/bogas/</a>
Traduction		<a href="http://www.expasy.org/tools/dna.html">http://www.expasy.org/tools/dna.html</a>

### 5.3 Gestion et analyse des séquences

#### 5.3.1 Vector NTi®

Vector NTI® est une suite logicielle développée par Invitrogen (USA) intégrant des outils d'analyse moléculaire et de gestion des séquences. Le logiciel centralise une base de données (site de restriction, plasmides etc.) et cinq modules d'application : Vector NTI, AlignX, BioAnnotator, ContigExpress et GenomBench (Lu and Moriyama, 2004). Vector NTi® permet donc de gérer et d'éditer de nombreuses séquences nucléiques et protéiques. Il peut également afficher les sites de restrictions, créer des séquences complémentaires, réaliser des traductions. AlignX a été utilisé pour réaliser rapidement des alignements multiples. L'application GenomBench et l'algorithme Sim4 ont été utilisés particulièrement pour localiser des EST sur des séquences génomiques et permettre ainsi de déduire la structure exon/intron de nombreux gènes. Toutes les séquences utilisées au cours de cette thèse ont été acquises et gérées par ce logiciel, l'archivage et la disponibilité (format Fasta) en ayant été grandement facilités.

### 5.4 Phylogénie

Des membres représentatifs de chaque classe de GST ont été sélectionnés à partir des bases de données publiques et privées. Les séquences, dont les numéros d'accession sont indiqués dans les Tableau 12 et Tableau 13, ont été utilisés pour générer des alignements par ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/>). Les analyses phylogénétiques en Neighbor Joining, UPGMA, Minimum Evolution et Maximum Parsimony ont été réalisées à l'aide du logiciel MEGA 4 (Tamura et al., 2007). L'analyse en Maximum de Vraisemblance a été réalisée en utilisant la suite de programmes disponible à l'adresse <http://www.phylogeny.fr/> (dereeper, 2008). Pour les méthodes de distances, l'arbre consensus a été obtenu en utilisant 500 valeurs de bootstraps, une matrice de substitution PAM, et le mode *complete deletion*.

## 5.5 Modélisation des structures tridimensionnelles

Un alignement structural des GST Sigma de rat (RnPGDS, PDB: 1PD2) (Kanaoka 1997), GST Sigma de calamar (PDB:1GSQ) (Ji, 1995), GST Pi de *Onchocerca volvulus* (PDB:1TU7) (Perbandt, 2005), GST de *Plasmodium falciparum* (PDB:2AAW) (Hiller, 2005) et de GST Alpha humaine (PDB:1GUH) (Sinning, 1993), a été réalisé en utilisant le programme SPDBviewer. L'alignement a ensuite été complété avec les séquences de GST d'algues en utilisant le programme ClustalW et retravaillé à la main sous BioEdit (Hall, 1999) pour conserver la topologie initiale de l'alignement structural. Les résultats obtenus ont été édités avec le programme ESPript 2.2 (Gouet et al., 1999), disponible en ligne à l'adresse : <http://espript.ibcp.fr/ESPript/cgi-bin/ESPript.cgi>, pour faire apparaître les éléments de structure secondaire.

Les modèles de structure des protéines EsGST6 et EsGST12 ont été prédits en utilisant le programme SwissModel (Arnold et al., 2006), accessible en ligne à l'adresse <http://swissmodel.expasy.org/>, et en utilisant le mode "Alignment" à partir de l'alignement structural réduit aux protéines 1PD2 et EsGST6 ou EsGST12.

Les structures tridimensionnelles ont ensuite été éditées dans PyMOL (Delano Scientific).

## 6. Analyses biochimiques

---

### 6.1 Analyses des protéines

#### 6.1.1 Extraction

Pour l'extraction des protéines totales d'algues brunes, les tissus congelés sont broyés en une fine poudre dans l'azote liquide et repris dans un tampon d'extraction 25 mM MOPS pH 7,2, 15 mM MgCl<sub>2</sub>, 15 mM EGTA, 1 mM DTT, 0,5 % PVP, additionné d'un cocktail d'inhibiteur de protéases (Complete, Roche). L'extrait est homogénéisé par agitation pendant 1 h à 4 °C, puis centrifugé 30 min à 10 000 g et à 4°C. Le surnageant récupéré constitue l'extrait protéique soluble total.

#### 6.1.2 Dosage des protéines

La concentration finale en protéines dans l'extrait est déterminée selon la méthode de Bradford (Bradford, 1976) en utilisant une gamme étalon de sérum albumine bovine (1,25 à 20 µg/mL).

### 6.1.3 Mesure de l'activité GST dans l'extrait protéique total d'algue

L'activité transférase des GST contenues dans l'extrait protéique est mesurée par spectrophotométrie à 340 nm dans un mélange réactionnel de 250 µL contenant 90 µL d'extrait protéique total (environ 10 µg), 150 µL de tampon phosphate 120 mM pH 7,5, 5µL de GSH 50 mM et 5µL de CDNB 50 mM. L'activité est mesurée toutes les 20 sec pendant 10 min. La conjugaison spontanée du GSH et du CDNB est mesurée sur l'extrait bouilli 10 min, et les valeurs sont soustraites aux activités mesurées.

## 6.2 Expression hétérologue et caractérisation des GST recombinantes

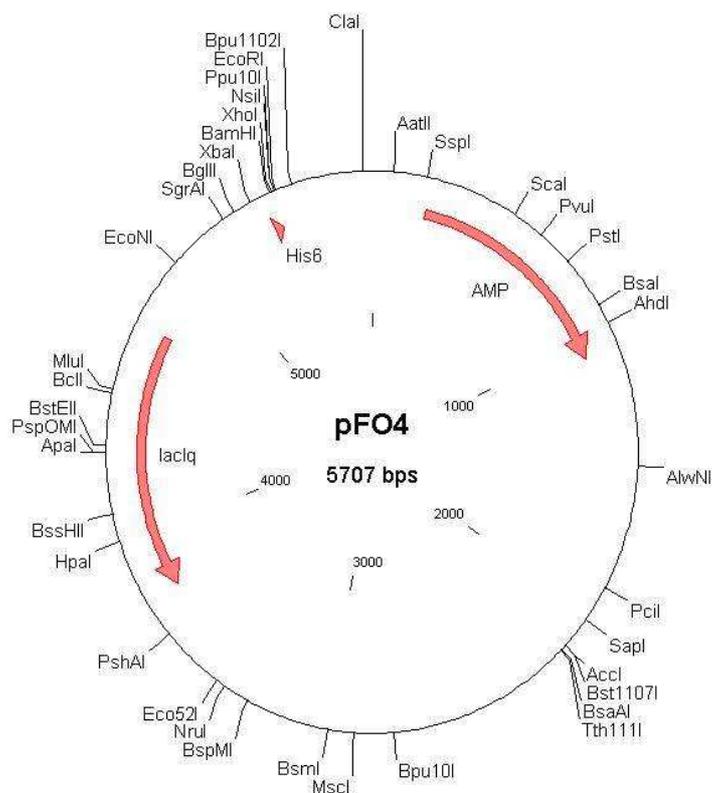
La production de protéines recombinantes se fait en deux étapes : une première étape de clonage du gène d'intérêt en système hétérologue, puis une deuxième étape d'extraction et de purification de la protéine d'intérêt.

Pour les GST cytosoliques, la souche d'*Escherichai coli* BL21(DE3) a été considérée, après insertion des gènes d'algues dans le vecteur pFO4, permettant ainsi la production de protéines recombinées avec une étiquette composée de six histidines. Par contre, pour les GST microsomales, nous avons utilisé un système basé sur le vecteur pYES2 et la souche de *Saccharomyces cerevisiae* INVSC1 commercialisé par Invitrogen.

### 6.2.1 Expression hétérologue chez *Escherichia coli*

Le clonage et l'expression hétérologue des GST cytosoliques de *L. digitata* et d'*E. siliculosus* ont été réalisés dans le cadre du programme « Marine Express », financé par le réseau d'excellence « Marine Genomics Europe ». Les séquences codantes *LdGST1*, *LdGST2*, *LdGST3*, *LdGST4*, *EsGST1*, *EsGST2*, *EsGST3*, *EsGST4*, *EsGST9* et *EsGST14* ont été amplifiées à partir d'EST, d'ADNc ou d'ADNg en utilisant des amorces contenant les sites de restriction *Bam*HI/*Eco*RI ou *Bgl*II/*Eco*RI (Tableau 11).

Ces amorces possèdent toutes la même température d'hybridation (70°C). Les conditions d'amplification par PCR se décomposent en une dénaturation initiale de 5 min à 94°C, suivie de 30 cycles de 30 sec à 94°C, 30 sec à 70°C et 6 min à 72°C, puis une étape finale d'élongation de 10 min à 72°C. Les fragments de PCR résultants sont ensuite purifiés, digérés par les enzymes appropriées, et clonés dans le vecteur d'expression pFO4. Il est dérivé du vecteur pET15 (Novagen) et contient une séquence codant une étiquette histidine en N-terminal. (Figure 43). Après clonage, tous les plasmides recombinants obtenus ont été séquencés pour vérifier l'intégrité de la séquence d'intérêt.



**Figure 43. Carte du vecteur d'expression pFO4.**

Les plasmides recombinants sont utilisés pour transformer une souche BL21(DE3) d'*Escherichia coli*. Les colonies transformées sont cultivées dans 2 mL de milieu Luria-Bertani contenant de l'ampicilline (100 µg/ml), sous agitation à 37 °C. La culture est ensuite diluée dans le milieu auto-inductif ZYP (Studier, 2005), contenant de l'ampicilline (100 µg/mL), puis remise à incuber à 20°C sous agitation, jusqu'au début de la phase stationnaire de croissance (densité optique stable).

### 6.2.2 Extraction des protéines

Les bactéries contenant la protéine recombinante sont récoltées par centrifugation 10 min à 5000 g. Le culot bactérien issu de 200 mL de culture est repris dans 40 mL de tampon Tris-HCl pH7,5, 300 mM NaCl, 60 mM imidazole (Tampon A) additionné d'un cocktail d'antiprotéases. Les cellules sont lysées mécaniquement par une presse de French à 1500 PSI (100 bars). La fraction insoluble est culottée par centrifugation à 20000 g pendant 90 min à 4°C. Le surnageant est collecté pour être passé sur colonne de chromatographie.

### **6.2.3 Purification par chromatographie sur colonne de nickel**

La purification est réalisée sur un système ÄKTA-FPLC (Amersham-Biosciences). Le surnageant est déposé sur une colonne de sépharose (IMAC Hypercell) (10 mL) préalablement chargée avec 100 mM NiSO<sub>4</sub> et équilibrée dans du tampon A, selon les instructions du fournisseur. La fraction non retenue sur la colonne est collectée.

Après un premier lavage au tampon A, l'élution est effectuée à raison de 1 mL/min, et selon un gradient linéaire de 60 mM à 500 mM imidazole, en utilisant un mélange progressif de tampon A et de tampon B (20 mM Tris-HCl pH7,5, 300 mM NaCl, 500 mM imidazole).

Afin d'augmenter le degré de pureté des protéines purifiées par chromatographie d'affinité, une deuxième dimension chromatographique peut être réalisée (chromatographie d'exclusion de taille ou d'échange d'ions (chapitres 6.2.8 et 6.2.9).

### **6.2.4 Analyse de la purification par gel SDS-PAGE**

A chaque étape de la purification (lyse par presse de French, lavages, élution) une fraction est collectée et déposée sur un gel dénaturant SDS-PAGE 12 %. La présence des protéines est ensuite révélée par coloration au bleu de Coomassie.

### **6.2.5 Dialyse**

L'analyse du chromatogramme et du gel de purification permettent de déterminer quelles sont les fractions d'élution qui contiennent la protéine purifiée. Ces fractions sont rassemblées, puis dialysées 18 heures à 4°C contre un tampon contenant 20 mM Tris-HCl pH7,5, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, et 1 mM DTT.

### **6.2.6 Conservation des protéines**

La protéine purifiée est finalement aliquotée et stockée à -80°C en présence de 10% de glycérol.

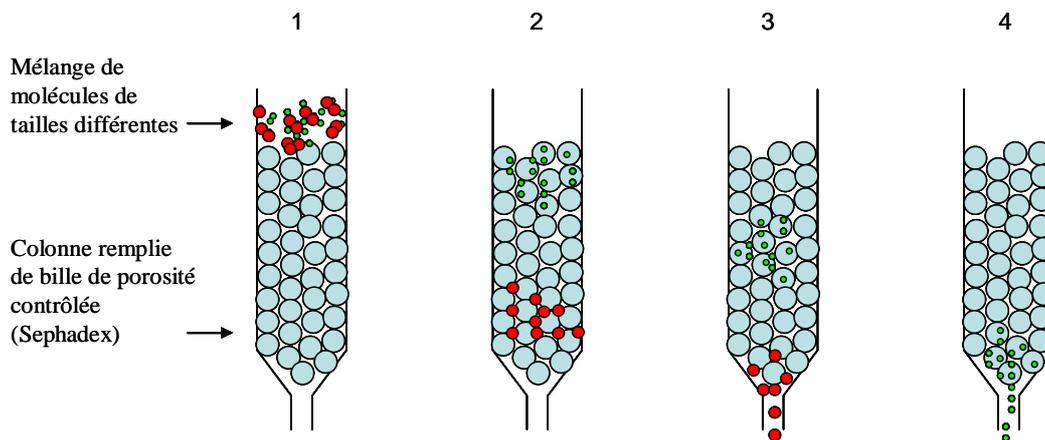
### **6.2.7 Concentration des protéines**

Si nécessaire, un grand volume de protéines éluées peut être concentré en utilisant une cellule AMICON et une membrane filtrant les molécules dont le poids moléculaire est inférieur à 3000 Da.

La membrane est humidifiée dans l'eau puis dans le tampon des protéines. Le système est ensuite fermé et une pression de 1 bar imposée par un flux d'azote permet d'effectuer la filtration.

### 6.2.8 Chromatographie d'exclusion de taille

La chromatographie d'exclusion, aussi appelée filtration sur gel, permet de séparer les molécules selon leur taille ou leur volume (Figure 44). En fonction de leur taille et de leur forme, les molécules pénètrent ou pas dans les billes, et sont éluées dans l'ordre des masses décroissantes.



**Figure 44. Principe de la chromatographie d'exclusion de taille.**

- 1: Dépôt d'un mélange de deux molécules (des grosses rouges et des petites vertes) sur une colonne remplie d'un gel de Sephadex.
- 2: Les petites molécules peuvent pénétrer dans les billes de Sephadex car leur diamètre est inférieur à celui des pores du gel. Les grosses molécules ne le peuvent pas en raison de leur grande taille; elles sont donc exclues du gel (d'où le nom de chromatographie d'exclusion).
- 3: Les grosses molécules ont donc un trajet plus court à parcourir pour arriver en bas de la colonne; elles sont donc éluées les premières.
- 4: Les petites molécules sont éluées ensuite car elles ont une plus grande distance à parcourir pour arriver en bas de la colonne.

La colonne utilisée est une Superdex HR 200 préparative (120 mL). Elle est tout d'abord lavée avec 1 volume de tampon 20 mM Tris-HCl pH 7,5 à raison de 1 mL/min, puis équilibrée avec 2 volumes de tampon 50 mM Tris-HCl pH7,5, 100 mM NaCl. Les échantillons sont injectés puis élués à raison de 0,5 mL/min au cours d'un programme d'éluion de 90.

La masse moléculaire apparente de la protéine recombinante purifiée peut également être évaluée en utilisant des protéines de taille connue. Les masse moléculaires des standards utilisés pour la calibration sont : l'anhydrase carbonique (29 kDa), la sérum albumine bovine

(66 kDa), l'alcool deshydrogénase (150 kDa), la  $\beta$ -amylase (200 kDa), l'apoferritine (443 kDa), la tryoglobuline (669 kDa), et le bleu dextran (2000 kDa).

### **6.2.9 Chromatographie d'échange d'ions**

La chromatographie d'échange d'ions permet de séparer des molécules selon leur charge. La colonne utilisée est une MONO Q (Amersham-Bioscience) d'un volume de 1 mL. Comme pour les autres méthodes de chromatographie, la colonne est branchée sur le système ÄKTA-FPLC. Elle est tout d'abord lavée avec 15 volumes d'eau distillée, puis équilibrée avec 15 volumes de tampon A contenant 20 mM Tris-HCl pH 7,5, 10 mM NaCl. La colonne est ensuite chargée avec 20 volumes de tampon B contenant 20 mM Tris-HCl pH 7,5, 1 M NaCl. La colonne est de nouveau équilibrée avec 15 volumes de tampon A. L'extrait protéique est ensuite déposé sur la colonne et la fraction non retenue est collectée. Un lavage avec 15 volumes de tampon A est opéré et le liquide en résultant est collecté. L'élution se fait ensuite selon un gradient linéaire de 10 mM à 1M NaCl (100% de tampon B), à raison de 20 volumes de colonne.

### **6.2.10 Western blot**

Les protéines sont séparées sur un gel dénaturant SDS-PAGE. Après migration, le gel est démoulé et immergé dans le tampon de transfert contenant 25 mM Tris-HCl, 0,2 M glycine, 20 % méthanol pendant 20 min. Le transfert des protéines présentes dans le gel vers la membrane (Hybond™-ECL, Amersham) est réalisé ensuite pendant 2 heures à 300 mA.

La membrane est ensuite incubée 1 heure à température ambiante dans du tampon TBS-Tween contenant 20 mM Tris-HCl pH7,5, 14 mM NaCl, 0,1 % Tween 20 et enrichi avec 5 % de lait écrémé qui joue le rôle d'agent bloquant. Les anticorps primaires anti-HisTag sont dilués dans ce même tampon au 1/100<sup>ème</sup> puis incubés avec la membrane sur la nuit à 4°C et sous agitation. Le lendemain, la membrane est rincée brièvement avec quoi ?? puis lavée 4 fois 15 min avec ce même tampon. Elle est ensuite incubée 1 h à température ambiante dans l'anticorps secondaire, couplé à la peroxydase HRP et dilué au 1/5000<sup>ème</sup> dans le tampon TBS-Tween-lait. La membrane est ensuite rincée brièvement et lavée 4 fois 15 min dans du tampon TBS-Tween.

La détection est réalisée à l'aide du kit ECL™ (Amersham). Le luminol et le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> utilisés induisent, en présence de la peroxydase, une émission lumineuse qui va imprimer les films photographiques. Ceux-ci sont ensuite développés de façon classique.

### 6.2.11 Expression hétérologue des GST microsomales chez la levure et obtention de fractions enrichies en microsomes

Pour les GST microsomales, le système hétérologue choisi est la levure *Saccharomyces cerevisiae*, et les protéines recombinantes ont été recherchées dans la fraction enrichie en microsomes. Les séquences codantes des gènes *mEsGST1*, *mEsGST2*, *mCcGST1* et *mCcGST2* ont été amplifiées par PCR à partir de la banque d'EST de sporophytes immatures d'*E. siliculosus* et de la banque de protoplastes de *C. crispus* en utilisant des amorces spécifiques contenant le site de restriction *BamHI* pour l'amorce sens et site *EcoRI* pour l'amorce antisens (Tableau 11). Pour minimiser les erreurs, la *Pfu* DNA polymérase (Promega, France) a été utilisée. Les amplicons ont été purifiés sur gel et clonés dans le vecteur pGEM®-T Easy pour atteindre un niveau suffisant de production des plasmides contenant les GST microsomales. Les plasmides recombinants ont été digérés avec les enzymes *BamHI* et *EcoRI* et les fragments purifiés sur gel. Ils ont ensuite été clonés dans le vecteur pYES2 (Invitrogen) préalablement digéré avec les enzymes citées ci-dessus. Après séquençage pour vérifier l'intégrité des séquences, la souche *S. cerevisiae* INVSC1 (Invitrogen) a été transformée par la méthode de l'acétate de lithium et les transformants ont été sélectionnés sur un milieu dépourvu d'uracile.

Les levures recombinantes sont cultivées pendant 2 jours à 30°C dans un milieu minimum enrichi en raffinose (1%) et en galactose (2%) pour induire l'expression des GST d'algues. Un volume de 1 mL de culture a été centrifugé à 5000 g pendant 10 min et resuspendu dans 600 µL de tampon 150 mM Tris-HCl pH 8. Les cellules sont ensuite lysées par vortexage en présence de billes de verre (0,4-0,6 mm, acid-washed glass beads, Sigma Aldrich) puis centrifugées à 10000 g pendant 10 min à 4°C. Dix mL de tampon phosphate sont ensuite ajoutés au surnageant et le tout est centrifugé à 100 000 g pendant 2 h à 4°C (rotor 45Ti, Beckman). Le culot obtenu est une fraction enrichie en microsomes, il est repris dans 500 µL de tampon d'activité (120 mM Na-phosphate, pH 7). La quantité de protéines totale est mesurée par absorbance à 280 nm. Les activités transférases sont mesurées sur 40 µg de protéines et les activités peroxydases sur 10 µg.

### 6.2.12 Mesures d'activités enzymatiques

La détermination des activités enzymatiques des glutathion transférases recombinantes est réalisée par dosage spectrophotométrique en utilisant un lecteur de microplaques Sapphire (Tecan). Les activités spontanées déterminées dans un milieu réactionnel ne contenant pas

d'enzyme sont systématiquement mesurées et soustraites pour déterminer les activités des enzymes recombinantes.

Les activités sont déterminées à 30 °C. Le glutathion est dissous dans l'eau distillée, les autres substrats sont dissous dans l'éthanol (sauf indications contraires). La concentration finale en éthanol dans le milieu réactionnel est d'environ 2 % (v/v). L'enzyme purifiée est diluée à une concentration de 5 à 50 µg/mL dans un tampon 20 mM Tris-HCl pH7,5, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1mM DTT, additionné de glycérol à une concentration de 10 % (v/v).

#### 6.2.12.1 Activités transférases

Sauf indication contraire, le dosage de l'activité glutathion transférase est réalisé dans une solution contenant 100 mM de tampon phosphate, en présence d'1 mM de glutathion (GSH), et d'1 mM du second substrat. Les mesures sont réalisées aux longueurs d'ondes et pH suivants :

**Tableau 10. Substrats et conditions d'utilisation pour la mesure de l'activité transférase.**

Substrat	$\lambda$	$\epsilon$	pH	Concentration finale
1-chloro-2,4-dinitrobenzene	340 nm	9600 M <sup>-1</sup> .cm <sup>-1</sup>	6,5	1 mM
1-bromo-2,4-dinitrobenzene	340 nm	9600 M <sup>-1</sup> .cm <sup>-1</sup>	6,5	1 mM
1-fluoro-2,4-dinitrobenzene	340 nm	9600 M <sup>-1</sup> .cm <sup>-1</sup>	6,5	1 mM
1-iodo-2,4-dinitrobenzene	340 nm	9600 M <sup>-1</sup> .cm <sup>-1</sup>	6,5	1 mM
<i>para</i> -nitrobenzoyl chloride	310 nm	1900 M <sup>-1</sup> .cm <sup>-1</sup>	6,5	1 mM
Acide éthacrinique	270 nm	5000 M <sup>-1</sup> .cm <sup>-1</sup>	6,5	0,2 mM avec 0,2 mM GSH
trans-4-phenyl-3-buten-2-one	290 nm	24800 M <sup>-1</sup> .cm <sup>-1</sup>	6,5	0,2 mM avec 0,2 mM GSH
4-hydroxynonanal	224 nm	13750 M <sup>-1</sup> .cm <sup>-1</sup>	6,5	0,1 mM avec 0,5 mM GSH
<i>trans</i> -2-nonanal	224 nm	19500 M <sup>-1</sup> .cm <sup>-1</sup>	6,5	0,1 mM avec 0,5 mM GSH
<i>para</i> -nitrophenyl acetate	400 nm	5000 M <sup>-1</sup> .cm <sup>-1</sup>	7	0,3 mM avec 0,5 mM GSH

L'enzyme (0,2-1µg) est préalablement incubée 5 min dans le mélange réactionnel (240 µL), et la réaction est démarrée par l'addition du second substrat. Les mesures sont relevées toutes les 20 sec pendant 10 min. Une unité d'activité enzymatique est définie comme la quantité d'enzyme capable de catalyser la disparition d'une micromole de substrat par minute. L'activité spécifique est exprimée en µmol. min.<sup>-1</sup>mg<sup>-1</sup> d'enzyme.

### 6.2.12.2 Activités peroxydases

L'activité peroxydase dépendante du glutathion est testée en présence d'1 mM de cumène hydroperoxyde, d'1 mM de t-butyl hydroperoxyde ou de 0,1 mM de chaque hydroperoxyde d'acides gras polyinsaturés testés (acide 13S-hydroperoxy-9Z,11E-octadecadiénoïque, 13(S)-HpODE ; acide 13S-hydroperoxy-9Z,11E-octadecatriénoïque, 13(S)-HpOTE ; acide 12-hydroperoxy-5Z,8Z,10E,14Z-eicosatétraénoïque, 12(±)-HpETE ; acide 15S-hydroperoxy-5Z,8Z,11Z,13E-eicosatétraénoïque, 15(S)-HpETE) (Cayman Chemicals). Le milieu réactionnel contient 0,2 mM de NADPH, 1mM de GSH et 0,25 unité de glutathion réductase dans 100 mM de tampon phosphate pH 7,0. La réaction est amorcée par l'ajout simultané du NADPH et du second substrat, et suivie par la diminution de l'absorbance à 340 nm. Le coefficient d'extinction molaire utilisé pour l'oxydation du NADPH à 340 nm est de  $6220 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ .

### 6.2.12.3 Effets du pH et de la température

Le pH optimal des enzymes recombinantes a été déterminé selon le dosage spectrophotométrique décrit précédemment, en utilisant le CDNB comme substrat. Pour les différentes valeurs de pH, les 100 mM de tampon phosphate pH 6,5, classiquement utilisés, sont remplacés par 100 mM des tampons suivants : acétate de sodium pH 4,0 à 5,5 ; phosphate de potassium pH 6,0 à 8,0 ; glycine-NaOH pH 9,5 à 10,5.

### 6.2.12.4 Détermination des paramètres cinétiques

Le  $K_m$  apparent pour le glutathion est déterminé en utilisant une concentration GSH de 0,03 mM à 3 mM en présence d'une concentration fixe de 1 mM de BDNB. Les paramètres cinétiques ont été calculés selon la méthode de Lineweaver et Burk.

### 6.2.12.5 Mesure de l'Activité prostaglandine synthase

Ce protocole expérimental a été mis en place et réalisé en collaboration avec Sophie Goulitquer, étudiante en thèse au Laboratoire de Biochimie " Epissage, Cancer, Lipides et Apoptose", INSERM U613, anciennement EA-948 "Oxylipides", Faculté de Médecine de Brest.

La réaction enzymatique est réalisée en présence de 2  $\mu\text{g}$  d'enzyme purifiée, d'1 mM de glutathion, d'1  $\mu\text{g}$  de prostaglandine H2 et de 100 mM de tampon potassium phosphate pH 7, dans un volume réactionnel final de 500  $\mu\text{L}$ , pendant 10 min à température ambiante. Des contrôles négatifs sont réalisés dans des mélanges réactionnels successivement sans enzyme, sans glutathion, sans prostaglandine, ou avec un inhibiteur de l'enzyme (Cibacron Blue 10  $\mu\text{M}$ ). L'arrêt de la réaction enzymatique et l'extraction des produits lipidiques sont réalisés par

ajout de 2 fois 2 mL d'acétate d'éthyle, suivis d'une phase d'évaporation complète sous flux d'azote. L'extrait est ensuite repris dans 100 µL d'éthanol pur et conservé à -80°C pendant au maximum 3 semaines. Vingt microlitres sont injectés dans une colonne de 5 µm Ultrasphere C18 column 250 x 4.6 mm (Beckman Coulter, Fullerton CA, USA). Un gradient d'acétonitrile de 0 à 100 % permet de séparer des différents constituants de l'extrait.

Les différentes fractions d'élution sont automatiquement analysées par un spectromètre de masse Navigator Thermo Finnigan LC/MS mass spectrometer (Thermo Electron, Bremen Germany). L'identification des produits de la réaction est effectuée en comparant les temps de rétention de la colonne de chromatographie et les spectres de masse des produits de la réaction avec ceux issus de produits purs, notamment les prostaglandines de la série 2.

### **6.2.13 Recherche de partenaires protéiques des GST de *Laminaria digitata***

#### **6.2.13.1 Extraction des protéines d'algues**

Plusieurs protocoles d'extraction de protéines ont été utilisés pour optimiser la recherche de partenaires protéiques. En effet, un point clé de cette expérience est l'obtention d'une grande quantité de protéines, environ 10 mg, pour maximiser les chances de rencontres entre la protéine d'intérêt et ses partenaires potentiels.

La première expérience a été réalisée en broyant 3,5 g de *L. digitata*, qui ont été repris dans 8 mL de tampon Tris-HCl 20 mM pH 7,5, 2% PVPP et un cocktail d'antiprotéases (Complete, Roche). L'extrait est ensuite homogénéisé sur roue pendant 3 h à 4°C, centrifugé 40 min à 4°C et 30000g. Le surnageant est ensuite filtré à 0,45 µm

La deuxième expérience a été réalisée sur 25 g d'algues broyées et repris dans 100 mL de tampon Tris-HCl 50mM pH 7,5, NaCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, cocktail d'antiprotéases et une spatule de DNase. Le mélange est homogénéisé sur roue à 4°C pendant une nuit puis centrifugé 30 min à 4 °C et 5000 g. La troisième expérience a été réalisée avec 15 g d'algues broyées et reprises dans 100 mL de tampon Tris-HCl 50 mM pH 9, NaCl 100 mM, MgCl<sub>2</sub> 15 mM et un cocktail d'antiprotéases. Le mélange est homogénéisé sur roue à 4°C pendant 3 heures et centrifugé 30 min à 4°C et 5000 g. Le surnageant est collecté et les polysaccharides de l'extrait sont précipités par ajout d'éthanol à 100 % sous agitation. Le mélange est à nouveau centrifugé 30 min à 4°C et 5000 g.

Les protéines de l'extrait sont ensuite précipitées au sulfate d'ammonium. Un premier palier à 10 % de sulfate d'ammonium est effectué pendant une nuit. L'échantillon est ensuite centrifugé 20 min à 15000 g. Puis un deuxième palier à 70 % de sulfate d'ammonium permet

de précipiter toutes les protéines restantes. Le mélange est alors centrifugé 20 min à 15000 g et le culot est repris dans 20 mL de tampon Tris-HCl 50 mM pH 9. Une étape de centrifugation de 10 min à 5000 g permet d'éliminer ce qui n'est pas soluble.

La quatrième expérience a été réalisée sur 15 g d'algues broyées et reprises dans 100 mL de tampon  $K_2CO_3$  à 200 g/L et PEG 1550 2 %. Le mélange est homogénéisé sur roue pendant une heure à 4°C puis centrifugé 30 min à 4°C et 5000 g. Les protéines contenues dans la phase supérieure sont ensuite précipitées en suivant le protocole au sulfate d'ammonium décrit précédemment.

A la suite de tous ces essais, la quantité de protéines a été estimée par dosage selon la méthode de Bradford. Puis l'extrait protéique final est concentré sur une cellule AMICON avec une membrane 1000 MWCO.

#### 6.2.13.2 **Pull-down**

Le Pull-down est une technique qui permet de mettre en évidence, *in vitro*, l'interaction entre deux ou plusieurs protéines. Pour réaliser cette technique, il est nécessaire d'avoir une protéine purifiée et étiquetée qui sert d'appât, et un extrait dans lequel se trouvent les partenaires potentiels (les proies).

La résine de nickel, Talon Metal Affinity Resin (Qiagen), utilisée pour fixer l'appât, est préparée à raison de 1 mL pour 1,5 mg de protéine dans un tube Eppendorf. La résine est lavée (agitation, centrifugation, élimination du surnageant) avec 10 volumes de tampon Tris-HCl 50 mM pH 7,5, 50 mM NaCl, 10 mM  $MgCl_2$ . Puis l'appât, c'est-à-dire la GST recombinante (180  $\mu$ g) possédant une étiquette composée de 6 résidus histidine, est fixé sur la résine par rotation pendant une heure à 4°C. La fraction non retenue est éliminée après centrifugation 10 min à 4°C et 5000 rpm.

L'incubation avec les proies potentielles s'effectue par ajout de l'extrait protéique total (3800  $\mu$ g) sur la résine et rotation pendant 18 heures à 4°C. La fraction ne présentant pas d'affinité pour l'appât ou la résine est éliminée après centrifugation. Les complexes appât – proies sont ensuite lavés avec 10 volumes de tampon Tris-HCl 50 mM pH 7,5, 50 mM NaCl, 10 mM  $MgCl_2$  pour éliminer les interactions non spécifiques. Un aliquot de la résine est ensuite prélevé et directement déposé sur un gel dénaturant SDS-PAGE. Un contrôle sans appât est également réalisé afin d'identifier les interactions non-spécifiques générées par la résine sur l'extrait protéique total.

Une autre méthode a également été testée. Au lieu de déposer un aliquot de la résine directement sur gel, l'appât et ses partenaires potentiels sont élués avec 3 volumes de tampon

Tris-HCl 50 mM pH7,5, 50 mM NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 400 mM imidazole. Cependant cette étape dilue l'échantillon et rend l'analyse sur gel difficile.

**Tableau 11: Liste des oligonucléotides utilisés au cours de mon travail de thèse.**

Gène Localisation ou utilisation	Oligonucléotide	Séquence
<i>LdGST1</i> Séquence codante	<i>Sens</i> GST 8_1F	5'-GCACACACTCTCAGTCCCCTT-3'
	<i>Antisens</i> GST 8_1R	5'-CGCAATGTACGCACTACACAT-3'
<i>LdGST1</i> PCRq	<i>Sens</i> GST8_PCRq_3F	5'-GCAGAGCCTCGCCCAGATGA-3'
	<i>Antisens</i> GST8_PCRq_3R	5'-CCATAGCTGCGTCGGCGAAT-3'
<i>LdGST2</i> Séquence codante	<i>Sens</i> 5'GST78	5'-ATGGCTCCCACCACATCTTTG-3'
	<i>Antisens</i> 3'GST78	5'-TTACTTGTTGGTGGTCTCTGA-3'
<i>LdGST2</i> PCRq	<i>Sens</i> 78GST3	5'-AGGCTGGTCTGGCTGAAGGAA-3'
	<i>Antisens</i> 78GST4	5'-TGGTCTCTGATCTCTCCTGGTGG-3'
<i>LdGST3</i> Séquence codante	<i>Sens</i> 5'GST54	5'-ATGGCTCCCAAGCTGGTCCTG-3'
	<i>Antisens</i> 3'GST54	5'-CTACTTGTCGTGCTTGGCGAT-3'
<i>LdGST3</i> PCRq	<i>Sens</i> GST54_PCRq_1F	5'-ATACGCTGGGCTTTGGAGCAA-3'
	<i>Antisens</i> GST54_PCRq_1R	5'-GGCTGGGCTTGACAACACCA-3'
<i>LdGST4</i> Séquence codante	<i>Sens</i> GST19_1F	5'-ACCATGCCGGCTGTCTTTA-3'
	<i>Antisens</i> GST19_1R	5'-TGCAGTTTACGCCTTGGAA-3'
<i>LdGST4</i> Intron	<i>Sens</i> 19GST1	5'-GCGGAGGACGTGTTTCATCA-3'
	<i>Antisens</i> 19GST2	5'-CAAAGTCTGGCACTTCTCCAAC-3'
<i>LdGST4</i> PCRq	<i>Sens</i> GST19_PCRq_1F	5'-ATACCAGATGGACGGCACCGA-3'
	<i>Antisens</i> GST19_PCRq_1R	5'-AGGCTAAAGGGCATTCCGGG-3'
<i>EsGST1</i> PCRq	<i>Sens</i> EsGST1_PCRq_2F	5'-CTACCGCCTGCACCACATGAA-3'

	<i>Antisens</i> EsGST1_PCRq_2R	5'-TACAAAGCGCAGAGGGAAGGG-3'
<i>EsGST2</i> PCRq	<i>Sens</i> EsGST2_PCRq_2F	5'-CCTCCGCACTCTCCGCTTAC-3'
	<i>Antisens</i> EsGST2_PCRq_2R	5'-GTCTTCCGCAACGCACTACTG-3'
<i>EsGST3</i> PCRq	<i>Sens</i> EsGST3_PCRq_2F	5'-ACAACATCGCCCGAAGGAC -3'
	<i>Antisens</i> EsGST3_PCRq_2F	5'-TGTCTTATCTCAACAAACCTCACC-3'
<i>EsGST9</i> PCRq	<i>Sens</i> CL4853_PCRq_2F	5'-CGCATGTCTGTGGTTCACCTATTC-3'
	<i>Antisens</i> CL4853_PCRq_2R	5'-GCCAACTACACACGGAAGGG-3'
<i>EsGST12</i> PCRq	<i>Sens</i> CL1683_PCRq_2F	5'-ATGCCCGTGTGGAGGTAGATG-3'
	<i>Antisens</i> CL1683_PCRq_2R	5'-GCACTGTCTGGCGAAAGCG-3'
<i>EsGST13</i> PCRq	<i>Sens</i> CL3957_PCRq_1F	5'-AGCGAAAGGGAAGTACATGAAGGG-3'
	<i>Antisens</i> CL3957_PCRq_1R	5'-TTGGGCGGCGAGCGTCTC-3'
<i>mEsGST1</i> PCRq	<i>Sens</i> mEsGST1_PCRq_2F	5'-TTGGGTTGTTGACAGTCAGAGAG-3'
	<i>Antisens</i> mEsGST1_PCRq_2R	5'-CAAACCAATACGGACGCTATGC-3'
<i>Esi0047_0117</i> PCRq	<i>Sens</i> CL1335_PCRq_1F	5'-CCGAACGGGCAGAAGGTCAC-3'
	<i>Antisens</i> CL1335_PCRq_1R	5'-CGACATGATGTTTGTGTACCAAGC-3'
<i>Esi0019_0095</i> PCRq	<i>Sens</i> CL754_PCRq_1F	5'-CCTGCCCTGGTGTTCATCG-3'
	<i>Antisens</i> CL754_PCRq_1R	5'-TCATCCATGTAGGAGAAGGTCACG-3'
<i>mEsGST2</i> PCRq	<i>Sens</i> mEsGST2_PCRq_2F	5'-TTGGTGGTACTCGCTGTGGTTAG-3'
	<i>Antisens</i> mEsGST2_PCRq_2R	5'-CCCACGACAGAGCAAATAC-3'
<i>EsEF1a</i> PCRq	<i>Sens</i> EsEF1a5'	5'- GCAAGGGCCTCAGCTCTG -3'
	<i>Antisens</i> EsEF1a3'	5'- ACAAGCCGTCTGGGTATATGTTAGC -3'
<i>EsTUA</i> PCRq	<i>Sens</i> EsTUA5'	5'- TTTGAGGAGTTTCGTCGGAGAT-3'

	<i>Antisens</i> EsTUA3'	5'-CACACAGCGCAAAACGGC-3'
EsACTIN PCRq	<i>Sens</i> EsACT5'	5'-CCCAGATCATGTTTCGAGACGTT-3'
	<i>Antisens</i> EsACT3'	5'-CACGCCGTCACCCGAGTC-3'
LdTUA PCRq	<i>Sens</i> Tuba2-1	5'-TCGTGCAGTTGGGTTTCGA-3'
	<i>Antisens</i> Tuba2-2	5'-CAAGACGCCATGCGATACG-3'
LdRPL36 PCRq	<i>Sens</i> Pld17B08-fw1q	5'-ATCGCGGCTTGTGTCTCTTG-3'
	<i>Antisens</i> Pld17B08-rev1q	5'-ACCGCACACCAACCCTTTC-3'
LdACTIN PCRq	<i>Sens</i> LdAct_fw3q	5'-GGATGTCGCGCACGATCT-3'
	<i>Antisens</i> LdAct_rev3q	5'-ACCTGACGGACAACCTGATGA-3'
EsGST1 Clonage pFO4	<i>Sens</i>	5'-GGGGGGGGATCCGCTCCCAAACCTCATCCTCACGTA-3'
	<i>Antisens</i>	5'-CCCCCGAATTCTTACTTGCGGTGCTTGCGGAGGAAT-3'
EsGST3 Clonage pFO4	<i>Sens</i>	5'-GGGGGGGGATCCTCTTCCACGCCACCCTCAACT-3'
	<i>Antisens</i>	5'-CCCCCGAATTCTTACGCCTTGGAGGCGTAGTACGC-3'
LdGST1 Clonage pFO4	<i>Sens</i>	5'-GGGGGGGGATCCGGCCCAAGCTTATCCTCTCGT-3'
	<i>Antisens</i>	5'-CCCCCGAATTCTTATGGCCCGACTCCAAGTACTTG-3'
LdGST2 Clonage pFO4	<i>Sens</i>	5'-GGGGGGGGATCCGCTCCCACCACATCTTTGACCC-3'
	<i>Antisens</i>	5'-CCCCCGAATTGTTACTTGTGGTGGTCTCTGATCTC-3'
LdGST3 Clonage pFO4	<i>Sens</i>	5'-GGGGGGGGATCCGCTCCCAAAGCTGGTCTGACG-3'
	<i>Antisens</i>	5'-CCCCCGAATTCTTACTTGTCTGCTTGGCGATGAACG-3'
LdGST4 Clonage pFO4	<i>Sens</i>	5'-GGGGGGGGATCCCGGCTGTCTTAACTACTTCG-3'
	<i>Antisens</i>	5'-CCCCCGAATTCTTACGCCTTGAAGCG-3'
mEsGST1 Clonage levure	<i>Sens</i>	5'-GGGGGGGGATCCACCATGGCTGTGACCATCGAGCTCACACCC-3'
	<i>Antisens</i>	5'-CCCCCGAATTCTTACATGTAAACCTTACGACGGA-3'
mEsGST2 Clonage levure	<i>Sens</i>	5'-GGGGGGGGATCCACCATGGCTGTGACCATCGAGCTCACACCC-3'
	<i>Antisens</i>	5'-CCCCCGAATTCTTAGGATATGCAAAGCTTCGTGGT-3'
mCcGST1 Clonage levure	<i>Sens</i>	5'-GGGGGGGGATCCACCATGGCTACCATGACCATCGAACTTACC-3'
	<i>Antisens</i>	5'-CCCCCGAATTCTCAGCAGCATGTCTTGACCACGAG-3'
mCcGST2 Clonage levure	<i>Sens</i>	5'-GGGGGGGGATCCACCATGGCTGAAGTAACGCTCCCGCCGCTG-3'
	<i>Antisens</i>	5'-CCCCCGAATTCTTATGAACGTAGCAGCGAAACGGC-3'

**Tableau 12: Numéros d'accèsion des séquences utilisées pour l'analyse phylogénétique des GST cytosoliques.**

Classe	Gène	Organisme	N°accession
Bêta	<i>EcGSTB</i>	<i>Escherichia coli</i>	AAC74707
	<i>PmGSTB</i>	<i>Proteus mirabilis</i>	P15214
	<i>OaGSTB</i>	<i>Ochrobactrum anthropi</i>	CAA76728
Rho	<i>MsGSTR</i>	<i>Micropterus salmoides</i>	AAQ91198
	<i>PmGSTR1</i>	<i>Pagrus major</i>	BAD98443
	<i>PpGSTR</i>	<i>Pleuronectes platessa</i>	CAA45293
Omega	<i>CeGSTO1</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>	AAA27959
	<i>TrGSTO</i>	<i>Takifugu rubripes</i>	AAL08414
	<i>MmGSTO1</i>	<i>Mus musculus</i>	NP_034492
Alpha	<i>RnGSTA2</i>	<i>Rattus norvegicus</i>	P04903
	<i>HsGSTA1</i>	<i>Homo sapiens</i>	NP_665683
	<i>GgGSTA4</i>	<i>Gallus gallus</i>	NP_990149
	<i>DrGSTA2</i>	<i>Danio rerio</i>	NP_998559
Mu	<i>HsGSTM5</i>	<i>Homo sapiens</i>	NP_000842
	<i>BtGSTM1</i>	<i>Bos taurus</i>	AAI02051
	<i>MmGSTM3</i>	<i>Mus musculus</i>	AAH44927
	<i>MfGSTM2</i>	<i>Macaca fascicularis</i>	AAF08540
Pi	<i>BtGSTP</i>	<i>Bos taurus</i>	AAI02705
	<i>MmGSTP1</i>	<i>Mus musculus</i>	AAH61109
	<i>HsGSTP1</i>	<i>Homo sapiens</i>	AAH61109
	<i>RnGSTP</i>	<i>Rattus norvegicus</i>	NP_036709
Sigma	<i>GgGSTS1</i>	<i>Gallus gallus</i>	CAA07005
	<i>OsGSTS</i>	<i>Ommastrephes sloanei</i>	P46088
	<i>TjGSTS</i>	<i>Tigriopus japonicus</i>	AAAY89316
	<i>AgGSTS1</i>	<i>Anopheles gambiae</i>	L07880
	<i>AgGSTS</i>	<i>Anopheles gambiae</i>	P46428
	<i>SiGSTS</i>	<i>Solenopsis invicta</i>	Q6X4T7
	<i>BgGSTS</i>	<i>Blatella germanica</i>	O18598
	<i>BmGSTS</i>	<i>Bombyx mori</i>	Q5CCJ4
	<i>MdGSTS</i>	<i>Musca domestica</i>	P46437
	<i>HsPDGS</i>	<i>Homo sapiens</i>	AAH20734
	<i>RnPGDS</i>	<i>Rattus Norvegicus</i>	035543
	<i>CiPGDS3</i>	<i>Ciona intestinalis</i>	Q0PMD3
Gamma	<i>CeGSTG1</i>	<i>Cunninghamella elegans</i>	AAL02368
	<i>CeGSTG2</i>	<i>Cunninghamella elegans</i>	AAL02369
Nu	<i>AcGSTN1</i>	<i>Ancylostoma caninum</i>	AAT37718
	<i>NdGSTN2</i>	<i>Nematospiroides dubius</i>	AAF36480
	<i>HcGSTN1</i>	<i>Haemonchus contortus</i>	AAF81283
Delta	<i>AgGSTD2</i>	<i>Anopheles gambiae</i>	CAA96104
	<i>AgGSTD1-5</i>	<i>Anopheles gambiae</i>	CAB03592
	<i>SsGSTD</i>	<i>Sarcoptes scabiei</i>	AAV65948
	<i>DmGSTD</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>	AAB26519
Epsilon	<i>AgGSTE1</i>	<i>Anopheles gambiae</i>	AAL59658

	<i>AgGSTE2</i>	<i>Anopheles gambiae</i>	AAV68398
	<i>DmGSTE17534</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>	AAF57693
	<i>DmGSTE17522</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>	AAF57702
Thêta	<i>AtGSTT10</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	CAA10457
	<i>EeGSTT1</i>	<i>Euphorbia esula</i>	AAF64449
	<i>HsGSTT1</i>	<i>Homo sapiens</i>	AAL31549
	<i>RnGSTT2</i>	<i>Rattus norvegicus</i>	AAH61856
Zêta	<i>BnGSTZ</i>	<i>Brassica napus</i>	AAO60042
	<i>OsGSTZ</i>	<i>Oryza sativa</i>	AAG32474
	<i>HsGSTZ1</i>	<i>Homo sapiens</i>	NP_665877
	<i>MmGSTZ1</i>	<i>Mus musculus</i>	AAH31777
Phi	<i>NtGSTF1</i>	<i>Nicotiana tabacum</i>	A41789
	<i>NtGSTF2</i>	<i>Nicotiana tabacum</i>	P46440
	<i>AtGSTF4</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	CAB80745
	<i>ZmGSTF3</i>	<i>Zea mays</i>	CAA29929
Lambda	<i>AtGSTL</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	CAB86032
	<i>GmGSTL</i>	<i>Glycine max</i>	AAG34872
	<i>PsGSTL</i>	<i>Pisum sativum</i>	BAC81649
	<i>TaGSTL</i>	<i>Triticum aestivum</i>	CAA76758
Tau	<i>AtGSTU4</i>	<i>Aegilops tauschii</i>	AAM89393
	<i>OsGSTU3</i>	<i>Oryza sativa</i>	AAQ02687
	<i>PtGSTU</i>	<i>Pinus tabuliformis</i>	AAV64044
	<i>CmGSTU3</i>	<i>Cucurbita maxima</i>	BAC21263
Algues brunes	<i>LdGST1</i>	<i>Laminaria digitata</i>	EF422836
	<i>LdGST2</i>	<i>Laminaria digitata</i>	EF422837
	<i>LdGST3</i>	<i>Laminaria digitata</i>	EF422838
	<i>LdGST4</i>	<i>Laminaria digitata</i>	EF422839
	<i>EsGST1</i>	<i>Ectocarpus siliculosus</i>	FP089530
	<i>EsGST2</i>	<i>Ectocarpus siliculosus</i>	FP089529
	<i>EsGST3</i>	<i>Ectocarpus siliculosus</i>	FP089528
	<i>EsGST4</i>	<i>Ectocarpus siliculosus</i>	FP089527
	<i>EsGST5</i>	<i>Ectocarpus siliculosus</i>	FP089526
	<i>EsGST6</i>	<i>Ectocarpus siliculosus</i>	FP089525
	<i>EsGST7</i>	<i>Ectocarpus siliculosus</i>	FP089524
	<i>EsGST8</i>	<i>Ectocarpus siliculosus</i>	FP089523
	<i>EsGST9</i>	<i>Ectocarpus siliculosus</i>	FP089522
	<i>EsGST10</i>	<i>Ectocarpus siliculosus</i>	FP089521
	<i>EsGST11</i>	<i>Ectocarpus siliculosus</i>	FP089520
	<i>EsGST12</i>	<i>Ectocarpus siliculosus</i>	FP089519
	<i>SbGST2</i>	<i>Sargassum binderi</i>	DV669544
	<i>FvGST1</i>	<i>Fucus vesiculosus</i>	CL225Contig1 <sup>a</sup>
	<i>FsGST1</i>	<i>Fucus sp</i>	CL169Contig1 <sup>a</sup>
	<i>FsGST2</i>	<i>Fucus sp</i>	CL290Contig1 <sup>a</sup>
Algues rouges	<i>CcGST1</i>	<i>Chondrus crispus</i>	EF423557
	<i>CcGST2</i>	<i>Chondrus crispus</i>	EF423558
	<i>GtGST1</i>	<i>Gracilaria tenuistipitata</i>	206.1 <sup>b</sup>
	<i>GtGST2</i>	<i>Gracilaria tenuistipitata</i>	100722.1 <sup>b</sup>
	<i>GcGST1</i>	<i>Gracilaria changii</i>	EC325559

<sup>a</sup> [http://www.sb-roscoff.fr/SIG/blast/blast\\_private.html](http://www.sb-roscoff.fr/SIG/blast/blast_private.html)

<sup>b</sup> [http://gracilaria.ib.usp.br/cgi-bin/gracilaria/cap3/cluster\\_editor/gene\\_list.pl?categ=ALL](http://gracilaria.ib.usp.br/cgi-bin/gracilaria/cap3/cluster_editor/gene_list.pl?categ=ALL)

Numéro d'accèsion pour EsGST13 = FP089518

**Tableau 13: Numéros d'accèsion des séquences utilisées pour l'analyse phylogénétique des GST microsomaux.**

Cluster	Espèces	Numéro d'accèsion
Bacteria	<i>Pseudomonas syringae</i> <i>Rhodopseudomonas palustris</i> <i>Chromobacterium violaceum</i>	NP_790229 ZP_00009790 NP_899939
MGST1	<i>Homo sapiens</i> <i>Rattus norvegicus</i> <i>Danio rerio</i>	P10620 P08011 BM532930
Insectes	<i>Anopheles gambiae</i> <i>Anopheles gambiae</i>	AAP37005 AAP37004
PGES	<i>Ciona intestinalis</i> <i>Homo sapiens</i> <i>Rattus norvegicus</i>	BW302022 O14684 AAG24803
FLAP	<i>Rattus norvegicus</i> <i>Homo sapiens</i> <i>Danio rerio</i>	P20291 P20292 AAH53181
LTC4 synthase	<i>Gallus gallus</i> <i>Rattus norvegicus</i> <i>Homo sapiens</i>	BU419439 BAB58882 Q16873
MGST2	<i>Hydra magnipapillata</i> <i>Homo sapiens</i> <i>Danio rerio</i> <i>Salmo salar</i>	BP512502 Q99735 AL921814 CA038571
<i>Synechocystis</i> cluster	<i>Synechocystis</i> sp. <i>Rhodopseudomonas palustris</i>	P73795 ZP_00009580
MGST3	<i>Xenopus laevis</i> <i>Homo sapiens</i> <i>Arabidopsis thaliana</i> <i>Chondrus crispus mGST1</i> <i>Chondrus crispus mGST2</i> <i>Ectocarpus siliculosus mGST1</i> <i>Ectocarpus siliculosus mGST2</i> <i>Ectocarpus siliculosus mGST3</i>	AW644270 O14880 AAM66941 CO650933 CO649734 FP089517 FP089516 FP089515
<i>E. coli</i> cluster	<i>Magnetospirillum magnetotacticum</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Yersinia pestis</i>	ZP_00052499 P64515 NP_405603

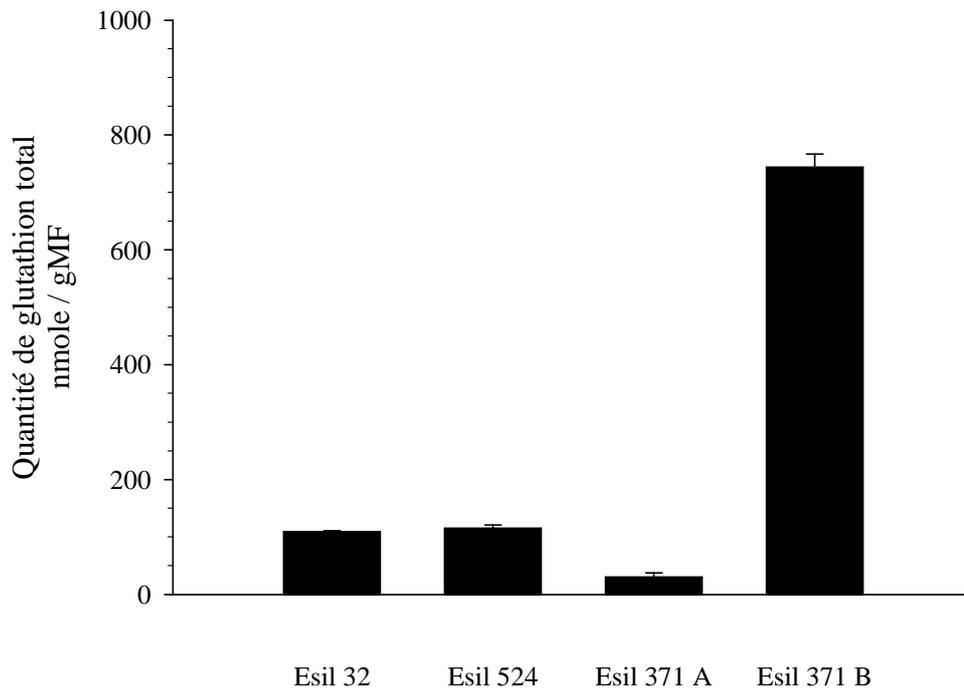
# **RESULTATS**

## 1. Le métabolisme du glutathion chez *E. siliculosus*

Dans ce chapitre, je vais décrire les variations de production du glutathion que j'ai mises en évidence chez *E. siliculosus*, recenser les gènes codant pour les enzymes du métabolisme de cette molécule dans le génome, et déterminer l'activité GST totale chez cette algue soumise à différents traitements.

### 1.1 Mesure de la quantité de glutathion dans plusieurs souches d'*E. siliculosus* cultivées au laboratoire

Le pool de glutathion total (réduit et disulfure) peut être mesuré sur un extrait brut par spectrophotométrie après une réaction enzymatique catalysée par une glutathion réductase. Ce test a été adapté au laboratoire avec l'aide de Sylvie Rousvoal. Il permet d'évaluer la quantité de glutathion total dans un échantillon, considérant que ce pool intracellulaire est formé majoritairement par la forme réduite (GSH). Les résultats sont présentés dans la Figure 45.



**Figure 45: Dosage du glutathion total (GSH+GSSG) dans différentes souches d'*E. siliculosus* cultivées au laboratoire.**

La quantité de glutathion mesurée est exprimée en nmoles de glutathion total par gramme de masse fraîche (nmole / gMF). Les résultats présentés sont issus de trois réplicats biologiques.

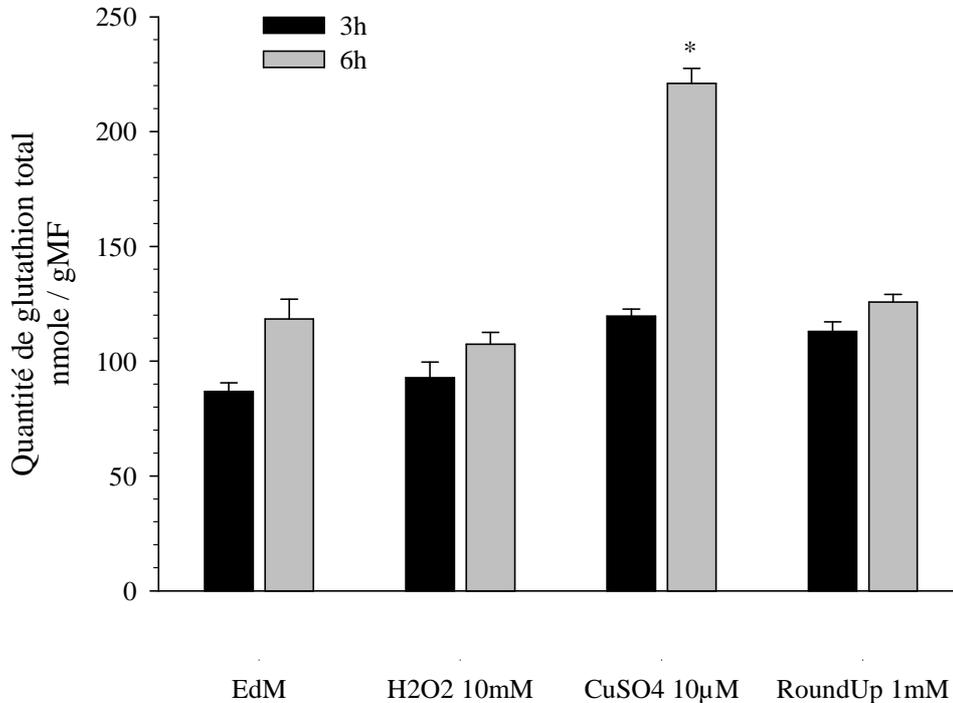
La souche Esil32 provient du Pérou et a été choisie comme souche de référence pour le séquençage du génome. La souche Esil 524 a été récoltée au Chili dans une zone fortement

polluée par du cuivre (Ritter et al., in prep), et elle est cultivée au laboratoire dans les mêmes conditions que la souche Esil32. La quantité de glutathion total (réduit et disulfure) mesurée dans les souches Esil32 et Esil524 est d'environ 100 nmoles / gMF. Si on considère qu'*Ectocarpus* est constitué de 90% d'eau, cela équivaut à une concentration intracellulaire d'environ 1 mM.

La souche Esil371 a été isolée en Australie près d'une cascade située à une quarantaine de km de la mer (West and Kraft, 1996). Lorsque cette souche est cultivée dans de l'eau de mer diluée au vingtième (Esil371A), afin de retrouver des conditions de culture/salinité proche de celles de son milieu naturel, la quantité de glutathion total est d'environ 60 nmoles de glutathion par gramme de masse fraîche. En revanche, lorsqu'elle est cultivée dans de l'eau de mer normale (Esil371B), elle présente une forte teneur en glutathion total avec environ 670 nmoles / gMF. Ceci représente donc une très forte augmentation de la production de cette molécule lorsque cette souche est cultivée en condition hypersaline par rapport à sa condition naturelle. L'étude des mécanismes qui permettent à cette souche de se développer en eau douce et en eau de mer est réalisée au laboratoire dans le cadre de la thèse de Simon Dittami.

## 1.2 Le cuivre stimule la production de glutathion chez *E. siliculosus*

Des traitements chimiques exogènes ont été appliqués à des cultures d'*E. siliculosus*, souche Esil32, afin d'analyser leur incidence sur la production de glutathion.



**Figure 46: Dosage du pool de glutathion total après différents traitements d'*E. siliculosus*.**

L'histogramme présente la moyenne de deux réplicats biologiques et trois réplicats techniques pour chaque condition. Les cultures ont été traitées pendant 3h et 6h avec 10 mM final de peroxyde d'hydrogène, 10 µM de sulfate de cuivre et 1mM équivalent glyphosate d'une solution commerciale de Round Up®. Des contrôles ont été réalisés en incubant les algues dans de l'eau de mer (EdM). Un test statistique a été effectué et les résultats significativement différents des conditions contrôles sont marqués par un astérisque (\*,  $p < 0,05$ ).

La quantité de glutathion chez *Ectocarpus* non traité est d'environ 100 nmoles / gMF, confirmant les résultats précédents. Les traitements en présence de 10 mM de peroxyde d'hydrogène et du Round Up® n'entraînent pas de modifications de la quantité de glutathion présent dans l'algue. De même, trois heures d'incubation avec 10 µM de CuSO<sub>4</sub> n'ont pas d'effet sur le pool de glutathion. Par contre, après 6h, le cuivre induit une augmentation significative de ce pool. La teneur mesurée est alors de 220 nmoles / g MF, représentant une augmentation d'un facteur 2 par rapport à la condition contrôle. Le cuivre engendre donc une perturbation physiologique de l'algue qui se traduit entre autre par une accumulation de glutathion.

### 1.3 Les gènes du métabolisme du glutathion sont conservés chez *E. siliculosus*

Le génome d'*Ectocarpus* a été séquencé à l'initiative de l'UMR7139 et sous la direction du Dr. Mark J. Cock. Différentes banques d'ADNc ont été générées, correspondant à différentes étapes du cycle de vie et à des algues stressées, et 91041 EST ont ainsi été séquencées. Le génome complet a été séquencé par le Génoscope (France) et les couvertures 3X, 7X, 10X et 10,5X ont été successivement disponibles au laboratoire. Au cours de ma dernière année de thèse, le séquençage du génome d'*Ectocarpus* a été finalisé et une plate-forme d'annotation a été mise en place. J'ai ainsi eu la charge de recenser et d'annoter les gènes impliqués dans le métabolisme du glutathion. En me référant à la carte présentée Figure 12, j'ai identifié tous les gènes codant pour les protéines impliquées dans les différentes réactions, et j'ai procédé à leur annotation manuelle en utilisant une panoplie d'outils bioinformatiques listés dans la section Matériels et Méthodes.

Sur les 17000 gènes que compte le génome d'*Ectocarpus siliculosus*, j'ai identifié et annoté 48 gènes liés au métabolisme du glutathion. Leur inventaire est présenté dans le Tableau 14.

Les gènes du cycle  $\gamma$ -glutamyl du glutathion sont au nombre de huit, ce qui peut sembler faible au regard de l'implication du glutathion dans des processus cellulaires vitaux. Deux gènes de glutamate cystéine ligase (GCLC), correspondant à la première étape de la synthèse du glutathion, ont été identifiés. Ils correspondent à la sous-unité catalytique de l'enzyme et partagent 50% d'identité au niveau protéique. Aucune sous-unité régulatrice n'a été trouvée. Alors que le gène de GCLC identifié chez *Arabidopsis* correspond à une protéine adressée au chloroplaste, aucun peptide signal n'a été identifié dans les séquences d'*Ectocarpus*. La deuxième étape de la synthèse est réalisée par une glutathion synthétase (GS), codé par un seul gène dans le génome de l'algue brune, ce qui est aussi le cas chez l'homme et *Arabidopsis*. Ce gène EsGS semble fortement exprimé dans les banques EST, ce qui souligne son importance fonctionnelle.

**Tableau 14: Inventaire des gènes liés au métabolisme du glutathion dans le génome d'*E. siliculosus*.**

Les gènes sont séparés en deux catégories, ceux impliqués dans la synthèse et dégradation du glutathion, puis ceux dont l'activité est dépendante du glutathion. Le nombre de gènes correspond au nombre de loci annotés dans le génome.

	Activité	E.C.	Gènes	Locus	EST
Cycle γ-glutamyl	Glutamate cystéine ligase (GCLC)	6.3.2.2	2	Esi0184_0033	1
				Esi0250_0012	0
	Glutathion synthétase (GS)	6.3.2.3	1	Esi0066_0082	10
	Gamma-glutamyl transpeptidase (GGT)	2.3.2.2	1	Esi0014_0172	0
	Peptidase (DP)	3.4.11.2	1	Esi0366_0009	3
	5-oxo-prolinase	3.5.2.9	2	Esi0018_0028 Esi1350_0001	1 0
	Cyclotransférase	2.3.2.4	1	Esi0037_0100	0
Activité GSH-dépendante	Glutathion réductase (GR)	1.8.1.7	2	Esi0019_0176	6
				Esi0888_0002	0
	Glutathion peroxydase (GPx)	1.11.1.9	7	Esi0152_0006	17
				Esi0099_0085	9
				Esi0192_0041	6
				Esi0152_0008	4
				Esi0049_0025	3
				Esi0509_0009	2
				Esi0007_0074	0
	Glutathion S- transférase (GST)	2.5.1.18	19	Esi1076_0002	16
				Esi0199_0061	14
				Esi0019_0095	10
				Esi0048_0023	8
				Esi0017_0101	7
				Esi0047_0117	7
				Esi0648_0004	5
Esi0004_0261				5	
Esi0648_0003				4	
Esi0023_0103				4	
Esi0386_0004				3	
Esi0384_0026				0	
Esi0386_0005				0	
Esi0617_0002	0				
Esi0617_0003	0				
Esi0617_0004	0				
Esi0028_0122	0				
Esi0191_0054	0				
Esi0021_0028	0				
Glutathion S-transférase microsomale (mGST)	-	3	Esi0122_0054	9	
			Esi0122_0055	5	
			Esi0122_0061	5	
Glutathion/Ascorbate déshydrogénase (DHAR)	1.8.5.1	1	Esi0041_0089	6	
Glutarédoxine (Grx)	1.20.4.1	7	Esi0010_0089	23	
			Esi0197_0012	12	
			Esi0083_0070	10	
			Esi0395_0013	5	
			Esi0072_0054	3	
			Esi0050_0061	0	
Esi0036_0002	0				
Phytochelatine synthase (PCs)		1	Esi0399_0022	1	

Parmi les gènes qui participent à la dégradation du GSH, un seul gène de  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase (GGT) a été recensé, et aucune EST ne lui est associée. La dipeptidase membranaire (DP) est codée par un seul gène, représenté par EST. La cyclotransférase qui catalyse la formation de 5-oxoproline à partir du glutamate est aussi codée par un seul gène, sans équivalent dans les banques d'EST. Deux gènes de 5-oxoprolinase ont été identifiés. Ils partagent 39 % d'identité au niveau de leurs séquences en acides aminés, et un seul semble transcrit dans les conditions de l'étude.

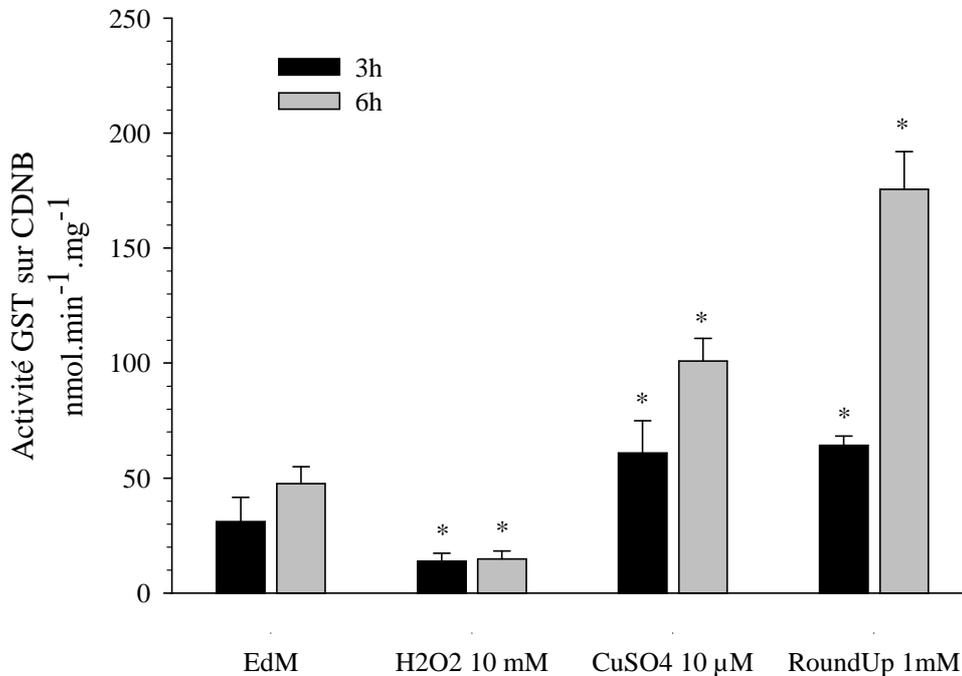
L'inventaire des gènes révèle que le nombre de loci correspondant à des enzymes dont l'activité est directement dépendante du glutathion est plus important que celui représentant les protéines qui participent à son recyclage. Ainsi, il existe deux gènes de glutathion réductases (GR) dans le génome d'*E. siliculosus*. Leurs séquences protéiques partagent 63 % d'identité, et l'un d'entre-eux est représenté par 6 EST alors que l'autre est absent des banques d'ADNc. Un gène de glutathion déhydroascorbate réductase (DHAR), auquel est associé six EST, a été identifié.

Les glutathion peroxydases comptent sept gènes dans le génome d'*Ectocarpus*, pour un total de 41 séquences dans les banques d'EST. Les protéines codées par ces gènes sont relativement divergentes et présentent des pourcentages d'identité variant de 15 à 79 %. Les gènes de glutathion S-transférases cytosoliques sont les plus abondants et totalisent 73 EST. De même, les trois GST microsomales identifiées représentent 19 EST. Les glutarédoxines sont codées par sept gènes. Leur représentation dans les banques d'EST est variable selon les gènes, suggérant que certaines sont plus essentielles que d'autres. Elles partagent de 10 à 40 % d'identité au niveau de leurs séquences en acides aminés. Un gène de phytochélatine synthase est présent dans le génome et, considérant son implication dans la réponse au stress cuivrique, il fait l'objet d'une étude plus approfondie dans le cadre de la thèse d'Andrés Ritter.

#### 1.4 L'activité enzymatique glutathion S-transférase totale varie en fonction de traitements chimiques chez *E. siliculosus*.

La synthèse du GSH, constitutive, est augmentée lors d'un traitement exogène d'*E. siliculosus* par le cuivre. De plus, parmi les gènes impliqués dans son métabolisme, 22 gènes correspondant à des glutathion S-transférases, plus ou moins représentés parmi les EST, ont été identifiés. J'ai donc choisi de mesurer l'activité enzymatique GST totale sur des échantillons d'algues ayant subi des traitements exogènes.

L'activité GST totale dans des extraits bruts peut être déterminée facilement par spectrophotométrie en utilisant le 1-chloro-2,4-dinitrobenzène (CDNB) comme substrat. Les résultats obtenus après différents traitements chimiques sont présentés dans la Figure 47.



**Figure 47: Activité GST totale dans l'extrait protéique brut d'*E. siliculosus*. L'activité GST a été déterminée en présence de CDNB.**

Les résultats présentés correspondent à la moyenne de duplicats biologiques et de quatre réplicats techniques. Les cultures ont été traitées pendant 3h et 6h avec 10 mM final de peroxyde d'hydrogène, 10 μM de sulfate de cuivre et 1mM équivalent glyphosate d'une solution commerciale de Round Up®. Les résultats sont exprimés en nmole par minute et par mg de protéines totales. Les résultats significativement différents de la condition contrôle eau de mer (EdM) sont indiqués par un astérisque (\*, p<0,05).

L'activité GST basale, c'est-à-dire dans la condition témoin (eau de mer), est relativement constante entre 3h et 6h avec 30 et 50 nmol.min<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup> respectivement. En présence de peroxyde d'hydrogène, cette activité est diminuée de moitié dès 3h et maintenue à 15 nmol.min<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup> après 6h de traitement. A l'inverse, le cuivre et le Round Up® augmentent l'activité GST. Ainsi, après 3h d'incubation, l'activité enzymatique est multipliée par deux, et atteint 100 nmol.min<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup> au bout de 6h avec le sulfate de cuivre, et 175 nmol.min<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup> dans le cas du traitement avec une solution commerciale de glyphosate formulé.

Si l'on compare l'effet des traitements sur la quantité de glutathion et sur l'activité des glutathion S-transférases, on s'aperçoit que le peroxyde d'hydrogène, le cuivre et le Round Up® ont une action différente sur l'algue, n'induisant pas les mêmes mécanismes de réponse.

En effet, l'incubation en présence de  $\text{CuSO}_4$  engendre une accumulation de glutathion intracellulaire et une augmentation de l'activité GST totale, alors que  $\text{H}_2\text{O}_2$  et Round Up® n'induisent pas de changements au niveau du glutathion et entraînent respectivement une diminution et une augmentation de l'activité GST totale. Ces données suggèrent que les mécanismes de réponse, et par conséquent la perception des stress et les processus de signalisation, sont variables selon les traitements.

Les GST sont donc impliquées dans la réponse aux différents traitements chimiques chez *E. siliculosus*. Leur caractérisation moléculaire et fonctionnelle a donc été entreprise à partir des ressources génomiques dont nous disposons pour les algues brunes.

## 2. Analyse des familles de glutathion S-transférases chez les algues brunes *L. digitata* et *E. siliculosus*.

Dans cette partie, je m'intéresserai aux GST des algues brunes *L. digitata* et *E. siliculosus*. L'appellation "glutathion S-transférases" regroupe trois familles d'enzymes qui ont été identifiées chez *Ectocarpus* et dont je vais détailler l'analyse. J'aborderai successivement la famille des GST cytosoliques, des GST microsomales, et des GST Kappa. Dans chacune de ces parties, je procéderai à un inventaire exhaustif des gènes à partir des ressources génomiques disponibles pour chacune des espèces, puis j'identifierai les plus proches homologues dans les bases de données. Je détaillerai ensuite leur structure exon-intron et leur localisation génomique. Enfin, je m'attacherai à déterminer la position des gènes de GST au sein de la classification. J'apporterai également des éléments quant à l'évolution des gènes dans le génome des algues brunes. Ce chapitre constitue donc une analyse *in silico* des ressources génomiques, puis des séquences de glutathion S-transférases identifiées.

### 2.1 Identification des GST dans les ressources génomiques de macroalgues

Les gènes de GST ont été recherchés dans les banques de données de macroalgues disponibles, par mots-clés, puis par Blast, en utilisant des séquences connues de GST. Ensuite, les différentes séquences identifiées ont servi de requête pour blaster sur la banque UniProt Knowledgebase (UniProtKB) afin d'identifier les plus proches homologues et ainsi débiter le processus de classification. Les résultats de Blast ont été considérés avec précaution car de nombreuses séquences aux fonctions mal identifiées se trouvent dans les bases de données publiques. Le premier résultat obtenu par Blast indique généralement la séquence présentant les plus fortes homologues, et l'analyse a été complétée en recherchant parmi les premiers hits la présence d'une séquence correspondant à une GST pour laquelle la classification est établie et/ou pour laquelle la fonction est caractérisée biochimiquement.

#### 2.1.1 Les GST dans les banques d'EST de *L. digitata*

Deux banques d'EST de sporophytes et de gamétophytes d'environ 500 séquences chacune (Crépineau, 2000), et une banque de 1985 séquences générées à partir de protoplastes de *L. digitata* (Roeder et al., 2005) ont été réalisées au laboratoire. Quatre gènes codant pour des glutathion S-transférases ont été identifiés dans la banque d'EST de protoplastes. Ces gènes, nommés *LdGST1*, *LdGST2*, *LdGST3* et *LdGST4*, conformément à la nomenclature proposée par Edwards et al. (2005), sont assez fortement représentés dans la banque avec

respectivement 21, 6, 4 et 10 séquences. Ces quatre séquences ne sont en revanche pas présentes dans la banque d'EST générée à partir d'algues non stressées.

Compte tenu du nombre d'EST séquencées pour ces différentes banques, il y a de fortes chances que cet inventaire ne soit pas exhaustif pour cette espèce. Les résultats de blast (i.e. l'ordre et la nature des premiers hits) sont quasiment les mêmes pour les 4 GST (Tableau 15).

**Tableau 15 : Homologues des GST cytosoliques de *L. digitata*.**

Les séquences protéiques des GST de *L. digitata* ont été comparées aux séquences de la base de données UniProtKB (SwissProt + TrEMBL) par BLASTp. Le premier hit et la première GST dont la classe est identifiée sont reportés dans ce tableau. Entre parenthèses est indiqué le pourcentage d'identité entre la séquence de *L. digitata* et la séquence identifiée par Blast.

Gène	1 <sup>er</sup> résultat de BLASTp sur UniProtKB	1 <sup>ère</sup> classe représentée
LdGST1	GST-like <i>Rhodferax ferrireducens</i> (35%)	GST Sigma <i>Solenopsis invicta</i> (29%)
LdGST2	GST-like <i>Pleisiocystis pacifica</i> (37%)	GST Sigma <i>Solenopsis invicta</i> (30 %)
LdGST3	GST-like <i>Rhodferax ferrireducens</i> (39%)	GST Sigma <i>Blatella germanica</i> (32%)
LdGST4	GST-like <i>Pleisiocystis pacifica</i> (33%)	GST Sigma <i>Bombyx mori</i> (31%)

Les meilleurs résultats par analyse Blastp sur la banque UniProtKB sont des protéines de protéobactéries annotées en tant que "glutathione S-transferase like", et présentant entre 30 et 40 % d'identité avec les séquences d'algues. La classe identifiée la plus proche est identique pour chacune des protéines d'algue: c'est la classe Sigma, représentée par des séquences identifiées chez des insectes, et les pourcentages d'identité sont de l'ordre de 30 %. Cependant, pour LdGST4, la GST d'eucaryote la plus proche est une GST de l'algue rouge *Chondrus crispus*.

### **2.1.2 Les GST dans les banques d'EST et le génome d'*E. siliculosus***

La recherche dans les banques d'EST disponibles avant la fin du séquençage du génome (septembre 2006) a permis d'identifier six GST cytosoliques, une GST de type kappa, deux GST microsomales et deux GST putatives. Ensuite, l'analyse du génome complet (novembre 2007) a révélé la présence de six autres GST cytosoliques, deux pseudogènes ( $\psi$ GST) ne contenant que la partie correspondant à l'extrémité 5' de gènes de GST cytosoliques, une GST microsomale, et trois GST putatives. Au total, le génome d'*Ectocarpus* comporte quatorze GST cytosoliques dont deux pseudogènes, trois GST microsomales, une GST Kappa et cinq GST putatives.

Les douze GST cytosoliques ont été nommées *EsGST1*, *EsGST2*, *ESGST3*, *ESGST4*, *ESGST5*, *ESGST6*, *EsGST7*, *EsGST8*, *EsGST9*, *EsGST10*, *EsGST11* et *EsGST12*. Afin de positionner ces gènes parmi les classes connues de glutathion S-transférases, des homologues ont été recherchés dans les bases de données publiques (Tableau 16).

**Tableau 16: Homologues des GST cytosoliques d'*E. siliculosus*.**

Les séquences protéiques des GST cytosoliques d'*Ectocarpus siliculosus* ont été comparées aux séquences de la base de données UniProtKB (SwissProt + TrEMBL) par BLASTp. Le premier hit et la première GST dont la classe est identifiée sont reportés dans ce tableau. Entre parenthèses est indiqué le pourcentage d'identité entre la séquence d'*E. siliculosus* et la séquence identifiée par blast.

Gène	1 <sup>er</sup> résultat de BLASTp sur UniProtKB	1 <sup>ère</sup> classe identifiée
EsGST1	GST-like <i>Rhodferax ferrireducens</i> (35%)	GST Sigma <i>Solenopsis invicta</i> (35%)
EsGST2	GST-like <i>Rhodferax ferrireducens</i> (36%)	GST Sigma <i>Ascaris suum</i> (40%)
EsGST3	GST-like <i>Rhodferax ferrireducens</i> (33%)	GST Sigma <i>Caenorhabditis elegans</i> (28%)
ESGST4	GST-like <i>Pleisiocystis pacifica</i> (34%)	GST Sigma <i>Caenorhabditis elegans</i> (29%)
EsGST5	GST-like <i>Pleisiocystis pacifica</i> (33%)	GST Sigma <i>Ommastrephes sloanei</i> (28%)
EsGST6	GST-like <i>Pleisiocystis pacifica</i> (35%)	GST Sigma <i>Caenorhabditis elegans</i> (29%)
EsGST7	GST-like <i>Pleisiocystis pacifica</i> (33%)	GST Sigma <i>Caenorhabditis elegans</i> (29%)
EsGST8	GST-like <i>Pleisiocystis pacifica</i> (33%)	GST Sigma <i>Ommastrephes sloanei</i> (27%)
EsGST9	GST-like <i>Pleisiocystis pacifica</i> (32%)	GST Sigma <i>Ommastrephes sloanei</i> (27%)
EsGST10	GST-like <i>Pleisiocystis pacifica</i> (38%)	GST Sigma <i>Solenopsis invicta</i> (35%)
EsGST11	GST-like <i>Pleisiocystis pacifica</i> (38%)	GST Sigma <i>Solenopsis invicta</i> (35%)
EsGST12	GST-like <i>Pleisiocystis pacifica</i> (39%)	GST Sigma <i>Solenopsis invicta</i> (34%)

Les douze GST cytosoliques présentent toutes des GST-like de protéobactéries comme plus proches homologues avec 32 à 39 % d'identité. De même, la classe identifiable la plus proche est la classe Sigma avec des taux d'identité variant de 27 à 40 %. De manière intéressante, la

classe Sigma n'est ici représentée que par des séquences issus de protostomiens (arthropodes, *Solenopsis invicta*, et céphalopodes, *Ommastrephes sloanei*), et de nématodes (*Ascaris suum* et *Caenorhabditis elegans*). Cependant, pour les protéines EsGST[1-9], la protéine d'eucaryote la plus proche est une GST de *Chondrus crispus*.

Les trois GST microsomaux, nommées *mEsGST1*, *mEsGST2* et *mEsGST3*, ont été comparées aux banques de données et les homologues identifiés sont reportés dans le Tableau 17.

**Tableau 17: Homologues des GST microsomaux d'*E. siliculosus*.**

Les séquences protéiques des GST microsomaux d'*E. siliculosus* ont été comparées aux séquences de la base de donnée UniProtKB (SwissProt + TrEMBL) par BLASTp. Le premier hit et la première GST dont la classe est identifiée sont reportés dans ce tableau. Entre parenthèses est indiqué le pourcentage d'identité entre la séquence d'*E. siliculosus* et la séquence identifiée par blast.

Gène	1 <sup>er</sup> résultat de Blastp sur UniProtKB	1 <sup>ère</sup> classe identifiée
mEsGST1	Protéine prédite <i>Nematostella vectensis</i> (50%)	GST microsomale 3 <i>Tigriopus japonicus</i> (41%)
mEsGST2	Protéine prédite <i>Nematostella vectensis</i> (43%)	GST microsomale 3 <i>Tigriopus japonicus</i> (40%)
mEsGST3	Protéine prédite <i>Nematostella vectensis</i> (46%)	GST microsomale 3 <i>Tigriopus japonicus</i> (39%)

Les résultats obtenus sont identiques pour les trois protéines d'algues et le plus proche homologue est une séquence prédite chez l'anémone de mer *Nematostella vectensis*. L'identité des séquences d'*Ectocarpus* avec la séquence d'anémone varie de 43 à 50 %. Ce résultat n'apporte cependant pas d'indication quant à l'appartenance des mGST d'*Ectocarpus* à une catégorie fonctionnelle donnée. La première enzyme de classe connue identifiée par blast est la glutathion S-transférase microsomale de type 3 (MGST3) du crustacée *Tigriopus japonicus* avec un taux d'identité de 40 % environ. Les meilleurs résultats de blast sont donc obtenus avec des séquences issues d'organismes marins.

Un gène codant pour une GST de type Kappa, nommé *EsGST13*, a été identifié dans le génome grâce à la recherche par mot-clé. La séquence a été comparée par Blast avec les bases de données publiques et les homologues les plus proches sont présentés dans le Tableau 18.

**Tableau 18: Homologues de la protéine EsGST13.**

Entre parenthèses est indiqué le pourcentage d'identité entre la séquence d'*E. siliculosus* et la séquence connue la plus proche.

Gène	Meilleurs résultats de Blastp sur UniProtKB
EsGST13	Protéine prédite <i>Nematostella vectensis</i> (46%)
	Glutathion S-transférase Kappa <i>Xenopus tropicalis</i> (39%)
	Glutathion S-transférase Kappa <i>Homo sapiens</i> (40%)
	Glutathion S-transférase Kappa <i>Bos taurus</i> (36%)
	Glutathion S-transférase Kappa <i>Rattus norvegicus</i> (37%)
	Glutathion S-transférase Kappa <i>Mus musculus</i> (35%)

Le meilleur résultat de blast est obtenu avec une protéine prédite chez l'anémone de mer *Nematostella vectensis* et correspond à 46 % d'identité. Les séquences suivantes sont toutes issues d'animaux, et représentent des GST appartenant à la classe Kappa. Les taux d'identité sont moyennement élevés, de 35 à 40%, mais l'homogénéité des résultats permet d'affirmer que le gène *EsGST13* appartient à la classe Kappa des glutathion S-transférases.

Au cours de l'annotation automatique du génome d'*E. siliculosus*, cinq séquences ont été annotées comme étant des glutathion S-transférases. Cependant, après une analyse plus fine de ces résultats, et en réalisant notamment des comparaisons par Blast, ces séquences n'ont pu être associées à aucune classe de GST connue. Les résultats de l'analyse par Blastp sont rapportés dans le Tableau 19.

**Tableau 19: Homologues des GST putatives d'*E. siliculosus*.**

Entre parenthèses est indiqué le pourcentage d'identité entre la séquence d'*E. siliculosus* et la séquence identifiée par blast.

Gènes	Meilleurs résultats de Blastp sur UniProtKB
Esi0047_00117	Glutathion S-transférase <i>Aurantimonas sp</i> (53%)
	Glutathion S-transférase <i>Rhodospseudomonas palustris</i> (53%)
	Glutathion S-transférase <i>Idiomarina baltica</i> (53%)
Esi0004_0261	Glutathion S-transférase <i>Cyanothece sp</i> (36%)
	Glutathion S-transférase <i>Anabaena variabilis</i> (28 %)
	Glutathion S-transférase <i>Nostoc punctiforme</i> (27%)
Esi0019_0095	Glutathion S-transférase <i>Acaryochloris marina</i> (40%)
	Glutathion S-transférase <i>Cyanothece sp</i> (41%)
	Glutathion S-transférase <i>Nostoc punctiforme</i> (41%)
Esi0023_0103	Glutathion S-transférase <i>Ostreococcus tauri</i> (49%)
	Protéine prédite <i>Ostreococcus lucimarinus</i> (40%)
	Glutathion S-transférase <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> (38%)
Esi0017_0101	Glutathion S-transférase <i>Ostreococcus tauri</i> (49%)
	Glutathion S-transférase <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> (46%)
	Protéine prédite <i>Ostreococcus lucimarinus</i> (47%)

La protéine codée par le locus *Esi0047\_00117* présente 53 % d'identité avec des GST putatives de protéobactéries. Ce résultat ressemble à celui obtenu pour les GST cytosoliques, mais aucune GST de classe connue n'est identifiable dans les résultats de Blastp. Les protéines *Esi0004\_0261* et *Esi0019\_0095* présentent de 27 à 41 % d'identité avec des séquences de cyanobactéries annotées comme GST. Les protéines *Esi0023\_0103* et *Esi0017\_0101* présentent de 38 à 49 % d'homologies avec des séquences de microalgues vertes annotées en tant que GST putatives.

### 2.1.3 Analyse d'autres banques de macroalgues

Les gènes identifiés codant pour des glutathion S-transférases chez *L. digitata* et *E. siliculosus* ont été utilisés pour rechercher des homologues dans les autres banques d'algues multicellulaires. Ainsi, pour les algues brunes, une séquence de GST cytosolique nommée SbGST2 a été identifiée dans une banque d'EST de *Sargassum binderi*, deux séquences nommées FsGST1 et FsGST2 ont été trouvées dans une banque d'EST de *Fucus serratus*, et une séquence nommée FvGST1 dans une banque d'EST de *Fucus vesiculosus*. Chez les algues rouges, *Gracilaria changii* et *Gracilaria tenuistipitata*, trois GST cytosoliques nommées respectivement GcGST1, GtGST1 et GtGST2 ont été identifiées. Aucune GST microsomale n'a été repérée dans ces bases de données. En revanche, l'algue rouge *Chondrus crispus* possède au moins deux GST microsomales (mCcGST1 et mCcGST2), en plus de ses trois GST cytosoliques (CcGST1, CcGST2, CcGST3). Aucune GST de type Kappa n'a été isolée dans les banques d'EST de macroalgues, à l'exception d'*Ectocarpus*. Les séquences identifiées dans ces espèces d'algues seront considérées pour améliorer l'analyse phylogénique et établir des hypothèses sur l'histoire évolutive des GST.

### 2.1.4 Récapitulatif des séquences de GST identifiées chez *L. digitata* et *E. siliculosus*

La recherche des homologues dans les bases de données ne constitue qu'une étape de l'annotation des gènes. Cela a permis en général d'obtenir des pistes quant à la classification. L'analyse des séquences est indispensable pour compléter ces premières observations. Déterminer la structure exons-introns des gènes, la taille des protéines codées, et rechercher les motifs conservés est nécessaire pour caractériser rigoureusement ces séquences. Le Tableau 20 est un récapitulatif exhaustif des séquences identifiées chez les deux algues brunes étudiées au laboratoire et il renseigne également sur les caractéristiques de chacune d'elles.

Les cadres ouverts de lecture des gènes *LdGST1*, *LdGST2*, *LdGST3* et *LdGST4* sont de 618, 639, 621 et 606 pb, codant respectivement pour des protéines de 205, 212, 206 et 201 aa. Chez *E. siliculosus*, parmi les douze gènes de GST cytosoliques, seuls six sont représentés dans les banques d'EST: *EsGST1*, *EsGST2*, *EsGST3*, *EsGST4*, *EsGST9* et *EsGST10*, par respectivement 16, 14, 3, 3, 2 et 4 EST. Ainsi, la moitié des gènes de GST cytosoliques est absente dans les banques ESTs. De plus, deux pseudogènes, notés  $\psi$ GST, ont été identifiés dans le génome. Ces séquences sont incomplètes et présentent un codon stop très en amont par rapport aux autres séquences. Leurs traductions génèrent des protéines très proches des GST cytosoliques mais tronquées en C-terminal, qui ne peuvent pas constituer des protéines fonctionnelles.

**Tableau 20: Inventaire des différentes familles de GST chez *L. digitata* et *E. siliculosus*.**

Organisme et famille <sup>a</sup>	Nom <sup>b</sup>	Locus <sup>c</sup>	EST	Gène (pb) <sup>d</sup>	ORF (pb) <sup>e</sup>	Protéine (aa) <sup>f</sup>
<b><i>L. digitata</i></b>						
Cytosoliques	<i>LdGST1</i>		21	618	618	205
	<i>LdGST2</i>		4	639	639	212
	<i>LdGST3</i>		6	621	621	206
	<i>LdGST4</i>		10	n.r.	606	201
<b><i>E. siliculosus</i></b>						
Cytosoliques	<i>EsGST1</i>	Esi0384_0026 Esi1076_0002	16	n.r.	618	205
	<i>EsGST2</i>	Esi0199_0061	14	3590	705	234
	<i>EsGST3</i>	Esi0648_0003	3	5910	606	201
	<i>EsGST4</i>	Esi0386_0004	3	2706	606	201
	<i>EsGST5</i>	Esi0386_0005	0	3122	606	201
	<i>EsGST6</i>	Esi0617_0003	0	2894	606	201
	<i>EsGST7</i>	Esi0617_0004	0	2851	606	201
	$\psi$ <i>GST</i>	Esi0617_0002	0	1258	360	120
	<i>EsGST8</i>	Esi0648_0004	0	3289	606	201
	<i>EsGST9</i>	Esi0648_0004	2	3360	687	228
	<i>EsGST10</i>	Esi0028 <sup>g</sup>	4	n.r.	621	206
	<i>EsGST11</i>	Esi0028_0122	0	3144	624	207
	<i>EsGST12</i>	Esi0191_0054	0	3805	621	206
	$\psi$ <i>GST</i>	Esi0021_0028	0	689	133	44
Kappa	<i>EsGST13</i>	Esi0048_0023	2	5482	738	245
Microsomales	<i>mEsGST1</i>	Esi0122_0060 Esi0122_0061	5	5096	426	141
	<i>mEsGST2</i>	Esi0122_0054	9	2821	429	142
	<i>mEsGST3</i>	Esi0122_0055	5	2221	426	141
GST putatives	bactéries	Esi0047_0117	7	5482	873	290
	cyanobactéries	Esi0004_0261	5	4505	888	295
		Esi0019_0095	10	7174	1344	447
		Esi0023_0103	4	15340	1443	480
microalgues	Esi0017_0101	7	2587	1452	483	

<sup>a</sup> Les GST ont été assignées à une famille sur la base des résultats de blast. <sup>b</sup> Le nom des gènes a été attribué conformément à la nomenclature proposée par Edwards et al. (2000). <sup>c</sup> Le nom des loci doit être lu de la façon suivante: les trois lettres Esi désigne *Ectocarpus siliculosus*, les quatre premiers chiffres indiquent le nom du supercontig génomique et les quatre derniers chiffres après le tiret bas représentent le locus sur le supercontig. <sup>d,e</sup> La taille des gènes exprimées en paires de bases est calculée du codon d'initiation au codon stop dans les séquences d'ADN génomique (Gène) ou d'ADN complémentaire (ORF). <sup>f</sup> La taille des protéines est déduite de la traduction des séquences codantes. <sup>g</sup> Aucun locus n'a été assigné pour *EsGST10* dans la première version de la prédiction automatique des séquences codantes, et sa localisation a été établie manuellement. L'abréviation "n.r" signifie "non renseigné".

La taille des séquences génomiques des GST cytosoliques est différente de la taille des séquences codantes, indiquant la présence d'introns. La taille des gènes est variable, de 2851 pb à 5910 pb. La taille des séquences codantes est également variable, de 606 à 705 pb. Les gènes *EsGST3*, *EsGST4*, *EsGST5*, *EsGST6*, *EsGST7* et *EsGST8* mesurent tous 606 pb, codant pour des protéines de 201 aa. Pour les autres GST cytosoliques, la taille des protéines est légèrement supérieure, de 205 à 207 aa, exception faite des protéines *EsGST2* et *EsGST9* avec respectivement 234 et 228 aa. La taille généralement attendue pour les GST cytosoliques est de 190 à 250 aa.

Le gène *EsGST13* code pour une protéine de 245 aa appartenant à la classe Kappa. Ce gène est représenté par deux séquences dans les banques d'EST.

Les GST microsomales, notées mEsGST[1-3], sont toutes représentées dans les banques d'EST, et la taille des gènes varie entre 2221 et 5096 pb, pour des protéines d'environ 140 aa, ce qui est comparable aux GST microsomales des autres organismes.

Les GST putatives annotées à partir d'homologies avec des séquences définies comme glutathion S-transférases chez des bactéries, des cyanobactéries et des microalgues, n'ont pas été renommées car la fonction GST de ces homologues n'a pas été démontrée, notamment par des études fonctionnelles. La présence de telles séquences dans la séquence du génome d'*Ectocarpus* aurait pu être attribuée à de la contamination (notamment bactérienne) dans l'ADN qui a été séquencé. Cependant, les cinq gènes sont représentés dans les banques d'EST. De plus, la taille des gènes, comprise entre 2587 et 15340 pb, est différente de la taille des séquences codantes, variant de 873 à 1452 pb, ce qui indique la présence d'introns et rend donc caduque l'origine d'une contamination bactérienne de ces gènes, qui appartiennent donc au génome d'*E. siliculosus*. Pour les gènes portés par les loci *Esi0023\_0103* et *Esi0017\_0101*, la recherche de peptides signaux par le logiciel Hectar (Gschloessl et al., 2008) dans les séquences protéiques correspondantes semble indiquer qu'elles sont chloroplastiques. Enfin, la taille des cinq protéines codées par ces gènes est très largement supérieure à celle de GST classiques. Pour cette raison, leur caractérisation n'a pas été réalisée au cours de mon travail de thèse.

### 3. Caractérisation des GST cytosoliques

---

#### 3.1 Identité des séquences protéiques

Comme nous l'avons vu en introduction, on considère que deux séquences protéiques de GST appartiennent à la même classe si elles partagent plus de 40 % d'identité, et moins de 25 % discriminent deux classes. J'ai donc cherché à savoir si toutes les GST identifiées chez *L. digitata* et *Ectocarpus* appartenait à la même classe. Pour cela, j'ai calculé les pourcentages d'identité entre toutes les séquences et j'ai recherché les groupes de gènes partageant plus de 40 % d'identité. Les résultats sont présentés dans le Tableau 21.

Un premier groupe, nommé A, est constitué de sept protéines d'*Ectocarpus*, EsGST3, EsGST4, EsGST5, EsGST6, EsGST7, EsGST8, EsGST9, et d'une protéine de *Laminaria*, LdGST4. Les séquences de ce groupe partagent des taux d'identité variant de 45 à 99 %. Ces GST appartiennent donc théoriquement à la même classe. Certaines GST d'*Ectocarpus* partagent d'ailleurs des taux d'identité très forts. Ainsi, les protéines EsGST4, EsGST5, EsGST6 et EsGST7 partagent plus de 95 % d'identité et il existe seulement 0,5 % de divergence entre les protéines EsGST6 et EsGST7. Dans ce groupe, la protéine la plus divergente est celle de *L. digitata* qui partage entre 40 et 60 % d'identité avec les protéines d'*Ectocarpus*. Toutes les protéines ont une taille de 201 acides aminés, à l'exception de la protéine EsGST9 qui est plus longue (228 aa) (Tableau 20).

Un deuxième groupe, nommé B, est constitué de quatre protéines d'*Ectocarpus*, EsGST1, EsGST10, EsGST11 et EsGST12, et de trois protéines de *Laminaria*, LdGST1, LdGST2 et LdGST3. Les séquences de ce groupe partagent 40 à 93 % d'identité. Théoriquement, ce groupe définit également une nouvelle classe de GST. Les plus forts taux sont obtenus entre des séquences d'*E. siliculosus*. Ainsi les protéines EsGST10, EsGST11 et EsGST12 présentent entre 86 % et 93 % d'identité. Les protéines LdGST1 et LdGST2 partagent 58 % d'identité entre-elles, et de 52 à 57 % avec les protéines d'*E. siliculosus*. En revanche, EsGST1 et LdGST3 sont les protéines les plus divergentes de ce groupe B. Elles présentent moins de 50 % d'identité avec le reste du groupe, mais partagent plus de 67 % d'identité entre-elles. De plus la protéine LdGST4, attribuée au groupe A, présente une valeur limite de 40 % avec EsGST1 du groupe B.

**Tableau 21: Pourcentages d'identité et de similarité entre les GST cytosoliques d'*E. siliculosus* et *L. digitata*.**

Les pourcentages ont été calculés par le logiciel MatGat 2.0. Les valeurs surlignées en rouge sont supérieures à 40 %, seuil à partir duquel les séquences appartiennent à la même classe.

	EsGST1	EsGST2	EsGST3	EsGST4	EsGST5	EsGST6	EsGST7	EsGST8	EsGST9	EsGST10	EsGST11	EsGST12	LdGST1	LdGST2	LdGST3	LdGST4
EsGST1		38,3	38,2	35,1	34,1	35,3	34,6	37,3	32,3	<b>42</b>	<b>40,9</b>	<b>41,1</b>	<b>46,1</b>	<b>49,5</b>	<b>67,5</b>	40,4
EsGST2	55,6		30,8	29,5	28,3	29,5	29,1	30,8	31,2	33,3	33,6	35,5	38,3	36,3	34,5	28,8
EsGST3	52,7	47,4		<b>85,1</b>	<b>84,1</b>	<b>85,1</b>	<b>85,6</b>	<b>79,6</b>	<b>67,5</b>	33	31,5	31,6	29	31,3	33,5	<b>56,6</b>
EsGST4	51,7	44,9	91,5		<b>95,5</b>	<b>96,5</b>	<b>97</b>	<b>90,5</b>	<b>76,3</b>	30,7	31	27,9	29,5	32,2	31,8	<b>59,5</b>
EsGST5	50,7	44,4	90,5	98		<b>95</b>	<b>95,5</b>	<b>88,6</b>	<b>74,6</b>	28,4	28,7	27,9	28,5	30,5	30,8	<b>57,6</b>
EsGST6	50,7	45,3	91,5	98	97		<b>99,5</b>	<b>89,6</b>	<b>75,4</b>	28,4	28,7	27,9	30	32,7	30,6	<b>59,5</b>
EsGST7	51,7	44,9	92	98,5	97,5	99,5		<b>90</b>	<b>75,9</b>	30,1	28,7	27,9	30	32,2	31,3	<b>59</b>
EsGST8	53,7	45,7	89,1	94,5	93	93,5	94		<b>84,6</b>	28,4	29,2	27,9	29,5	33,2	31,7	<b>55,6</b>
EsGST9	47,8	47,4	75,9	80,7	79,4	79,8	80,3	85,5		25,3	26,1	24,9	28,6	32,2	27,8	<b>45,7</b>
EsGST10	64,6	52,1	50,5	49,5	49	49,5	50	47,1	43,4		<b>87,4</b>	<b>93,7</b>	<b>57</b>	<b>52,8</b>	<b>45,2</b>	30,3
EsGST11	62,3	52,6	50,7	49,8	48,8	49,3	48,8	46,9	43,4	93,7		<b>86</b>	<b>57,2</b>	<b>52,6</b>	<b>44</b>	30,1
EsGST12	63,6	53,4	50	49	49,5	50	49,5	47,6	43,9	99	92,8		<b>57,5</b>	<b>52,8</b>	<b>44,7</b>	29,3
LdGST1	65,9	57,7	50,2	48,8	47,3	49,3	49,3	46,8	43,9	73,8	72,9	75,2		<b>58,5</b>	<b>47,8</b>	38,2
LdGST2	65,6	55,1	51,9	48,6	47,2	49,1	49,1	49,1	47,8	71,2	70,8	72,6	75,5		<b>48,4</b>	33,6
LdGST3	84	53,8	52,9	50	48,5	49	50	47,6	43	65	65,2	64,6	66,5	65,6		34,6
LdGST4	57,6	49,1	75,1	75,1	74,1	74,1	74,1	70,1	58,3	50	51,7	51,5	56,6	50	54,4	

similarité

Identité

La protéine EsGST2 partage de 28 à 38 % d'identité avec les autres séquences. Sur la base de l'identité de séquence, on ne peut donc pas l'affilier à l'un ou l'autre des 2 groupes, bien qu'elle semble plus proche du groupe B (de 33 à 38 %).

Les pourcentages d'identité de séquences entre les groupes A et B varient de 25 à 33 %. La séparation des deux groupes en deux classes distinctes est donc envisageable.

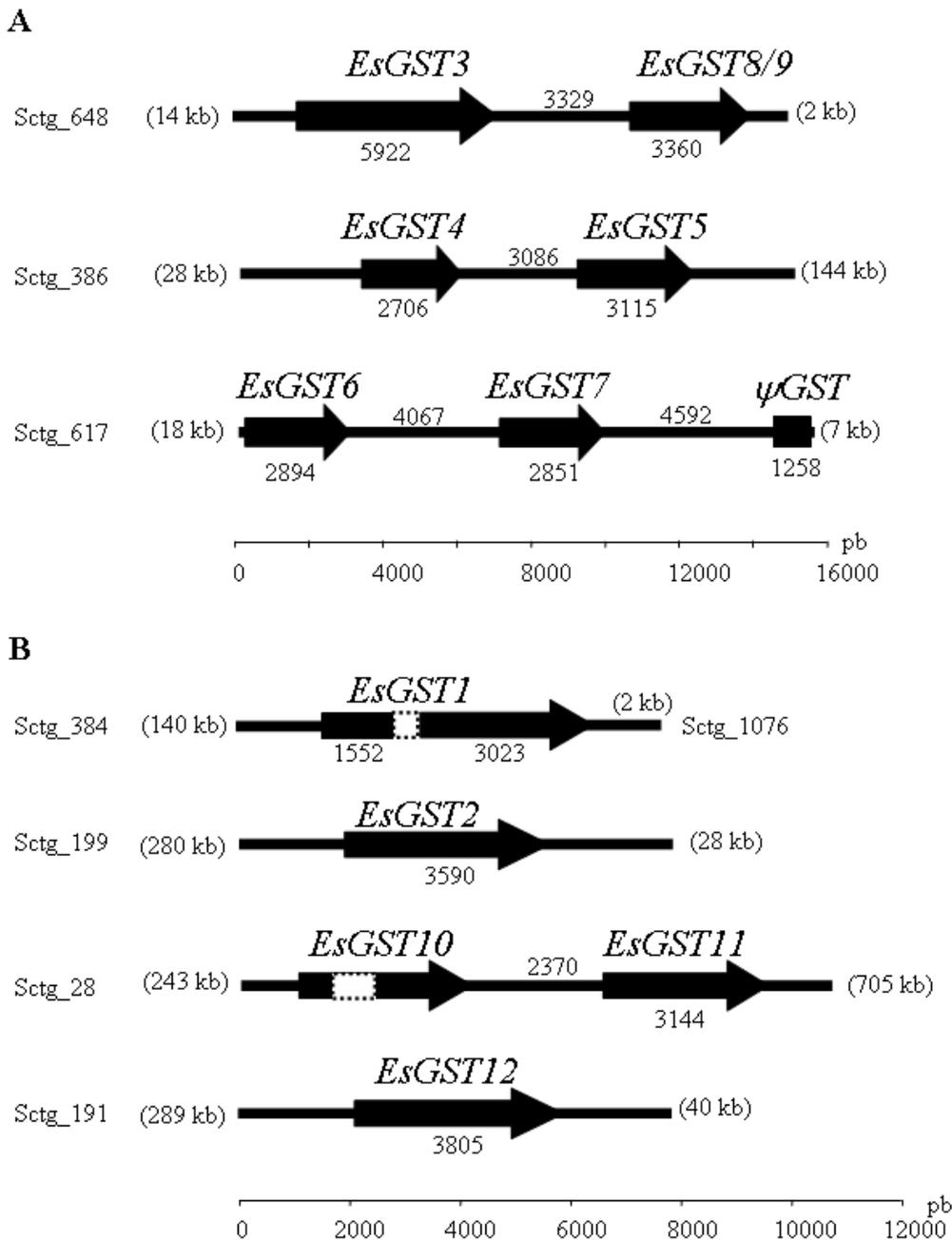
### 3.2 Localisation génomique

Ne disposant pas de la séquence génomique de *L. digitata*, la localisation génomique ne concerne que les GST d'*Ectocarpus*. En réalisant des alignements entre les EST et les séquences génomiques, j'ai positionné les différents gènes sur les supercontigs génomiques. Les résultats présentés tiennent compte des groupes A et B précédemment identifiés (Figure 48).

Les 6 gènes du groupe A sont répartis sur trois supercontigs génomiques. Dans chaque cas, ils sont organisés en tandem et orientés dans le même sens. Les gènes *EsGST8* et *EsGST9* sont localisés au même locus, Esi0648\_0004, indiquant un cas d'épissage alternatif (cf. page 149). *EsGST3* et *EsGST8/9* sont localisés sur le supercontig sctg\_648 et sont séparés par une région intergénique de 3329 pb. De même, *EsGST4* et *EsGST5* sont localisés sur le supercontig sctg\_386, et sont séparés par 3086 pb. Enfin, *EsGST6*, *EsGST7*, et l'un des pseudogènes sont localisés sur sctg\_617 et les régions intergéniques sont de 4067 pb entre *EsGST6* et *EsGST7* et 4592 pb entre *EsGST7* et  $\psi$ GST.

Le gène *EsGST2*, non affilié à l'un des deux groupes, a tout de même été inclus dans le groupe B dont il semble le plus proche. Les cinq gènes d'*Ectocarpus* de ce groupe sont plus dispersés que le groupe A et sont portés par quatre supercontigs. Le gène *EsGST1*, représenté par 16 EST, est localisé aux extrémités de deux supercontig non chevauchants, sctg\_384 pour la partie 5' et sctg\_1076 pour la partie 3'. Ce gène correspond à deux loci prédits par l'annotation automatique (Tableau 20), mais les séquences codantes de ceux-ci sont erronées avec, sur le sctg\_384, un codon stop prématuré, et sur sctg\_1076, un codon d'initiation aberrant. La taille exacte du gène n'a pas pu être déterminée, mais il a permis de joindre physiquement deux supercontigs génomiques. Les gènes *EsGST12* et *EsGST2* sont les seuls gènes de GST sur leur supercontig respectifs. Les gènes *EsGST10* et *EsGST11* sont localisés sur le supercontig sctg\_28. Ils sont en tandem dans la même orientation. La région intergénique les séparant est de 2370 pb.

Le gène *EsGST10*, présent dans les banques d'EST, n'a pas été défini lors de la première prédiction automatique des cadres ouverts de lecture dans le génome. Ceci est dû à la présence d'une zone formée par la succession de 781 N (bases non identifiées), au milieu de la séquence du supercontig 28, et qui masque un des exons du gène. Cependant, par des alignements entre les séquences EST et les séquences génomiques, j'ai pu localiser ce gène dans le génome et l'assigner au sctg\_28.



**Figure 48: Organisation génomique des GST cytosoliques d'*E. siliculosus*.**

(A) GST cytosoliques du groupe A, (B) GST cytosoliques du groupe B. Le nom des supercontigs est indiqué à gauche. Seule une partie de chaque supercontig supportant les gènes de GST est représentée, et la taille des régions situées en amont et aval de ces gènes est donnée entre parenthèses. Les gènes sont représentés par des flèches noires, leur taille depuis le codon d'initiation jusqu'au codon de terminaison de la traduction est indiquée

en pb en dessous. La longueur des régions intergéniques est indiquée au dessus des séquences. Les lignes en pointillés pour *EsGST1* et *EsGST10* correspondent à des zones dont la séquence n'est pas connue.

### 3.3 Structure des gènes

La structure d'un gène se caractérise par le nombre, la position et la taille des exons et des introns dans la séquence nucléotidique. Elle a été déterminée en alignant la séquence d'ADN complémentaire, uniquement composée des exons, avec la séquence d'ADN génomique, présentant exons et introns. D'une manière générale, il est admis que les GST d'une même classe ont la même structure génique.

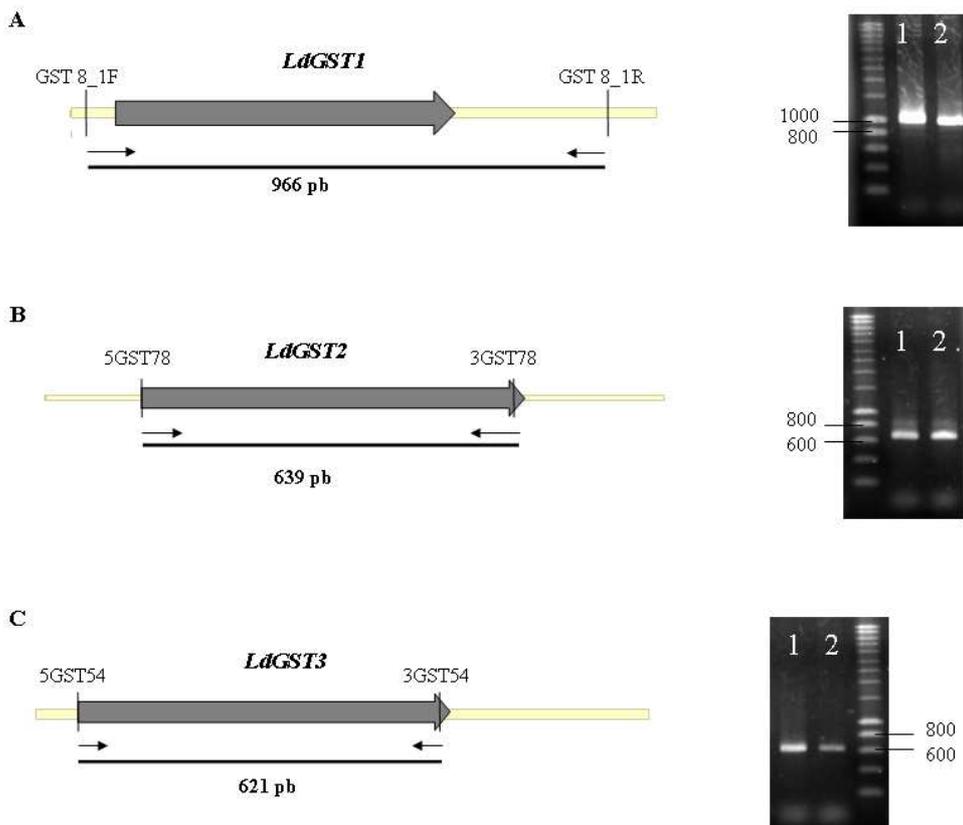
#### 3.3.1 LdGST

Dans le cas de *L. digitata*, les séquences génomiques n'étaient pas connues. Par conséquent, j'ai d'abord cherché à amplifier les fragments génomiques en utilisant des couples d'amorces spécifiques bordant les séquences codantes de chacun des quatre gènes. Les résultats des PCR pour les gènes *LdGST1*, *LdGST2* et *LdGST3* sont présentés Figure 49. Puis les séquences de ces amplicons ont été alignées avec celles déduites de la banque de protoplastes. L'ensemble de ces résultats montre qu'il n'y a pas d'introns dans *LdGST[1-3]*.

Par contre, la séquence complète du gène *LdGST4* n'a pas pu être obtenue à partir d'ADN génomique par cette approche à cause de la présence d'introns de grande taille. J'ai donc utilisé d'autres amorces pour générer des fragments plus courts et ainsi positionner les introns (Figure 50). La séquence d'ADN comprise entre les oligonucléotides GST19\_1F et GST19\_1R (Figure 50-gel n°5) a été amplifiée à partir d'ADNc. En revanche, la séquence correspondante n'a pas été amplifiée à partir d'ADN génomique malgré des modifications du programme de PCR. Ceci indique la présence d'intron(s) de grande taille, en tout cas dont la longueur est incompatible sans doute avec les capacités de polymérisation de l'enzyme utilisée. De même, la séquence comprise entre les oligonucléotides GST19\_1F et GST19\_PCRq\_1R (fragment 1) est supposée contenir un intron. Celle comprise entre les oligonucléotides 19GST1 et 19GST2 (fragment 3) a été amplifiée en présence d'ADNc et d'ADNg, et la taille des amplicons produits est différente. Cette séquence, qui comporte donc un intron, a été clonée et séquencée; l'intron mesure 633 pb, il commence par GT et se termine par AG. La région comprise entre les oligonucléotides 19GST1 et GST19\_1R mesure 345 pb pour l'ADNc et environ 2100 pb pour l'ADN génomique. Cette région comporte l'intron de 633 pb précédemment décrit ainsi qu'un autre intron d'environ 1100 pb. Celle comprise entre les oligonucléotides utilisés pour les expériences de PCR quantitative

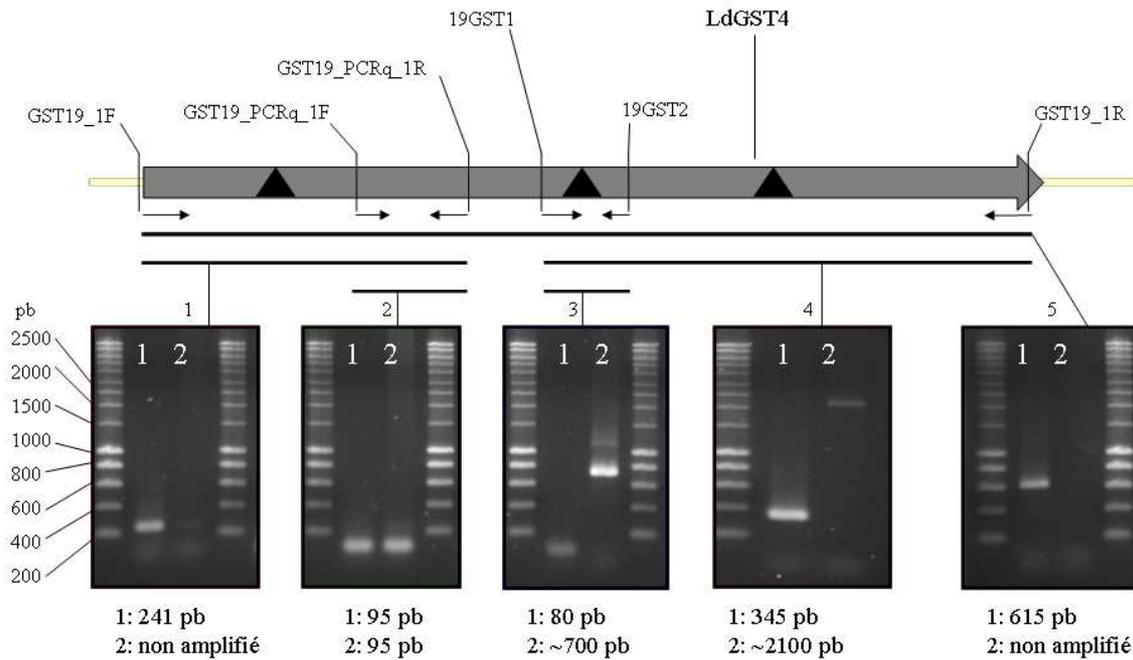
(fragment 2) ne comporte pas d'intron. Ainsi, le gène *LdGST4* contient au moins 3 introns dont la position exacte n'a pas pu être clairement identifiée.

Pour compléter ces résultats, et afin de déterminer le nombre de copie de chacun des gènes de GST chez *L. digitata*, j'ai réalisé plusieurs Southern blot en utilisant des sondes spécifiques de chacun des gènes. Cependant, aucun signal n'a pu être détecté sur les membranes contenant l'ADN génomique digéré (résultats non montrés).



**Figure 49: Structure des gènes *LdGST1* (A), *LdGST2* (B) et *LdGST3* (C).**

La structure des gènes a été déterminée en comparant la longueur des fragments amplifiés à partir d'ADNc (puits 1) et à partir d'une matrice d'ADN génomique (puits 2). Les différents fragments ont ensuite été séquencés.



**Figure 50: Structure du gène LdGST4.**

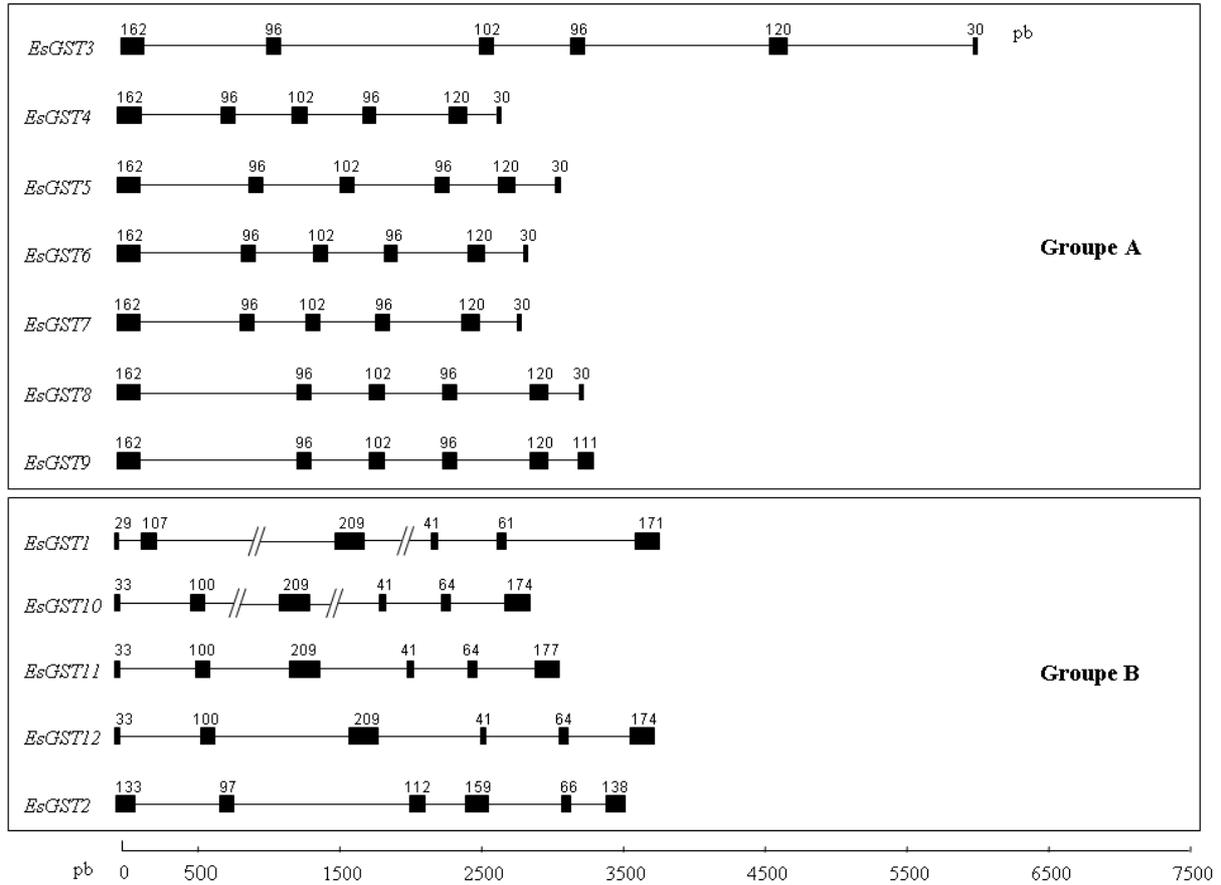
La position des introns (triangles noirs) a été déterminée en comparant la longueur des fragments amplifiés en présence d'ADNc (puits 1) et d'ADN génomique (puits 2).

### 3.3.2 EsGST

Pour *E. siliculosus*, la comparaison a pu être réalisée directement à partir des ressources génomiques disponibles. La structure des gènes de GST cytosoliques est détaillée dans la Figure 51.

Tous les introns identifiés font apparaître les mêmes sites d'épissages en 5' et 3'. Ils commencent tous par GT et se terminent tous par AG. Cette règle, confirmée pour d'autres gènes d'*E. siliculosus*, a été utilisée dans certains cas lorsque les alignements entre séquences ADNg et ADNc n'étaient pas corrects. Ce fut le cas pour les gènes *EsGST5*, *EsGST6* et *EsGST7*, qui n'ont pas de séquences correspondantes dans les banques d'EST, et dont la structure a été résolue avec la séquence la plus proche, *EsGST4*. Chacune des structures a ensuite été validée par la traduction des exons théoriques identifiés.

Le nombre d'introns dans la séquence codante est identique dans tous les gènes de GST cytosoliques d'*Ectocarpus*. Les gènes *EsGST[1-12]* comportent 6 exons et 5 introns. La taille des introns est très variable d'un gène à l'autre, et la taille des exons confirme l'existence des groupes A et B.



**Figure 51: Structure des gènes de GST cytosoliques d'*E. siliculosus*.**

Les exons sont représentés par des rectangles noirs et les introns par des lignes. La taille en pb est indiquée au-dessus des exons. L'échelle est conservée pour les exons et les introns. Les lignes parallèles positionnées dans les introns 2 et 3 des gènes *EsGST1* et *EsGST10* correspondent aux introns dont la longueur n'a pas pu être déterminée avec précision.

Ainsi, les gènes *EsGST[3-9]*, appartenant au groupe A, forment un cluster dans lequel la taille des exons est strictement conservée. Les 6 exons mesurent respectivement 162, 96, 102, 96, 120 et 30 pb. Seul le gène *EsGST9* présente une variation dans la taille du dernier exon, qui mesure 111 pb. Cette variation est due à une modification du site d'épissage du dernier intron (cf p.148).

De même, les gènes *EsGST[10-12]*, appartenant au groupe B, présentent une structure génique très conservée. Les six exons mesurent respectivement 33, 100, 209, 41, 61 et 174 ou 177 pb. *EsGST1* présentent de faibles variations et les six exons mesurent 29, 107, 209, 41, 61 et 171 pb.

Le cas d'*EsGST2* est très intéressant car sa structure permet de l'assigner au groupe B. En effet, le premier exon de ce gène a exactement la même taille (133 pb) que la fusion de l'exon 1 (33 pb) et de l'exon 2 (100 pb) des autres gènes du groupe B. De même, l'addition des exons

2 (97 pb) et 3 (112 pb) du gène *EsGST2* donne une taille identique à celle de l'exon 3 (209 pb) des gènes du même groupe. La protéine EsGST2 présente moins de 40 % d'identité avec les autres membres du groupe B, mais la structure du gène suggère son appartenance à ce groupe. Ce résultat est encore plus frappant lorsque l'on observe la position des introns par rapport à un alignement des séquences protéiques (Figure 52). Ainsi, l'intron 1 du gène *EsGST2* est localisé précisément au même endroit que l'intron 2 des autres séquences du groupe B. De plus, l'intron 3 d'*EsGST2* est localisé au même endroit que l'intron 3 des autres séquences. Les exons 4, 5 et 6 sont quant à eux très divergents en séquence et en structure.

De manière remarquable, la position des introns par rapport à la séquence protéique chez la GST Sigma de souris (MmPGDS) est identique à la position de certains introns dans les séquences du groupe B et de l'intron identifié dans LdGST4. Ainsi, l'intron 2 de la séquence murine et l'intron 2 des GST du groupe B sont localisés à la même position. L'intron 3 du gène de souris présente une position comparable à celle de l'intron 2 d'*EsGST2*. L'intron 4 de la séquence de souris présente la même position que l'intron 3 du groupe B et la position du dernier exon de la séquence murine est identique à celle du dernier exon du groupe B.

**Figure 52: Alignement des GST cytosoliques et localisation des introns.**

Les résidus surlignés blanc sur fond gris sont conservés. La position des introns par rapport aux séquences protéiques est surlignée en rouge. Lorsque l'intron est localisé entre deux codons, les deux acides aminés sont surlignés. Lorsque l'intron est situé entre deux nucléotides d'un codon, seul ce dernier est surligné. La position des introns de la GST Sigma de souris décrite par Kanaoka et al. (2000) est la première séquence de l'alignement. Pour ce gène, le premier intron est localisé en dehors de la séquence codante.

	1	60
MmPGDS	(1)	--MPNYKLLYFNMRGRAEIRYIYFAYLDIKYEDHRIEQADWPKIKPILPFGKIFVLEVG
LdGST1	(1)	--MGPKLILSYVDIPALGEPRLALAMSGQAWEDKRVSKKEEFMAIKPSLPLYNQLETLEVG
LdGST2	(1)	MAPTTSLLTYRDFAGPAEPVVMALAMTGPQWEDKRVSFSEFPALKPGLPNGQLFVLEVG
LdGST3	(1)	--MAPKLVLTFRDIPGAAEPIRWALEQSGQEWEDKRLTGEEFGVVKPSLPLNGQLFVLEVD
EsGST1	(1)	--MAPKLILTYRDMAGAAEPVWRWALEKGGLEWEDKRLTREEFGALKPGLPNGQLFVLSVD
EsGST10	(1)	---MAPMKLTYRFEFAALGEPRLALALAQSGVEWIDNRLPSEEWPTLKPILPYQQMFLVLEVD
EsGST12	(1)	---MAPMKLTYRFEFAALGEPRLALALAQSGVEWIDNRPVSEQWPTLKPILPYQQMFLVLEVD
EsGST11	(1)	---MAPMKLTYRDIFAALGEQLRLALALAQSGVEWIDNRVTFEEWPTLKPILPYQQMFLVLEVD
EsGST2	(1)	---MSSITLTYRFDIPGPABAIRLAFYVGGIPFKORRVSQRQEFAKIKRDLPFAQLFILTVD
EsGST3	(1)	---MSSPTLNYRFLPGRAEATRVALAYAGKEFDDKRLTFPEYGACKWAGK--GLEVLQMD
EsGST4	(1)	---MPSTATLNYRGLPGRGEATRVALAYAGKDFEDNRMGFPEYGACKWAGK--GLEVLQMD
EsGST5	(1)	---MPSTATLHYRGLPGRGEATRVALAYAGKDFVNTMGFPEYGACKWAGK--GLEVLQMD
EsGST6	(1)	---MPSTATLNYRGLPGRGEATRVALAYAGKDFEDNRMGFPEYGACKWAGK--GLEVLQMD
EsGST7	(1)	---MPSTATLNYRGLPGRGEATRVALAYAGKDFEDNRMGFPEYGACKWAGK--GLEVLQMD
EsGST8	(1)	---MPSTATLHYRDDPGRAEATRVALAYAGKDFEDNIMGFPEYGACKWAGI--GLEVLQMD
EsGST9	(1)	---MPSTATLHYRDDPGRAEATRVALAYAGKDFEDNIMGFPEYGACKWAGI--GLEVLQMD
LdGST4	(1)	----MPAVFNRYRGI PARGBATRVALAVAGVDYEDKRMSFEEFGACEFKT----LQVYQMD
	61	120
MmPGDS	(58)	GLTIHCSLAIAARYLTKNTELAGKTALEQCQADAVVDTLDDFMS-LFPWAEKG-QDLKERM
LdGST1	(59)	GTLIPCSLAQMRYIGKIGGLYSEDPIEAFADAAMEAVIDMHFHLRPTVHEQDPAKKLEM
LdGST2	(61)	GKVLPCSGAQLRYVGGKLAGLYPEDALEALADAAVDSVGDNHNKMLAPTQQKDKVQMEM
LdGST3	(59)	GYTLPCSMTILRYVGGKLGGLHPSDDLEAAKCAVLDAAVDIFYINVRPAYTEKDQAKQLEM
EsGST1	(59)	GFELACSMAILRYVGGKLGGLYPSDDLAAAKCATMDCATDYYINIRPSFMEKDEAKKMEM
EsGST10	(58)	GAVIPC SLAILRYVGGKMGDFYPTDPIQAAFASATDAVSDIHGYMRGIFLEKDADAKAQL
EsGST12	(58)	GAVIPC SLAILRYVGGKIGNLYPTDPIQAAFASATDAVSDIQGYMRGIFLEKDADAKAQL
EsGST11	(58)	GAVIPC TFAILRYVGGKMGDLYPTDPIQAAFASATDAVNDMHGHRMRAIFFEKDADAKTQL
EsGST2	(58)	DEVFPCSAAILRYAGKIGGLYPSDPIAAAKVAVIDCMFDIQAAIRPSIYETNAQRKLSM
EsGST3	(57)	GAEYTCSTALLRYAGKLGGLYPDDALAALKVDEIVMIGEDILANMFKCMGAEDDTVAKGV
EsGST4	(57)	DAEYTCSTALLRYAGKLGGLYPDDALAALKVDEIVMIAEDVLTNMFKCMGQEDDTVAKGL
EsGST5	(57)	DAEYFCSTALLRYAGKLGGLYPDDALAALKVDEIVMIAEDVLTNMFKCMGQKDDTVAKGV
EsGST6	(57)	DAEYTCSTALLRYAGKLGGLYPDDALAALKVDEIVMIAEDVMANMFKCMGQEDDTVAKGV
EsGST7	(57)	DAEYTCSTALLRYAGKLGGLYPDDALAALKVDEIVMIAEDVMANMFKCMGQEDDTVAKGV
EsGST8	(57)	DAEYTCSTALLRYAGKLGGLYPDDALAALKVDEIVMIAEDVMANMFKCVQKDDTMANGL
EsGST9	(57)	DAEYTCSTALLRYAGKLGGLYPDDALAALKVDEIVMIAEDVMANMFKCVQKDDTMANGL
LdGST4	(53)	GTDYTCSTALLRYAGKLGGLYQYPECPLASLKVDEIVMIAEDVFINLFSSTMGEKDEAKKLEK
	121	180
MmPGDS	(116)	FNELLTHQ-APRLLKDLDTYLG--DKEWFIGNVTWADFYWDICSTTLLVLK----PGL
LdGST1	(119)	RKAMTDNYLPTWLGNLERALK-AAGGSYFAGGKLSIGDIYVVARLNWLKRGALDG-IPDT
LdGST2	(121)	RQNLVRDFLPTWLGNEKALA-NAGGTYFAGGKLSIGDIYVVARLVWLKEGSLDG-IPDS
LdGST3	(119)	FGDLAVNYIPKWLANVEKQLA-ATEGIYFAEKM-SVADIMITTRLKTLRDNNGYNG-VPTT
EsGST1	(119)	RADLAANYIPKWLNSMEKQLS-STDGTFPDGQM-TVADMMIAYRLHMHKNGVLDG-IPPT
EsGST10	(118)	RKDLVETVLPFWLANLEKALK-LAGGKYFAGDKLSIGDIYVVARLNWLTGTFEG-VPST
EsGST12	(118)	RKDLVETVLPFWLANLEKALK-LAGGKYFAGDKLSIGDIYVVARLNWLTGTFEG-VPST
EsGST11	(118)	LKDLVEKLLPEWLANLEKALK-LAGGKYFAGDKLSIGDIYVVARLNWLTGTFDESVPSSA
EsGST2	(118)	RKELSEVTLPWLQYLERWLE-RAGTTFVGEIITICDLVIYTRMKWLRRLVVLV-IPDT
EsGST3	(117)	LEGKVKGLVELLVS KLAANPS----SKFFVGTSPTIADLQVHAVIKNAQAGFLTG-IPPT
EsGST4	(117)	LEGKIKTLVDMLTS KLAANPS----SKFFVGTSPTIADLQVHAVIKNFEANFLTG-LPTT
EsGST5	(117)	LEGKIKTLVDMVLAKLAANPS----SKFFVGTSPTIADLQVHAVIKNFEANFLTG-LPTT
EsGST6	(117)	LEGKIKTLVGMVLAKLAANPS----SKFFVGTSPTIADLQVHAVIKNFEANFLTG-LPTT
EsGST7	(117)	LEGKIKTLVGMVLAKLAANPS----SKFFVGTSPTIADLQVHAVIKNFEANFLTG-LPTT
EsGST8	(117)	LEGKIKTLVEMLTSR LAANAS----SKFFVGHPTIADLQVHAVIKNFEANFLTG-LPTT
EsGST9	(117)	LEGKIKTLVEMLTSR LAANAS----SKFFVGHPTIADLQVHAVIKNFEANFLTG-LPTT
LdGST4	(113)	CQTLMAGKIKDLLEDIARKVEANKCSTFCV GASLTIADIQVHAVIATVQAGFLTG-IPPT

	181	239
MmPGDS	(168)	LDIYPKLVSLRNKVQAIPASAWILKRPQTKL-----
LdGST1	(177)	IVDDFPLLSALVQSVMSSEKIVKYLESGP-----
LdGST2	(179)	IVDEYPLLSALIERVNAEPNIAKYHQERSETTNK-----
LdGST3	(176)	IFDSSYPNLNLYDSIVGEPKIAAFIAKHDK-----
EsGST1	(176)	IADSCPSLCALYDAVVSEPKVAAFLAKHAK-----
EsGST10	(176)	LLDKSPLLSLQVQVMAEPRIIVAYMEERPCK-----
EsGST12	(176)	LLDESPLVSSLVQVMAEPRIIVAYMEERPCK-----
EsGST11	(177)	ILEEFPLLSLQVQVMAEPRIIVAYMEERPCK-----
EsGST2	(176)	ILRNFRVRHSEAVASHPKVDDYYKNGPGKVTGDGSPPIPPSPPHSPLTPITLPSNGD
EsGST3	(172)	LIADTAPTLMEMEAALLEDPKVEAYYASKA-----
EsGST4	(172)	HIADTAPTLMEMQAALLEDPKVKAYYASKA-----
EsGST5	(172)	HIADTAPTLMEMEAALLEDPKVKAYYASKA-----
EsGST6	(172)	HIADTAPTLMEMQAALLEDPKVKAYYASKA-----
EsGST7	(172)	HIADTAPTLMEMQAALLEDPKVKAYYASKA-----
EsGST8	(172)	HIADTAPTLMEMQAALLEDPKVKAYYASKA-----
EsGST9	(172)	HIADTAPTLMEMQAALLEDPKVEITGEGVLRFGQVNI RRMIEEKGLHPLATVGM AEDI--
LdGST4	(172)	MVEDICPSLKALDHAVMEHPKVKAYYASKA-----

### 3.4 Epissage alternatif

Un cas d'épissage alternatif a été détecté au sein des GST cytosoliques. Ainsi, lorsque, j'ai aligné les différentes EST avec les séquences génomiques, j'ai obtenu un résultat surprenant sur le supercontig 648. En effet, des EST appartenant à deux gènes différents s'alignaient au niveau du même locus génomique (Esi0648\_0004). Cependant, seules les EST d'un des deux gènes s'alignaient sur toute sa longueur, définissant ainsi le gène *EsGST9*. Les EST de l'autre gène ne s'alignaient que sur une partie de ce locus. En étudiant la structure exon/intron du locus, et en traduisant les exons, j'ai mis en évidence que deux séquences différentes pouvaient être produites à partir de ce locus (Figure 53).

	26601		26660
<i>EsGST8</i>	tctatctgcgacttgtgctggtatgtggtgcaaccgc	ag	GTGCACGCCGTGATCAAGAAC
<i>EsGST9</i>	tctatctgcgacttgtgctggtatgtggtgcaaccgc	ag	GTGCACGCCGTGATCAAGAAC
	26661		26720
<i>EsGST8</i>	TTCGAAGCGAACTTCCTGACGGGTCTCCCCACGACCCACATCGCGGACACCGCTCCCACG		
<i>EsGST9</i>	TTCGAAGCGAACTTCCTGACGGGTCTCCCCACGACCCACATCGCGGACACCGCTCCCACG		
	26721		26780
<i>EsGST8</i>	CTCATGGAGATGCAGGCCGCCCTCTTGGAGGACCCCAAG	gt	accgctaccctacggttgc
<i>EsGST9</i>	CTCATGGAGATGCAGGCCGCCCTCTTGGAGGACCCCAAG	gt	accgctaccctacggttgc
	26781		26840
<i>EsGST8</i>	tgttgctgctgcattaactctgctcctgtgctggttcgcccgtacatccgtgtgctatcgagg		
<i>EsGST9</i>	tgttgctgctgcattaactctgctcctgtgctggttcgcccgtacatccgtgtgctatcgagg		
	26841		26900
<i>EsGST8</i>	aacacgcaccacgccccttctccaggcaagactttcaaggacaaaagt		cgaacgacgaaca
<i>EsGST9</i>	aacacgcaccacgccccttctccaggcaagactttcaaggacaaaagt		cgaacgacgaaca
	26901		26960
<i>EsGST8</i>	caagcgaacgtcttcacccccccccctccctccctcccatcatcccttcgtccatccctg		
<i>EsGST9</i>	caagcgaacgtcttcacccccccccctccctccctcccatcatcccttcgtccatccctg		
	26961		27020
<i>EsGST8</i>	accaaaacactcagccaatcac	ag	GTGAAGGCGTACTACGCTTCCAAGGCGTGAACATAC
<i>EsGST9</i>	accaaaacactc	ag	CCAATCACAGGTGAAGGCGTACTACGCTTCCAAGGCGTGAACATAC
	27021		27080
<i>EsGST8</i>	GCCGGATGATAGAGGAAAAAGGGCTTCACCCACTGGCGACAGTTGGCATGGCCGAGGACA		
<i>EsGST9</i>	GCCGGATGATAGAGGAAAAAGGGCTTCACCCACTGGCGACAGTTGGCATGGCCGAGGACA		
	27081	27100	
<i>EsGST8</i>	TTTGAGACTCGCGGGATGC		
<i>EsGST9</i>	TTTGAGACTCGCGGGATGC		

**Figure 53: Epissage alternatif des gènes *EsGST8* et *EsGST9*.**

L'alignement présente un fragment de la séquence du supercontig 648 supportant les deux derniers exons (5 et 6) des gènes *EsGST8* et *EsGST9*. Les séquences en minuscules correspondent aux introns (partie 3' de l'intron 4 et intron 5), les séquences en majuscules et surlignées en gris correspondent aux exons, les sites d'épissage des introns sont indiqués en rouge, les codons stop sont marqués en gras, et les séquences 3' non traduites de l'exon 6 sont indiquées en italique.

La séquence surlignée en gris comprise entre les bases 26640 et 26759 constitue les 120 pb de l'exon 5 des gènes *EsGST8* et *EsGST9*. L'exon 6 du gène *EsGST8* (30 pb) est situé entre les bases 26985 et 27014. Sa taille et sa séquence traduite sont conservées avec les autres GST du groupe A. En revanche, le gène codant pour la protéine *EsGST9* présente un site d'épissage de l'intron 5 modifié par rapport au gène codant pour la protéine *EsGST8*. Ce site d'épissage 3' est situé 10 paires de bases en amont, ce qui entraîne un décalage du cadre de lecture. Le codon stop TGA n'est alors pas reconnu comme tel et la traduction du messageur est réalisée jusqu'au codon stop suivant. Le gène *EsGST9* possède 81 pb supplémentaires et code donc pour une protéine de 228 acides aminés, soit 27 de plus que la protéine *EsGST8*.

Le gène *EsGST9* est présent dans la banque d'EST, tandis qu'*EsGST8* est absent. Cependant, l'exon 6 du gène *EsGST8* est très conservé avec tous les autres membres du groupe A, et c'est *EsGST9* qui est divergent. *EsGST8* n'existe pas en tant que gène dans la base d'annotation du génome car il ne peut pas y avoir, informatiquement parlant, deux gènes associés au même locus.

### **3.5 Etude phylogénétique des GST cytosoliques de macroalgues**

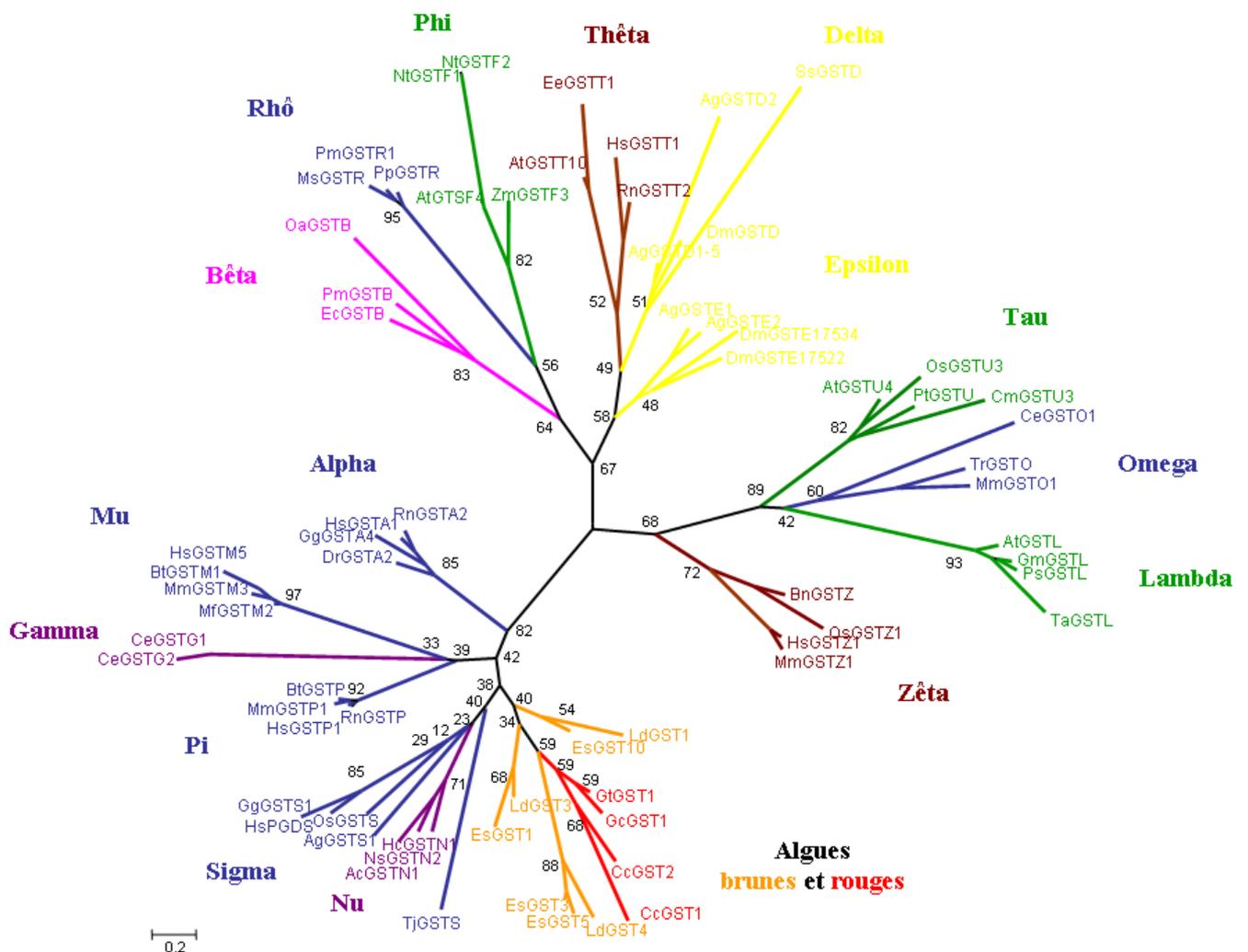
Les glutathion S-transférases sont présentes dans la plupart des organismes et sont réparties en 16 classes, selon des critères d'identité de séquences, de structure de gènes, d'immuno-réactivité, et de spécificité de substrats. Certaines classes sont communes à plusieurs règnes du vivant, d'autres sont spécifiques de phyla ou de type d'organismes. Les phylogénies de GST ne reflètent donc pas l'évolution des espèces, mais plutôt des similitudes de fonctions et/ou de spécificité de substrats.

#### **3.5.1 Position des GST d'algues parmi les GST cytosoliques.**

Afin de préciser si les séquences des groupes A et B de GST cytosoliques de *L. digitata* et d'*E. siliculosus* appartiennent ou non à des classes existantes de glutathion S-transférases, j'ai réalisé une étude phylogénétique en utilisant à la fois des méthodes de distances et des méthodes de caractères. J'ai procédé en deux étapes. D'une part, j'ai analysé un lot réduit mais représentatif de chaque groupe de GST d'algues avec des séquences appartenant aux différentes classes connues de GST cytosoliques. Ainsi, j'ai produit un alignement multiple contenant les séquences d'algues brunes LdGST1, LdGST3 et LdGST4, EsGST1, EsGST3, EsGST5, EsGST10, quatre GST provenant des algues rouges *Chondrus crispus*, *Gracilaria changii*, *Gracilaria tenuistipitata*, et 59 autres séquences identifiées chez divers organismes. J'ai ensuite considéré deux méthodes de distance, le Neighbor Joining et le Minimum Evolution. Ces deux méthodes sont rapides et permettent l'analyse d'un grand nombre de séquences (Figure 54 et Figure 55), mais la réduction des caractères à une matrice de distance entraîne une perte d'information. Elles m'ont cependant permis d'obtenir une vision d'ensemble, que j'ai pu ensuite affiner en utilisant d'autres méthodes.

Ainsi, je n'ai ensuite conservé que les classes Sigma, Alpha, Mu et Pi et j'ai aligné toutes les GST d'algues brunes et rouges disponibles. J'ai alors combiné la méthode des distances du Neighbor Joining (NJ) avec les méthodes de caractères du Maximum de parcimonie et du Maximum de vraisemblance. L'avantage de la méthode du Maximum de parcimonie est qu'elle ne réduit pas les séquences à une distance et qu'elle donne de

l'information sur les séquences ancestrales. En revanche, elle ne calcule pas les longueurs de branches. Le Maximum de vraisemblance est considéré comme la méthode la plus fiable, et elle est basée sur un modèle probabiliste. Comparée à la parcimonie, cette méthode est beaucoup plus fiable et moins sensible aux effets d'attraction des longues branches. L'inconvénient des méthodes de caractères, et notamment du maximum de vraisemblance, est qu'elles sont lentes et nécessitent une grosse puissance de calcul. Par conséquent, les analyses de maximum de vraisemblance ont été réalisées sur un serveur externe accessible depuis le site web [www.phylogeny.fr](http://www.phylogeny.fr).



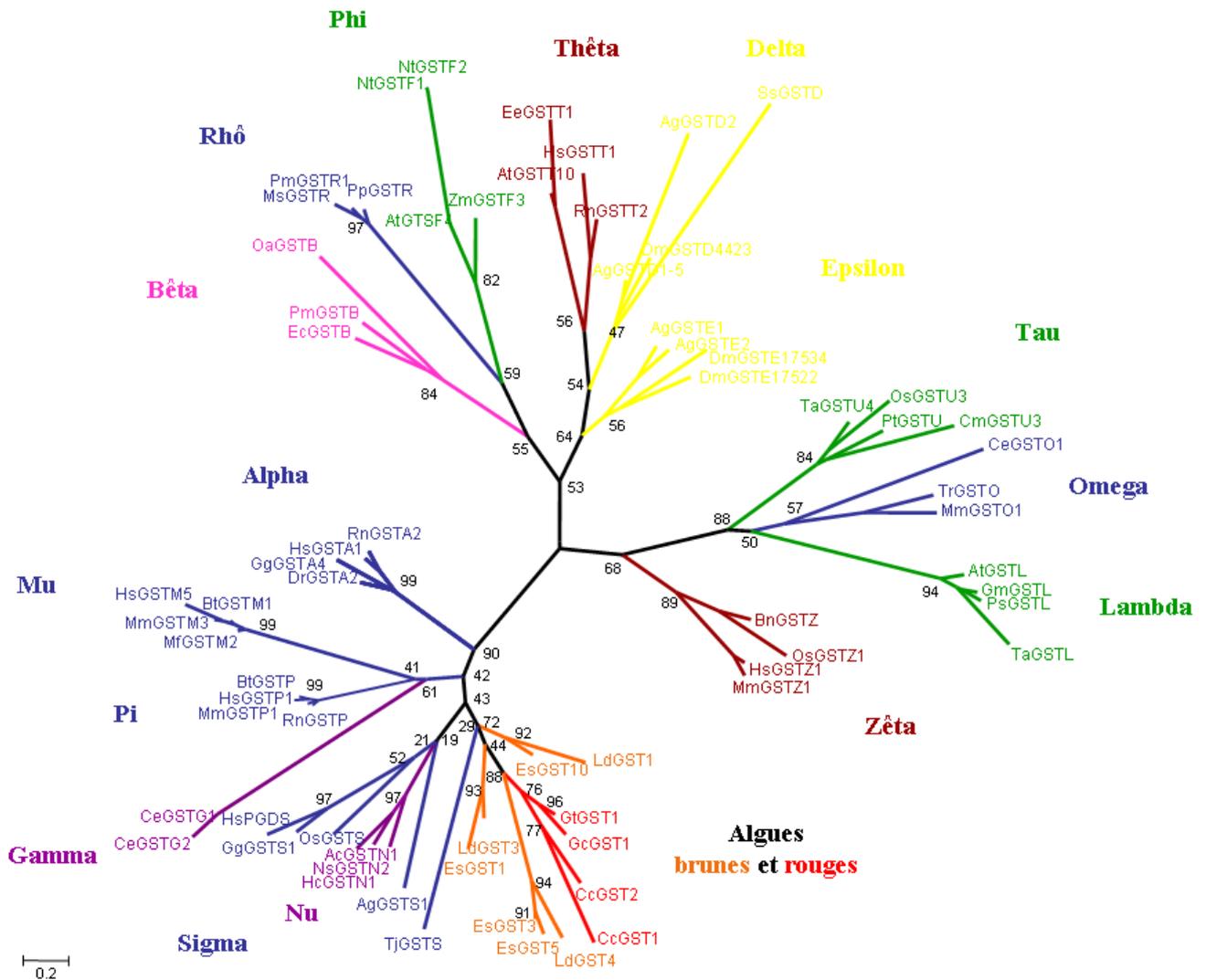
**Figure 54:** Arbre phylogénétique, calculé par la méthode du Minimum Evolution, présentant les relations existantes entre des GST cytosoliques de classes connues et des GST d'algues brunes et rouges.

L'alignement par ClustalW (matrice BLOSUM) et l'arbre calculé par la méthode du Minimum Evolution ont été réalisés avec MEGA 4. Les paramètres utilisés sont: un consensus de 1000 bootstraps, le mode Complete deletion pour la résolution des gaps et un modèle de substitution basé sur une matrice PAM (Point Accepted Mutation, Dayhoff 1978). La classe Beta spécifique des bactéries est représentée en rose, les classes animales Alpha/Mu/Pi/Sigma/Rho/Omega en bleu, les classes Gamma de nématodes et Nu de parasites en violet, les

classes Phi/Lambda/Tau, spécifiques des plantes, en vert, les classes communes Theta/Zeta en marron, les séquences d'algues rouges en rouge, et les séquences d'algues brunes en orange.

L'arbre consensus de la Figure 54 montre que deux groupes majeurs de glutathion S-transférases peuvent être établis, conformément à ce qui a été décrit dans la littérature (Snyder and Maddison, 1997; Frova, 2006). Un premier groupe de glutathion S-transférases contient les enzymes des classes Beta, Delta, Epsilon, Theta, Rho, Phi, Zeta, Lambda, Omega et Tau. Ces classes regroupent des protéines provenant d'organismes très variés, à la fois eucaryotes avec des animaux, des plantes supérieures, des champignons, mais également procaryotes avec la classe Beta spécifique des bactéries. Les membres de la classe Omega sont majoritairement rencontrés chez les mammifères, mais également chez les Helminthes (Girardini et al., 2002). Les GST des classes Theta et Zeta sont rencontrées chez les animaux et les plantes supérieures, tandis que les classes Phi, Tau et Lambda sont spécifiques des plantes supérieures (Sheehan et al., 2001; Dixon et al., 2002b). Les classes Delta et Epsilon sont spécifiques des insectes (Sawicki et al., 2003; Ranson and Hemingway, 2005) et la classe Rho récemment décrite semble être spécifique des poissons (Konishi et al., 2005).

Le deuxième groupe majoritaire regroupe les classes Alpha, Mu, Pi, Gamma, Nu et Sigma. Ces classes sont spécifiques des métazoaires (Pearson, 2005). Les classes Alpha, Mu et Pi sont rencontrées exclusivement chez les vertébrés (Mannervik et al., 2005). La classe Sigma est rencontrée principalement chez les mammifères, mais quelques représentants ont été identifiés chez les insectes et les céphalopodes (Tomarev et al., 1993; Jowsey et al., 2001; Singh et al., 2001). La présence de cette classe chez les vertébrés et les invertébrés suggère qu'elle a évolué avant la divergence des classes Alpha, Mu et Pi. Les classes récemment élucidées, Nu et Gamma, comprennent des protéines rencontrées respectivement chez les nématodes et les champignons (Cha et al., 2002; Schuller et al., 2005). Un lien de parenté entre les classes Nu et Sigma est suggéré par la topologie de l'arbre.



**Figure 55:** Arbre phylogénétique calculé par la méthode du Neighbor Joining, présentant les relations existantes entre les différentes classes de GST cytosoliques et des GST d'algues.

Les arbres générés par la méthode du Minimum Evolution et du Neighbor Joining présentent des topologies identiques. Les résultats de cette analyse phylogénétique montrent clairement que les GST d'algues brunes et rouges ne se mélangent à aucune des autres classes précédemment citées. Elles se regroupent ensemble, ce qui est une première information importante à considérer. De plus, les GST d'algues se positionnent dans le groupe des GST spécifiques des métazoaires et partagent un ancêtre commun avec les classes Sigma et Nu. Cette affiliation avec des enzymes animales, plutôt surprenante, laisse supposer une origine évolutive très ancienne des GST Sigma et des GST d'algues.

La topologie du cluster des GST d'algues brunes et rouges ne semble pas indiquer la présence d'une classe unique mais certainement de deux à trois classes ou sous-classes de GST spécifiques chez les algues rouges et brunes.

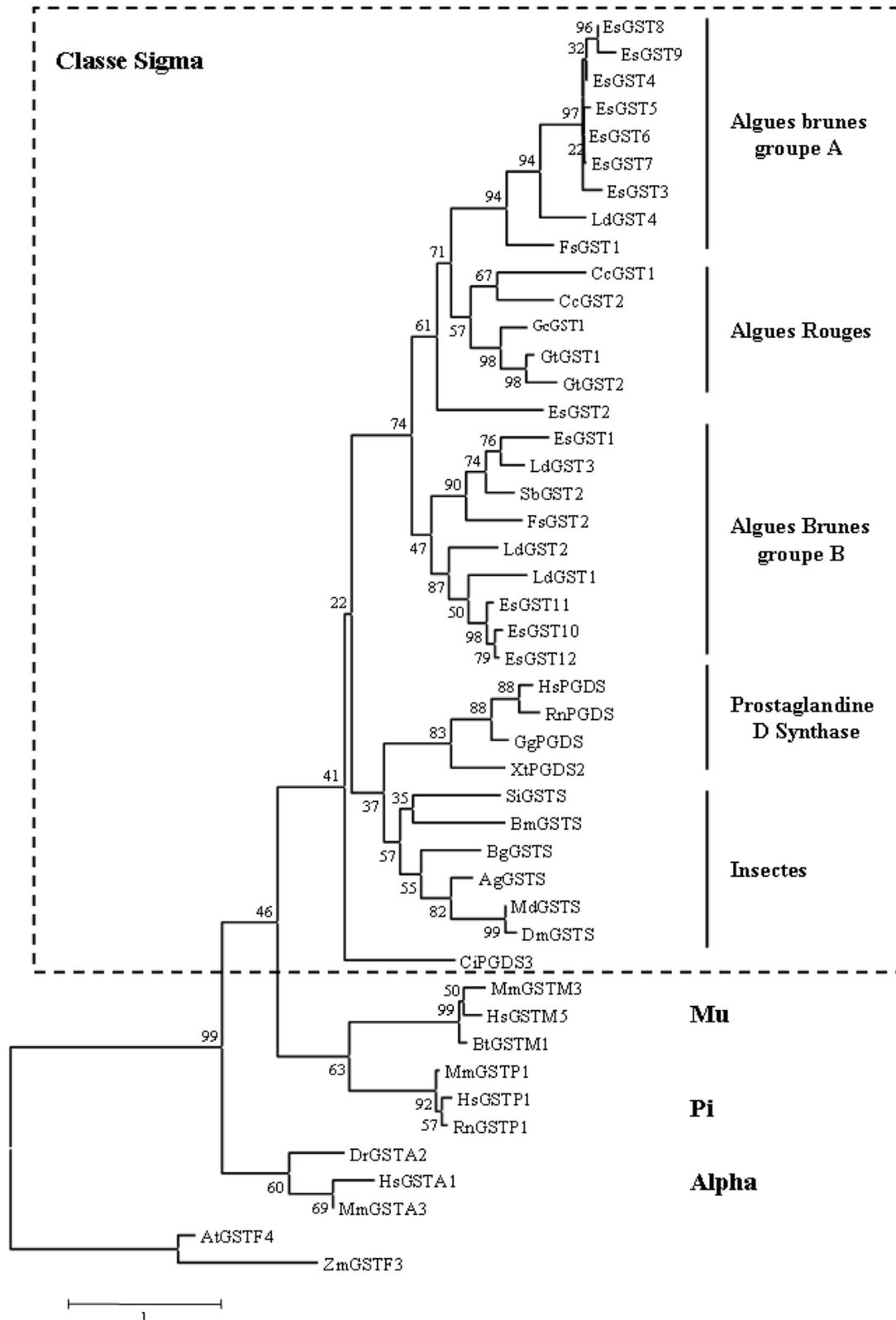
J'ai ensuite entrepris une analyse plus ciblée des GST de macroalgues, en utilisant plus de séquences spécifiques de ces organismes, recensées à partir de différentes bases de données. Ainsi, j'ai considéré 20 séquences de GST d'algues brunes, identifiées chez *L. digitata* (LdGST[1-4]), *E. siliculosus* (EsGST[1-12]), *Fucus serratus* (FsGST1, FsGST2), *Fucus vesiculosus* (FvGST1), *Sargassum binderi* (SbGST2) et cinq séquences d'algues rouges, identifiées chez *Chondrus crispus* (CcGST1, CcGST2), *Gracilaria tenuistipitata* (GtGST1, GtGST2) et *Gracilaria changii* (GcGST1). J'ai comparé ces séquences avec des membres représentatifs du cluster de GST animales composé des classes Alpha, Mu, Pi et Sigma. Pour la classe Sigma, j'ai choisi les GST parmi les prostaglandines D synthases (PGDS) de vertébrés et d'invertébrés, et les GST Sigma d'insectes. La classe Phi, spécifique des plantes supérieures, a été utilisée comme groupe externe pour enraciner les arbres.

Les arbres générés par différentes méthodes présentent tous la même topologie (Figure 56, Figure 57, Figure 58). Les GST d'algues brunes et rouges forment un cluster qui partage un ancêtre commun avec les GST de la classe Sigma comprenant les PGDS et les GST d'insectes. Ce cluster de GST d'algues se divise en deux sous-groupes, correspondant pour l'un au groupe B des GST d'algues brunes *Ectocarpus* et *Laminaria*, et pour l'autre au groupe A des GST d'algues brunes *Ectocarpus* et *Laminaria*, plus un groupe formé uniquement par des GST d'algues rouges. La séparation des groupes A et B est supportée par des valeurs de bootstrap significatives (74 en Neighbor Joining, Figure 56, et 91 en maximum de vraisemblance, Figure 58).

Le regroupement du groupe A et des GST d'algues rouges est observé dans tous les types d'arbres mais les valeurs de bootstraps sont faibles (71 en Neighbor Joining, 41 en Maximum de parcimonie et 51 en Maximum de vraisemblance). De plus, la protéine *EsGST2* est toujours située à la base du groupe des GST d'algues rouges et du groupe A des GST d'algues brunes. La protéine *EsGST2* est assez divergente en terme de séquence et les valeurs de bootstraps du nœud reliant ce gène aux autres gènes d'algues ne sont pas significatives (61 en Neighbor Joining, 36 en Maximum de parcimonie et 36 en Maximum de vraisemblance). J'ai donc réalisé un arbre phylogénétique par la méthode du maximum de vraisemblance en excluant *EsGST2* (Figure 59). La conséquence directe de cette exclusion est le renforcement du nœud reliant les GST du groupe A et les GST d'algues rouges. La valeur de bootstraps obtenue en maximum de vraisemblance est alors de 90. Le groupe A des GST d'algues brunes est donc plus proche du groupe des GST d'algues rouges que du groupe B des GST d'algues brunes.

Le groupe A des GST d'algues brunes contient les paralogues *EsGST[3-9]* et les orthologues *FsGST1* et *LdGST4*. Les séquences de ce groupe partagent de 44 à 99 % d'identité. Les arbres obtenus par la méthode du Neighbor Joining et du maximum de vraisemblance montrent que les branches des paralogues du groupe A d'*Ectocarpus* sont très courtes. Ceci indique que les gènes ont peu divergé entre-eux parce que la diversification s'est sans doute faite au sein de l'espèce.

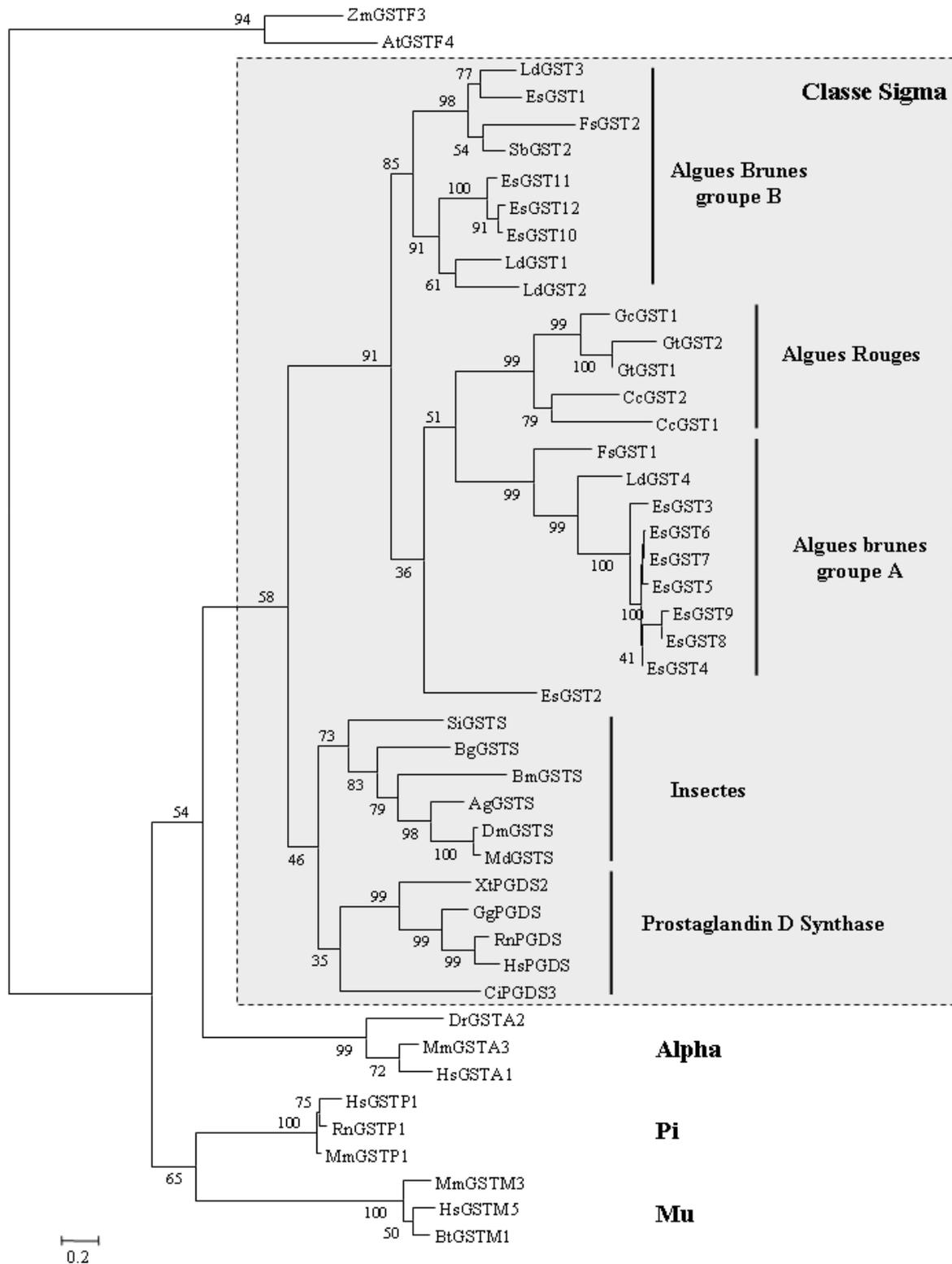
Le groupe B est composé des paralogues *EsGST1* et *EsGST[10-12]* et des orthologues *LdGST[1-3]*, *SbGST2*, *FvGST1* et *FsGST2*. Les séquences de ce groupe partagent de 38 à 95 % d'identité. Toutes les topologies d'arbres montrent que ce groupe est scindé en deux sous-groupes contenant à la fois des GST d'*Ectocarpus* et de *L. digitata*, supportés par des nœuds forts avec la méthode du maximum de vraisemblance.



**Figure 56: Arbre phylogénétique des GST de la classe Sigma obtenu par la méthode du Neighbor Joining.**

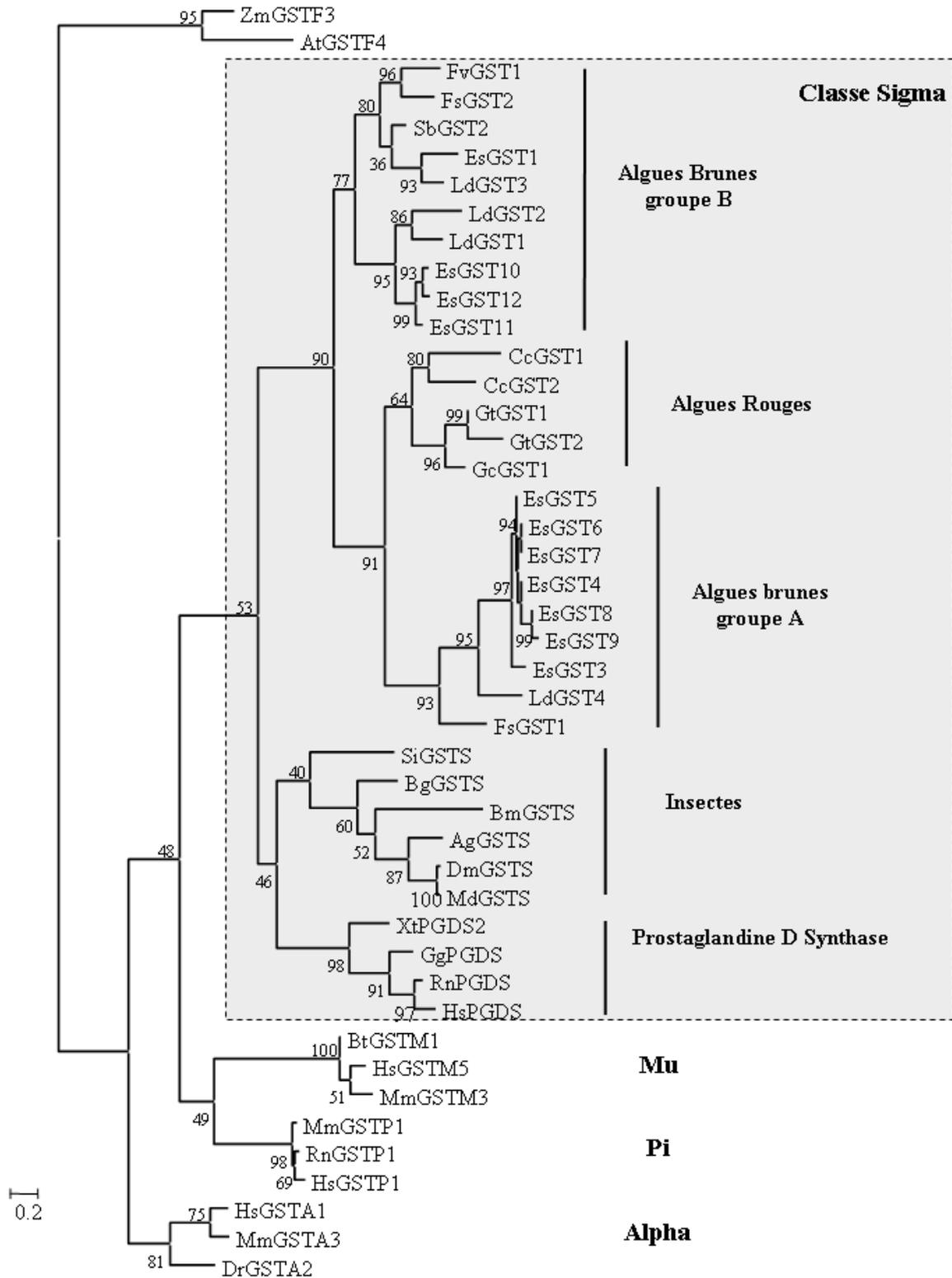
L'arbre consensus a été généré par le programme Mega 4.0 (Tamura, 2007), à partir d'un alignement réalisé par le programme ClustalW, et en utilisant une matrice de substitution de Dayhoff (PAM). La robustesse des branches est évaluée par 1000 réplicats de bootstraps.





**Figure 58: Arbre phylogénétique des GST de la classe sigma obtenu par la méthode du Maximum de vraisemblance.**

L'arbre consensus a été généré en exécutant la suite de commandes disponibles sur le site <http://www.phylogeny.fr> (Dereeper et al., 2008), à partir d'un alignement réalisé par le programme ClustalW, et en utilisant une matrice de substitution de Dayhoff (PAM). La robustesse des branches est évaluée par 500 réplicats de bootstraps.



**Figure 59: Arbre phylogénétique des GST de la classe sigma excluant EsGST2 obtenu par la méthode du Maximum de vraisemblance.**

L'arbre consensus a été généré en exécutant la suite de commandes disponibles sur le site <http://www.phylogeny.fr> (Dereeper et al., 2008), à partir d'un alignement réalisé par le programme ClustalW, et en utilisant une matrice de substitution de Dayhoff (PAM). La robustesse des branches est évaluée par 500 réplicats de bootstraps.

Toutes les GST d'algues partagent un même ancêtre commun qui s'apparente à la classe Sigma. La divergence est importante au sein de cette classe et les pourcentages d'identité entre les différents groupes sont reportés dans le Tableau 22.

**Tableau 22: Pourcentages d'identité entre les différents groupes de GST Sigma.**

	PGDS	Sigma Insectes	Algues brunes A	Algues brunes B	Algues rouges
PGDS		32-39 %	25-29%	28-30%	25-32%
Sigma Insectes			23-29%	32-34%	22-34%
Algues brunes A				25-32%	21-36%
Algues brunes B					25-40%

Les PGDS et les GST Sigma d'insectes partagent moins de 40% d'identité et appartiennent pourtant à la même classe. Considérant cela, les groupes A et B des GST d'algues brunes et les GST d'algues rouges peuvent être assignés à la classe Sigma.

### 3.6 Analyse des séquences protéiques

Malgré les divergences importantes entre les séquences primaires, il a été démontré que la structure tridimensionnelle des GST était extrêmement conservée entre toutes les classes (Dixon et al., 2002b).

Pour analyser les séquences protéiques de GST d'algues, j'ai cherché à identifier les motifs conservés et les sites de fixation des substrats, en me basant sur un alignement avec des protéines de structure connues. Pour obtenir l'alignement le plus fiable possible, j'ai d'abord généré un alignement structural, avec le programme SPDB Viewer, à partir des structures de plusieurs enzymes : GST Sigma de rat RnPGDS (PDB: 1PD2), GST Sigma de calamar (PDB:1GSQ), GST Pi de *Onchocerca volvulus* (PDB:1TU7), GST Alpha humaine (PDB:1GUH), et une GST de *Plasmodium falciparum* (PDB:2AAW). Puis un second alignement a été construit sous ClustalW à partir des 5 GST citées ci-dessus et des 12 GST Sigma d'*E. siliculosus* et des 4 GST Sigma de *L. digitata*. Cet alignement a été retravaillé à la main pour conserver le premier alignement structural, puis édité par le programme ESPript, en faisant apparaître les éléments de structure secondaire de la protéine RnPGDS (1PD2). Cette protéine est l'une des GST Sigma les mieux décrites dans la littérature. Les résidus de cette enzyme impliqués dans la fixation du glutathion, de la prostaglandine H2, et dans la formation du dimère (Kanaoka et al., 1997) ont été reportés sur l'alignement (Figure 60).

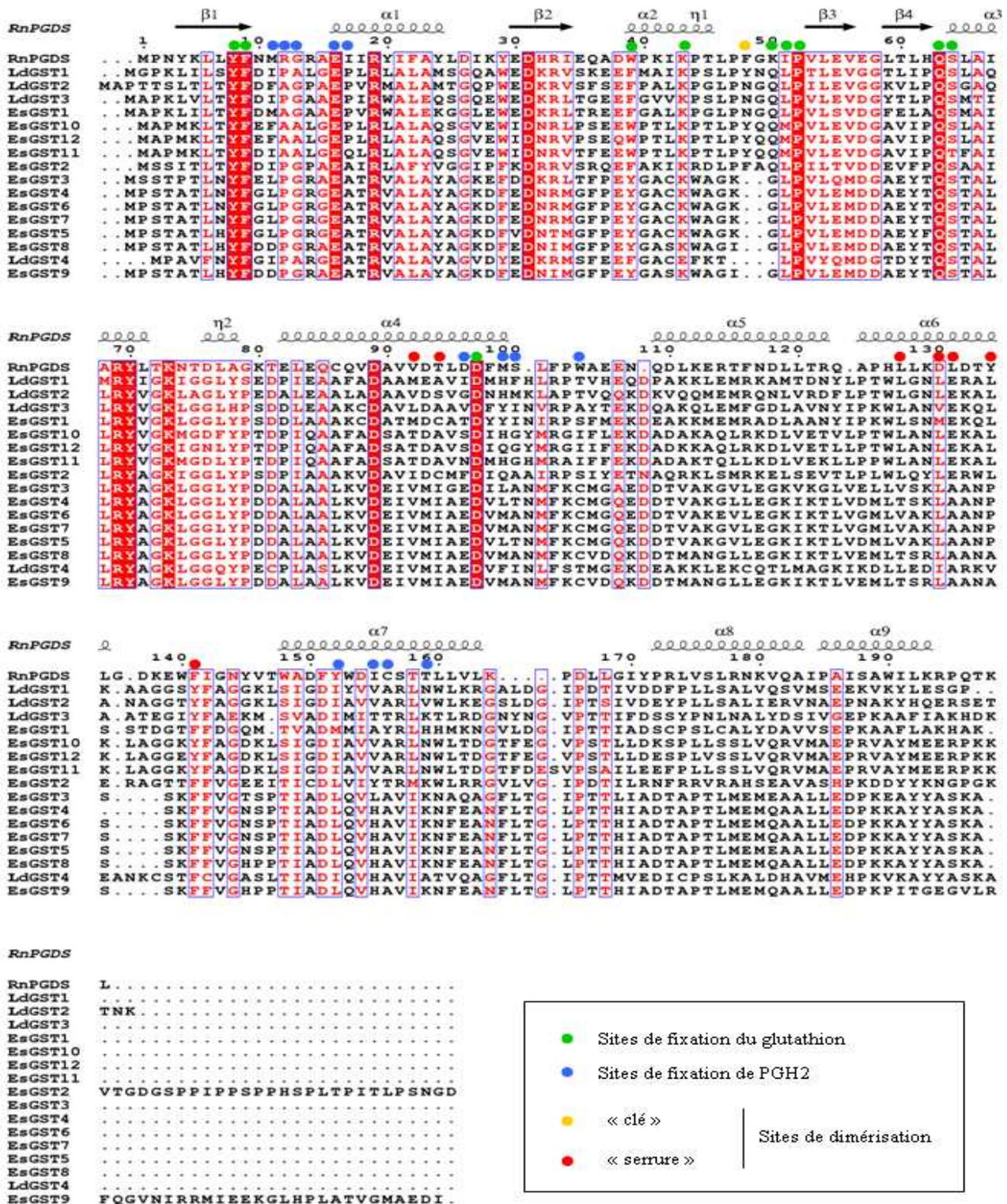


Figure 60: Alignement des prostaglandine D synthases humaine (IIYI) et murine (1PD2) avec les GST sigma des groupes A et B de *L. digitata* et *E. siliculosus*.

Les résidus conservés sont en blanc sur fond rouge, les résidus similaires en rouges encadrés en bleu. La structure secondaire de RnPGDS (1PD2) est indiquée au-dessus des séquences alignées.

Les structures η1 et η2 indique la position d'hélices 3<sub>10</sub> (le pas d'hélice contient 3 résidus au lieu de 3,6 résidus pour une hélice α).

Toutes les GST cytosoliques sont constituées de deux domaines: le domaine N-terminal comprend le site de fixation du glutathion et se compose d'un motif thiorédoxine représentant environ un tiers de la protéine et dont la structure,  $\beta\alpha\beta\alpha\beta\alpha$ , est très conservée. Le domaine C-terminal est constitué de 6 hélices  $\alpha$  qui sont beaucoup plus variables selon les protéines.

### **3.6.1 Etude du site de fixation du glutathion**

Chez la protéine RnPGDS (1PD2), les résidus impliqués dans la fixation du glutathion sont la tyrosine Y8, la phénylalanine F9, le tryptophane W39, la lysine K43, la lysine K50, l'isoleucine I51, la proline P52, la glutamine Q63, la sérine S64 et l'aspartate D97. Dans les GST d'algues brunes, les deux résidus aromatiques, tyrosine (Y8) et phénylalanine (F9), qui terminent le premier brin  $\beta$  ( $\beta$ 1), sont conservés. Dans l'hélice  $\alpha$ 2, le résidu aromatique, tryptophane (W39) est conservé dans les protéines EsGST10, EsGST11 et EsGST12, et remplacé par un autre aa aromatique, une phénylalanine, dans les protéines LdGST[1-4] et EsGST[1-2], ou par une tyrosine dans les protéines EsGST[3-9]. La lysine (K43) est conservée dans toutes des séquences d'algues sauf dans la protéine LdGST4 qui présente à la place un résidu glutamate. Dans la boucle située entre l'hélice  $\alpha$ 2 et le brin  $\beta$ 3, la lysine K50 n'est pas conservée, elle est remplacée par une glutamine dans les enzymes LdGST[1-3], EsGST[1-2] et EsGST[10-12], et par une glycine dans les protéines EsGST[3-9]. L'isoleucine I51 est remplacée par une leucine dans la plupart des enzymes d'algues et par une méthionine dans les protéines EsGST[10-12]. La proline (P52) est très conservée. Entre le brin  $\beta$ 4 et l'hélice  $\alpha$ 3, le résidu glutamine (Q63) est aussi très conservé, la sérine (S64) suivante est présente chez toutes les protéines d'algues, excepté chez EsGST11 où elle est remplacée par une thréonine. Le résidu aspartate (D97), localisé dans l'hélice  $\alpha$ 4, est retrouvé dans toutes les séquences de l'alignement.

Le site de fixation du glutathion (site G) est donc relativement bien conservé chez les séquences d'algues. Ceci a permis d'identifier et d'annoter avec certitude les gènes de GST présents dans le génome d'*E. siliculosus*.

### **3.6.2 Etude du site de fixation du second substrat**

Dans la Figure 60, les sites de fixation de la prostaglandine H<sub>2</sub> chez RnPGDS (1PD2) ont été représentés par des ronds bleus (M11, R12, G13, E16, I17, N96, M99, S100, W104, Y152, I155, C156, T159). Ces résidus sont conservés chez la PGDS humaine. Ces résidus ne sont pas conservés, ni en identité, ni en propriété, chez les protéines d'algues brunes.

### 3.6.3 Dimérisation

L'interaction des sous-unités du dimère de RnPDGS s'effectue par une association de type "clé-serrure". Ainsi, la phénylalanine F48 du domaine I de l'une des sous-unités constitue la clé qui interagit avec une poche hydrophobe, la serrure, formée par les résidus V91, T94, L127, D130, L131, Y134, F141 du domaine II de l'autre sous-unité.

Les résidus important pour l'établissement de la structure quaternaire chez les GST d'algues sont reportés dans le Tableau 23.

**Tableau 23: Acides aminés impliqués dans la dimérisation des GST Sigma.**

Les acides aminés hydrophobes sont indiqués par un fond gris.

		Clé	Serrure						
	RnPGDS	F48	V91	T94	L127	D130	L131	Y134	F141
Groupe B	LdGST1	Y	A	A	L	L	E	L	F
	LdGST2	N	A	S	L	L	E	L	F
	LdGST3	N	V	A	L	V	E	L	F
	EsGST1	N	T	C	L	M	E	L	F
	EsGST2	F	V	C	L	L	E	L	F
	EsGST10	Y	A	A	L	L	E	L	F
	EsGST11	Y	A	A	L	L	E	L	F
	EsGST12	Y	A	A	L	L	E	L	F
Groupe A	EsGST3	W45	I	I	V	L	A	P	F
	EsGST4	W45	I	I	T	L	A	P	F
	EsGST5	W45	I	I	V	L	A	P	F
	EsGST6	W45	I	I	V	L	A	P	F
	EsGST7	W45	I	I	V	L	A	P	F
	EsGST8	W45	I	I	T	L	A	A	F
	EsGST9	W45	I	I	T	L	A	A	F
	LdGST4	F43	I	I	L	I	A	V	C

La phénylalanine F48 de RnPDGS, formant la clé, est conservée chez EsGST2. Elle est remplacée par une tyrosine (Y), autre aa hydrophobe, dans les protéines LdGST1, EsGST10, EsGST11 et EsGST12. Chez LdGST2, LdGST3 et EsGST1, F48 est remplacée par une asparagine (N). Cet acide aminé, petit et polaire, est très différent de la phénylalanine, et ne peut pas jouer le rôle de clé. De plus, aucun acide aminé aromatique hydrophobe n'est présent à proximité de ce site. Dans les protéines du groupe A, EsGST[3-9] et LdGST4, on observe un gap de 2 à 3 aa dans l'alignement entre  $\alpha 2$  et  $\beta 3$ , ce qui semble indiquer que le résidu formant la clé est absent. Ce type d'observation a déjà été réalisé pour certaines GST de classe Sigma. Cependant, pour ces séquences du groupe A, un résidu aromatique hydrophobe W45 ou F45 est présent et pourrait jouer le rôle de clé.

La nature hydrophobe des résidus formant la serrure est bien conservée dans les protéines LdGST1, EsGST10, EsGST11 et EsGST12, suggérant un motif "clé-serrure" pour la dimérisation de ces GST. De même, la poche hydrophobe semble présente chez les enzymes du groupe A. En revanche, l'absence de résidu clé dans les protéines LdGST2, LdGST3 et EsGST1, et les modifications dans la poche hydrophobe, suggèrent d'autres types d'interactions pour leur dimérisation.

Les GST d'algues brunes présentent des spécificités par rapport aux PGDS représentées dans l'alignement. La boucle comprise entre les hélices  $\alpha 4$  et  $\alpha 5$  est allongée de deux aa, et la boucle comprise entre les hélices  $\alpha 7$  et  $\alpha 8$  présente quatre aa supplémentaires. Ces boucles ont un rôle dans le repliement des protéines et peuvent donc influencer les capacités catalytiques des GST algales.

La structuration des groupes A et B apparaît assez nettement sur l'alignement. Par exemple, la boucle comprise entre l'hélice  $\alpha 2$  et le brin  $\beta 3$  est réduite chez les protéines appartenant au groupe A (EsGST[3-9] et LdGST4). De façon similaire, la boucle comprise entre l'hélice  $\alpha 6$  et  $\alpha 7$  est plus courte de 3 résidus.

### **3.6.4 Localisation des résidus divergents**

Afin d'identifier les résidus qui divergent uniquement entre les paralogues du même groupe de GST Sigma chez *Ectocarpus*, j'ai réduit le précédent alignement aux séquences les plus proches, au sein de chacun des groupes A et B. J'ai donc éliminé EsGST9 du groupe A, EsGST1 et EsGST2 du groupe B, et toutes les GST de *L. digitata*. Cependant, j'ai conservé la séquence de RnPGDS pour avoir accès aux informations de structure secondaire, et j'ai localisé chaque changement d'acide aminé entre les paralogues d'un même groupe. Ensuite, pour évaluer la position de ces résidus divergents dans la structure tertiaire, j'ai modélisé une protéine de chaque groupe et j'ai mis en évidence les résidus divergents.

#### **3.6.4.1 EsGST Sigma groupe A**

La Figure 61 présente la localisation des divergences entre les paralogues du groupe A d'*E. siliculosus*. Les triangles noirs indiquent qu'au moins un résidu diffère entre les séquences considérées. De larges portions de séquences sont conservées, et les divergences sont généralement bien localisées. Ainsi, les principales sont situées dans le brin  $\beta$ 1, dans la boucle entre  $\beta$ 1 et  $\alpha$ 1, dans le brin  $\beta$ 2, entre  $\beta$ 4 et  $\alpha$ 3, entre l'extrémité C-terminale de l'hélice  $\alpha$ 4 et l'hélice  $\alpha$ 6, et à l'extrémité C-terminale de  $\alpha$ 7.

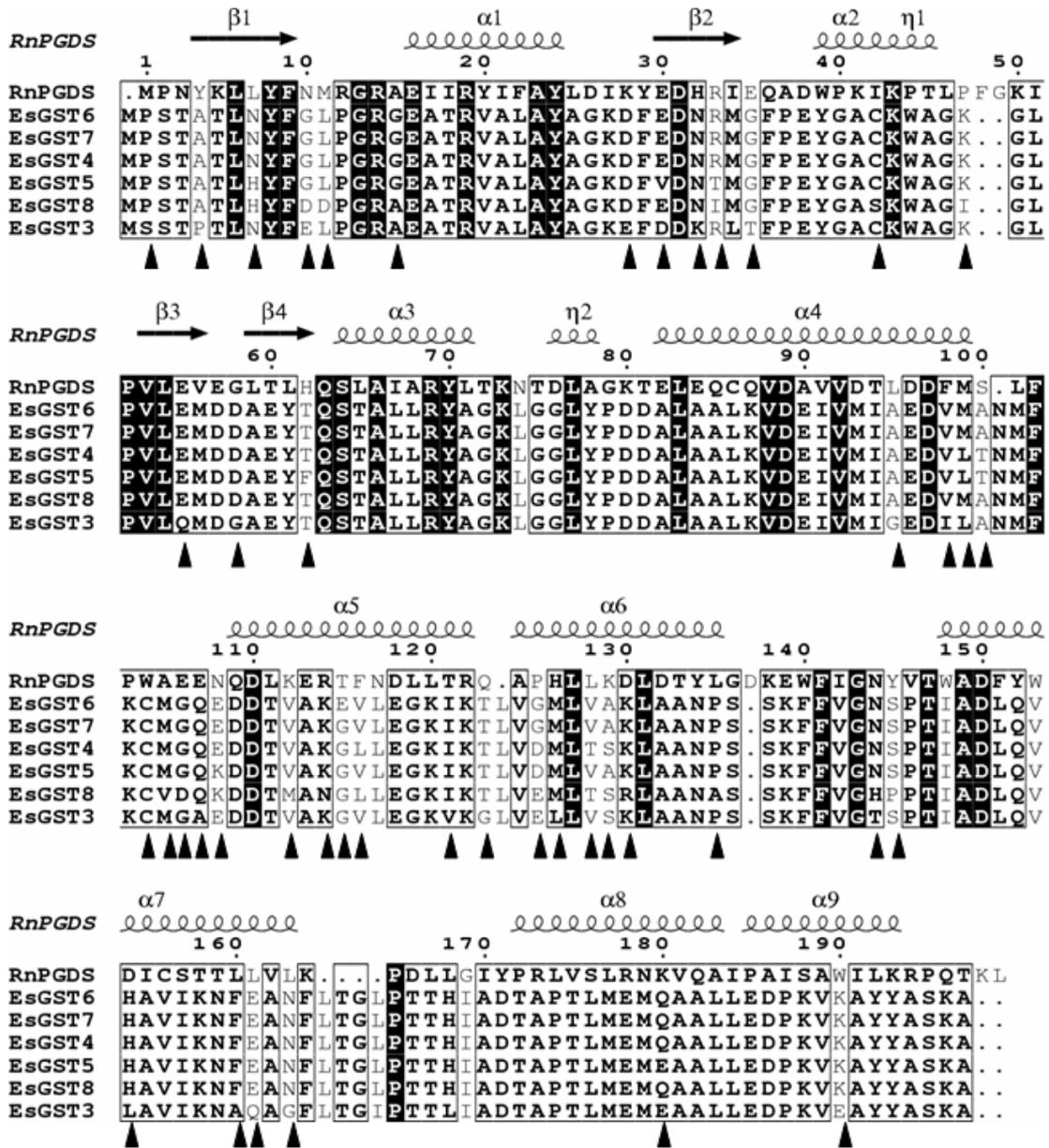
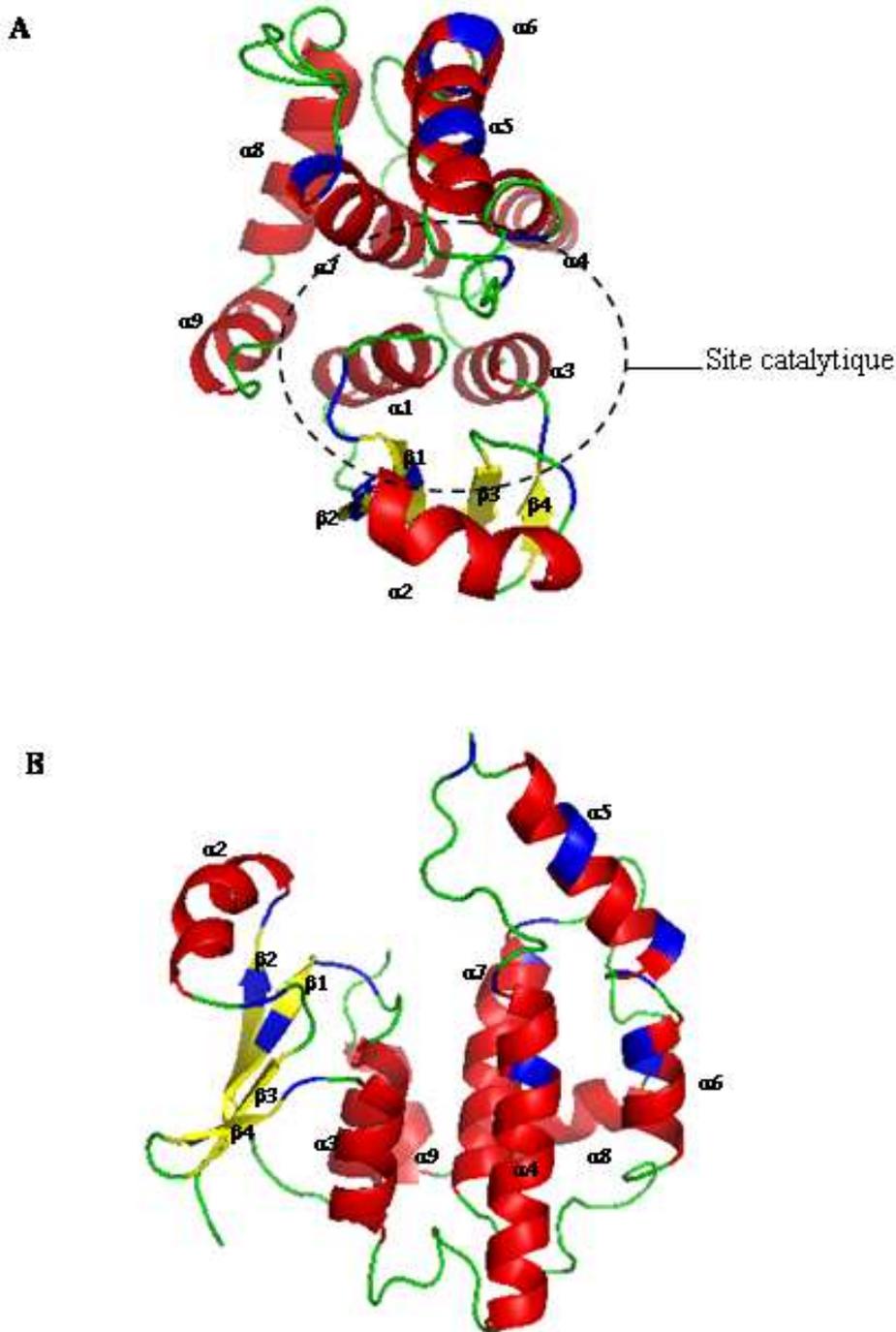


Figure 61: Alignement protéique des GST Sigma du groupe A d'*Ectocarpus* avec la PGDS de rat.

Les éléments de structure secondaire de la protéine RnPGDS (PDB: 1PD2) sont représentés au dessus de l'alignement. Les triangles localisent les résidus divergents entre les GST Sigma du groupe A d'*Ectocarpus*. Les résidus écrits en blanc et surlignés en noirs sont identiques entre les séquences murines et algales. Les résidus écrits en noir et encadrés sur fond gris sont similaires.



**Figure 62: Modélisation de la structure de la protéine EsGST6.**

La structure a été prédite et modélisée à partir d'un alignement de la protéine EsGST6 avec RnPGDS (PDB: 1pd2), à l'aide de SWISS-MODEL, et éditée sous PyMOL 0.99 (Delano Scientific) en vue du dessus (A) et vue de profil (B). Les brins  $\beta$  sont colorés en jaune, les boucles en vert et les hélices  $\alpha$  en rouge. Les résidus divergents entre les GST Sigma du groupe A d'*Ectocarpus* sont colorés en bleu.

La Figure 62 présente la position probable des résidus divergents dans la protéine EsGST6. Les résultats sont à interpréter avec prudence car il ne s'agit que d'un modèle basé sur l'alignement d'EsGST6 avec RnPGDS. Les acides aminés ne peuvent donc pas être

localisés avec certitude, mais cette approche donne une vision d'ensemble et permet de positionner les divergences par rapport aux différents sites de l'enzyme.

Ainsi, les résidus divergents observés dans le brin  $\beta 1$ , dans la boucle entre  $\beta 1$  et  $\alpha 1$  et dans le brin  $\beta 2$  et entre  $\beta 4$  et  $\alpha 3$  sont situés au niveau du motif thioredoxine. Ils sont aussi très proches de la gorge catalytique de l'enzyme. Les changements occasionnés dans cette zone ont certainement une influence sur l'activité de l'enzyme. De même, l'extrémité C-terminale de l'hélice  $\alpha 4$  et l'extrémité C-terminale de  $\alpha 7$  deviennent voisines de par le repliement de la protéine. Ces deux hélices forment une partie de la gorge catalytique, impliquée dans la fixation du substrat spécifique des GST. Les divergences positionnées au sein de ces extrémités C-terminales pour les séquences du groupe A des GST Sigma sont donc localisées dans une zone proche du site catalytique. A l'inverse, les divergences positionnées dans les hélices  $\alpha 5$  et  $\alpha 6$  semblent éloignées du site catalytique. C'est dans l'hélice  $\alpha 5$  que se trouve la seule divergence entre les protéines EsGST6 et EsGST7.

### 3.6.4.2 EsGST Sigma groupe B

La Figure 63 présente la localisation des divergences entre les paralogues EsGST[10-12] du groupe B des GST Sigma d'*Ectocarpus*. Comme dans le cas du groupe A, les séquences sont très conservées et les résidus divergents sont la plupart du temps groupés. Ainsi, les principales divergences sont situées dans les boucles entre  $\beta 1$  et  $\alpha 1$ , entre  $\beta 2$  et  $\alpha 2$ , à l'extrémité N-terminale de  $\alpha 3$ , entre  $\alpha 3$  et  $\alpha 4$ , entre l'extrémité C-terminale de l'hélice  $\alpha 4$  et l'extrémité N-terminale de l'hélice  $\alpha 6$ , et entre l'hélice  $\alpha 7$  et  $\alpha 8$ .

La modélisation de la structure d'EsGST12 à partir d'un alignement avec RnPGDS (Figure 64) a permis de localiser ces divergences par rapport aux différents sites de l'enzyme. Ainsi, les résidus responsables de ces différences, situés entre  $\beta 1$  et  $\alpha 1$ , et entre  $\beta 2$  et  $\alpha 2$ , sont vraisemblablement positionnés dans le site catalytique de l'enzyme, plus particulièrement au niveau du site de fixation du glutathion. De même, de nombreux changements de séquences sont localisés entre l'hélice  $\alpha 4$  et l'hélice  $\alpha 6$ . Cette zone comprend une boucle entre  $\alpha 4$  et  $\alpha 5$  qui pourrait être repliée vers le site catalytique. Les changements dans  $\alpha 5$  et  $\alpha 6$  sont plutôt sur la face externe de l'enzyme. Au sein de ce groupe de GST, il existe une autre zone très variable qui est comprise dans la boucle entre  $\alpha 7$  et  $\alpha 8$ . Cette boucle semble être dirigée vers l'extérieur de l'enzyme, du même côté que l'hélice  $\alpha 6$ .

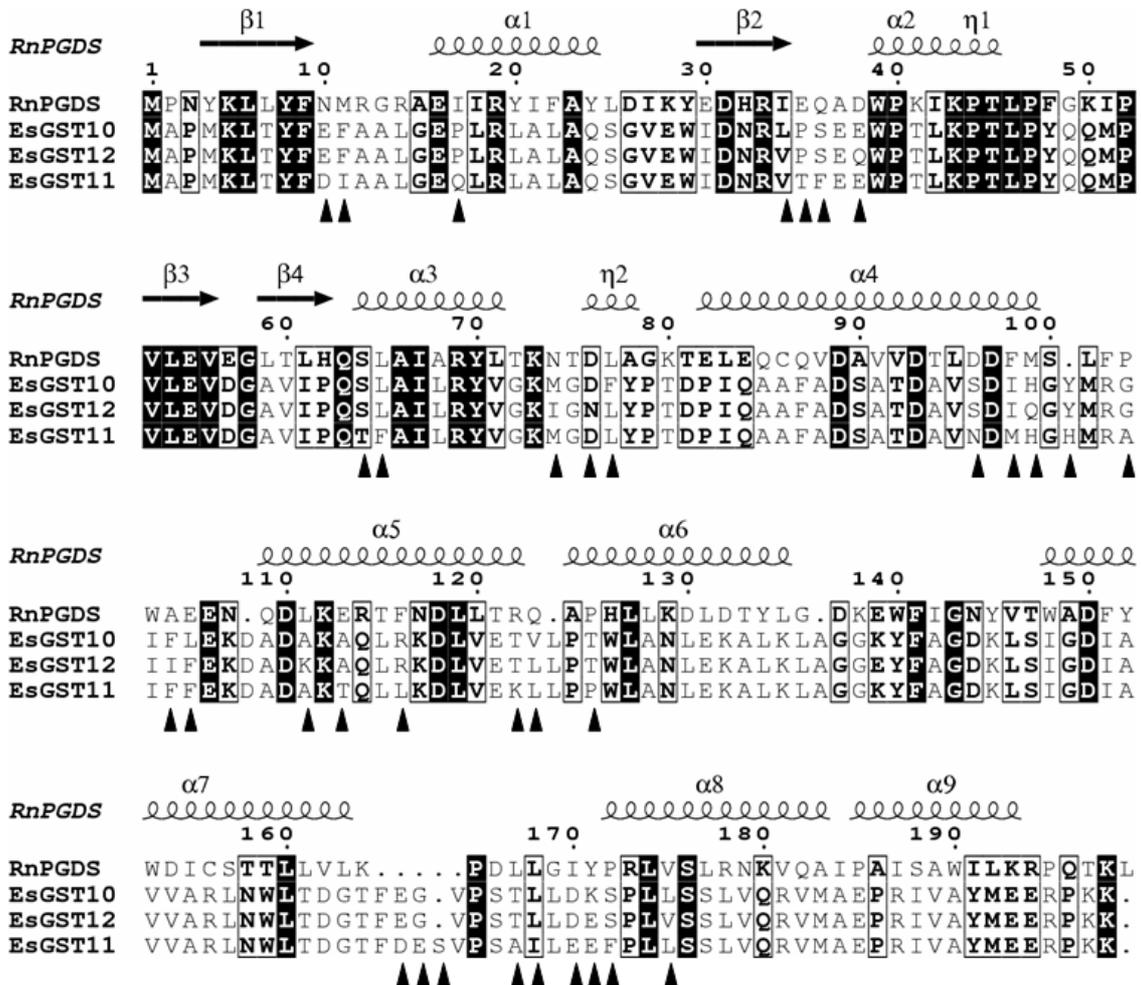


Figure 63: Alignement des GST Sigma du groupe B d'*Ectocarpus* avec la prostaglandine D synthase de rat.

Les éléments de structure secondaire de la protéine RnPGDS (PDB: 1PD2) sont représentés au dessus de l'alignement. Les triangles noirs localisent les résidus divergents entre les GST Sigma du groupe B d'*Ectocarpus*. Les résidus écrits en blanc et surlignés en noirs sont identiques entre les séquences murines et algales. Les résidus écrits en noir, encadrés sur fond gris, sont similaires.

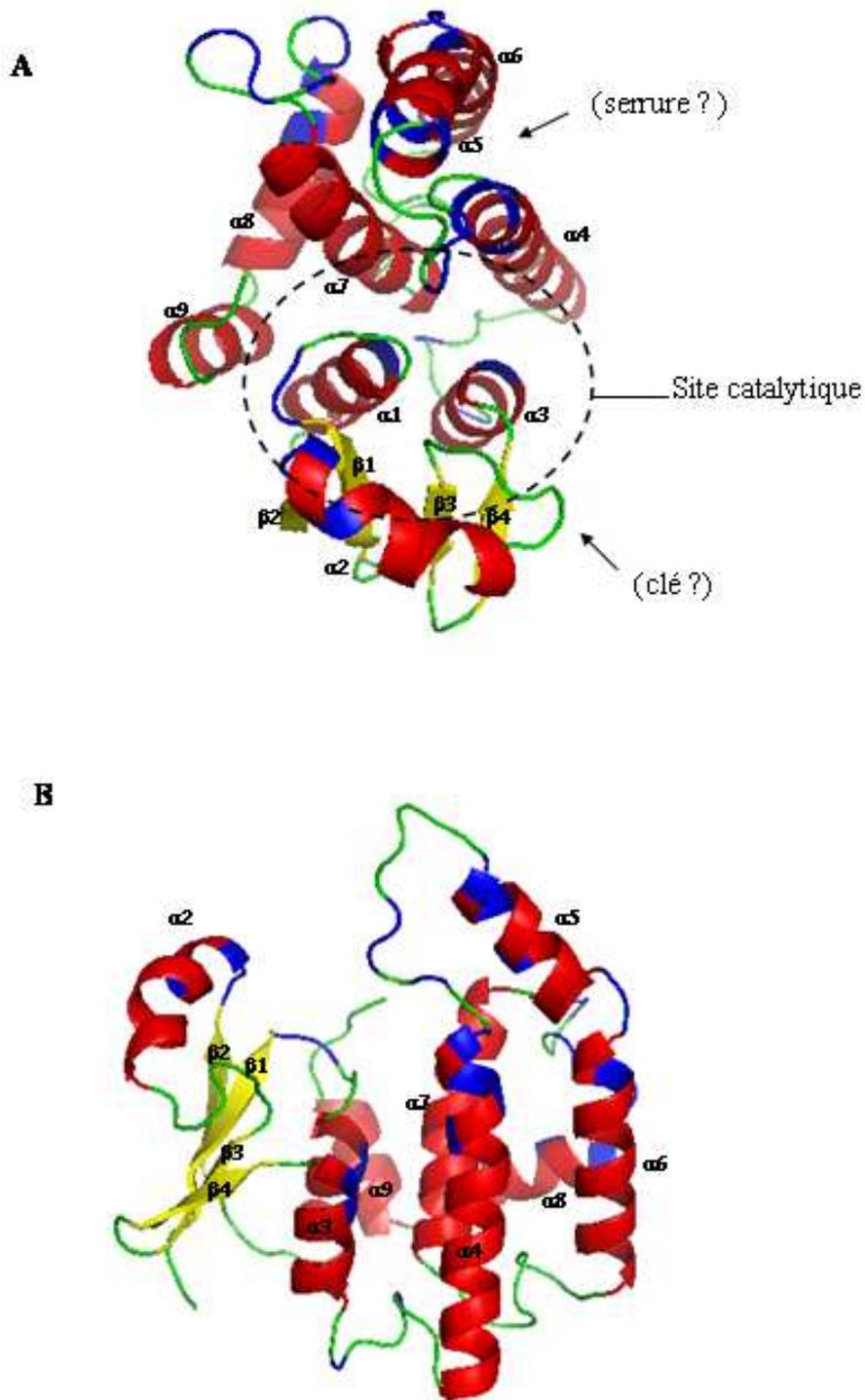


Figure 64: Modélisation de la structure de la protéine EsGST12.

Que se soit pour les protéines du groupe A ou du groupe B, les divergences observées ne sont pas positionnées aléatoirement sur la séquence. Il existe donc des zones strictement conservées et des zones variables.

### 3.7 Caractérisation des GST microsomales

Aucune GST microsomale n'a été mise en évidence parmi les EST de *L. digitata*. Chez *Ectocarpus*, trois GST microsomales ont été identifiées dans les ressources génomiques.

#### 3.7.1 Structure des Gènes

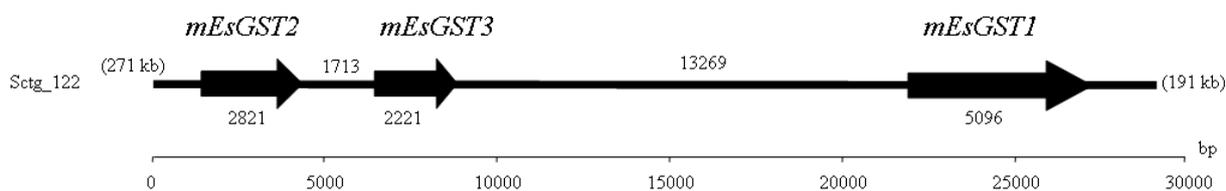
Les trois gènes de GST microsomales codent pour des protéines qui sont conservées. Ainsi, mEsGST1 et mEsGST3 sont les plus proches, avec 87 % d'identité au niveau des séquences en aa. Ensuite, mEsGST3 et mEsGST2 partagent 78 % d'identité, et mEsGST1 et mEsGST2 sont les plus divergentes, avec tout de même 73 % d'identité (Tableau 24).

**Tableau 24: Identité et similitude des GST microsomales d'*E. siliculosus*.**

	mEsGST1	mEsGST2	mEsGST3	identité %
mEsGST1		73,2	86,6	
mEsGST2	83,1		78,2	
mEsGST3	92,3	84,5		

similitude %

L'alignement des EST avec les séquences génomiques a permis de localiser ces gènes sur les supercontigs. Les résultats sont présentés dans la Figure 65.

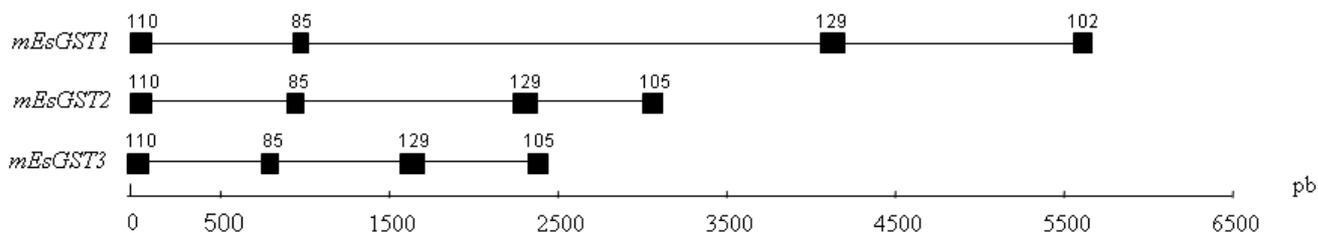


**Figure 65: Organisation génomique des gènes de GST microsomales d'*E. siliculosus*.**

Les gènes sont représentés par des flèches noires, leur taille depuis le codon d'initiation jusqu'au codon de terminaison de la traduction est indiquée en pb en dessous. Seule la partie du sctg supportant les gènes de mGST est représentée, et la taille des extrémités est indiquée entre parenthèses. La longueur des régions intergéniques est indiquée au-dessus des séquences.

Les trois gènes sont localisés sur le sctg\_122. Ils forment un tandem de trois gènes orientés dans le même sens. Les gènes *mEsGST2* et *mEsGST3* sont séparés par 1713 pb. La région intergénique entre *mEsGST1* et *mEsGST3* est sept fois plus grande et mesure 13269 pb. Il n'y a pas de gènes dans cette région intergénique.

Comparé aux gènes *mEsGST2* et *mEsGST3*, la taille de *mEsGST1* est plus importante. La structure de ces gènes a été analysée et les résultats sont présentés dans la Figure 66.



**Figure 66: Structure des gènes de GST microsomaux d'*E. siliculosus*.**

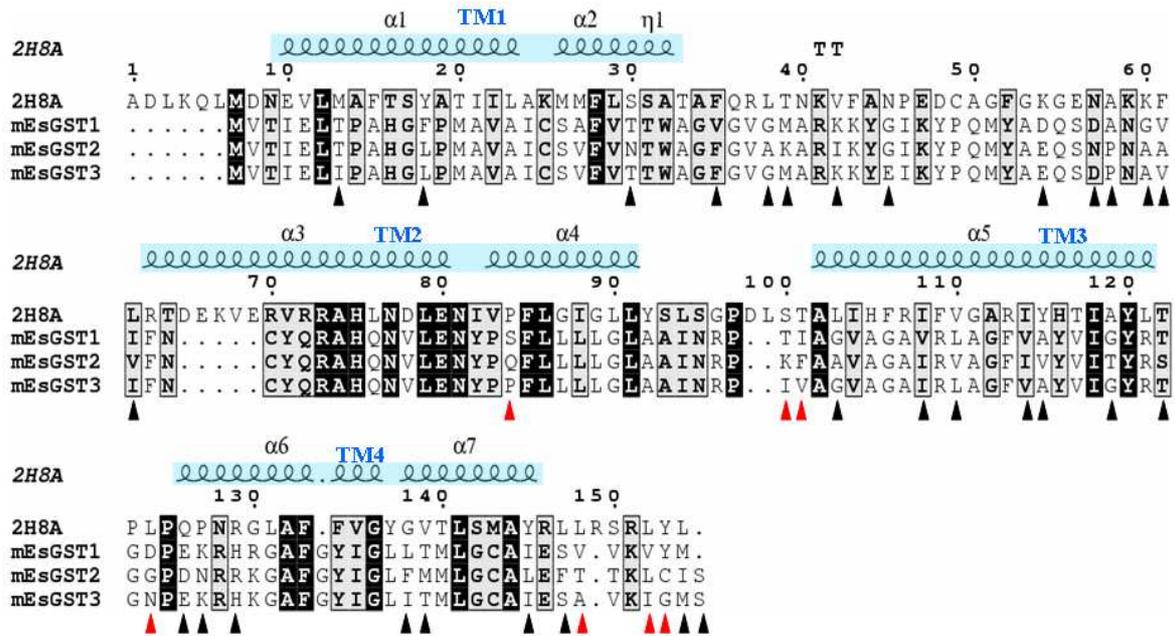
La structure des gènes a été établie en comparant les séquences génomiques et les séquences d'ADNc. Les exons sont représentés par des rectangles noirs et leur taille en paires de bases (pb) est indiquée au-dessus. L'échelle est identique pour les exons et les introns.

La structure est remarquablement bien conservée entre les trois gènes. Ils présentent tous quatre exons séparés par trois introns. La taille des exons est strictement conservée, avec respectivement 110, 85, 129, et 105 ou 102 pb pour le dernier exon. En revanche, la taille des introns est plus variable avec notamment un grand intron de 2707 pb entre les exons 2 et 3 du gène *mEsGST1*, ce qui explique sa plus grande taille (Figure 65).

### 3.7.2 Analyse des séquences protéiques mEsGST

Le fait que ces protéines soient membranaires rend leur expression hétérologue plus compliquée, ce qui se traduit par un nombre peu élevé de GST microsomaux cristallisés. Cependant, la structure tri-dimensionnelle a été obtenue pour la GST microsomale 1 de rat, purifiée à partir de microsomes de foie (Holm et al., 2006). Les protéines ont été cristallisées dans une bicouche lipidique selon un ratio lipide/ protéine faible obtenu par dialyse.

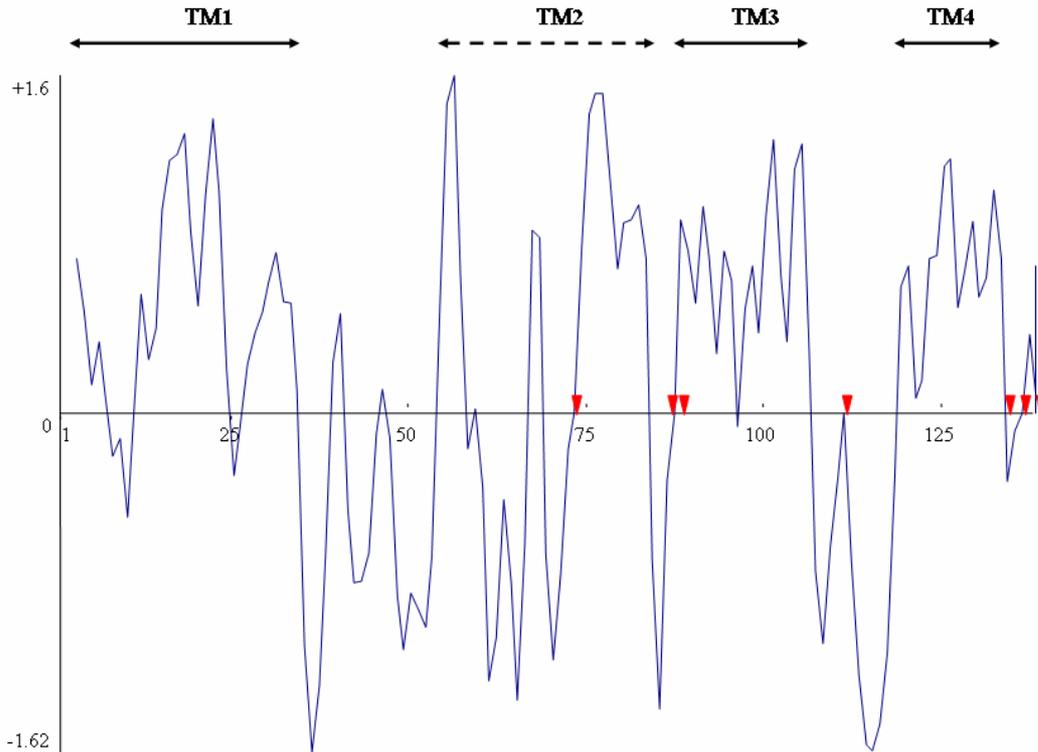
La Figure 67 présente un alignement des GST microsomaux d'*Ectocarpus* avec la protéine mRnGST1 (PDB: 2H8A).



**Figure 67: Alignement protéique des mEsGST avec RnMGST1.**

L'alignement a été généré par le programme ClustalW et édité sous ESPrpt 2.2. Les éléments de structure secondaire de la protéine mRnGST1 (PDB: 2H8A) (Holm et al., 2006) sont représentés au-dessus de l'alignement. Les segments transmembranaires sont surlignés en bleu. Les résidus écrits en blanc sur fond noir sont identiques, les résidus en noir sur fond gris sont similaires. Les triangles indiquent les résidus divergents entre les protéines d'*Ectocarpus* : en noir, une seule protéine diverge, en rouge les trois protéines divergent.

La taille des protéines mEsGST1 et mEsGST[2-3] est respectivement de 141 et 142 acides aminés. L'identité de séquence entre RnMGST1 et les mGST d'*Ectocarpus* étant faible (18 %), la position des structures secondaires de RnMGST1 sur les mGST d'algues est donc à prendre avec précaution. Toutefois, la structure générale des GST microsomales comprend quatre domaines transmembranaires (TM) constitués d'hélices  $\alpha$ . Chez RnMGST1, le segment TM1 est formé des hélices  $\alpha 1$  et  $\alpha 2$ , TM2 est formé par les hélices  $\alpha 3$  et  $\alpha 4$ , TM3 correspond à  $\alpha 5$ , et TM4 est constitué des hélices  $\alpha 6$  et  $\alpha 7$ . Les boucles comprises entre TM1 et TM2, et TM3 et TM4, sont situées dans le cytoplasme, tandis que les extrémités N et C-terminales, ainsi que la boucle entre TM2 et TM3, sont situées dans le lumen.



**Figure 68: Profil d'hydrophatie consensus des mEsGST[1-3].**

Le profil d'hydrophatie a été généré dans le logiciel Vector NTi en utilisant l'algorithme de Kyte et Doolittle, à partir du consensus de l'alignement des trois GST microsomales d'*Ectocarpus*. Les segments transmembranaires probables sont délimités par des flèches. La position des résidus hautement divergents est indiquée par des triangles rouges. Le segment TM2 est en pointillé car sa longueur est incertaine.

La localisation des résidus divergents entre les mEsGSTs met en évidence que les régions correspondantes à TM1 et TM2 sont très conservées. En revanche, la boucle cytoplasmique entre TM1 et TM2 présente de nombreuses variations. De même, les segments transmembranaires TM3 et TM4 sont le site de plusieurs divergences. Il existe sept positions qui présentent 100 % de divergence entre les paralogues d'*Ectocarpus*. Elles sont situées entre les deux hélices de TM2, à l'extrémité C-terminale de la boucle entre TM2 et TM3, et de la boucle entre TM3 et TM4, et dans l'extrémité C-terminale des protéines. Cinq de ces positions sont donc vraisemblablement localisées dans la partie de la protéine située dans le lumen. L'analyse du profil d'hydrophatie (Figure 68) montre qu'il existe bien quatre segments transmembranaires dans les mEsGST. Cependant, la délimitation du segment 2 est incertaine.

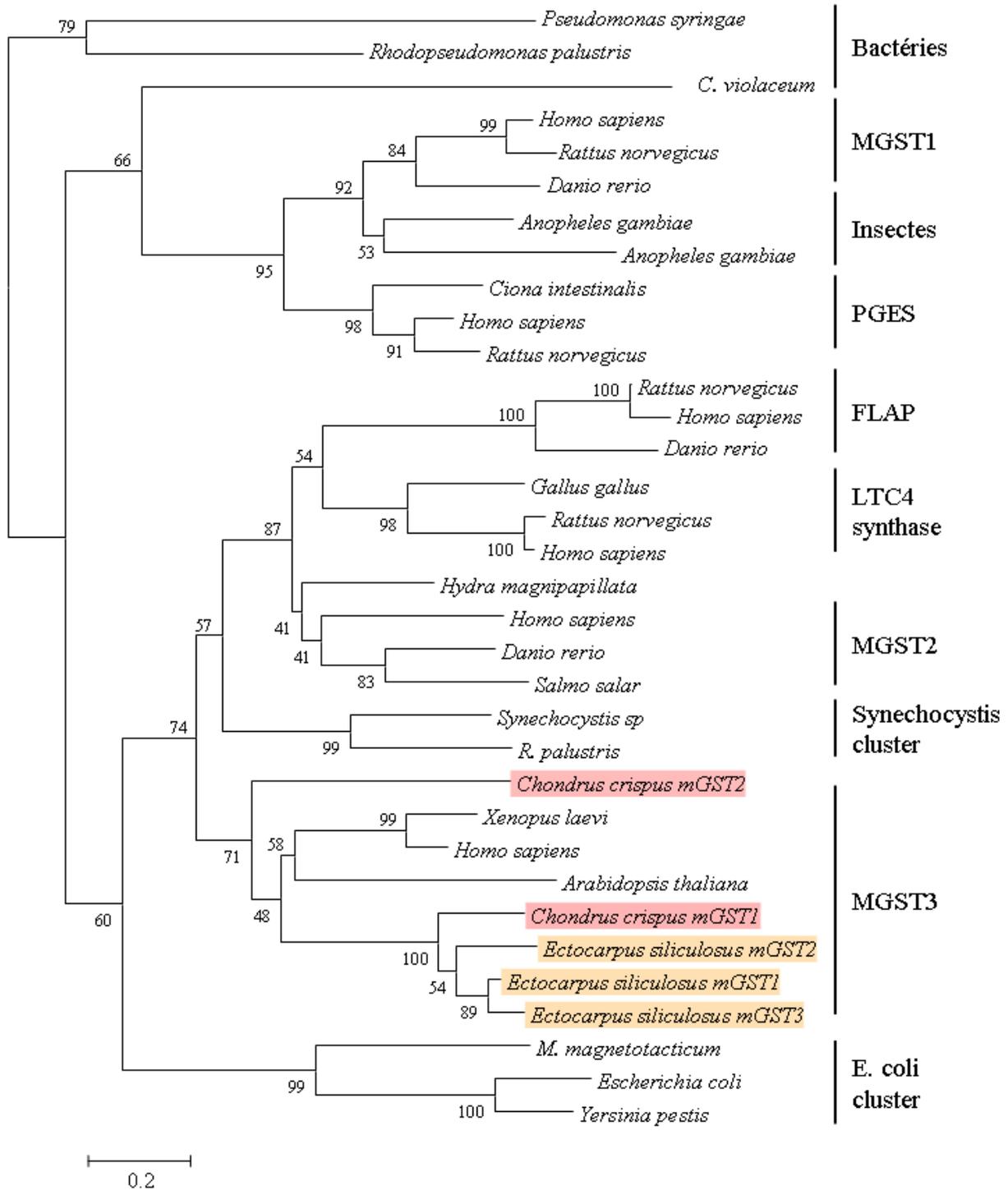
### 3.7.3 Etude phylogénétique des GST microsomales

Les GST microsomales forment une superfamille de protéines appelées MAPEG. Les membres de cette superfamille sont regroupées par classes, dont six chez les eucaryotes et trois chez les procaryotes.

J'ai réalisé une analyse phylogénétique pour évaluer la position des GST microsomales d'algues brunes au sein de cette superfamille. J'ai inclus dans cette analyse des séquences identifiées chez *C. crispus*, nommées mCcGST1 et mCcGST2. La protéine mCcGST1 partage entre 72 et 77 % d'identité avec les protéines d'*Ectocarpus*. La protéine mCcGST2 partage 29 à 32 % avec mCcGST1 et mEsGST[1-3].

Un alignement a été réalisé avec des membres représentatifs de chacune des classes de MAPEG et des clusters spécifiques de bactéries et d'insectes identifiés par Bresell et al. (2005). Un arbre phylogénétique basé sur la méthode des distances est présenté en Figure 69. Seule la méthode du Neighbor Joining a été utilisée au cours de cette analyse car il s'agit ici d'assigner les GST microsomales d'algues à l'une ou l'autre des classes de MAPEG préalablement définies par Bresell et ses collaborateurs. La topologie de l'arbre obtenu par cette méthode est en accord avec la littérature et les nœuds définissant les différentes familles de MAPEG sont supportés par de fortes valeurs de bootstraps (> 70%).

Les protéines mCcGST1 et mEsGST[1-3] appartiennent à la même classe, ceci étant confirmé par la forte valeur de bootstrap du nœud qui les unit. Ces protéines semblent appartenir à la classe MGST3 qui est la seule à regrouper des protéines d'origine animale et végétale. La protéine CcGST2 semble également appartenir à cette classe, comme l'indique la valeur de bootstrap du nœud la reliant aux autres MGST3.



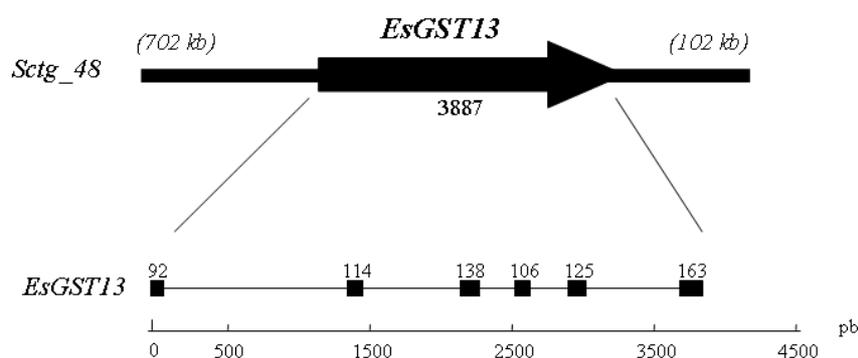
**Figure 69: Arbre phylogénétique des MAPEG obtenu par la méthode du Neighbor Joining.**

L'arbre a été construit par le logiciel Mega 4.0 (Tamura et al., 2007), à partir d'un alignement généré par le programme ClustalW. L'arbre présenté est un consensus de 1000 répliquats de bootstraps. Les GST microsomaux de *C. crispus* et *E. siliculosus* sont surlignées respectivement en rouge et orange.

### 3.8 Caractérisation de la protéine EsGST13, une GST Kappa

Le gène *EsGST13* (Esi0048\_0023) a été identifié dans le génome et dans les banques d'EST. Ce gène n'a pas d'homologue dans les autres banques de macroalgues. Les résultats de blast sur la banque UniProtKB semblent indiquer que ce gène code pour une GST de type Kappa.

Il est unique dans le génome, est localisé sur le sctg \_48, et présente une structure de six exons et cinq introns dans la séquence codante (Figure 70).



**Figure 70: Structure du gène EsGST13.**

Le gène est représenté par une flèche noire, sa taille depuis le codon d'initiation jusqu'au codon de terminaison de la traduction est indiquée en pb en dessous. La taille du supercontig bordant ce gène est indiquée entre parenthèses. La structure du gène a été établie en comparant la séquence génomique et les séquences d'ADNc. Les exons sont représentés par des rectangles noirs et leur taille en pb est indiquée au-dessus. L'échelle est identique pour les exons et les introns.

La taille du gène est comparable à celle des autres familles de GST. Les six exons mesurent respectivement 92, 114, 138, 106, 125 et 163 pb. Ce gène code pour une protéine de 245 aa qui partage 32 à 40 % d'identité avec des GST Kappa de nématode (CeGSTK) et de mammifères (HsGSTK1, MmGSTK1) (Tableau 25).

**Tableau 25: Pourcentages d'identité entre la protéine EsGST13 et des GST Kappa.**

	HsGSTK1	MmGSTK1	CeGSTK
EsGST13	40 %	36 %	32 %
HsGSTK		71 %	29 %
MmGSTK			28%

HsGSTK1: accession Q9Y2Q3; MmGSTK1: accession AY29096; CeGSTK: QO9652.

Les GST Kappa sont caractérisées par l'insertion d'un domaine hélicoïdal dans le domaine thiorédoxine. J'ai réalisé un alignement entre la GST Kappa d'*Ectocarpus* et les GST Kappa

d'*H. sapiens* et de *C. elegans* en faisant apparaître les éléments de la structure secondaire de la protéine humaine cristallisée (Figure 71).

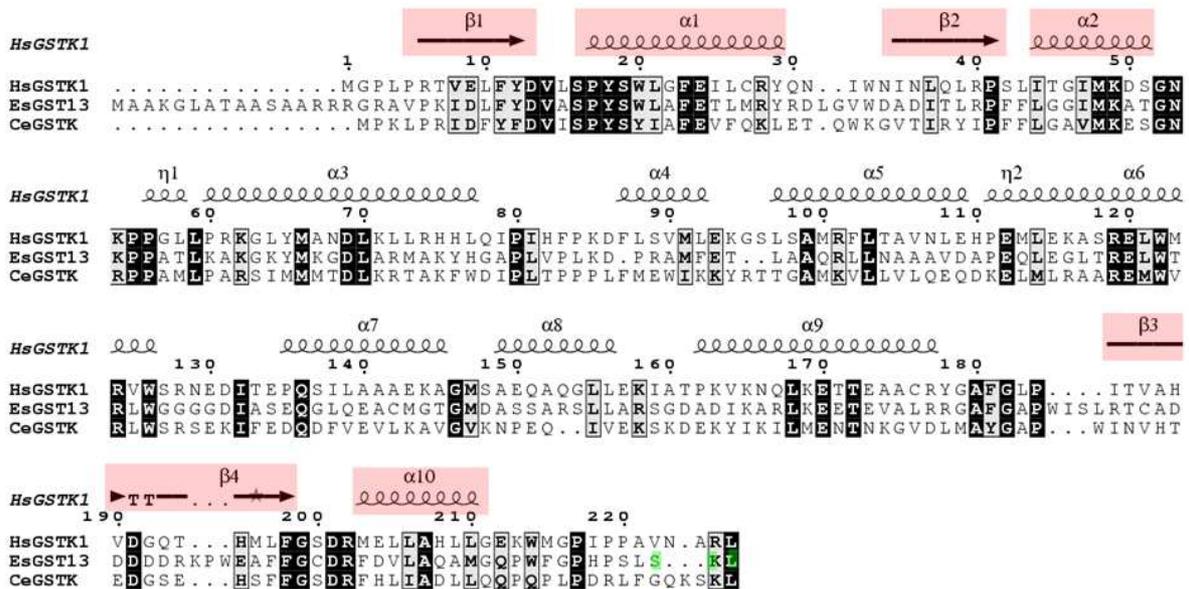


Figure 71: Alignement de la protéine EsGST13 avec les GST Kappa humaine et de nématode.

L'alignement a été généré par le programme ClustalW et édité sous ESPript 2.2. Les éléments de structure secondaire de la protéine HsGSTK1 (PDB: 1YZX) (Li et al., 2005) sont représentés au dessus de l'alignement. Les résidus écrits en blanc sur fond noir sont identiques, les résidus en noir encadrés sur fond gris sont similaires. Les éléments de structure secondaire correspondants au motif thiorédoxine sont surlignés en rouge. Le signal C-terminal d'adressage aux péroxysomes est surligné en vert.

Le domaine hélicoïdal s'insère entre l'hélice  $\alpha 2$  et le brin  $\beta 3$ . Il est constitué par 7 hélices chez HsGSTK1. La protéine EsGST13 possède un signal d'adressage aux péroxysomes (Miura et al., 1992), comme la protéine CeGSTK.

## 4. Fonctions biologiques des glutathion S-transférases chez les algues.

---

Dans cette partie, je présente les résultats des expériences que j'ai réalisées pour évaluer la fonction biologique des GST chez les algues brunes et rechercher des substrats de ces enzymes. J'ai d'une part utilisé des approches de biologie moléculaire pour identifier des conditions de stress qui modifient l'expression des gènes de GST, et d'autre part, des approches de biochimie pour mesurer l'activité d'enzymes recombinantes sur différents substrats.

### 4.1 Analyse des variations d'expression des gènes en fonction des traitements exogènes

Afin de générer des perturbations cellulaires, plusieurs types de traitements ont été appliqués. Ainsi, j'ai traité *L. digitata* avec des oligoguluronates, du cuivre, du méthyle jasmonate et du 15-HETE. Pour *Ectocarpus*, j'ai élargi le spectre des molécules et j'ai réalisé des traitements avec du peroxyde d'hydrogène, de l'azide de sodium, des herbicides (diuron, atrazine, glyphosate, Round Up® ®), des métaux lourds (CdCl<sub>2</sub>, ZnSO<sub>4</sub>, CuSO<sub>4</sub>), des hydrocarbures (galette de pétrole, essence sans plomb), des dérivés d'acides gras oxydés (MeJA, 13-HpOTrE, 15-HEPE, 15-HETE). J'ai aussi endommagé des algues par coupure avec une lame de rasoir, et analysé l'expression de gènes à partir d'algues ayant subi des traitements hypo et hypersalins réalisés par S. Dittami dans le cadre de sa thèse.

Les variations d'accumulation des transcrits des gènes de GST d'*E. siliculosus* et de *L. digitata* ont été mesurées par PCR quantitative sur des ADNc synthétisés à partir des ARN totaux. Les valeurs relatives d'expression présentées résultent de plusieurs étapes de calculs permettant de normaliser les données (cf Matériel et méthode 4.3). Les valeurs en ordonnée dans les histogrammes sont exprimées en logarithme de base 2, et les variations sont donc égales à 2<sup>n</sup>. Cette représentation en Log<sub>2</sub> permet une meilleure visualisation des rapports, en présentant notamment des valeurs négatives pour les phénomènes de répression, et en réduisant l'échelle.

Les expériences de traitements sur *L. digitata* et *E. siliculosus* ayant été réalisées à différents moments au cours de la thèse, j'expose ici les résultats de chaque gène par espèce, puis par

groupe au sein de chaque espèce. Les gènes de GST d'*Ectocarpus* n'ont pas pu tous être analysés en raison notamment de la difficulté à dessiner des oligonucléotides spécifiques.

#### 4.1.1 *Laminaria digitata*

Pour cette espèce, les traitements ont été réalisés pendant 6h et les quatre gènes de GST Sigma ont été analysés. En parallèle à ces traitements, j'ai mesuré la concentration de peroxyde d'hydrogène dans l'eau des algues traitées pendant les 90 premières minutes. Les résultats de cette cinétique sont donnés en Figure 72.

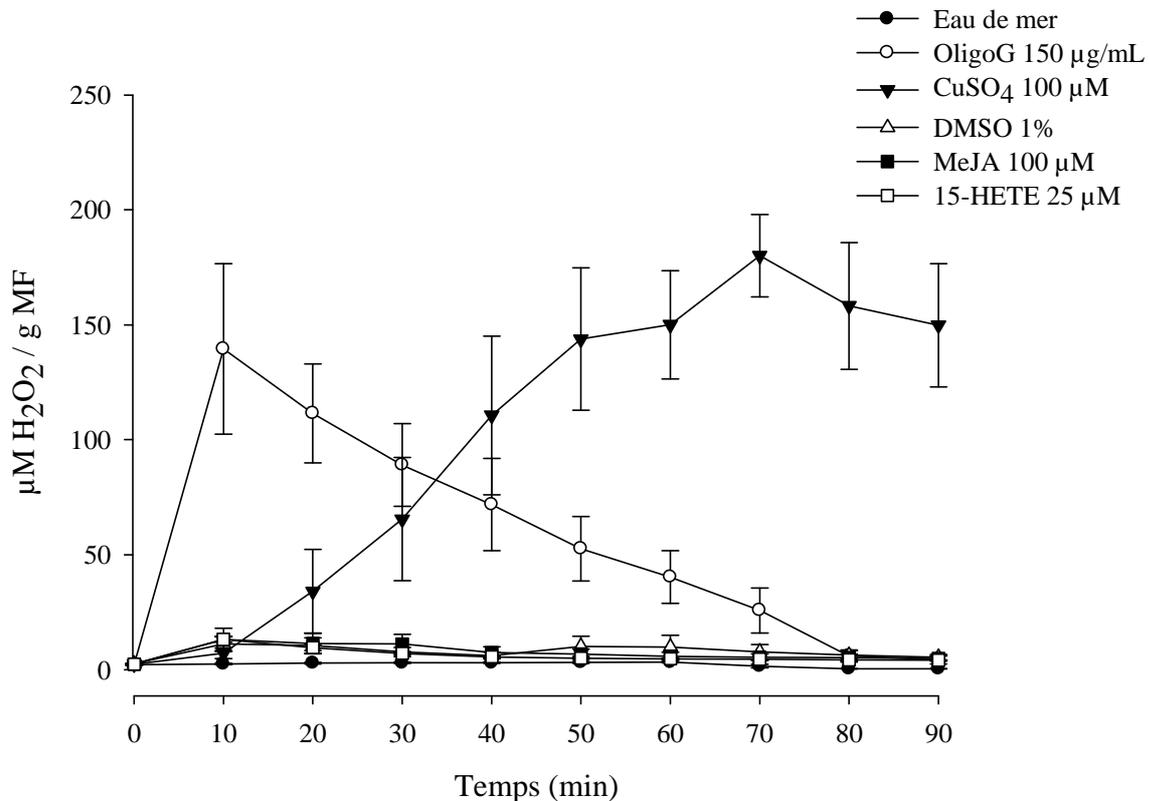


Figure 72: Mesure de la quantité d' $H_2O_2$  libérée par *L. digitata* en réponse à différents traitements.

Deux des quatre traitements appliqués à *L. digitata* entraînent une production et une libération de peroxyde d'hydrogène dans le milieu extracellulaire. Les oligogulonates induisent une synthèse d' $H_2O_2$  massive dans les dix premières minutes d'incubation. Il s'agit d'un burst oxydant. Le niveau de peroxyde d'hydrogène diminue ensuite progressivement pour revenir à un niveau basal après 80 minutes. Le cuivre provoque également une production importante de peroxyde d'hydrogène, d'intensité comparable à celle observée dans la condition précédente. Cependant, elle est plus progressive et atteint son maximum au bout de 70 minutes. Le niveau d' $H_2O_2$  reste très élevé après 90 minutes d'incubation.

#### 4.1.1.1 GST Sigma groupe A

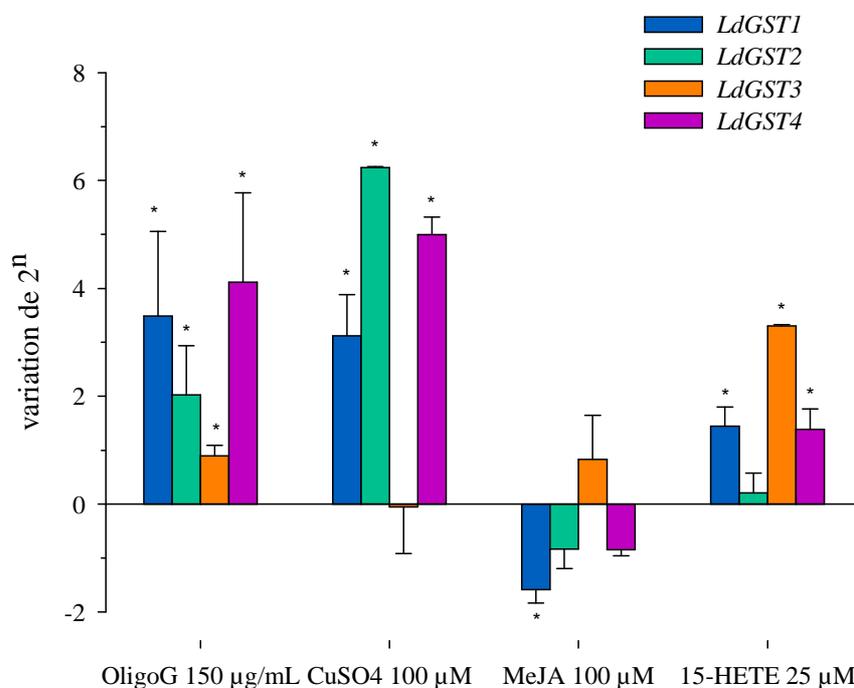
Pour *LdGST4*, la Figure 73 montre qu'après 6h de traitement, la quantité d'ARN messager de ce gène est multipliée par 16 en présence d'oligogulonates, et par 30 en réponse au cuivre. Le méthyle jasmonate ne modifie pas le niveau d'expression, et le 15-HETE entraîne une faible augmentation du niveau de transcrits.

#### 4.1.1.2 GST Sigma groupe B

Pour *LdGST1*, les traitements aux oligogulonates et au cuivre induisent une augmentation d'un facteur 9 de la quantité de transcrits accumulés (Figure 73). Les 2 dérivés d'acides gras oxydés modifient l'expression de ce gène avec la même intensité, mais le MeJA la réprime alors que le 15-HETE l'induit.

Les dérivés d'acides gras MeJA et 15-HETE ne modifient pas l'expression du gène *LdGST2*. En revanche le traitement par les oligogulonates induit une accumulation d'un facteur 4, et le cuivre multiplie massivement l'accumulation d'ARN messagers (par un facteur 60).

Enfin, les oligogulonates entraînent un doublement de la quantité de transcrit de *LdGST3*. Le cuivre et le méthyle jasmonate n'ont pas d'effet sur la transcription. En revanche, l'expression du gène est modifiée par un traitement 6h en présence de 15-HETE, avec une quantité de transcrits multipliée par 10.



**Figure 73: Profils d'accumulation des transcrits des gènes LdGST après 6h de traitements.**

Les valeurs significativement différentes des conditions contrôles sont indiquées par une astérisque (\*) ( $p < 0,05$ ).

#### 4.1.2 Ectocarpus siliculosus

Pour les expériences de traitements d'*Ectocarpus*, les temps 3h et 6h ont été considérés. De plus, la quantification des transcrits de GST a également été réalisée sur des lots d'ADNc correspondants à des stress salins appliqués pendant 6h et 24h.

Seules cinq des douze GST Sigma ont été analysées, dont deux sur sept du groupe A et trois sur cinq du groupe B. Deux des trois GST microsomales et la GST Kappa ont également été considérées, ainsi que deux des cinq GST putatives.

##### 4.1.2.1 GST Sigma groupe A

L'analyse du profil d'expression du gène *EsGST3* (Figure 74) montre qu'après 3h de traitements, les variations d'accumulation de transcrits sont relativement faibles. En revanche, après 6h, plusieurs traitements ont un effet important sur le niveau d'expression de ce gène. Ainsi, l'azide de sodium (NaN<sub>3</sub>) induit une augmentation de l'expression du gène par un facteur 30. Le glyphosate et sa formule commerciale, le Round Up®®, entraînent une forte accumulation de transcrits, avec des quantités multipliées par 13 et 65 respectivement. De même, le cuivre induit l'expression du gène par un facteur 12.

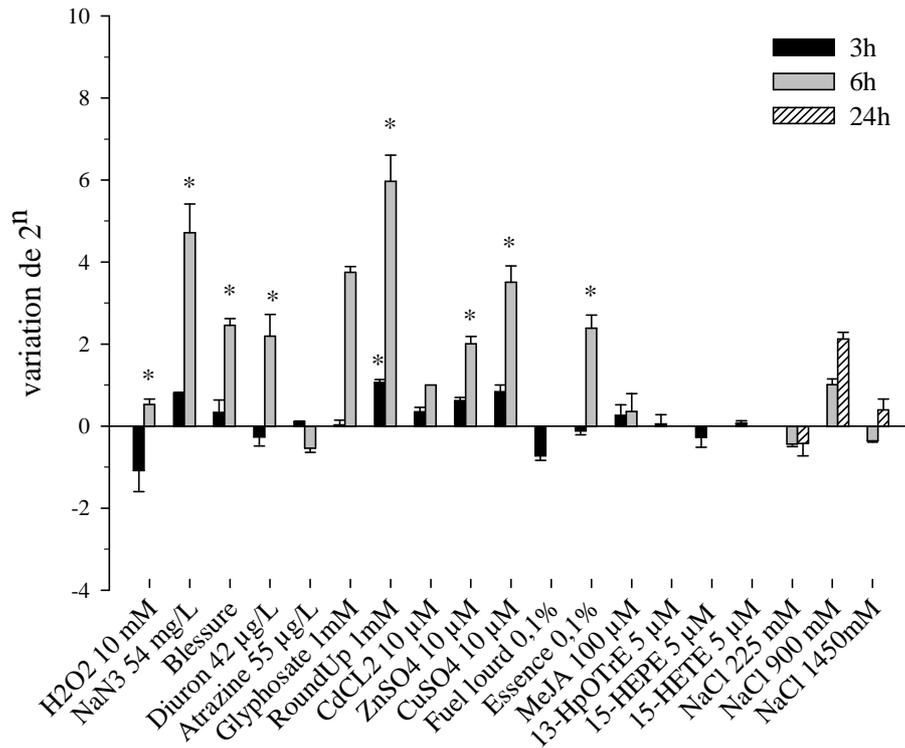
D'autres traitements influencent plus modérément le profil d'expression du gène *EsGST3*. Les blessures au rasoir, l'herbicide diuron, le sulfate de zinc, et l'essence multiplie par 4-5 la quantité de transcrits accumulés.

Enfin, aucune variation de la transcription de ce gène n'a été observée en présence d'atrazine et des dérivés d'acides gras oxydés testés. De même, le stress salin n'a que peu d'effet sur l'expression gène *EsGST3*, car c'est seulement après 24h d'incubation dans un milieu hypersalin (900 mM de NaCl, soit environ deux fois la concentration de l'eau de mer) qu'une induction a été mise en évidence.

Le gène *EsGST9* (Figure 75) résulte de l'épissage alternatif du locus *Esi0648\_0004*. Les oligonucléotides ont été dessinés dans la partie 3'UTR non codante de ce gène, sur la base des EST d'*EsGST9*. On ne peut donc pas exclure que ces oligonucléotides s'hybrident sur la partie 3'UTR du gène *EsGST8* si celui-ci est transcrit.

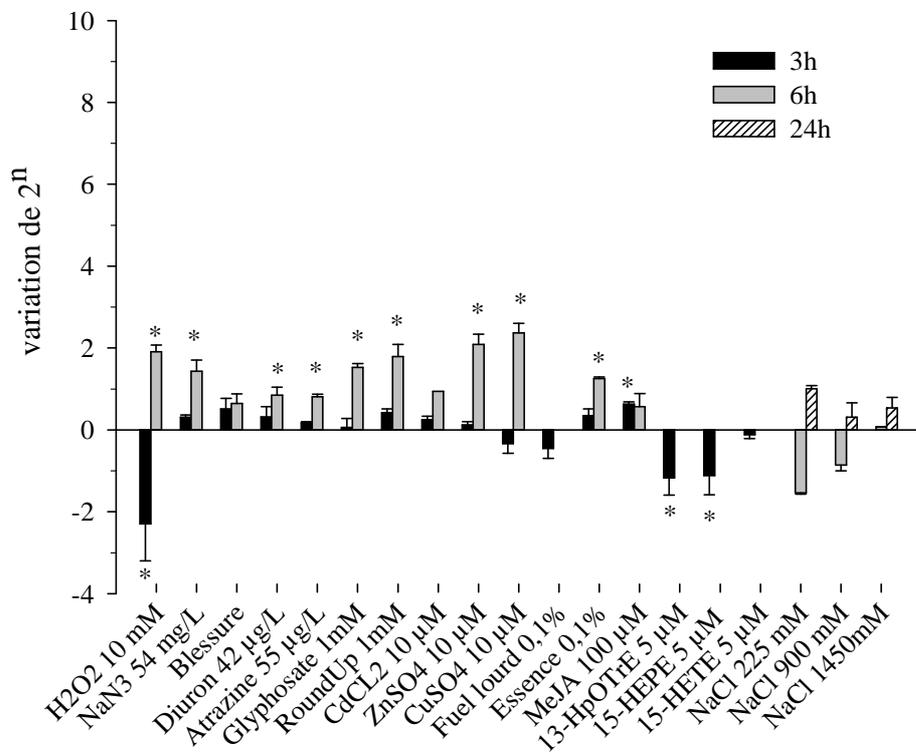
Son expression est d'une manière générale plus faiblement affectée que les autres GST par les traitements réalisés. A l'instar du gène *EsGST3*, les traitements exogènes ont moins d'effet à 3h qu'à 6h, à l'exception du peroxyde d'hydrogène et des oxylipines 13-HpOTrE et 15-HEPE, qui diminuent l'accumulation de transcrit (facteur 3-5) par rapport aux conditions contrôles.

Après 6h, le peroxyde d'hydrogène, l'azide de sodium, le glyphosate, le Round Up® , le zinc et le cuivre ont une influence modérée sur l'expression d'*EsGST9*, en engendrant une augmentation de la quantité de transcrits du même ordre que ce qui a été décrit ci-dessus. Les variations en condition de stress salin sont un peu surprenantes, notamment pour les conditions 225 mM et 900 mM, où on observe une diminution après 6h d'incubation et une induction après 24h. Cependant, l'intensité de ces variations est peu élevée (maximum d'un facteur 3).



**Figure 74: Modification du profil d'accumulation des transcrits du gène *EsGST3* en fonction de divers traitements.**

Les valeurs significativement différentes des conditions contrôles sont indiquées par une astérisque (\*) ( $p < 0,05$ ).



**Figure 75: Modification du profil d'accumulation des transcrits du gène *EsGST9* en fonction de divers traitements.**

Les valeurs significativement différentes des conditions contrôles sont indiquées par une astérisque (\*) ( $p < 0,05$ ).

#### 4.1.2.2 GST Sigma groupe B

Le Round Up® et le cuivre sont des conditions qui influencent fortement l'expression d'*EsGST1* (Figure 76). En effet, une forte accumulation de transcrits est observée après 3h et 6h en présence de l'herbicide. De plus, le cuivre, après 3h de traitement n'a que peu d'effet, alors qu'après 6h, une augmentation du niveau de transcrit d'un facteur 9 est observée par rapport au témoin eau de mer.

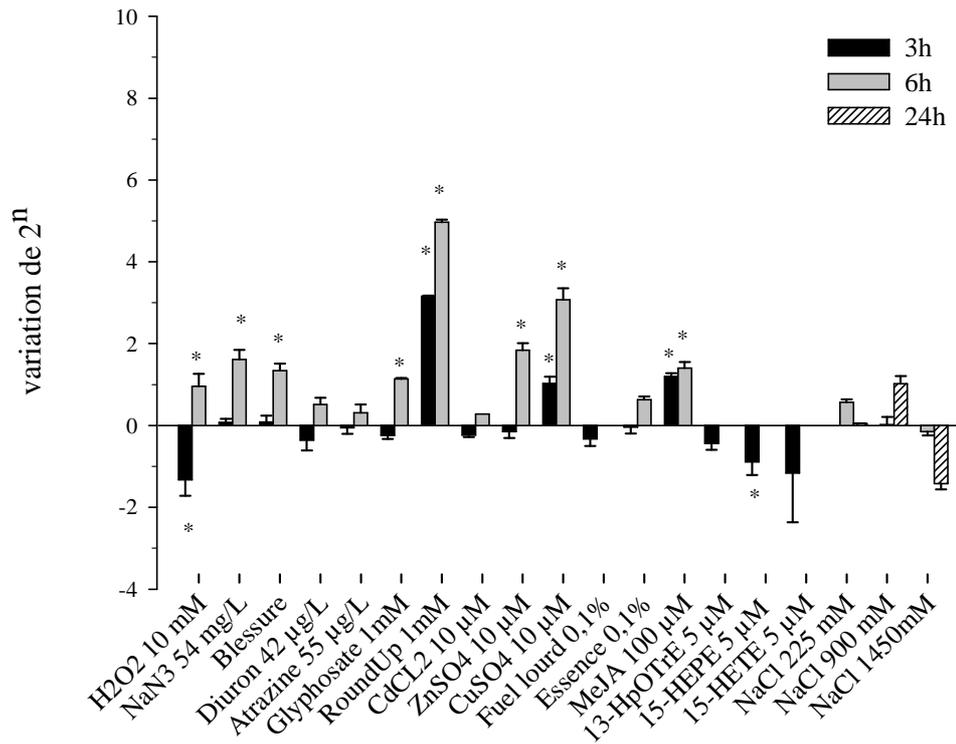
D'autres traitements ont un effet moindre sur l'expression de ce gène. Le peroxyde d'hydrogène, qui réprime d'un facteur 2-3 l'expression après 3h, entraîne un doublement de la quantité de transcrits après 6h de traitement. L'azide de sodium, le zinc et les blessures au rasoir sont responsables d'une augmentation modérée de l'expression d'*EsGST1* après 6h. Le méthyle jasmonate montre aussi un effet modéré, avec des facteurs d'accumulation d'environ 2-3 après 3h et 6h d'incubation. En revanche, les autres dérivés d'acide gras ont tendance à réprimer légèrement ce gène.

L'expression du gène *EsGST2* (Figure 77) est relativement peu affectée par les traitements exogènes et les principales variations sont enregistrées après 3h. Ainsi, le peroxyde d'hydrogène et le fuel lourd répriment d'un facteur 4 l'accumulation d'ARN messagers. A l'inverse, le 15-HETE entraîne une accumulation de transcrits d'un facteur 3,5.

La plupart des traitements réalisés ont un impact sur l'expression du gène *EsGST12* (Figure 78). Ainsi, le peroxyde d'hydrogène, qui entraîne une baisse de la quantité de transcrits à 3h, multiplie par 14 leur nombre après 6h d'incubation. L'azide de sodium, dont l'effet est nul à 3h, provoque une forte augmentation de l'expression à 6h. De plus, la formule commerciale du glyphosate induit une augmentation de la quantité d'ARNm dès 3h, équivalent au traitement par le glyphosate seul après 6h, puis multiplie par 200 la quantité de transcrits accumulée après 6h de traitement. Le cuivre accroît l'expression d'un facteur 5 après 3h et d'un facteur 60 après 6h d'incubation. Le zinc induit l'expression du gène d'un facteur 12 après 6h.

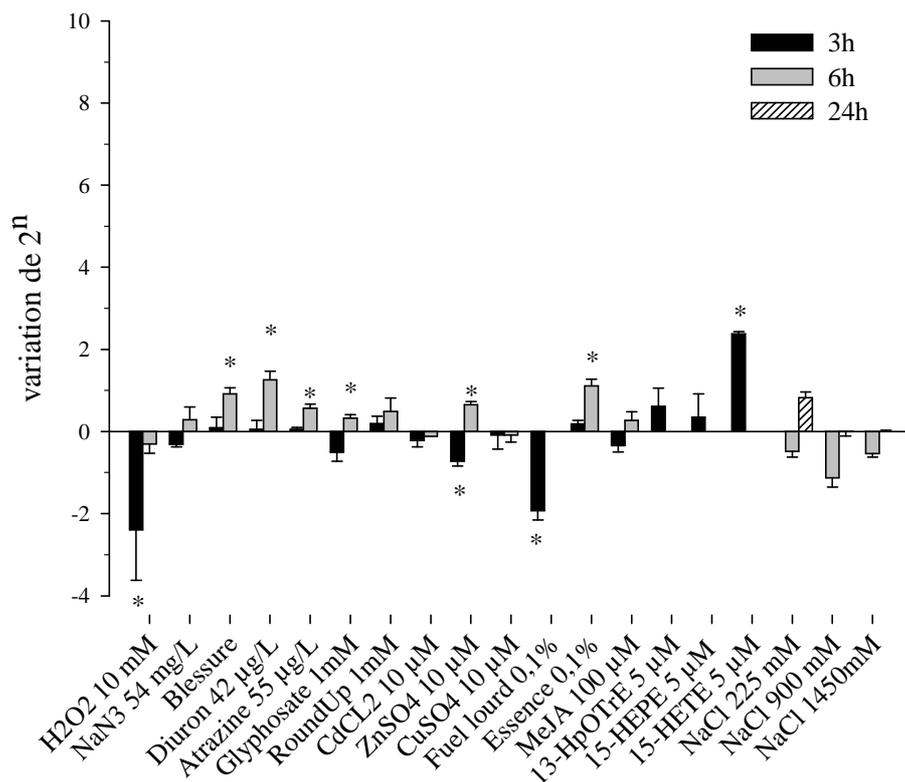
D'autres traitements ont un impact moindre mais significatif sur les profils d'expression. Les blessures au rasoir, le Diuron, le glyphosate et le méthyle jasmonate augmentent le pool de transcrits d'un facteur 5 en moyenne après 6h de traitement.

L'atrazine, le cadmium et les hydroperoxydes d'acides gras n'ont pas d'effet sur la transcription du gène *EsGST12*.



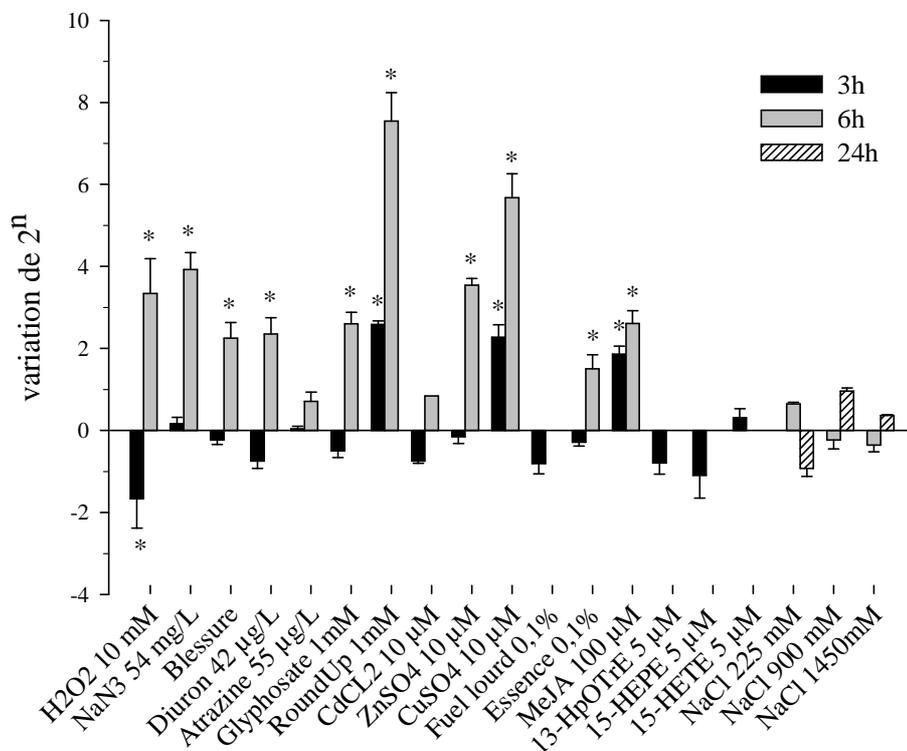
**Figure 76: Modification du profil d'accumulation des transcrits du gène *EsGST1* en fonction de divers traitements.**

Les valeurs significativement différentes des conditions contrôles sont indiquées par une astérisque (\*) (p<0,05).



**Figure 77: Modification des profils d'accumulation des transcrits du gène *EsGST2* en fonction de divers traitements.**

Les valeurs significativement différentes des conditions contrôles sont indiquées par une astérisque (\*) ( $p < 0,05$ ).

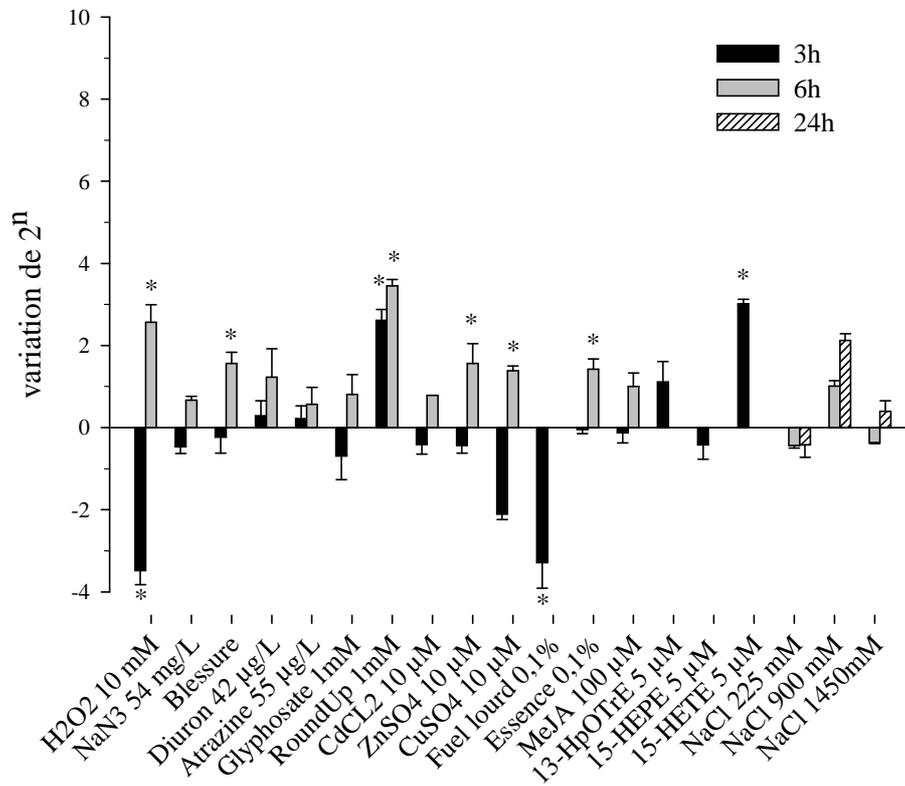


**Figure 78: Modification du profil d'accumulation des transcrits du gène *EsGST12* en fonction de divers traitements.**

Les valeurs significativement différentes des conditions contrôles sont indiquées par une astérisque (\*) ( $p < 0,05$ ).

### 4.1.2.3 GST Kappa

La quantité de transcrits du gène *EsGST13* (Figure 79) est diminuée de 10 et 12 fois après 3h de traitement par le fuel lourd et le peroxyde d'hydrogène respectivement. De même, après 3h d'incubation en présence de cuivre, le niveau d'accumulation de transcrits est divisé par 4. Cependant, au bout de 6h, ces 2 derniers traitements ont l'effet inverse et semblent induire l'expression de ce gène. Le Round Up® et le 15-HETE augmentent par 6 l'expression du gène après 3h de traitement, effet qui est amplifié pour l'herbicide après 6h. Les blessures au rasoir, le zinc et l'essence, qui n'ont pas d'effet sur l'expression du gène *EsGST13* après 3h, multiplient environ par 2 le taux de transcrits après 6h.



**Figure 79: Modification du profil d'accumulation des transcrits du gène *EsGST13* en fonction de divers traitements.**

Les valeurs significativement différentes des conditions contrôles sont indiquées par une astérisque (\*) ( $p < 0,05$ ).

#### 4.1.2.4 GST microsomales

Après 3h de traitement, la plupart des conditions entraîne une diminution de l'expression du gène *mEsGST1* (Figure 80). Ainsi, en présence de peroxyde d'hydrogène et de fuel lourd, le taux de transcrite est divisé par 2, alors que le cuivre divise par 12 cette quantité. Les dérivés d'acides gras provoquent tous une baisse de 2 à 8 fois du niveau d'expression du gène *mEsGST1*.

Au bout de 6h, les profils sont inversés et la plupart des traitements augmente la quantité de transcrits. Ainsi, le cuivre stimule d'un facteur 4-5 l'expression du gène. De plus, l'azide de sodium et le glyphosate qui n'ont pas d'effet significatif à 3h, induisent respectivement d'un facteur 8 et 7 ce taux d'expression. Le Round Up® induit l'accumulation de 25 fois plus de transcrits.

Les profils d'accumulation de transcrits du gène *mEsGST2* (Figure 81) montrent que les traitements appliqués ont globalement un faible effet répresseur à 3h et modérément inducteur à 6h. Ainsi, les blessures au rasoir, le Round Up® ®, le cuivre et le fuel lourd diminuent l'expression d'un facteur 2 à 4. Au bout de 6h, l'azide de sodium, le Diuron, le glyphosate, le Round Up® ®, le zinc, le cuivre et l'essence augmentent l'expression de 3 à 8 fois. Par contre, le stress hyposalin (225 mM NaCl, soit deux fois moins que la concentration en eau de mer) entraîne une diminution de la quantité de transcrits *mEsGST2* après 24h de traitement.

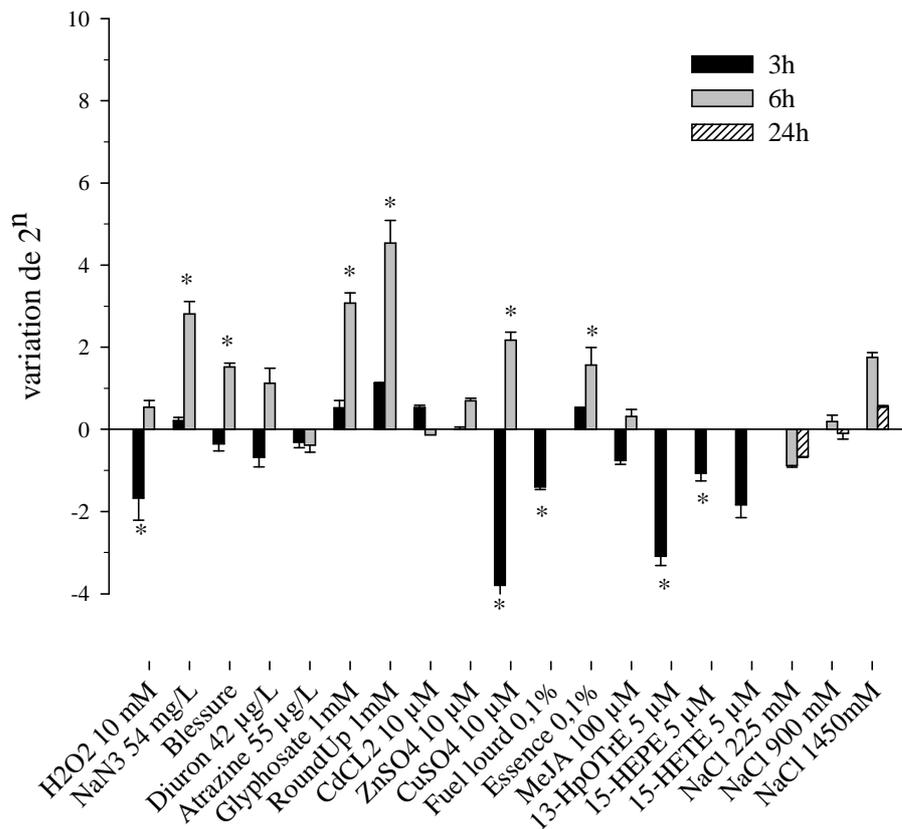


Figure 80: Modification du profil d'accumulation des transcrits du gène *mEsGST1* en fonction de divers traitements.

Les valeurs significativement différentes des conditions contrôles sont indiquées par une astérisque (\*) ( $p < 0,05$ ).

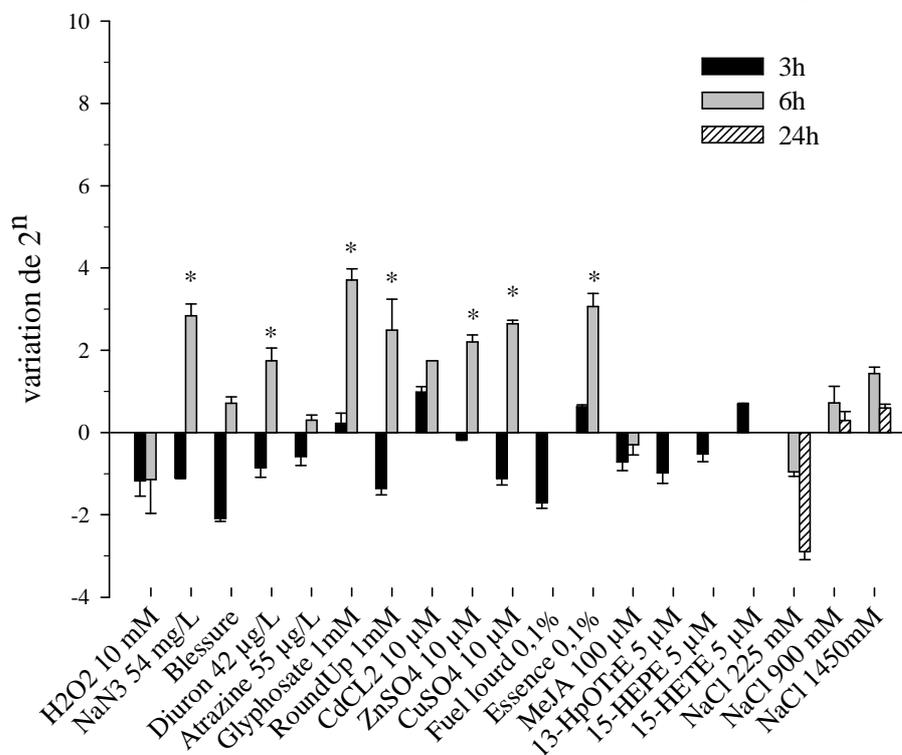


Figure 81: Modification du profil d'accumulation des transcrits du gène *mEsGST2* en fonction de divers traitements.

#### 4.1.2.5 GST putatives

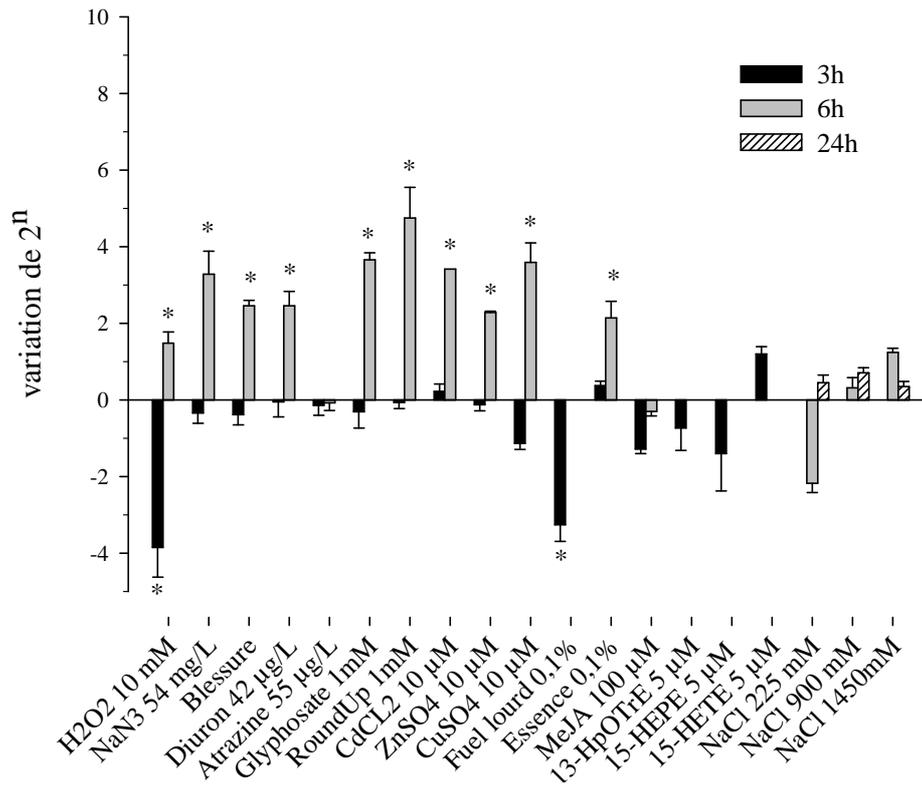
Le peroxyde d'hydrogène et le fuel lourd entraînent une forte diminution de la quantité de transcrits du gène *Esi0047\_117* (Figure 82) après 3h de traitement. Les autres conditions n'ont pas d'effets significatifs après cette période d'incubation.

En revanche, au bout de 6h, le peroxyde d'hydrogène induit l'expression de ce gène d'un facteur 3, l'azide de sodium d'un facteur 11, le glyphosate et le Round Up® d'un facteur 12 et 30 respectivement, et le cuivre d'un facteur 13. De plus, la quantité de transcrits est divisée par 6 en condition de stress hyposalin, et aucun effet n'est observé après 24h. Les stress hypersalins n'ont pas d'influence notable sur le niveau de transcription de ce gène.

Le gène *Esi0019\_0095* (Figure 83) est globalement réprimé dans les conditions de traitements testées, notamment après 3h. Par contre, après 6h, on observe une augmentation de la quantité de transcrits suite aux traitements par le peroxyde d'hydrogène et le glyphosate. En revanche, le Round Up® diminue l'expression du gène quelle que soit la durée d'incubation testée. De même, la quantité de transcrits est diminuée d'un facteur 7 après 3h et 6h chez les algues endommagées. Le diuron multiplie par 3 l'accumulation de transcrits dès 3h.

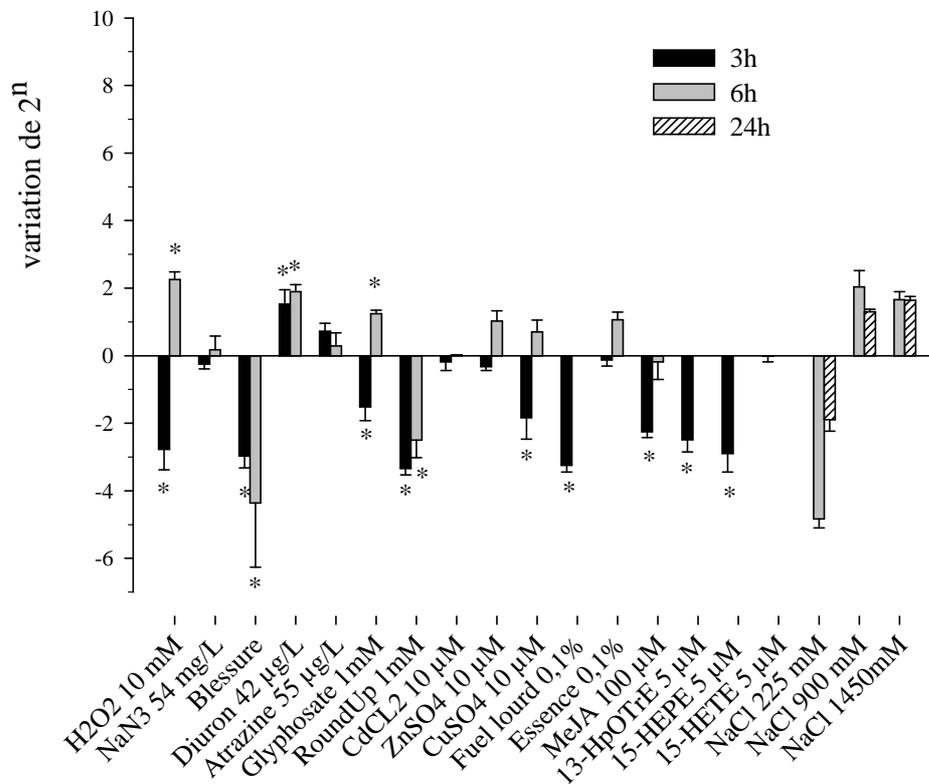
Les dérivés d'acides gras ont un effet négatif sur l'expression du gène; le méthyle jasmonate diminue son expression d'un facteur 4,5, le 13-HpOTrE d'un facteur 6, et le 15-HEPE d'un facteur 8. En revanche, le 15-HETE n'a aucune influence.

Le stress hyposalin a globalement un effet répressur sur la quantité de transcrits accumulée. Ainsi, après 6h, le taux de transcrits de ce gène est 16 fois inférieur à la normale, et après 24h, il est divisé par 4. Les stress hypersalins n'ont eux pas d'effets.



**Figure 82: Modification du profil d'accumulation des transcrits du gène *Esi0047\_0117* en fonction de divers traitements.**

Les valeurs significativement différentes des conditions contrôles sont indiquées par une astérisque (\*) ( $p < 0,05$ ).



**Figure 83: Modification du profil d'accumulation des transcrits du gène *Esi019\_0095* en fonction de divers traitements.**

Les valeurs significativement différentes des conditions contrôles sont indiquées par une astérisque (\*) ( $p < 0,05$ ).

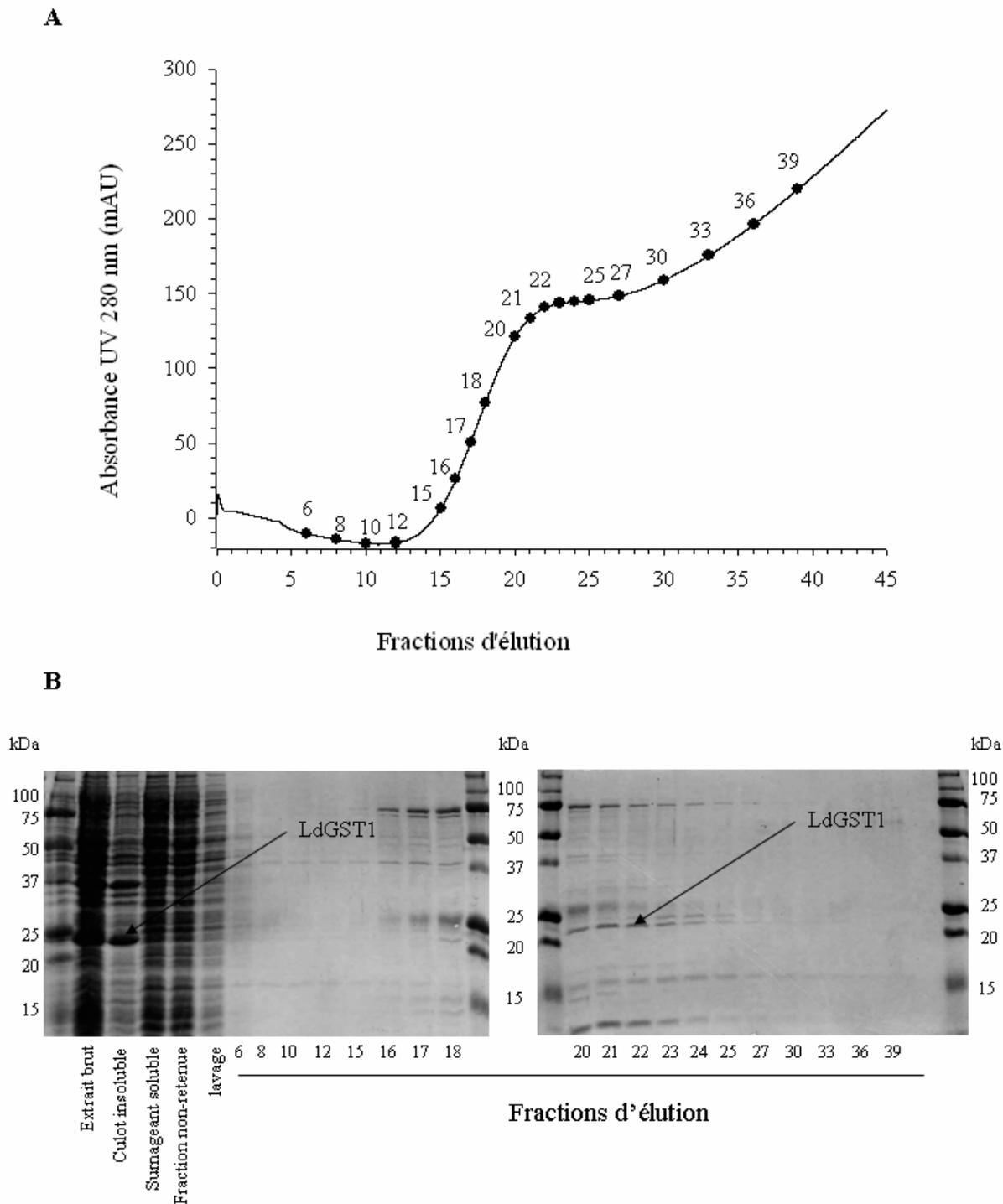
## 4.2 Caractérisation des GST cytosoliques recombinantes.

### 4.2.1 Expression des gènes en système hétérologue

Au cours de ma thèse, une plate-forme de surexpression de protéines (Marine Express) a été mise en place au laboratoire et a permis de surexprimer un certain nombre de protéines sélectionnées à l'issue de l'analyse des banques d'EST produite par l'équipe. Ainsi, au cours d'une phase test, les protéines LdGST[1-3] ont été surexprimées en système bactérien. Dans une deuxième phase à moyen débit, EsGST[1,2,3] ont été surexprimés, puis EsGST[4,9,13] ont fait partie d'une dernière phase de surexpression. La plate-forme a pris en charge le clonage des gènes d'intérêt, notamment dans le vecteur pFO4 qui permet d'insérer dans la protéine recombinante une extension N-terminale constituée par six résidus histidine, puis la transformation de la souche BL21 d'*E. coli* pour réaliser la surexpression en petit volume (2 mL), et enfin l'analyse rapide, sur gel et par Dot blot, de la présence de protéines surexprimées solubles dans les clones bactériens. Les résultats ont été positifs, c'est-à-dire l'obtention de protéines recombinantes dans la fraction soluble, pour les trois protéines de *Laminaria* et pour deux protéines d'*Ectocarpus*, EsGST[1,3]. J'ai donc réalisé la purification de LdGST1, LdGST2, LdGST3, EsGST1, EsGST3 et LdGST4. La taille attendue pour les GST est comprise entre 20 et 25 kDa sur un gel dénaturant. Les protéines LdGST4, LdGST[1,2,3] ont été produites respectivement 1 et 3 fois indépendamment pour subvenir aux besoins expérimentaux, et deux purifications ont été réalisées pour EsGST1 et EsGST3. Les résultats présentés ici n'illustrent qu'une seule des productions pour chacune des enzymes.

#### 4.2.1.1 LdGST1

L'analyse du gel de purification de la protéine LdGST1 (Figure 84) montre que l'enzyme est majoritairement présente dans le culot bactérien et est donc produite dans la fraction insoluble. Une faible bande apparaît cependant dans les fractions d'élutions 20 à 24. Ces fractions ont été collectées et dialysées pour éliminer l'imidazole et les sels. Le dosage de l'extrait protéique indique que 540 µg d'enzyme ont été purifiés. Cependant, le gel montre que les fractions 20 à 24 sont contaminées par plusieurs protéines bactériennes ayant des poids moléculaires variables. Ensemble, ces contaminants représentent presque la moitié de l'extrait protéique. La quantité de LdGST1 est donc certainement surestimée suite au dosage réalisé. La présence de la protéine recombinante a été évaluée par Western blot en utilisant un anticorps anti-HisTag (Figure 88).

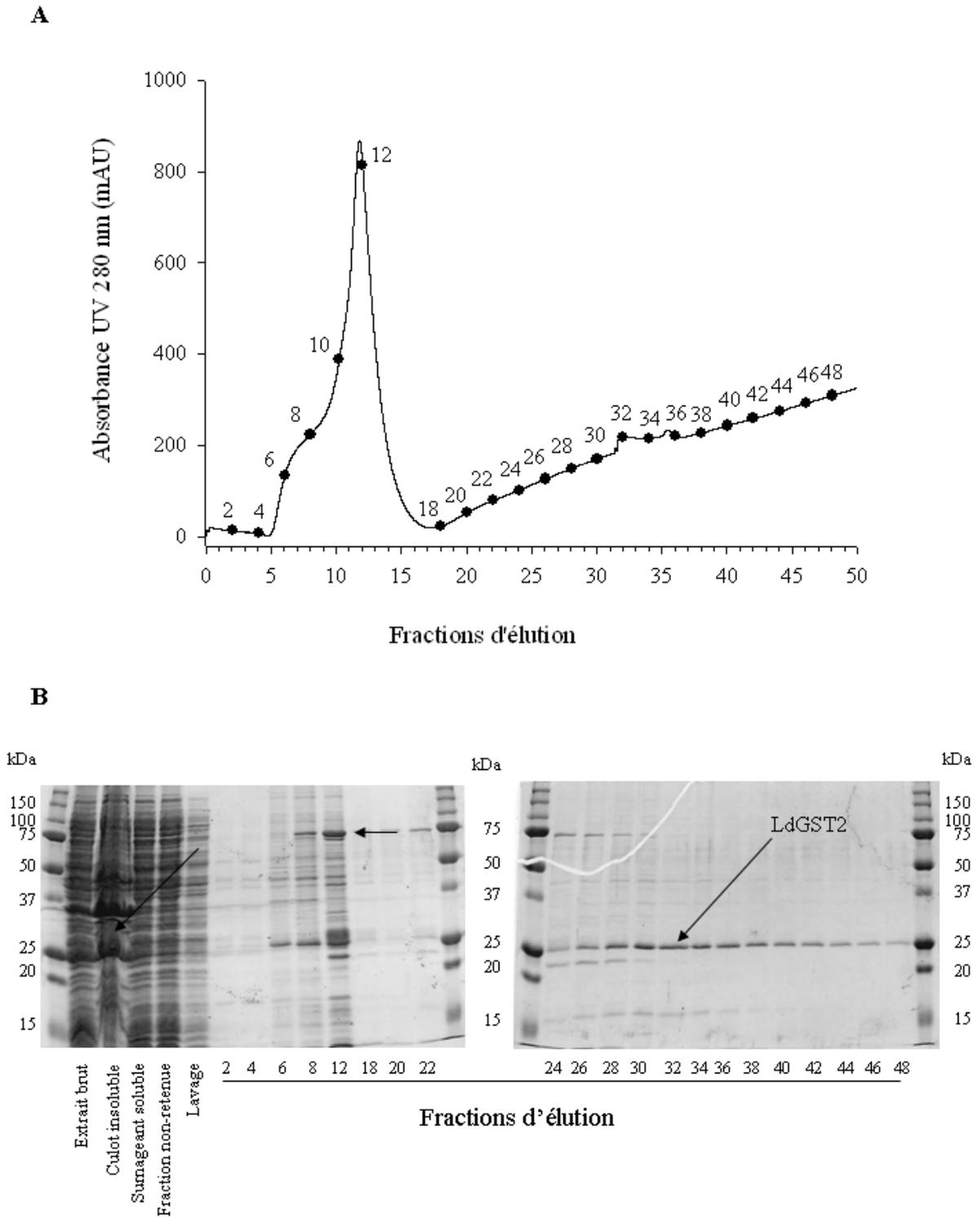


**Figure 84: Purification de la protéine LdGST1 par chromatographie d'affinité.**

La protéine recombinante (étiquette 6x-histidine) a été purifiée sur une résine chargée de nickel (A), et les différentes fractions d'élution ont été analysées sur gel dénaturant SDS-PAGE (B) afin de déterminer celles contenant la protéine purifiée.

#### 4.2.1.2 LdGST2

La protéine LdGST2 possède une taille théorique de 23 kDa. Après migration du gel dénaturant, il semble qu'une partie de la protéine LdGST2 soit présente dans la fraction insoluble (Figure 85). De plus, le chromatogramme montre qu'une fraction protéique importante est éluée dans les 15 premières minutes. Ceci équivaut à une concentration d'imidazole de 30 à 60 mM. Cette concentration est généralement trop faible pour décrocher les protéines étiquetées par un tag 6x-histidine à partir de la résine de nickel. Le gel confirme qu'un grand nombre de protéines est élué. On observe ainsi une bande de forte intensité à 75 kDa, et plusieurs bandes entre 20 et 25 kDa. Parmi celle-ci, il y aurait LdGST2, qui serait décrochée de la colonne par l'éluion de protéines de poids moléculaire plus élevé. Les fractions 26 à 42 ont été quand même rassemblées, et le dosage protéique indique que 420 µg de protéines ont été purifiées. La présence de la protéine recombinante a été évaluée par Western blot (Figure 88).



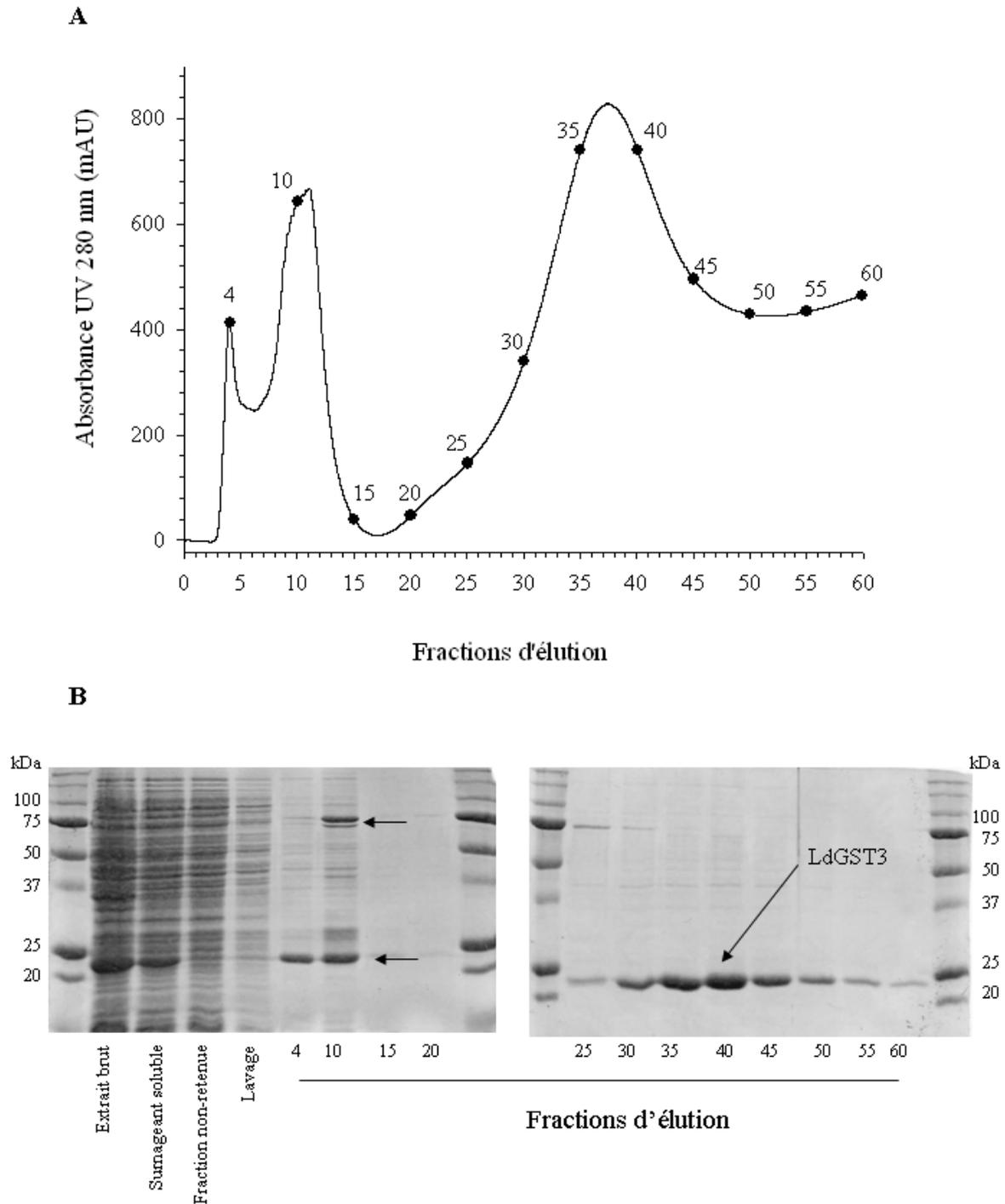
**Figure 85: Purification de la protéine LdGST2 par chromatographie d'affinité.**

La protéine recombinante (étiquette 6x-histidine) a été purifiée sur une résine chargée de nickel (A), et les différentes fractions d'élution ont été analysées sur gel dénaturant SDS-PAGE (B) afin de déterminer celles contenant la protéine purifiée.

#### 4.2.1.3 **LdGST3**

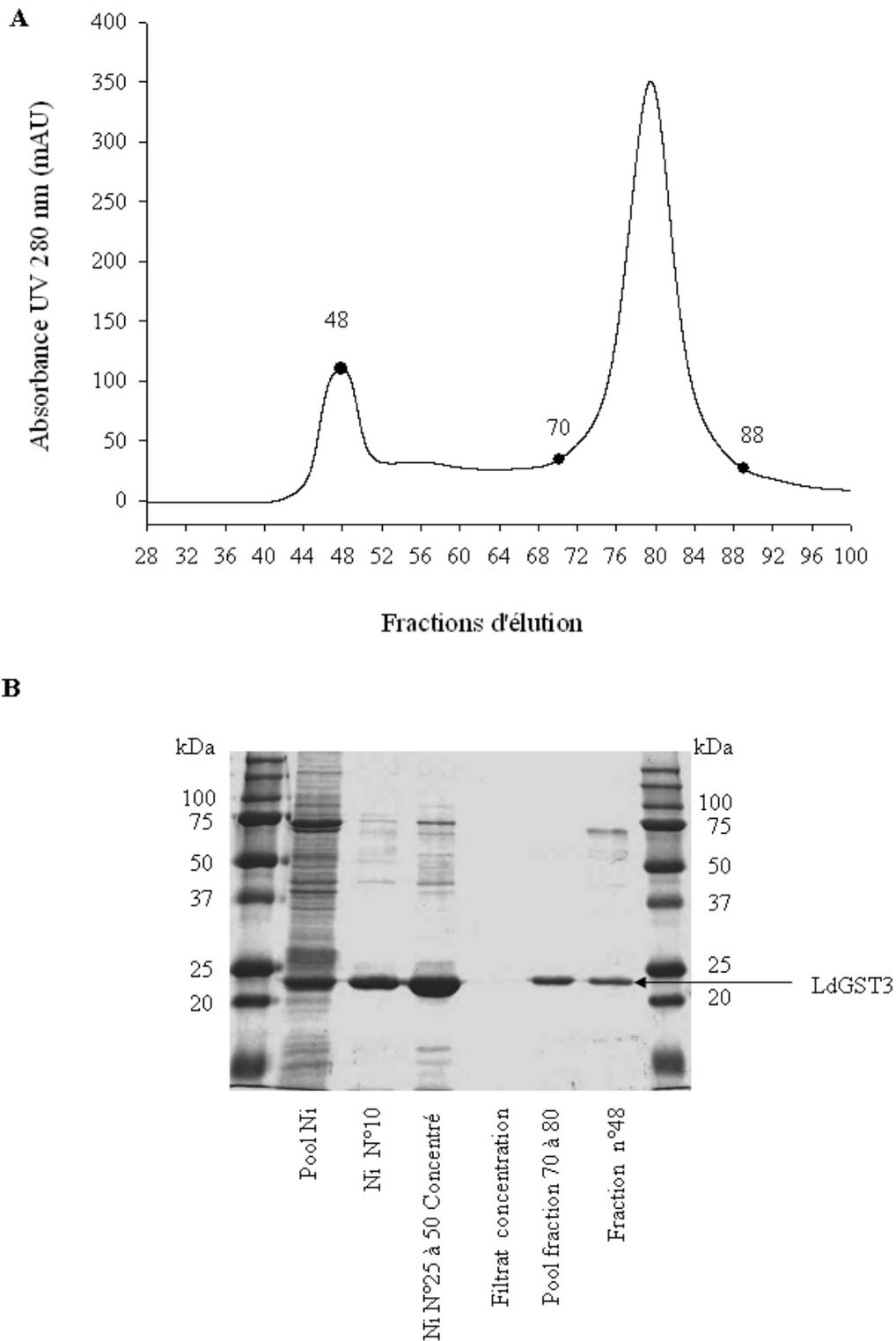
L'analyse de la Figure 86 indique que la protéine LdGST3 est surexprimée dans la fraction soluble. La taille attendue de cette protéine est de 23 kDa. Le chromatogramme d'élution fait apparaître deux lots protéiques. Un premier lot est élué pendant les 15 premières minutes du gradient d'imidazole. Il correspond à une protéine de 75 kDa et une protéine de 23 kDa qui semble être LdGST3. Le deuxième lot est élué plus tardivement, entre 100 et 225 mM imidazole. Il contient une quantité élevée de protéines, dont une à la taille attendue pour LdGST3. Les fractions 25 à 55 ont été collectées, mélangées, et le dosage indique que 2,8 mg de protéines ont été purifiés. La présence de la protéine recombinante a été évaluée par Western blot.

Disposant de suffisamment d'échantillons et souhaitant augmenter la pureté de LdGST3, j'ai réalisé une deuxième étape de chromatographie par exclusion de taille. Le profil d'élution et le gel correspondant sont présentés en Figure 87. Le chromatogramme montre que deux lots de protéines sont à nouveau mis en évidence. L'analyse sur gel confirme que la fraction 48 contient une protéine de 75 kDa et LdGST3, et que les fractions 70 à 88 ne contiennent que LdGST3.



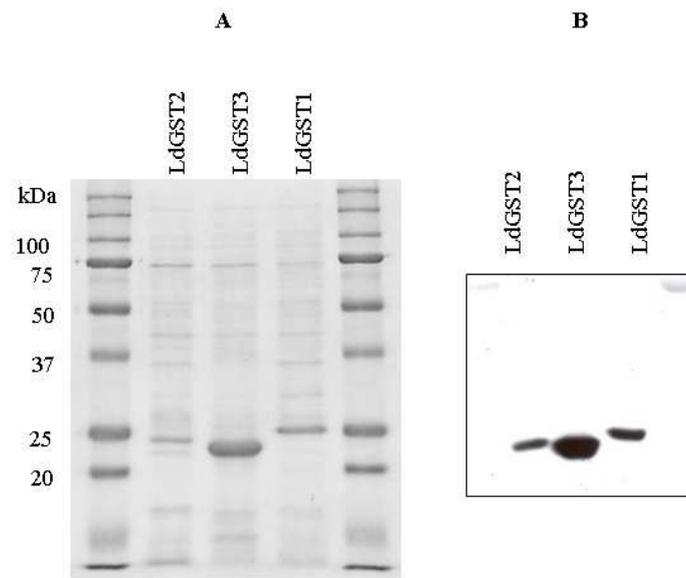
**Figure 86: Purification de la protéine LdGST3 par chromatographie d'affinité.**

La protéine recombinante (étiquette 6x-histidine) a été purifiée sur une résine chargée de nickel (A), et les différentes fractions d'élution ont été analysées sur gel dénaturant SDS-PAGE (B) afin de déterminer celles contenant la protéine purifiée.



**Figure 87: Purification de la protéine LdGST3 par chromatographie d'exclusion de taille.**

La protéine recombinante précédemment purifiée par chromatographie d'affinité est concentrée puis élue sur une chromatographie d'exclusion de taille (A). Les différentes fractions d'élution sont ensuite analysées sur un gel dénaturant SDS-PAGE (B) afin de collecter celles contenant la protéine purifiée.

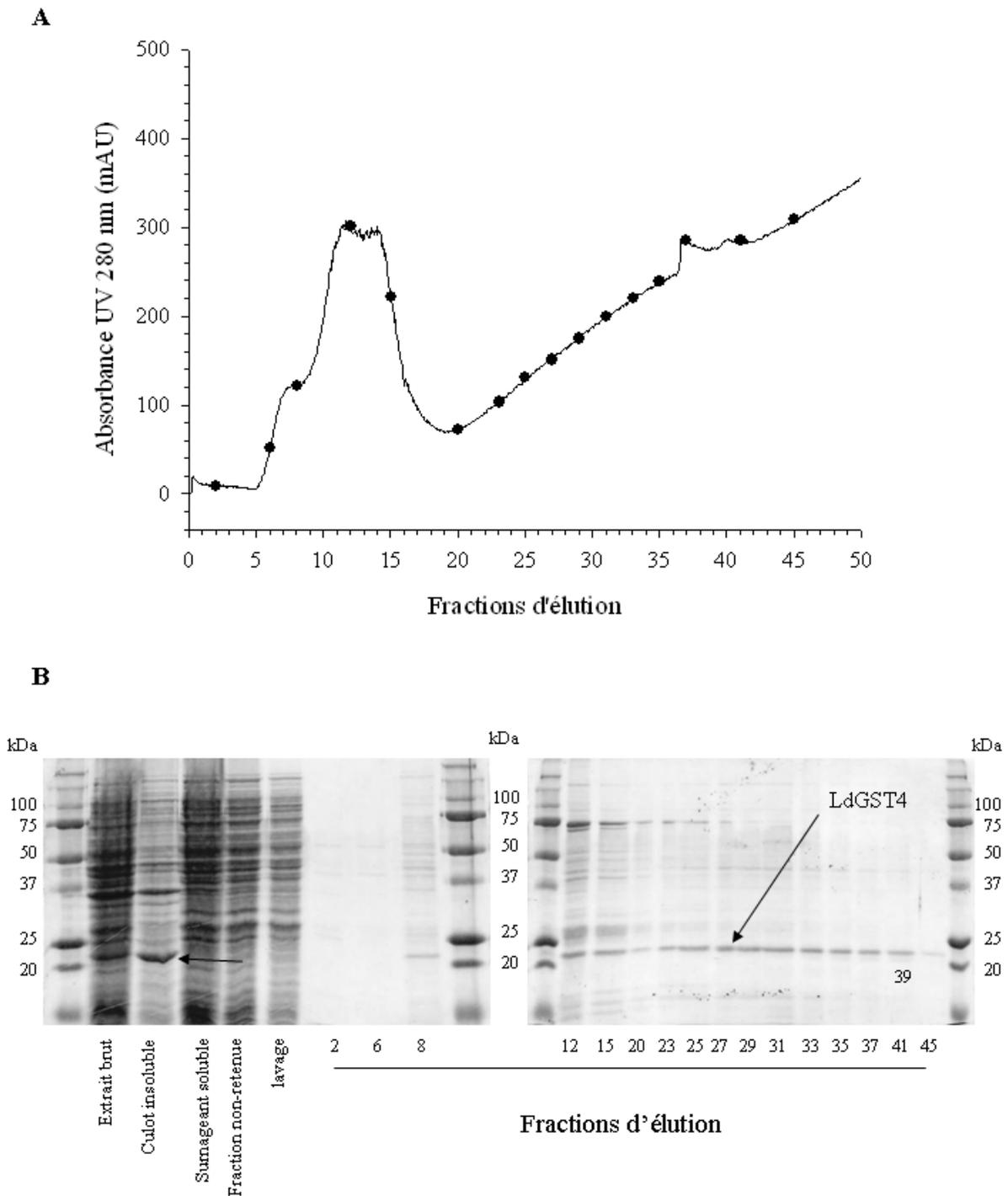


**Figure 88: Analyse par Western blot de la purification des protéines LdGST[1,2,3].**

Un aliquot du pool des fractions de purification a été déposé sur gel dénaturant (A). Un anticorps anti-HisTag a été utilisé pour la révélation (B).

#### 4.2.1.4 LdGST4

La protéine LdGST4 possède une taille théorique de 22 kDa. L'analyse du gel (Figure 89) montre qu'elle est majoritairement exprimée dans la fraction insoluble. L'élution fait apparaître un pic de protéines au cours des 15 premières minutes du gradient. La protéine majoritaire de ce pic a une taille de 75 kDa. La protéine LdGST4 est éluée entre 80 et 180 mM imidazole, ce qui correspond aux fractions 20 à 37. Le dosage indique que 350 µg d'enzyme ont été purifiés.



**Figure 89: Purification de la protéine LdGST4 par chromatographie d'affinité.**

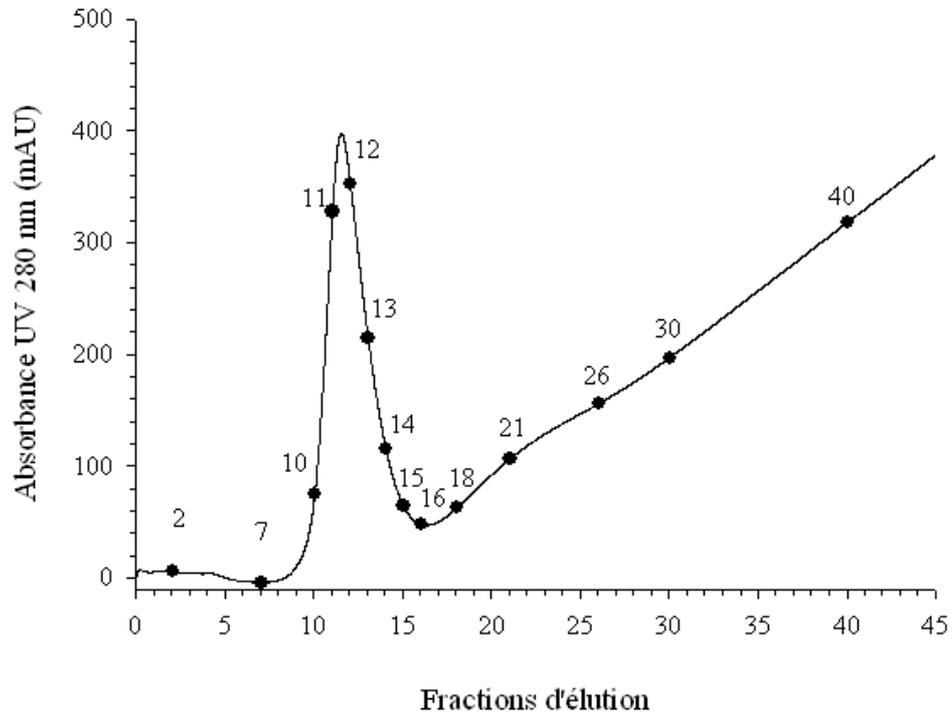
La protéine recombinante (étiquette 6x-histidine) a été purifiée sur une résine chargée de nickel (A), et les différentes fractions d'élution ont été analysées sur gel dénaturant SDS-PAGE (B) afin de déterminer celles contenant la protéine purifiée.

#### 4.2.1.5 EsGST1

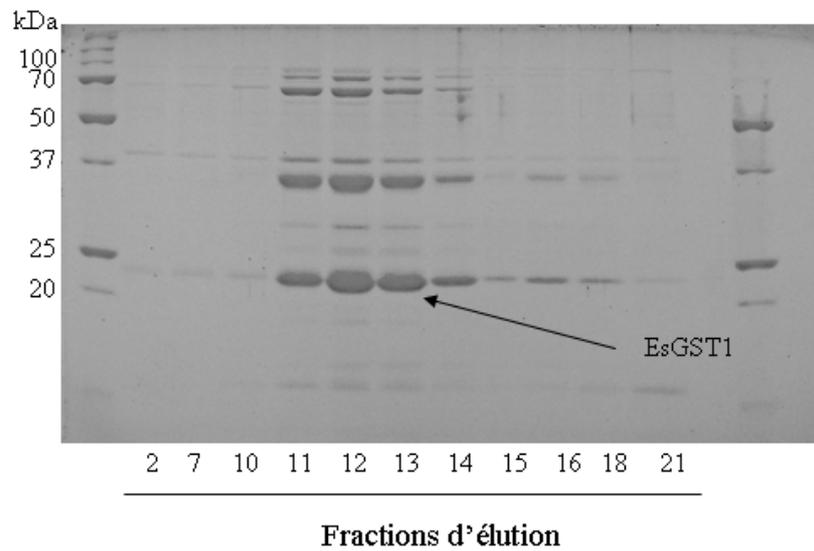
La protéine EsGST1, d'une taille de 22,5 kDa, est éluée entre 45 et 60 mM imidazole avec la quasi-totalité des protéines fixées sur la colonne. Il y a donc certainement un effet d'entraînement des protéines entre elles. Il y a notamment dans ce lot une protéine d'environ 70 kDa, et une protéine très abondante d'environ 35 kDa (Figure 90).

Afin de séparer les différents constituants de ce mélange, l'échantillon a été élué sur une chromatographie d'échanges d'anions qui permet de séparer les molécules selon leur charge. Les résultats sont présentés dans la Figure 91. Les fractions 5 et 6 de cette deuxième dimension chromatographique contiennent la protéine EsGST1. La fraction 22 contient la protéine de 35 kDa et les fractions 26 et 27 contiennent la protéine de 70 kDa. Dans ces deux dernières fractions, on trouve également EsGST1. Il se pourrait donc qu'EsGST1 et la protéine de 70 kDa ait une affinité l'une pour l'autre. Les fractions 5 et 6 ont été collectées et le dosage indique que 64 µg d'enzyme ont été purifiés.

**A**

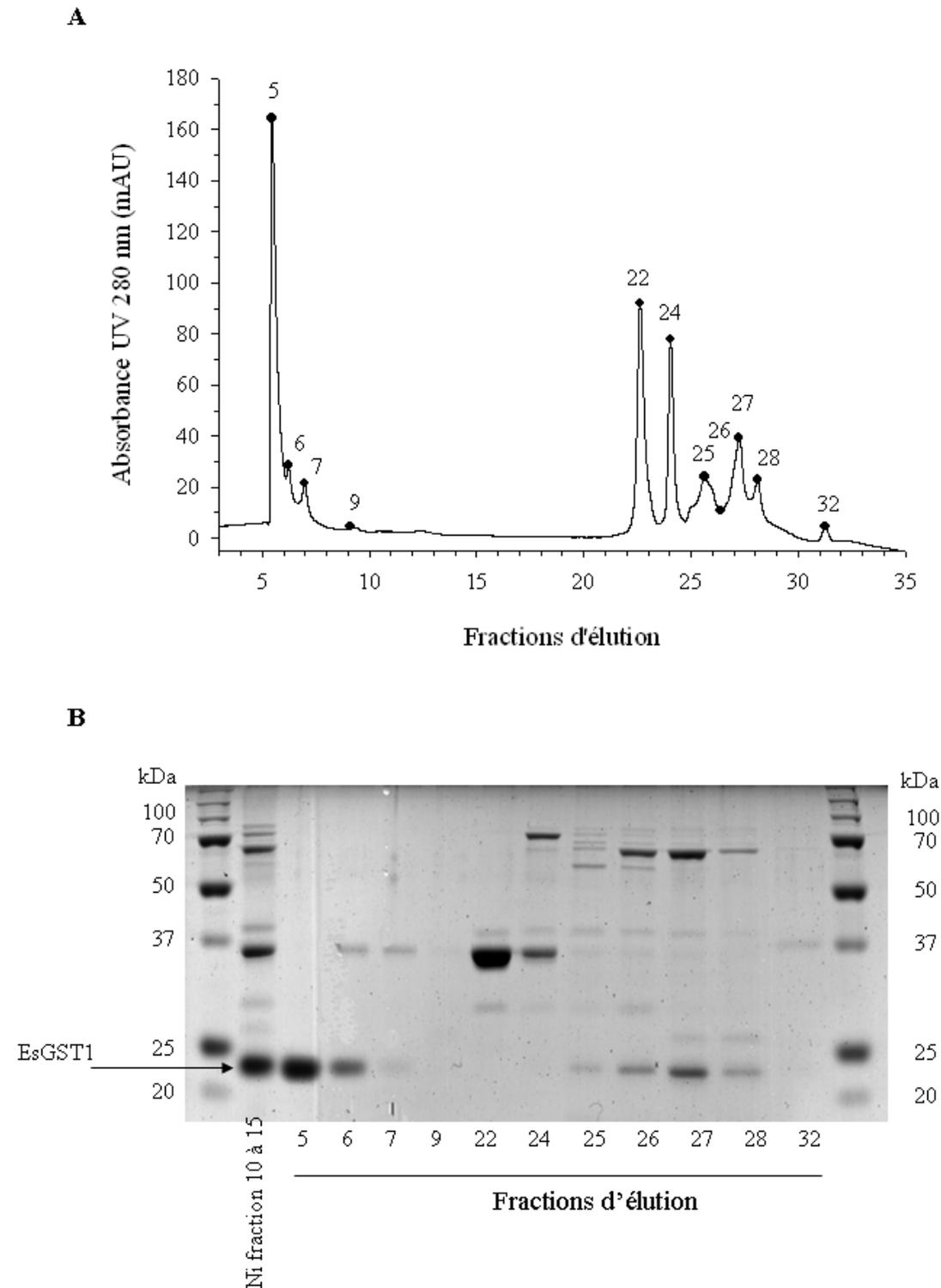


**B**



**Figure 90: Purification de la protéine EsGST1 par chromatographie d'affinité.**

La protéine recombinante (étiquette 6x-histidine) a été purifiée sur une résine chargée de nickel (A), et les différentes fractions d'élution ont été analysées sur gel dénaturant SDS-PAGE (B) afin de déterminer celles contenant la protéine purifiée.



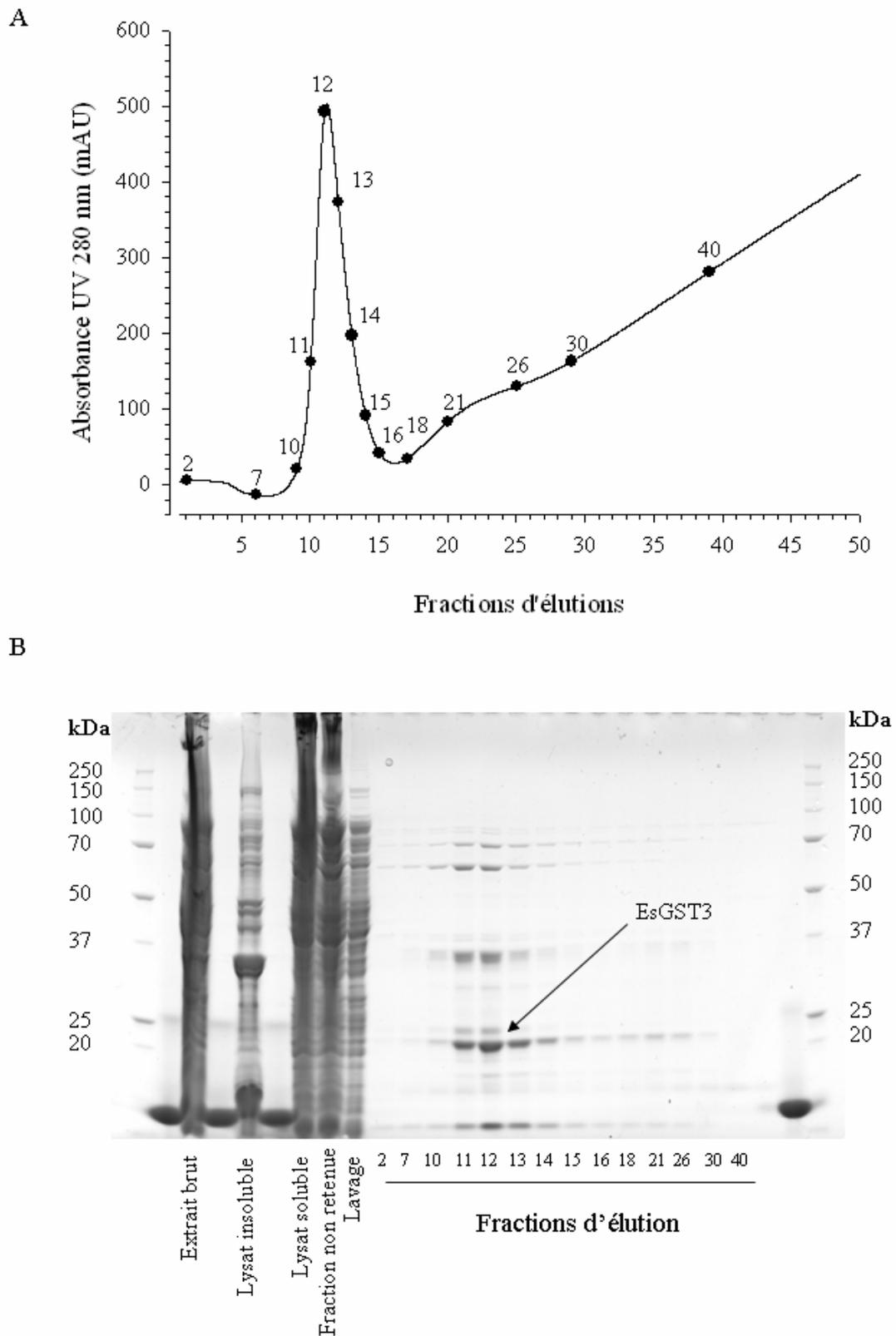
**Figure 91: Purification de la protéine EsGST1 par chromatographie d'échange d'ions.**

Certaines fractions issues de la purification par chromatographie d'affinité ont été analysées par chromatographie d'échange d'ions (A) afin de séparer les différentes constituants du mélange protéique. Les fractions d'élutions ont ensuite été analysées par gel dénaturant SDS-PAGE pour collecter celles contenant la protéine d'intérêt purifiée.

#### 4.2.1.6 **EsGST3**

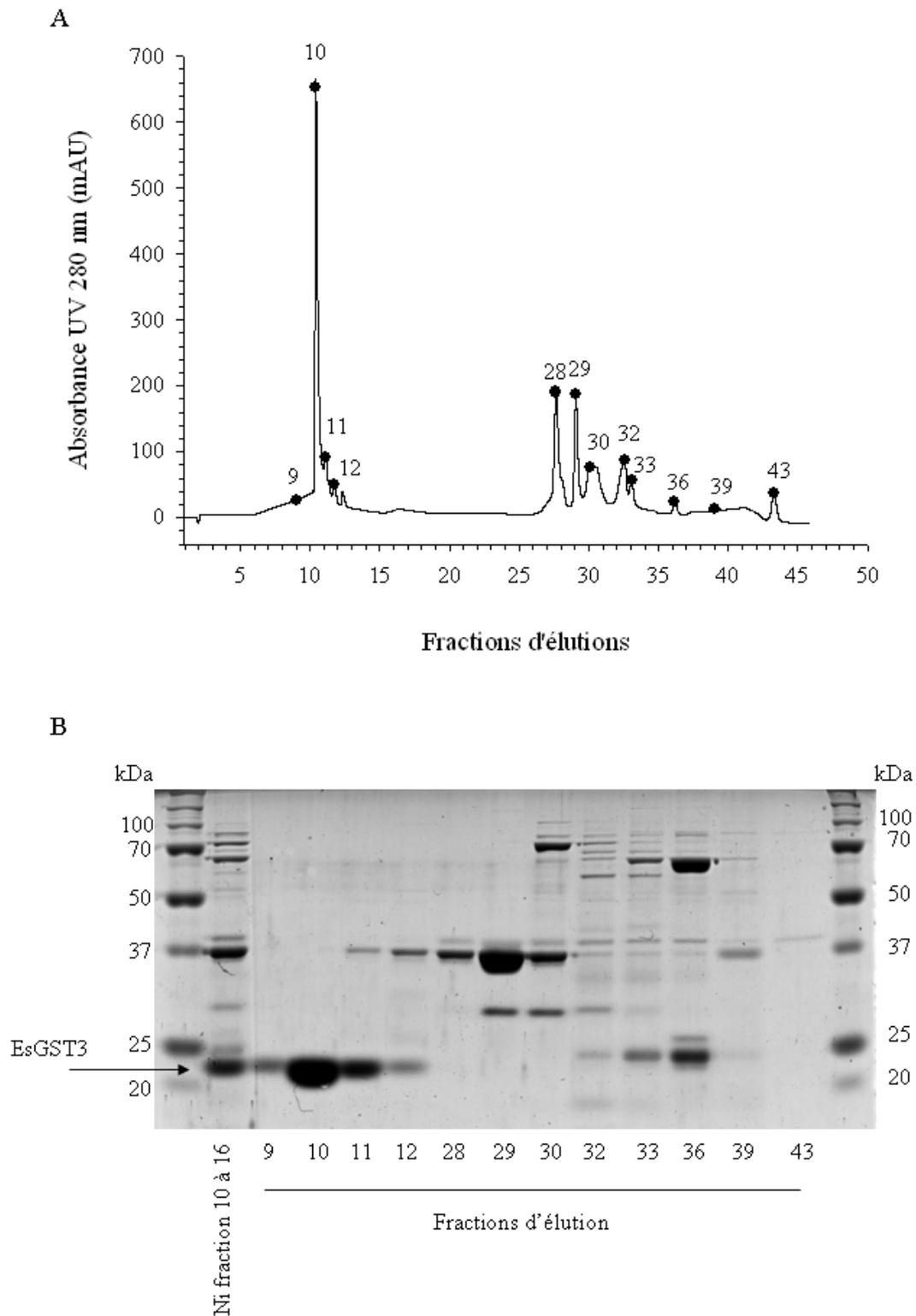
Le profil de purification d'EsGST3 ressemble beaucoup au profil de EsGST1 (Figure 92). La protéine ne semble pas exprimée dans la fraction insoluble, mais après la chromatographie d'affinité, elle est éluée avec deux autres protéines majoritaires entre 45 et 60 mM imidazole. La chromatographie d'échanges d'ions a permis de séparer tous les constituants du mélange (Figure 93). La protéine est donc purifiée dans trois fractions (9, 10, 11) qui ont été collectées. Le dosage indique que 330 µg de protéine ont été purifiés.

Mis à part LdGST3, la purification des GST cytosoliques n'a pas donné de très bons rendements. Les protéines LdGST1, LdGST2, et LdGST4 sont produites en grande partie dans la fraction insoluble, et la purification par chromatographie d'affinité sur colonne de nickel n'a pas permis d'éviter la présence de protéines contaminantes. Ainsi, toutes les GST purifiées semblent contenir une protéine d'*E.coli* d'environ 70 kDa. Il a été possible de séparer cette protéine bactérienne des GST d'*Ectocarpus* EsGST1 et EsGST2, mais les quantités de protéines d'algues restantes sont peu élevées.



**Figure 92: Purification de la protéine EsGST3 par chromatographie d'affinité.**

La protéine recombinante (étiquette 6x-histidine) a été purifiée sur une résine chargée de nickel (A), et les différentes fractions d'élution ont été analysées sur gel dénaturant SDS-PAGE (B) afin de déterminer celles contenant la protéine purifiée.



**Figure 93: Purification de la protéine EsGST3 par chromatographie d'échange d'ions.**

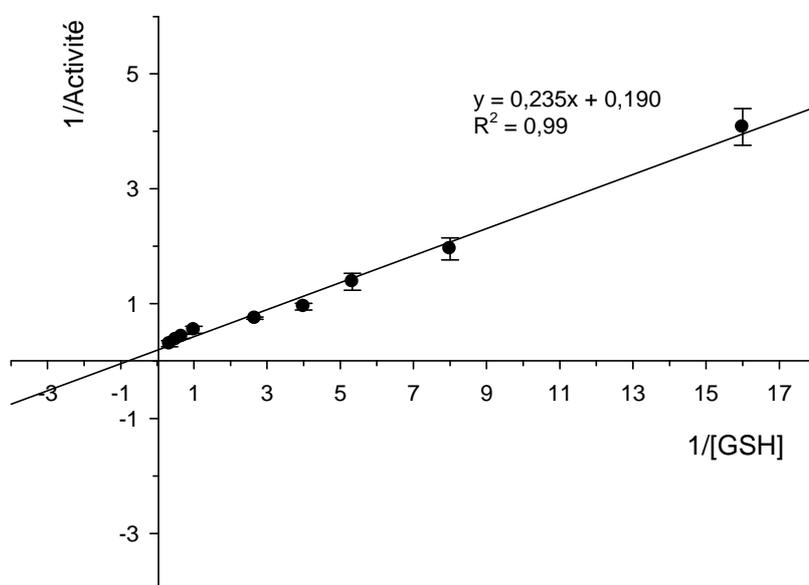
Certaines fractions issues de la purification par chromatographie d'affinité ont été analysées par chromatographie d'échange d'ions (A) afin de séparer les différents constituants du mélange protéique. Les fractions d'élutions ont ensuite été analysées par gel dénaturant SDS-PAGE pour collecter celles contenant la protéine d'intérêt purifiée.

#### 4.2.2 Activités enzymatiques des GST recombinantes

Les protéines ont été produites et purifiées dans le but de tester leur activité enzymatique sur une gamme de substrats, et d'explorer ainsi leurs spécificités catalytiques. Les substrats utilisés sont dits généralistes car il ne sont pas spécifiques d'une GST, et sont couramment employés pour caractériser les propriétés biochimiques des enzymes, quelle que soit leur origine. Le Tableau 26 reprend les différents tests qui ont été réalisés.

Les GST d'*Ectocarpus* ne présentent aucune activité avec les substrats considérés. Des tests en présence de CDNB à différents pH ont aussi été réalisés, mais n'ont pas donné de résultats. Ces deux enzymes n'ont donc pas été considérées pour la suite du travail, d'autant plus que la quantité produite était très faible et n'autorisait pas un grand nombre d'expériences.

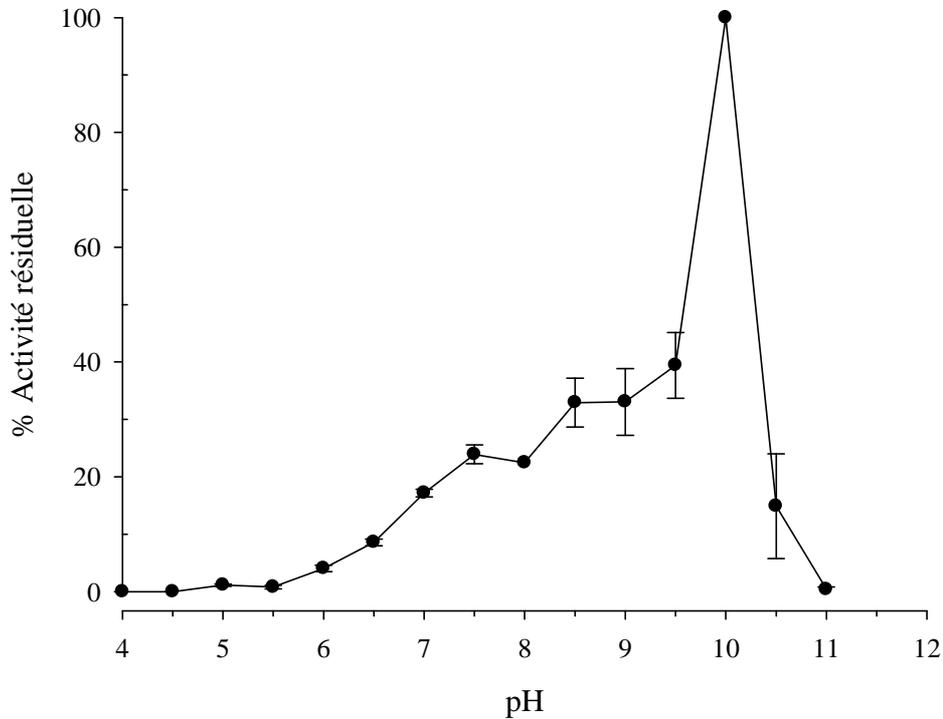
La protéine LdGST3, produite en grande quantité, est la plus active des GST d'algues brunes. Elle présente une activité spécifique de  $0,98 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$  sur le CNDB (Tableau 26) et des activités transférases plus élevées contre d'autres substrats halogénés tels que le 1-bromo-2,4-dinitrobenzène ( $3,34 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ ) et le 1-fluoro-2,4-dinitrobenzène ( $7,44 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ ). L'affinité de cette enzyme pour le glutathion a été déterminé en calculant son  $K_m$ , qui est évalué à 1,2 mM (Figure 94).



**Figure 94: Détermination des paramètres cinétiques de LdGST3 pour le glutathion par analyse de Lineweaver-Burk.**

L'affinité n'est pas très élevée mais on considère généralement que la concentration intracellulaire d'un substrat est approximativement la même ou est supérieure à la valeur du  $K_m$  de l'enzyme à laquelle il se fixe. L'optimum de pH de l'activité de conjugaison sur le

CDNB a été évalué à 10 (Figure 95). Cependant, la plupart des tests ont été réalisés à pH 7 car l'activité est plus stable.



**Figure 95: Détermination du pH optimal de LdGST3 recombinante.**

LdGST3 possède également une activité de conjugaison du glutathion sur l'aldéhyde 4-HNE. De plus, cette enzyme est dotée d'une activité peroxydase et peut prendre en charge des hydroperoxydes organiques tels que le t-butyl hydroperoxyde ( $0,61\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ ) et dans une moindre mesure, des hydroperoxydes d'acide gras dérivés de la voie des octadécanoïdes. La protéine LdGST4 présente une faible activité sur le FDNB, et est inactive sur tous les autres substrats.

Les protéines LdGST1 et LdGST2 sont actives sur certains substrats halogénés, mais à des niveaux relativement faibles comparés à LdGST3. De plus, ces deux enzymes présentent également une activité peroxydase sur le cumène hydroperoxyde.

**Tableau 26: Activités enzymatiques des protéines recombinantes.**

Substrats	Activité spécifique ( $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ de protéine)					
	LdGST1	LdGST2	LdGST3	LdGST4	EsGST1	EsGST3
<b>Aryles halogénés</b>						
1-chloro-2,4-dinitrobenzène (CDNB)	0,23 ± 0,02	0,08 ± 0,01	0,98 ± 0,10	n.d.	n.d.	n.d.
1-bromo-2,4-dinitrobenzène (BDNB)	n.d.	0,10 ± 0,05	3,34 ± 0,04	n.d.	n.d.	n.d.
1-fluoro-2,4-dinitrobenzène (FDNB)	n.d.	0,68 ± 0,31	7,44 ± 0,66	0,30 ± 0,07	n.d.	n.d.
1-iodo-2,4-dinitrobenzène (IDNB)	0,43 ± 0,05	n.d.	1,29 ± 0,11	n.d.	0,03 ± 0,01	n.d.
Chlorure de <i>para</i> -nitrobenzoyle	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	-	-
<b>Carbonyles <math>\alpha,\beta</math>-insaturés</b>						
Acide Ethacrinique	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	-	-
<i>trans</i> -4-phenyl-3-buten-2-one	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	-	-
4-hydroxynonenal (4-HNE)	-	-	0,69 ± 0,01	-	-	-
<i>trans</i> -2-nonenal	-	-	n.d.	-	-	-
<b>Divers</b>						
<i>para</i> -nitrophenyl acetate	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	-	-
<b>Hydropéroxydes</b>						
Cumène hydroperoxyde	0,159 ± 0,009	0,102 ± 0,040	0,12 ± 0,01	n.d.	-	-
<i>t</i> -butyl hydroperoxyde	n.d.	n.d.	0,61 ± 0,12	n.d.	-	-
13-HpODE	-	-	0,06 ± 0,01	-	-	-
13-HpOTE	-	-	0,08 ± 0,01	-	-	-

Les valeurs d'activités correspondent à la moyenne et à la déviation standard de 4 réplicats. Dans chaque test, la valeur du témoin sans enzyme a été soustraite. L'abréviation n.d. signifie qu'aucune activité enzymatique n'a été détectée. Les tirets indiquent que les tests d'activités n'ont pas été réalisés.

### 4.2.3 Identification d'inhibiteurs de l'activité enzymatique

La recherche de molécules pouvant inhiber l'activité de LdGST3 a été réalisée en parallèle de l'étude sur la protéine CcGST2 de *C. crispus*. Pour cela, nous avons testé les principaux inhibiteurs de GST décrits dans la littérature. Les acides biliaires (acides choliques) sont couramment employés, mais le plus efficace de tous est le Cibacron blue qui se fixe dans le site catalytique de l'enzyme. Il inhibe fortement l'activité transférase de LdGST3 avec une IC<sub>50</sub> de 0,1 µM (Tableau 27).

**Tableau 27: Inhibition de l'activité enzymatique de la protéine LdGST3.**

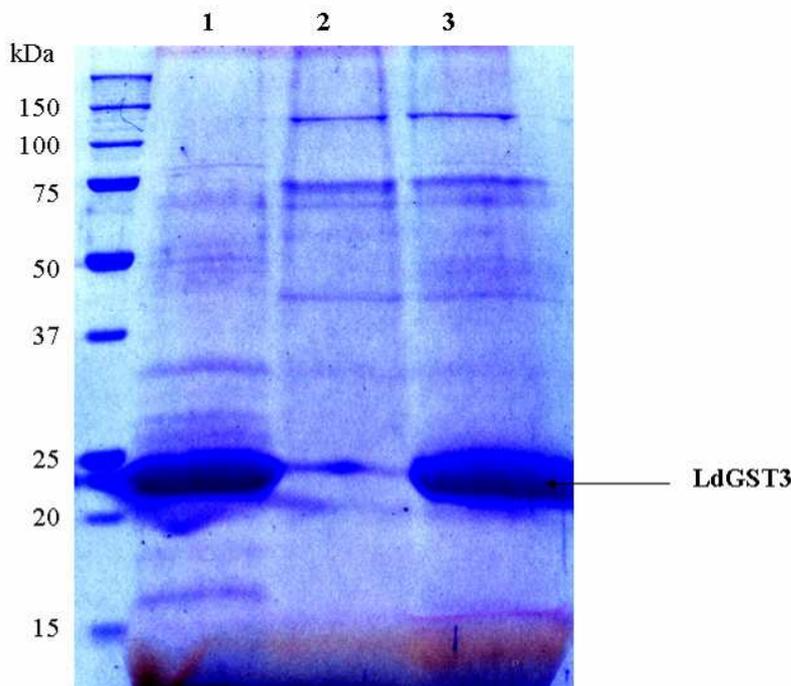
Inhibiteur	Gamme de concentration (µM)	IC <sub>50</sub> (µM)
		LdGST3
Cibacron Blue	0-10	0,1
Acide chénodéoxycholique	0-1000	93
Acide lithocholique	0-1000	83
Indométhacine	0-1000	71
Acide acétylsalicylique	0-1000	>1000

La mesure d'inhibition a été déterminée sur l'activité enzymatique de LdGST3 en présence de CDNB. La valeur d'IC<sub>50</sub> représente la concentration pour laquelle 50% de l'activité enzymatique est inhibée.

#### 4.2.4 Recherche de partenaires protéiques

La recherche de partenaires protéiques des GST de *L. digitata* a été effectuée en réalisant une approche de pull-down. Cette méthode permet de mettre en évidence, *in vitro*, l'interaction entre deux ou plusieurs protéines. Pour réaliser ce type d'expérience, il est nécessaire d'avoir une protéine purifiée et étiquetée qui sert d'appât, et un extrait protéique dans lequel se trouvent les partenaires potentiels (les proies). Les protéines LdGST[1,2,3] ont été fixées sur une résine chargée de nickel par l'intermédiaire de leur étiquette 6x-histidine et des extraits protéiques de *L. digitata* ont été déposés. Après incubation, plusieurs lavages ont été effectués pour décrocher les protéines n'ayant pas d'interactions spécifiques avec les LdGST. Ensuite, un aliquot de la résine a été déposé sur un gel dénaturant.

Les résultats obtenus pour la protéine LdGST3 sont présentés en Figure 96. La protéine LdGST3 a subi plusieurs étapes de purification, mais est tout de même contaminée par un certain nombre d'autres protéines (puits 1). De plus, chacune des protéines présentes dans le puit 3 est également retrouvée dans le contrôle "appât seul" (puits 1) ou le contrôle "proies seules" (puits 2). L'analyse des profils obtenus dans les différentes conditions expérimentales ne révèle pas de protéine spécifique fixée par LdGST3.



**Figure 96: Recherche de partenaires protéiques de LdGST3 par pull-down.**

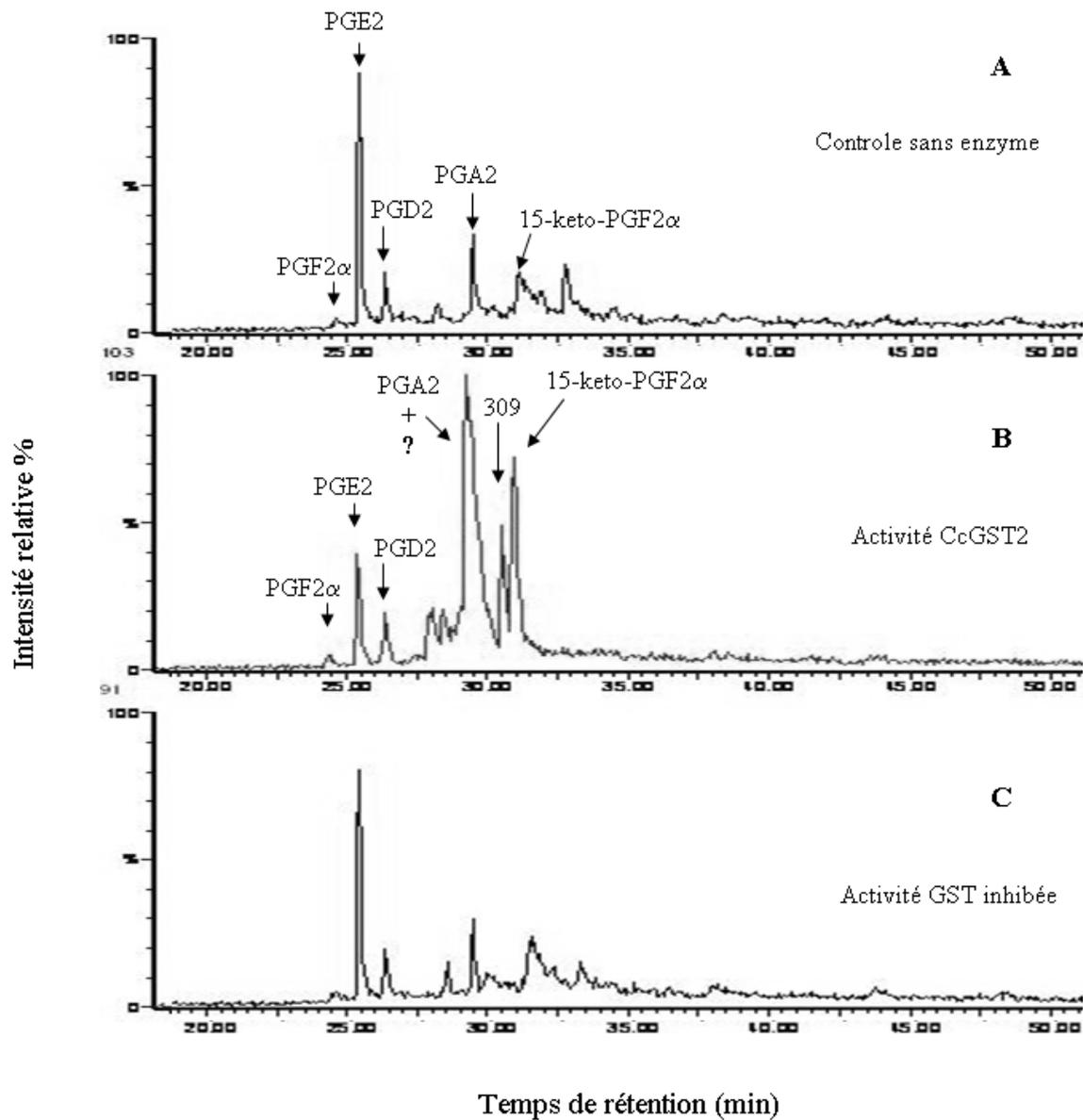
Gel SDS-PAGE coloré au bleu de Coomassie. Puits 1: LdGST3 seule, déposée sur la résine chargée de nickel. Puits 2: Extrait protéique seul. Puits 3: Mélange constitué d'extrait protéique et de LdGST3.

#### 4.2.5 Activité enzymatique de CcGST2 en présence de PGH<sub>2</sub>.

La caractérisation de la protéine GST2 de *C. crispus* a été réalisée par Cécile Hervé au cours de son doctorat. Cette protéine est active et capable de conjuguer le glutathion avec les dérivés du dinitrobenzène, le 4-HNE, et les hydroperoxydes d'acides gras. Elle est également très fortement inhibée par le Cibacron Blue (Cb), qui inhibe la synthèse de PG chez *C. crispus* (Hervé et al., 2007). Suite à ces travaux, il a été suggéré que CcGST2 pourrait intervenir dans la synthèse des prostaglandines.

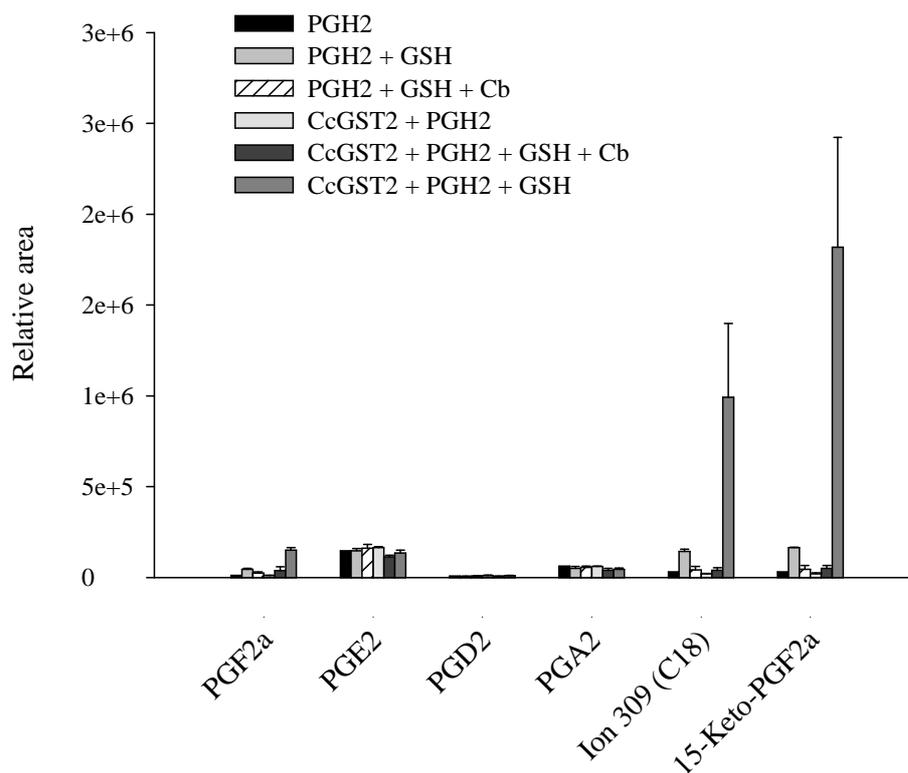
Par conséquent, j'ai réalisé des tests, en collaboration avec Sophie Goulitquer (INSERM U613, Brest), pour identifier et quantifier les produits formés en présence de la prostaglandine H<sub>2</sub> (PGH<sub>2</sub>). Cette prostaglandine, précurseur de toutes les autres prostaglandines de la série 2, est le substrat de la prostaglandine D synthase des mammifères.

Le milieu réactionnel considéré contient la PGH<sub>2</sub>, le GSH et l'enzyme purifiée. Des contrôles sans enzymes, sans GSH, et en présence de Cibacron blue ont été réalisés. L'expérience a été effectuée à température ambiante, pendant 10 minutes. A la fin de la réaction, les produits polaires et lipidiques ont été extraits à l'acétate d'éthyle, puis évaporés, et repris dans l'éthanol. Ils ont ensuite été séparés par chromatographie en phase liquide (LC), en fonction de leur polarité et de la taille de leur chaîne carbonée (Figure 97). Les différents composés repérés ont été analysés par spectrométrie de masse, puis comparés à une banque de molécules standard. Cette banque a été réalisée par Sophie Goulitquer sur la même colonne et avec le même spectromètre de masse à partir de composés commerciaux, notamment des prostaglandines. Les molécules identifiées et les quantités produites dans les différents milieux réactionnels sont présentées Figure 98.



**Figure 97: Chromatogrammes d'élué des produits formés après 10 min d'incubation dans différents mélanges réactionnels contenant de la PGH2.**

Le chromatogramme A correspond au témoin sans enzyme et présente les produits de la réaction entre la PGH2 et le GSH. Le chromatogramme B présente les produits de la réaction enzymatique de CcGST2 sur PGH2 et GSH. Le chromatogramme C représente le témoin de la réaction enzymatique inhibée et correspond aux produits de la réaction entre la PGH2, le GSH, le Cibacron Blue et CcGST2.



**Figure 98: Proportions de produits formés dans différents mélanges réactionnels.**

Le chromatogramme A de la figure 22 fait apparaître les produits formés au cours de la réaction entre PGH2 et le glutathion, en absence d'enzyme. Dans cette conditions, différentes prostaglandines sont synthétisées: PGF2a, 15-keto-PGF2a, PGE2, PGD2 et PGA2. La prostaglandine H2 est instable à température ambiante, et elle forme rapidement d'autres prostaglandines.

En revanche, au cours de la réaction enzymatique entre PGH2, GSH et CcGST2, deux produits nouveaux sont formés. L'un en quantité importante et présente un spectre de masse inconnu, l'autre nommé ion 309 est plus minoritaire et son spectre laisse supposer qu'il s'agit d'un composé oxydé à 18 carbones.

Le chromatogramme C illustre la séparation des produits formés au cours de la réaction entre PGH2, GSH, CcGST2 et le Cibacron blue. L'analyse montre qu'aucun produit n'est formé au cours de cette réaction en comparaison du témoin sans enzyme (A).

L'intensité de certains ions a été reportée dans la Figure 98. Ainsi, le 15-keto-PGF2a et l'ion 309 sont fortement accumulés au cours de la réaction enzymatique entre PGH2, GSH et CcGST2. L'intensité relative du composé inconnu n'est pas représentable car son spectre n'est pas nettement défini, et il est donc difficile de vouloir le quantifier.

### 4.3 Caractérisation de l'activité des GST microsomaux.

Les gènes correspondant aux GST microsomaux mEsGST1 et mEsGST2, ainsi que ceux de l'algue rouge *C. crispus* mCcGST1 et mCcGST2 de *C. crispus*, ont été clonés dans le vecteur pYES2 et les plasmides recombinants ont été utilisés pour transformer la souche de levure INVSC1. En parallèle, une transformation a aussi été réalisée avec le vecteur de levure vide. Des fractions enrichies en microsomes ont été produites à partir des différentes levures transgéniques. L'activité enzymatique de conjugaison du glutathion sur le CDNB et l'activité peroxydase sur le cumène hydroperoxyde ont ensuite été mesurées pour les différentes mGST (Tableau 28).

**Tableau 28: Activités enzymatiques des GST microsomaux.**

	mEsGST1	mEsGST2	mCcGST1	mCcGST2
Quantité de protéines extraite	120 µg	220 µg	80 µg	110 µg
Activité ( $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ )				
CDNB (1mM)	n.d.	n.d.	0,08± 0,01	n.d.
CuOOH (1mM)	0,035 ± 0,002	0,022 ± 0,003	0,038 ± 0,008	0,005 ± 0,001

n.d signifie qu'aucune activité enzymatique n'a été détectée.

Les quatre protéines présentent une activité peroxydase sur le cumène hydroperoxyde. Cette activité est très faible pour mCcGST2. Elle est comparable entre mEsGST[1-2] et mCcGST1. En revanche, seule la protéine mCcGST1 présente une activité de conjugaison du CDNB.

# **DISCUSSION**

## 1. Le Glutathion chez *Ectocarpus siliculosus*

Le glutathion est présent de manière constitutive dans les cellules de l'algue brune *Ectocarpus siliculosus*. Le dosage du glutathion dans les souches Esil32 et Esil524 cultivées au laboratoire a établi que la teneur en glutathion total (GSH + GSSG) est de l'ordre de 100 nmol / gMF, soit environ 1mM. Ce résultat est comparable à ce qui a été mesuré chez les algues rouges *Chondrus crispus* et *Mastocarpus stellatus*, et les algues brunes *Fucus vesiculosus* et *F. distichus* (Collén and Davison, 1999a, c). La concentration en glutathion est légèrement plus faible dans la souche Esil371 qui est cultivée dans de l'eau de mer diluée au vingtième, avec une valeur de l'ordre de 0,6 mM. Cependant, une très forte augmentation de la quantité de GSH a été observée lorsque cette souche a été cultivée en eau de mer normale, indiquant que cette condition de culture génère un stress important pour cette algue. On peut donc supposer que l'augmentation du pool de glutathion fait partie d'un mécanisme d'adaptation de cette souche à un milieu hypersalin.

Les gènes du métabolisme du glutathion annotés au cours de cette étude représentent 0,3 % des gènes prédits automatiquement à partir de la séquence du génome, et 0,2 % des séquences issues des banques d'EST. Le glutathion est un métabolite très abondant dans les cellules où il joue un grand nombre de rôles, notamment dans le métabolisme des acides aminés, dans des processus de détoxication, de transport et de signalisation. L'activation de la synthèse du glutathion et l'accumulation de ce dernier dans les cellules sont des marqueurs d'une perturbation oxydative du cytosol (Noctor and Foyer, 1998) et les enzymes de synthèse et de métabolisme du glutathion sont induites en réponse aux stress (Mittova et al., 2003).

### 1.1 Les enzymes du cycle $\gamma$ -glutamyl sont représentées par un faible nombre de gènes

Deux gènes de GCLC, catalysant la première étape de la synthèse du GSH, ont été identifiés dans le génome mais une seule EST a été repérée dans les banques d'ADNc. Ceci est surprenant compte tenu de l'importance fonctionnelle de ce gène. Le gène de glutathion synthétase GS, catalysant la deuxième étape de la synthèse du GSH est bien représenté dans les différentes banques d'EST avec dix séquences, justifiant son importance dans le métabolisme basal de l'algue.

Le glutathion est dégradé majoritairement dans l'espace extracellulaire. Il est transporté par une famille de protéines membranaires ATP-dépendantes appartenant à la famille des MRP (multidrug-resistance protein) (Keppler, 1999). Ces transporteurs jouent un rôle décisif dans les mécanismes de détoxification car ils sont indispensables au transport des conjugués glutathionylés, du glutathion réduit, et du glutathion disulfure. Le génome d'*E. siliculosus* contient, après une analyse par blast, au moins deux gènes (Esi0000\_0226 et Esi0455\_0017) présentant plus de 50% de similitude avec les MRP humaines.

A l'instar de GCLC, il n'existe qu'une seule copie du gène de  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase (GGT) et il est absent dans les banques d'ESTs. Ce gène participe pourtant activement à l'importation des acides aminés dans le cytoplasme en catalysant la formation de composés  $\gamma$ -glutamylés qui sont reconnus par des transporteurs membranaires. De même, la cyclotransférase intracellulaire qui produit de la 5-oxoproline et libère l'acide aminé de son groupement  $\gamma$ -glutamyl, est codée par un seul gène, pour lequel aucune EST n'a été identifiée. La 5-oxoprolinase qui permet la formation de glutamate par l'hydrolyse de l'ATP, est codée par deux paralogues, dont un seul est représenté dans les banques. La dipeptidase membranaire permettant le clivage du groupement cystéinylglycine est codée par un seul gène représenté par 3 EST. Les acides aminés glycine et cystéine produits par cette protéine sont transportés dans le cytosol des cellules par l'intermédiaire de transporteurs membranaires d'acides aminés.

Chez *E. siliculosus*, le nombre de gènes impliqué dans la synthèse et la dégradation du GSH est comparable à ce qui a été déterminé chez les plantes et les animaux. Leur faible nombre suggère une régulation fine de leur activité. Chez l'homme, les stress oxydants et thermiques, les radiations ionisantes, les métaux lourds, les antioxydants, la prostaglandine A<sub>2</sub> et de faibles quantités de glutathion activent la transcription des gènes de GCL. Le maintien du niveau de glutathion cellulaire est donc associé à la réponse cellulaire aux perturbations. L'activité liée aux enzymes de synthèse et de dégradation du glutathion doit donc pouvoir être rapidement régulée pour éviter son accumulation ou compenser son déficit.

### **1.1.1 Les enzymes dont l'activité est GST-dépendante sont représentées par un grand nombre de gènes.**

A l'inverse des gènes codant pour les protéines impliquées dans la synthèse et la dégradation du glutathion, les enzymes pour lesquelles le glutathion est un substrat sont codées par des familles multigéniques. Dans la plupart des réactions impliquant le glutathion

réduit (GSH), le groupement thiol de la cystéine est oxydé, produisant du glutathion disulfure (GSSG). La réaction inverse est catalysée par une glutathion réductase (GR), en utilisant le pouvoir réducteur du NADPH. Le pool de glutathion réduit est donc maintenu par l'activité des glutathion réductases.

Deux gènes de GR sont présents dans le génome, l'un est absent des banques d'EST et l'autre est représenté par six séquences. Le glutathion réduit est indispensable pour éviter la formation de ponts disulfures non spécifiques qui engendrent l'agrégation et l'inactivation des protéines.

Un gène de glutathion dehydrogénase (DHAR), enzyme qui participe au cycle de l'ascorbate-glutathion, a été identifié. Il est représenté par six EST. DHAR catalyse la réduction du dehydroascorbate en ascorbate, en utilisant le pouvoir réducteur du GSH. L'ascorbate est oxydé en dehydroascorbate lors de la réduction du peroxyde d'hydrogène catalysée par l'ascorbate peroxydase (APX). Trois gènes codant pour des APX sont présents dans le génome.

Sept glutathion peroxydases (GPx) ont été identifiées dans le génome et dans les banques d'EST. L'une d'elle, codée au niveau du locus Esi0152\_0006, est particulièrement bien représentée avec 17 séquences. De plus, cette protéine possède 79 % d'identité avec une autre GPx, Esi0152\_0008, localisée sur le même supercontig. Ces enzymes utilisent le glutathion comme donneur d'électrons pour catalyser la dégradation du peroxyde d'hydrogène et des hydroperoxydes organiques formés par l'oxydation des acides gras.

Sept gènes de glutarédoxines, totalisant 53 EST, ont été repérés dans le génome. Leur annotation est difficile, tant les homologies avec des séquences préalablement caractérisées chez d'autres organismes sont faibles. Ces protéines sont connues pour réduire les ponts disulfures interprotéiques en formant un pont disulfure entre deux cystéines de leur site catalytique.

Sur les douze gènes de GST cytosoliques présent dans le génome d'*Ectopcarpus*, seuls six d'entre-eux sont associés à des EST. L'absence de certains gènes dans la collection d'EST suggère donc que l'inventaire réalisé chez *Laminaria*, uniquement à partir de ce type de ressource, n'est pas complet.

## 2. Origine et évolution des GST d'algues brunes.

---

La totalité des GST cytosoliques identifiée chez les algues brunes *E. siliculosus*, *L. digitata*, *F. serratus*, *F. vesiculosus*, et *S. binderi* appartient à la classe Sigma. Ce résultat est identique lorsque l'on considère les GST d'algues rouges *C. crispus*, *G. gracilis*, et *G. changii*. Jusqu'à ce jour, les GST Sigma n'ont été caractérisées que chez les métazoaires et les oomycètes (Hervé et al., 2008). De même, les trois GST microsomales d'*E. siliculosus* et les deux de *C. crispus* appartiennent à la même classe, MGST3, qui est la seule classe de MAPEG à regrouper des protéines de métazoaires et de plantes. En outre, le génome d'*E. siliculosus* contient une GST de type Kappa, décrite principalement chez les métazoaires. Cette composition en gènes de GST dans les génomes d'algues est donc surprenante car elle ressemble fortement à celle des métazoaires.

Toutes les lignées eucaryotes actuelles, y compris celles des algues et des métazoaires, dérivent d'un protiste ancestral. L'endosymbiose d'une cyanobactérie par un protiste ancestral, hétérotrophe, a donné naissance au premier eucaryote photosynthétique (Figure 99). La cyanobactérie est devenue le plaste et des transferts de gènes ont eu lieu entre le génome bactérien et le génome du protiste. Cet eucaryote autotrophe a évolué en donnant la lignée verte, la lignée des glaucophytes et la lignée des algues rouges. Ensuite, un deuxième événement d'endosymbiose entre un protiste ancestral et une algue rouge a donné naissance, entre autre, à la lignée des hétérochontes comprenant les algues brunes, les diatomées et les oomycètes et à la lignée des haptophytes. L'algue rouge a été réduite à l'état de plaste et des transferts de gènes ont eu lieu entre le génome de l'algue et du protiste (Cavalier-Smith, 2002).

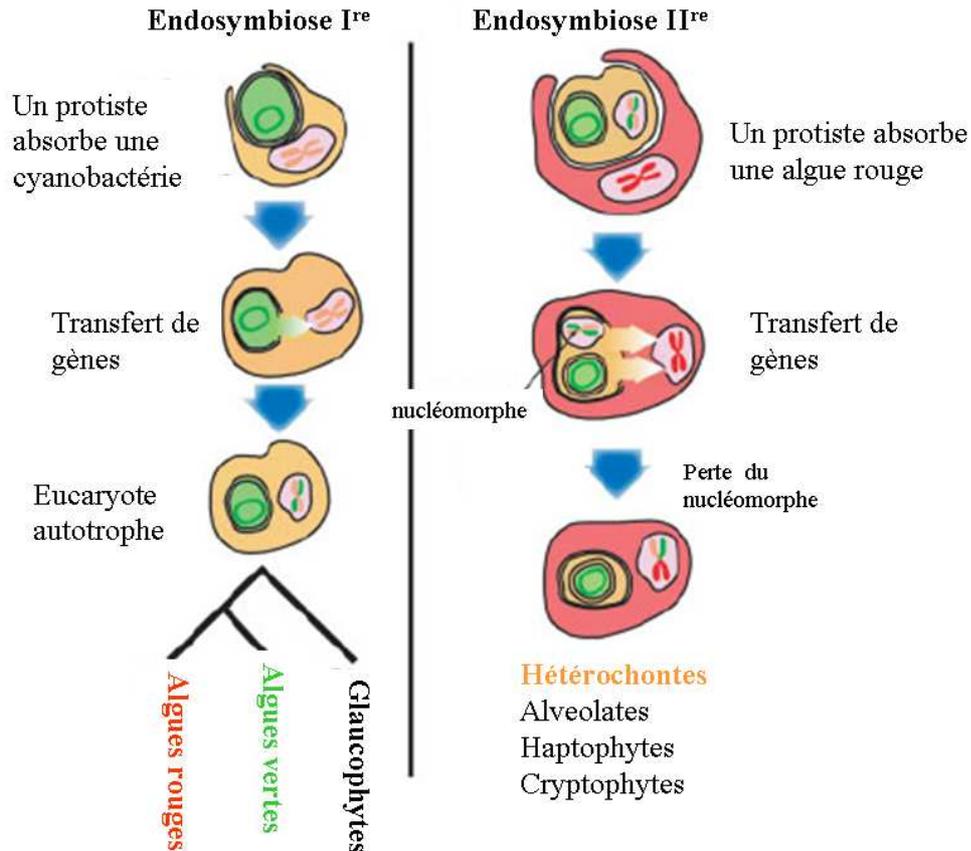


Figure 99: Théorie endosymbiotique, d'après Bhattacharya, 2004.

## 2.1 Classes de GST du protiste ancestral

L'analyse des génomes eucaryotes (Tableau 29) montre que trois classes de GST cytosoliques sont conservées chez des organismes appartenant aux grandes lignées d'eucaryotes. Il s'agit des classes Theta, Zeta et Sigma. De même, la classe MGST3 des MAPEG est ubiquiste. La classe Kappa est absente de la plupart des génomes séquencés mais elle a été identifiée chez des métazoaires et chez *Ectocarpus*, ainsi que chez la bryophyte *Physcomitrella patens*. On peut donc postuler que des GST appartenant aux classes Theta, Zeta, Sigma, MGST3 et Kappa étaient présentes dans l'ancêtre commun de toutes les lignées d'eucaryotes.

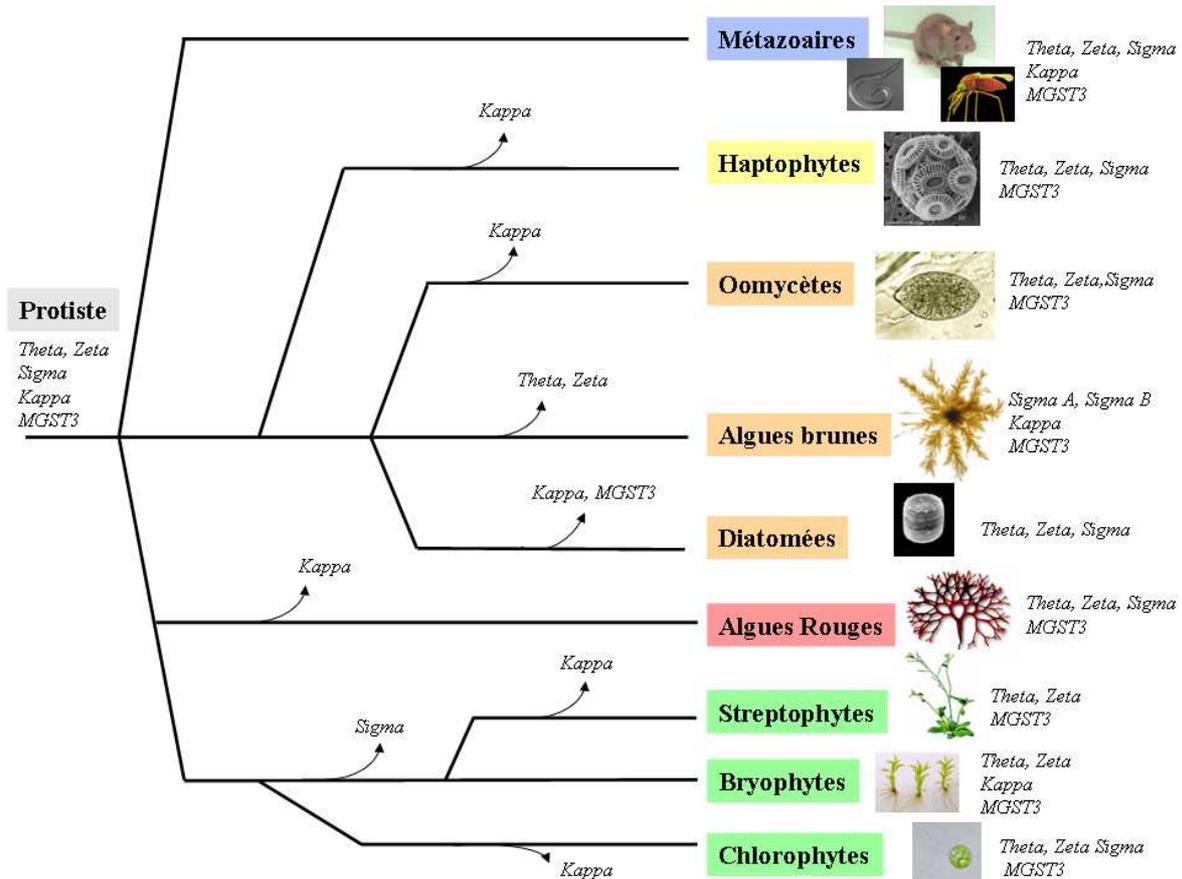
**Tableau 29: Classes de GST conservées dans les grand groupes d'eucaryotes.**

La présence ou l'absence de GST a été déterminée par un blastp dans les génomes séquencés.

		Glutathion S-transférase					
Classification	Espèce	Theta	Zeta	Sigma	MGST3	Kappa	
Hétérochontes	Phaeophyceae	<i>Ectocarpus siliculosus</i>	-	-	+	+	+
	Diatomées	<i>Thalassiosira pseudonana</i>	-	-	+	-	-
		<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	+	+	+	-	-
	Oomycètes	<i>Phytophthora sojae</i>	+	+	+	+	-
		<i>Phytophthora ramorum</i>	+	+	+	+	-
Haptophytes		<i>Emiliana huxleyi</i>	+	+	+	+	-
Rhodophytes	Floridophyceae	<i>Chondrus crispus</i> <sup>1</sup>	+	+	+	+	-
	Bangiophyceae	<i>Cyanidioschyzon merolae</i>	-	+	-	+	-
Viridiplantae	Chlorophytes	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	+	-	+	+	-
		<i>Ostreococcus lucimarinus</i>	-	-	+	+	-
	Bryophytes	<i>Physcomitrella patens</i>	+	+	-	+	+
	Streptophytes	<i>Arabidopsis thaliana</i>	+	+	-	+	-
		<i>Oryza sativa</i>	+	+	-	+	-
Métazoaires		<i>Homo sapiens</i>	+	+	+	+	+
		<i>Caenorhabditis elegans</i>	+	+	+	+	+
		<i>Drosophila melanogaster</i>	+	+	+	+	-

<sup>1</sup>Une analyse par tBLASTn du génome de *Chondrus crispus* séquencé à 95 %, a été réalisée au moment de la rédaction de cette discussion, en collaboration avec Jonas Collén, superviseur du projet de séquençage.

Les différentes classes de GST ont ensuite évolué au sein des lignées, par élimination, conservation, et diversification des gènes. Ainsi, D'après les données actuelles sur les génomes eucaryotes séquencés, il semble que les classes Theta et Zeta ont été perdues chez les algues brunes et que la classe Sigma a été perdue chez les plantes terrestres. De même, la classe MGST3 des MAPEG semble avoir été perdue chez les diatomées, et la classe Kappa est absente de la plupart des organismes (Figure 100).



**Figure 100: Evolution supposée des familles de GST dans les grandes lignées d'eucaryotes.**

Les flèches indiquent la perte des classes.

Les séquences conservées se sont diversifiées et ont permis l'émergence de nouvelles classes. Ainsi, comme le suggère C. Frova (Frova, 2006) les classes Alpha, Mu et Pi ont vraisemblablement évolué à partir de la classe Sigma chez les métazoaires. L'évolution de la classe Nu chez les nématodes, à partir de la classe Sigma, expliquerait également le lien de parenté entre ces deux classes, observé au cours des analyses phylogénétiques. Les classes Delta et Epsilon, spécifiques des insectes, ont évolué à partir de la classe Theta, de même que la classe Rho, spécifique des poissons. D'après les analyses phylogénétiques, la classe Omega

partage un ancêtre commun avec la classe Zeta. Chez les plantes terrestres, les classes Phi et Tau ont respectivement évolué à partir des classes Theta et Zeta. La conservation de l'activité maleylacétoacétate isomérase des GST Zeta chez les métazoaires et les plantes terrestres suggère que les classes de GST Theta, Zeta et Sigma, présentes dans la lignée du protiste ancestral, ont conservé des activités semblable dans les descendants. Chez les algues brunes, la classe Sigma s'est diversifiée, faisant apparaître deux groupes distincts A et B.

## 2.2 Evolution de la classe Sigma chez les algues brunes

### 2.2.1 Structure du gène de GST Sigma ancestral

En 2000, Kanaoka et ses collaborateurs ont démontré que la structure de certains gènes de GST Sigma de mammifères, de nématodes, et de céphalopodes, était strictement conservée. Ces gènes possèdent 5 introns qui sont localisés de façon identique quelle que soit l'origine des séquences (Kanaoka et al., 2000). Les auteurs ont alors considéré que cette structure de gène était ancestrale et avait été maintenue dans certains descendants. Ayant réalisé un alignement protéique des GST sigma d'*Ectocarpus* avec la PGDS de souris, j'ai mis en évidence qu'il y avait des reliques de cette structure ancestrale dans les GST Sigma du groupe B d'*E. siliculosus* (Tableau 30), et dans la GST du groupe A de *Laminaria digitata*. De même la position de l'unique intron des GST Sigma de *C. crispus* est conservée avec la position de l'intron 1 des gènes du groupe B d'algues brunes.

**Tableau 30: Conservation de la position des introns de la classe Sigma dans certaines séquences d'algues brunes.**

<i>RnPGDS</i>	Intron 2	Intron 3	Intron 4	Intron 5
Localisation identique	Intron 2 <i>EsGST[1, 10-12]</i> Intron 1 <i>EsGST2</i>	Intron 2 <i>EsGST2</i>	Intron 3 <i>EsGST[1, 2, 10-12]</i> Intron <i>LdGST4</i>	Intron 5 <i>EsGST[1, 10-12]</i>

Ce résultat confirme que les GST Sigma d'*Ectocarpus*, de *Chondrus*, de *Laminaria* et de métazoaires ont la même origine. Ce type de signature rejette l'hypothèse d'une convergence évolutive. Il semble donc que le gène de GST Sigma du protiste ancestral présentait au moins quatre introns dans sa séquence codante. La détermination de la structure d'autres gènes de GST Sigma devrait permettre de savoir si cette structure génique était plus proche de celle présente chez les métazoaires ou chez *E. siliculosus*.

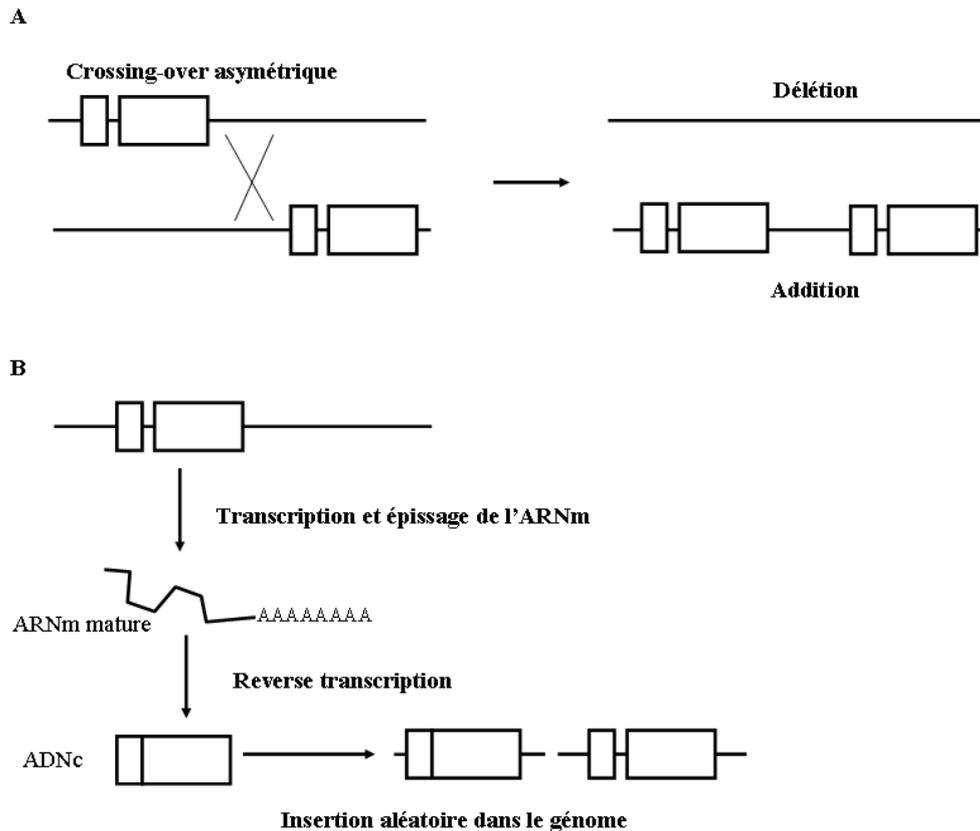
## 2.2.2 Evolution par duplication

Les GST Sigma sont généralement présentes en faible nombre dans les génomes de métazoaires. Ainsi, un seul gène a été identifié chez l'homme, le rat (Kanaoka et al., 1997; Nebert and Vasiliou, 2004), et les insectes (Ding et al., 2003), ou les copépodes (Lee et al., 2008b). Pour les algues, l'analyse du génome (couverture 95%) de *C. crispus* a révélé uniquement la présence de deux gènes correspondants à ceux identifiés dans les banques d'EST. Les microalgues vertes *Ostreococcus lucimarinus* et *Chlamydomonas reinhardtii* contiennent respectivement une et trois GST Sigma. De même, trois gènes codant pour des GST Sigma ont été identifiés chez l'haptophyte *Emiliana huxleyi*. Les diatomées *T. pseudonana* et *P. tricornutum* contiennent chacune un gène de GST Sigma dans leur génome.

En revanche, dans la lignée des algues brunes et des oomycètes, on constate une multiplication du nombre de copies de gènes. Ainsi le génome d'*Ectocarpus* contient 12 gènes de GST Sigma, et les génomes de *P. sojae* et *P. ramorum* contiennent respectivement 14 et 6 gènes de cette classe. De même, quatre GST Sigma sont présentes parmi les 1084 gènes de la banque d'EST de protoplastes de *L. digitata*. Le grand nombre de gènes souligne l'importance fonctionnelle des GST de la classe Sigma chez ces organismes.

### 2.2.2.1 Groupes A et B

Chez les algues brunes, l'identité des séquences et la caractérisation des structures de gènes fait apparaître une séparation des GST Sigma en deux groupes, A et B. L'apparition d'un nouveau gène est généralement le fruit d'un événement de duplication (Ohno, 1970). Des gènes dupliqués sont appelés paralogues et forment des familles multigéniques. La duplication de gènes peut se faire par crossing-over asymétriques (Figure 101A), par rétroposition (Figure 101B), ou par duplication des chromosomes ou du génome complet (Zhang, 2003). Lorsque les gènes sont dupliqués en entier, leur évolution peut mener à la conservation de la fonction originale. Dans ce cas, la présence de copies invariantes permet de produire plus d'ARN messagers et donc plus de protéines. Il est également possible que l'une des copies acquière une nouvelle fonction par des mutations. Enfin, la séquence peut se dégrader par des mutations engendrant un codon stop prématuré ou un décalage du cadre de lecture, créant ainsi un pseudogène. D'une manière générale, il est admis qu'une des copies conserve la fonction ancestrale tandis que la pression de sélection est relâchée sur l'autre copie, permettant l'apparition de nouvelles fonctions.

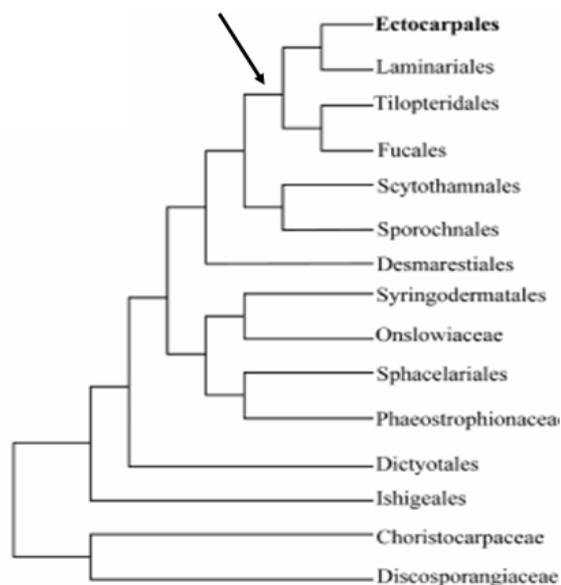


**Figure 101: Modes de duplication des gènes.**

(A) Duplication par crossing-over asymétrique qui induit la recombinaison de deux sites non identiques. (B) Rétroposition. Les rectangles et les lignes représentent respectivement les exons et les introns.

La topologie de l'arbre phylogénétique des GST Sigma (Figure 59) indique que le groupe A est plus proche de celui des GST Sigma d'algues rouges que du groupe B. L'arbre phylogénétique ne reflète pas la phylogénie des espèces mais regroupe des séquences sur la base d'un alignement protéique. Il est vraisemblable que les séquences des protéines du groupe A et celles des algues rouges se rapprochent de la séquence ancestrale. De ce fait, le groupe B a très certainement évolué par une duplication d'un gène ancêtre du groupe A.

L'analyse phylogénétique montre que les groupes A et B sont conservés chez trois espèces d'algues brunes: *E. siliculosus*, *L. digitata*, et *F. vesiculosus*. Ces deux groupes étaient donc présents chez l'ancêtre commun des Ectocarpales, des *Laminariales*, et des Fuciales. (Figure 102).



**Figure 102: Phylogénie des algues brunes, d'après (Kawai et al., 2007).**

La flèche indique la position probable de la duplication ayant engendré les groupes A et B.

Les données moléculaires sont insuffisantes pour remonter plus haut dans l'évolution et localiser la duplication. Cependant, l'analyse de GST Sigma chez d'autres hétérochontes devrait permettre de situer cette duplication dans l'évolution des différentes classes d'organismes. En effet, le grand nombre de gènes de GST Sigma identifié chez les oomycètes suggère que des événements de duplication ont permis l'extension de la famille multigénique. Il serait probable que la duplication des groupes A et B ait eu lieu chez l'ancêtre commun des algues brunes et des oomycètes.

La spéciation a généré des orthologues qui ont suivie une évolution indépendante. Chez *Ectocarpus*, les gènes du groupe B ont évolué en conservant des reliques de la structure du gène ancestral, tandis que les gènes du groupe A ont perdu cette structure. Chez *Laminaria*, les gènes du groupe B ont perdu la structure ancestrale et la seule position d'intron identifiée dans LdGST4, groupe A, est une relique de la structure ancestrale. La structure des gènes a donc évolué de façon indépendante dans les deux génomes d'algues brunes.

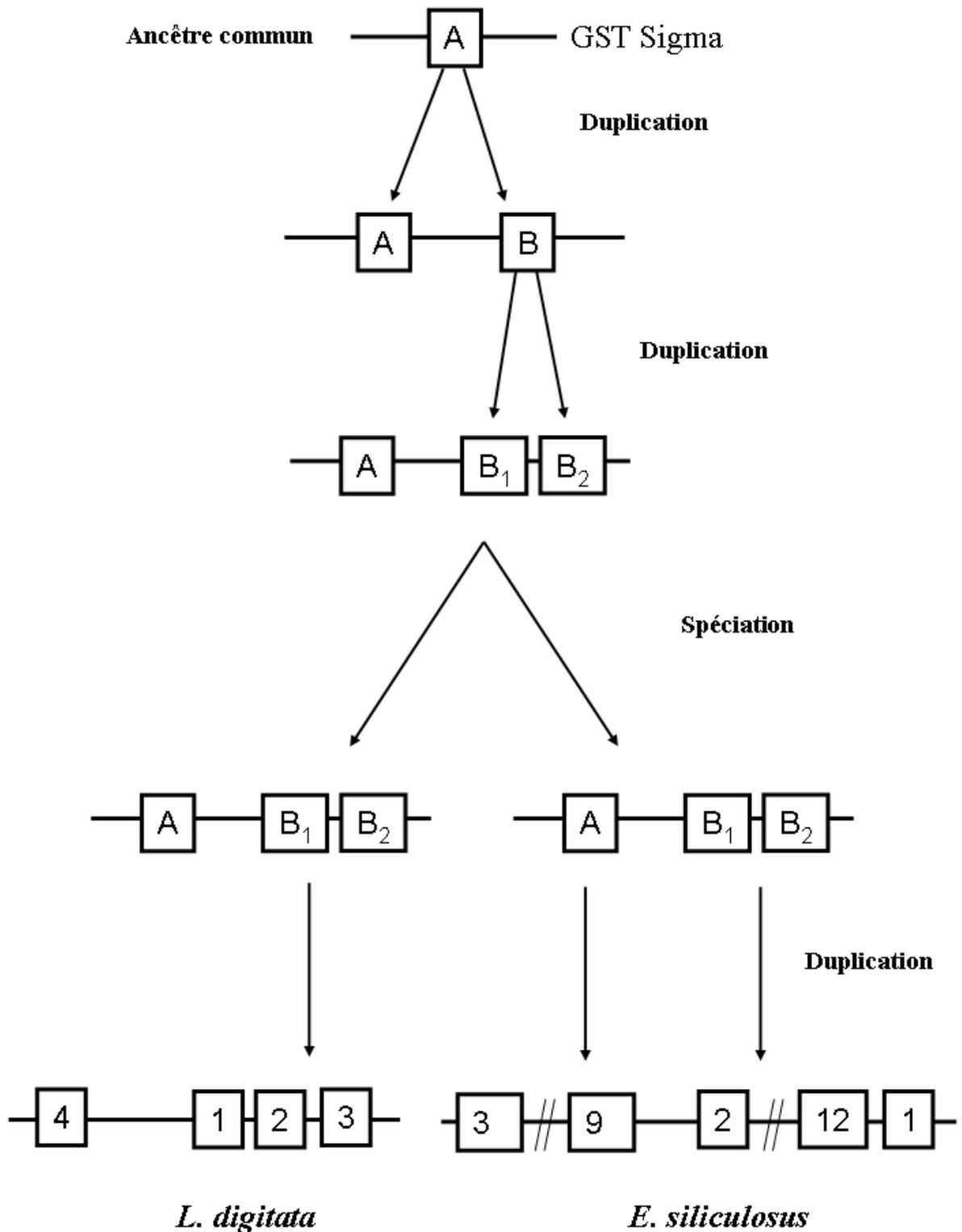
L'organisation génomique en tandem est caractéristique des phénomènes de duplication. Chez *Ectocarpus*, les gènes du groupe A sont tous organisés en tandem. La présence d'introns, et la conservation de la structure des gènes du groupe A, semble indiquer un phénomène de duplication par crossing-over inégal. La structuration du groupe A apparaît relativement homogène et compacte, avec des séquences qui partagent de forts taux d'identité.

Ceci suggère des duplications récentes des séquences au sein du groupe et/ou une pression de sélection qui n'a entraîné que peu d'altérations des séquences protéiques. Ce groupe, proche du groupe des GST d'algues rouges, tendrait à avoir conservé la fonction ancestrale du gène de GST Sigma.

Le groupe B des GST d'*Ectocarpus* est plus divergent. Les gènes *EsGST[10-12]* sont très similaires et deux d'entre-eux sont localisés en tandem sur le même supercontig, ce qui semble indiquer qu'ils ont évolué par duplication. En revanche, le gène *EsGST2* code pour une protéine dont l'identité avec les autres membres du groupe (*EsGST[1, 10-12]*) est comprise entre 33 et 38 %, mais la structure de ce gène présente des reliques du gène Sigma ancestral. Il semble donc que ce gène soit apparu par une duplication du gène B ancestral. N'ayant pas d'orthologues identifiés chez *L. digitata*, ce gène a été affilié au groupe B, même s'il constitue tout de même une évolution de ce groupe. Les divergences au niveau de la séquence protéique peuvent permettre l'acquisition d'une nouvelle fonction. Si des homologues sont identifiés dans d'autres espèces d'algues brunes, ils pourraient alors permettre de définir un groupe C des GST Sigma.

Chez *L. digitata*, les gènes ne présentent pas d'introns et ont donc perdu la structure ancestrale. L'une des hypothèses pour expliquer l'absence d'introns dans ces GST fait appel à la rétroposition. Ce phénomène conduit à l'intégration dans le génome d'un ADN complémentaire synthétisé à partir d'un ARN messager, générant ainsi la formation de gènes sans introns.

D'après l'arbre phylogénétique (Figure 59) le groupe B est structuré en deux sous-groupes, B1 et B2, chez *Ectocarpus* et *Laminaria*, suggérant qu'une duplication a eu lieu avant la divergence des deux espèces (Figure 103).



**Figure 103: Modèle d'évolution de la famille multigénique des GST Sigma chez les algues brunes.**

Ce modèle illustre les phénomènes de duplications et de spéciations ayant généré la famille multigénique des GST Sigma chez *L. digitata* et *E. siliculosus*. La localisation génomique n'est pas respectée.

### **2.2.3 Diversification fonctionnelle des paralogues de GST**

Les divergences au niveau des acides aminés entre les paralogues ne sont pas réparties aléatoirement le long des séquences, mais sont localisées à des sites spécifiques. De même, certaines parties des protéines sont très conservées.

Les régions subissant une pression de sélection seront conservées entre les différents paralogues. Les régions conservées sont en général indispensables au maintien de la structure de la protéine ou impliquées dans les mécanismes catalytiques essentiels à la fonction principale de l'enzyme. Dans le cas des GST, il est fort probable qu'il existe une pression de sélection qui maintient les résidus nécessaires à la fixation du glutathion.

De manière remarquable, les sites divergents sont assez semblables chez les GST Sigma du groupe A et du groupe B. Ainsi, les positions ayant subi des variations sont localisées dans le motif thiorédoxine, N-terminal, et plus précisément au niveau des boucles dirigées vers le site de fixation du glutathion. Le domaine C-terminal est également variable, et les divergences sont observées d'une part dans les structures secondaires dirigées vers le site catalytique, et d'autre part sur la face externe des protéines.

Les résidus qui se trouvent dans les boucles entre  $\beta 1$  et  $\alpha 1$ , entre  $\beta 2$  et  $\alpha 2$ , et entre  $\beta 4$  et  $\alpha 3$  sont localisés dans la gorge catalytique de l'enzyme et plus particulièrement au niveau du site de fixation du glutathion. De même, les acides aminés qui sont positionnés dans les extrémités C-terminales des hélices  $\alpha 4$ ,  $\alpha 7$  et  $\alpha 9$ , et dans la boucle entre  $\alpha 4$  et  $\alpha 5$ , peuvent se trouver dirigés vers la gorge catalytique. Ce sont donc potentiellement des sites de fixation du substrat spécifique. En revanche, les résidus situés dans les extrémités N-terminales des brins  $\beta 1$ ,  $\beta 2$ ,  $\beta 4$ , dans la boucle entre  $\alpha 3$  et  $\alpha 4$ , et dans les hélices  $\alpha 5$ ,  $\alpha 6$  et  $\alpha 8$ , ne sont pas dirigés vers le site catalytique. Ils ont cependant leur importance dans le maintien de la structure, dans l'association du dimère ou dans la fixation d'éléments régulateurs. Il est d'ailleurs intéressant de constater que la seule divergence entre EsGST6 et EsGST7, au niveau protéique, est localisée dans l'hélice  $\alpha 5$ .

L'évolution des gènes par duplication permet de créer des protéines avec de nouvelles fonctions. La forte conservation de certains motifs suggère que le mécanisme catalytique ancestral est conservé et que les spécificités apparaissent dans le type de substrat pris en charge.

#### **2.2.4 Hétérodimérisation**

Si l'on considère les phénomènes d'hétérodimérisation au sein d'une même classe, les GST d'*Ectocarpus* peuvent théoriquement s'associer pour former 28 dimères au sein du groupe A et 15 dimères au sein du groupe B. Ainsi, 43 isoenzymes peuvent être formées à partir de 12 gènes. Par comparaison, chez l'homme, 17 GST appartenant à 5 classes différentes ont été identifiés, ce qui permet théoriquement l'association de 37 dimères.

#### **2.2.5 Elongation des protéines EsGST2 et EsGST9**

La protéine EsGST2 présente environ 28 aa de plus que ses paralogues du groupe B. Ces acides aminés sont situés à l'extrémité C-terminale de la protéine. De manière remarquable, cette partie supplémentaire contient 9 prolines, soit 45 % des prolines totales de la protéine. Cette structure additionnelle a très certainement un rôle structural et pourrait être impliquée dans la fixation d'EsGST2 au sein d'un complexe protéique.

La plus grande taille de la protéine EsGST9 est due à une modification du site d'épissage du dernier intron du gène Esi0648\_0004, ce qui engendre un décalage du cadre de lecture. Ainsi, la protéine présente 27 aa de plus que ses paralogues du groupe A, formant une extension C-terminale de la protéine. Presque tous ces acides aminés supplémentaires sont hydrophobes. Il est possible que cette structure hydrophobe permette l'ancrage de la protéine EsGST9 au sein d'un complexe protéique ou d'une membrane.

Que ce soit pour EsGST2 ou EsGST9, cette extension C-terminale est située dans le prolongement de l'hélice  $\alpha_9$ . Cette dernière est localisée sur l'un des bords de la gorge du site catalytique. On ne peut donc pas exclure que cette partie allongée soit repliée vers le site actif modifiant ainsi les propriétés enzymatiques des protéines.

#### **2.2.6 Formation de pseudogènes**

Deux pseudogènes de GST Sigma ont été identifiés dans le génome d'*Ectocarpus*. Le locus Esi0021\_0122 est un paralogue des gènes du groupe B et le locus Esi0617\_0004 est un paralogue des gènes du groupe A. La duplication des gènes génère une redondance fonctionnelle qui autorise l'accumulation de mutations dans l'une des copies. Les mutations délétères ne sont pas éliminées par la sélection, ces gènes deviennent alors des pseudogènes qui ne sont pas exprimés ou n'ont pas de fonctions (Lynch and Conery, 2000).

### 2.3 Evolution de la classe MGST3 chez les algues brunes.

La classe des GST microsomales MGST3 est la seule parmi celles des MAPEG à être présente dans toutes les lignées eucaryotes. Au cours de l'évolution des métazoaires, de nouvelles classes de MAPEG se sont développées. Les analyses phylogénétiques semblent indiquer que les classes MGST3, MGST2, LTC4 synthase et FLAP ont un ancêtre commun. Il est donc probable qu'elles aient évolué à partir de MGST3. De même, MGST1 et PGES sont des groupes frères, qui sont assez proches d'un autre groupe formé par des protéines bactériennes (Bresell et al., 2005).

Les trois gènes de MGST3 présents dans le génome d'*Ectocarpus* sont groupés sur le même fragment génomique et leur organisation en tandem semble indiquer leur évolution par des événements de duplication. Les divergences majeures entre les trois protéines sont localisées dans la boucle entre  $\alpha 1$  et  $\alpha 2$ , et dans l'extrémité C-terminale. Ces positions sont dirigées vers le cytoplasme et sont impliquées dans la reconnaissance du substrat. La classe MGST3 d'*Ectocarpus* a sans doute subi une diversification fonctionnelle.

### 2.4 Pertinence de la classe Kappa.

A ce jour, la classe Kappa des GST n'a été identifiée que chez certains métazoaires, chez une algue brune, *E. siliculosus*, chez la mousse *P. patens*, et chez certaines bactéries. L'hypothèse d'une convergence évolutive étant peu pertinente, la représentation de cette classe suggère que la lignée du protiste ancestral disposait d'un gène de type GST Kappa. De plus, il n'existe qu'une seule copie génique de GST Kappa dans les génomes au sein desquels cette classe a été identifiée.

Le gène de GST Kappa d'*Ectocarpus* présente une séquence d'adressage au péroxysome. Ces organites sont présent chez les plantes et les animaux et sont liés au métabolisme des lipides, notamment dans la  $\beta$ -oxydation des acides gras qui permet de générer de l'acétyl-CoA et de l'acyl-CoA (Wanders et al., 2000). De plus, les péroxysomes sont des sites de détoxification cellulaires, et dans lesquels il y a aussi production de radicaux hydroxyles et de peroxyde d'hydrogène (Masters, 1998). Les péroxysomes contiennent des catalases et des superoxyde dismutases impliquées dans la destruction des espèces actives de l'oxygène. L'activité peroxydase de la GST Kappa humaine a été détectée en présence d'hydropéroxydes organiques, et son rôle dans la détoxification des produits de peroxydation des lipides a été envisagé (Morel et al., 2004).

Malheureusement, la GST Kappa d'*Ectocarpus* n'a pas pu être produite en système hétérologue et par conséquent, son activité n'a pas été étudiée.

## 2.5 Origine bactérienne des GST putatives d'*E. siliculosus*

Les homologues les plus proches des GST putatives identifiées dans le génome d'*E. siliculosus* sont des protéines de procaryotes. L'origine d'une contamination bactérienne du séquençage est rejetée par la présence d'introns dans ces gènes. De même, chez *C. crispus*, la protéine CcGST3 présente des homologies avec des séquences de GST putatives de gamma protéobactéries. Le gène qui code pour CcGST3 ne présente pas d'introns mais les ARN messagers possèdent une queue polyA (hervé, 2008).

Ces GST putatives pourraient trouver leur origine dans l'endosymbiose entre le protiste ancestral et une cyanobactérie. Ces gènes semblent avoir des homologues dans les génomes de la lignée verte (*A. thaliana*, *P. patens*) mais les identités sont faibles.

## 2.6 Perte des classes Theta et Zeta

A l'heure actuelle, *E. siliculosus* est le seul organisme multicellulaire qui ne possède pas de GST appartenant aux classes Theta et Zeta. La classe Theta des GST est présente chez les bactéries et les eucaryotes. Elle est donc considérée comme la classe ancestrale des GST cytosoliques. Les enzymes de cette classe n'ont pas d'activité spécifique caractérisée mais catalysent la conjugaison du glutathion et du CDNB, et présentent des activités peroxydases. La classe Theta serait donc un acteur majeur du métabolisme de phase II de détoxification cellulaire. Cette classe aurait évolué pour former le facteur d'élongation eEF1B- $\gamma$  et la classe Zeta (Frova, 2006). La classe Zeta possède une activité spécifique conservée chez les plantes et les animaux. Les enzymes de cette classe, en plus de leur activité de conjugaison du CDNB, catalysent l'isomérisation du maleylacétoacétate en fumarylacétoacétate, avant-dernière réaction de la voie de dégradation de la tyrosine. L'absence présumée de ce gène chez *Ectocarpus*, et la présence des enzymes agissant en amont (homogentisate 1,2-dioxygénase, E.C. 1.13.11.5; Esi0379\_0012) et en aval (fumarylacetoacetase, E.C. 3.7.1.2; Esi0188\_0001) de la voie catabolique, suggère que l'activité originale de la GST Zeta est catalysée par une enzyme différente.

### 3. Fonction biologique des familles de GST chez les algues.

Bien qu'aucune donnée expérimentale ne permette d'affirmer avec certitude quelle est la fonction des GST Sigma, Kappa, et MGST3 chez les algues, des hypothèses peuvent être suggérées en se basant sur l'origine des gènes, sur leurs fonctions dans d'autres organismes, ainsi que sur leurs profils d'expression dans des algues soumises à différents stress.

#### 3.1 Activités enzymatiques des GST microsomales

Les résultats d'activité obtenus sur les GST microsomales d'*Ectocarpus* et de *Chondrus* indiquent que ces enzymes n'ont pas d'activité transférase sur le CDNB mais sont dotées d'une activité peroxydase. Ces caractéristiques sont partagées avec les MGST3 humaines. En revanche, la protéine MGST3 d'*Arabidopsis* présente une faible activité transférase sur le CDNB mais n'est pas active sur le cumène hydroperoxyde (Bresell et al., 2005). Les protéines d'algues mEsGST[1,2] et mCcGST1 ont des niveaux d'activités peroxydase comparables tandis que mCcGST2 présente une activité réduite. Ceci semble corrélé avec la divergence de cette protéine au sein de la classe MGST3.

Les protéines MGST3 humaines ont, en plus, la capacité de conjuguer du GSH et du leucotriène A4 pour former le LTC4 (Jakobsson et al., 1997). Il est intéressant de constater que parmi les GST microsomales, la LTC4 synthase et la MGST3 de métazoaires partagent cette même activité. Les analyses phylogénétiques montrent que la LTC4 synthase a vraisemblablement évolué à partir de MGST3, ce qui constitue un cas de sous-fonctionnalisation. Dans ce cas, le gène dupliqué devient plus performant pour catalyser une réaction spécifique parmi celles qu'étaient capables de réaliser l'enzyme codée par le gène ancestral (Zhang, 2003). MGST2 dérive de MGST3 et a conservé la capacité de catalyser la réduction du 5-HpETE en 5-HETE. A l'inverse, FLAP partage un ancêtre commun avec MGST3, MGST2, et LTC4 synthase, mais ne possède plus d'activité catalytique. Son évolution a vraisemblablement généré une nouvelle fonction.

#### 3.2 Fonction des GST Sigma chez les algues

Chez tous les métazoaires étudiés, la classe Sigma semble avoir un lien avec le métabolisme des oxylipines. Le terme d'oxylipines s'étend à l'ensemble des composés, cycliques ou linéaires, issus du métabolisme oxydatif des acides gras polyinsaturés (AGPI). Chez les métazoaires, le précurseur des oxylipines est généralement l'acide arachidonique

(C20). Les groupes de GST Sigma de mammifères et d'insectes sont les mieux décrits dans la littérature. Chez les mammifères, cette classe correspond aux prostaglandine D synthases hématopoïétiques qui catalysent la formation de PGD<sub>2</sub> à partir de PGH<sub>2</sub> (Kanaoka et al., 1997; Jowsey et al., 2001). Ces enzymes sont donc impliquées dans la signalisation hormonale permettant la réponse au stress à l'échelle de l'organisme. De même, chez *Ciona intestinalis*, invertébré appartenant au phylum des chordés, un gène de GST Sigma présentant plus de 95 % d'homologie avec les PGDS a été identifié (Rowley et al., 2005). Chez les insectes, les GST Sigma sont vraisemblablement impliquées dans la détoxification des produits de la peroxydation des lipides, tels que le 4-HNE. L'activité de conjugaison de ce composé avec le glutathion a été mesurée pour des enzymes de *D. melanogaster* (Singh et al., 2001; Agianian et al., 2003) et d'*H. cunea* (Yamamoto et al., 2007). Les GST Sigma sont présentes chez les helminthes (vers parasites) et seraient impliquées dans la conjugaison du glutathion et des aldéhydes chez *Paragonimus westermani* (Hong et al., 2000), et dans la synthèse de PGE<sub>2</sub> chez *Ascaridia galli* (Meyer et al., 1996) et PGD<sub>2</sub> chez *Schistosoma haematobium* (Johnson et al., 2003). Les GST Sigma interviennent donc dans la synthèse ou la dégradation des oxylipines issues du métabolisme oxydatif de l'acide arachidonique. De plus, les GST Alpha, Mu et Pi, qui dérivent de la classe Sigma, présentent des activités enzymatiques de conjugaison des oxylipines. Les prostaglandine A<sub>2</sub> et J<sub>2</sub> sont conjuguées au glutathion par l'intermédiaire des GSTA1-1, A2-2, M1-1 et P1-1 humaines (Bogaards et al., 1997). La formation de conjugués glutathionylés à partir de prostaglandines et des produits des lipoxygénases ne représente pas seulement la stabilisation chimique des eicosanoides, mais aboutit aussi à la formation de métabolites présentant de nouvelles activités biologiques et qui peuvent être transportés par les systèmes de pompes à glutathion (Murphy and Zarini, 2002).

La classe Sigma est absente chez les plantes terrestres et il est intéressant de constater que la lignée verte ne produit pas d'acide arachidonique. Les oxylipines des plantes terrestres sont formées par l'oxydation d'acides gras en C18, l'acide linoléique et l'acide linoléique (Howe and Schilmiller, 2002). Il est donc tentant de supposer que la classe Sigma a été perdue en même temps que la voie de synthèse de l'acide arachidonique. Ainsi, cette classe de GST ferait partie des voies de biosynthèse d'oxylipines à partir d'eicosanoides.

De plus, les algues rouges et les algues brunes produisent des oxylipines issues du métabolisme oxydatif d'acides gras en C20 et en C18. Il a été démontré que ces composés étaient notamment synthétisés au cours des réactions de défense et de tolérance aux stress abiotiques. Le rôle biologique des oxylipines chez les algues reste inconnu, mais ces

composés sont principalement produits en réponse au stress (Bouarab et al., 2004; Küpper et al., 2006; Ritter et al., 2008). Les voies de biosynthèse des oxylipines n'ont pas encore été élucidées chez les algues brunes et rouges, mais il est fort probable que les GST Sigma en soient des acteurs. Ainsi, à l'instar des GST Sigma animales, elles pourraient être impliquées dans la formation de composés spécifiques, et dans la dégradation des produits de peroxydation des lipides. Le nombre élevé de GST Sigma chez les algues pourrait ainsi supporter la capacité à produire un large panel d'oxylipines.

La production hétérologue de GST Sigma d'algues a permis de démontrer leurs capacités à catalyser des réactions de conjugaison de composés électrophiles et de réduction d'hydroperoxydes. Cette caractéristique est partagée avec les GST Sigma de métazoaires (Tableau 31).

LdGST3 présente notamment une activité transférase sur le 4-HNE qui est un aldéhyde généré à partir du 15-HpETE, produit de la peroxydation de l'acide arachidonique. Ce composé est produit chez *L. digitata* après un traitement par 150 µg/mL d'oligogulonates et a été détecté dans l'air 1h après incubation. Le 4-HNE aurait un rôle de répulsif contre le broutage des herbivores, mimé par l'action des oligogulonates (Goulitquer et al., 2008). Le 4-HNE joue un rôle dans la signalisation cellulaire par l'activation de kinases (Leonarduzzi et al., 2004) mais il est très réactif et réagit avec les acides nucléiques et les acides aminés, entraînant de sérieuses perturbations, conduisant notamment à la mort cellulaire lorsqu'il s'accumule (Blair, 2006). La conjugaison avec GSH par les GST permet donc de moduler les concentrations intracellulaires de 4-HNE, qui peut être transporté dans le milieu extracellulaire via les pompes à glutathion, où il est pris en charge par les GGT et éliminé sous forme d'acides mercapturiques (Blair, 2006). Les GST Sigma de *L. digitata* pourraient donc avoir un rôle dans le transport du 4-HNE dans le milieu extracellulaire participant ainsi à son processus de volatilisation. L'activité peroxydase des GST Sigma pourrait également intervenir en amont de la production d'aldéhydes en réduisant les hydroperoxydes organiques, prévenant ainsi les dommages cellulaires.

**Tableau 31: Activité des GST Sigma.**

Les tirets indiquent que les tests d'activités n'ont pas été réalisés.

Espèce	enzyme	Activité spécifique ( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ )			référence
		CDNB	4-HNE	CuOOH	
<i>Chondrus crispus</i>	CcGST2	$1,56 \pm 0,08$	$0,20 \pm 0,02$	$0,15 \pm 0,03$	déTECTÉE
<i>Laminaria digitata</i>	LdGST3	$0,98 \pm 0,10$	$0,69 \pm 0,01$	$0,12 \pm 0,01$	-
<i>Tigriopus japonicus</i>	TjGSTS	$0,30 \pm 0,01$	-	-	(Lee et al., 2007)
<i>Drosophila melanogaster</i>	DmGSTS1	0,4	$8,4 \pm 0,4$	$0,173 \pm 0,016$	(Singh et al., 2001)
<i>Xenopus laevis</i>	XIGSTS	14,7	-	0,4	(Carletti et al., 2003)
<i>Gallus gallus</i>	GgPGDS	$97 \pm 2$	$2,80 \pm 0,13$	$0,51 \pm 0,02$	déTECTÉE (Thomson et al., 1998)
<i>Rattus norvegicus</i>	RnPGDS	$9,2 \pm 0,03$	-	$0,35 \pm 0,03$	déTECTÉE (Jowsey et al., 2001)
<i>Homo sapiens</i>	HsPGDS	$5,06 \pm 0,01$	-	$0,052 \pm 0,007$	déTECTÉE (Jowsey et al., 2001)

La formation d'oxylipines à partir de la prostaglandine H<sub>2</sub> a été détectée chez CcGST2, GST Sigma de *C. crispus*. L'inhibition de CcGST2 entraînant également la diminution de la production de ces oxylipines, cela démontre le caractère enzymatique de leur formation. Cette activité n'a pas pu être mesurée sur les enzymes d'algues brunes pour des raisons techniques, dû notamment à des problèmes avec le spectromètre de masse. Il aurait pourtant été très intéressant de comparer les produits formés, dans des conditions expérimentales similaires, par LdGST3 (GST Sigma du groupe B). Les produits formés par CcGST2 sont notamment le 15-keto-PGF<sub>2</sub>α et un dérivé d'acide gras en C18. D'autres composés sont formés mais n'ont pas pu être identifiés. Chez les mammifères, les prostaglandines ont des fonctions très spécialisées, maturation des ovocytes, fièvre, agrégation des plaquettes, vasodilatation, qui dépendent généralement des types de cellules, de tissus et d'organes (Funk, 2001). L'organisation du thalle des algues est relativement simple. La présence des prostaglandines chez les algues pose donc un certain nombre d'interrogations sur leur rôle physiologique. Chez les végétaux, les jasmonates sont des analogues structuraux des prostaglandines et sont également impliqués dans les processus de défense et de reproduction (Lee et al., 2008a).

Chez les algues, comme chez certains invertébrés, des oxylipines halogénées ont été identifiées (Rowley et al., 2005; Guschina and Harwood, 2006). La fonction de ces composés est inconnue mais les fortes teneurs en iode chez *L. digitata* laissent supposer la présence de iodovulones (cyclopentenone iodé). Ce genre de métabolite pourrait représenter une forme de complexation de l'iode mais également avoir des propriétés biologiques. De manière purement hypothétique, les GST Sigma pourraient catalyser une attaque nucléophile sur les iodovulones, d'une façon similaire à celle effectuée sur le CDNB, conjuguant ainsi l'eicosanoïde et le glutathion et libérant un atome d'iode. Les oxylipines glutathionylés peuvent avoir un rôle biologique, dans la transduction du signal notamment, et l'iode peut participer aux réactions de défense.

L'analyse des profils d'expression des gènes de GST confirme que les conditions qui entraînent la production d'oxylipines, favorisent également l'accumulation des transcrits des gènes de GST Sigma.

### 3.3 Effets des traitements exogènes

#### 3.3.1 L'accumulation de transcrits

Le recyclage des ARN messagers joue un rôle central dans le contrôle de l'expression des gènes, en modulant les quantités de transcrits disponibles pour la traduction. Ce recyclage est un système très complexe et qui est extrêmement régulé (Parker and Song, 2004).

Il est important de prendre en considération ce phénomène de recyclage lorsque l'on analyse les résultats obtenus par PCR quantitative. En effet, cette méthode détermine le niveau d'accumulation d'un transcrit à un temps  $t$ . Ce niveau résulte de l'opposition de deux facteurs: la transcription et la dégradation, et les deux sont importants pour la régulation de l'expression d'un gène. La transcription à proprement parlée, peut être évaluée par la méthode du Run-On (Hirayoshi and Lis, 1999).

Si l'on observe une augmentation de la quantité de transcrits accumulés en réponse au traitement, soit la transcription est augmentée, soit la dégradation est diminuée, soit les deux phénomènes sont simultanés. De même, si l'on observe une diminution du taux de transcrits accumulés, soit la transcription est diminuée, soit la dégradation est augmentée, soit les deux.

#### 3.3.2 Conditions de traitement

Afin de visualiser des réponses précoces, la durée des traitements choisis est courtes, 3h et 6h pour *E. siliculosus* et seulement 6h pour *L. digitata* en raison des faibles quantités de matériel biologique disponibles.

De plus, les produits chimiques ont été appliqués à des concentrations élevées pour permettre de visualiser une réponse. Ces stress aigus vont stimuler fortement et rapidement un grand nombre de réactions permettant le maintien de l'intégrité cellulaire. Cette stratégie peut être rapprochée de celle basée sur l'utilisation de protoplastes pour identifier des gènes de stress et de défense. Cela constitue une première étape de l'analyse d'un stress et il convient ensuite de réaliser des stress chroniques.

L'intérêt de cette expérience est de déterminer quelles sont les molécules qui modifient l'expression des gènes de GST. Plusieurs types de molécules ont été utilisés pour générer différents types de stress. Ces molécules peuvent perturber l'intégrité de la paroi et générer des cascades de signalisation, dont la finalité est la mise en place de systèmes de protection cellulaire.

### **3.3.3 Les traitements exogènes modifient l'accumulation des transcrits.**

Tous les gènes analysés sont transcrits dans les conditions normales de vie de l'algue. Il existe donc un niveau basal de transcription. L'accumulation des transcrits des différents gènes de GST (cytosolique, microsomale, kappa et putative) est variable en fonction des traitements et des gènes. Ceci est compatible avec la diversification fonctionnelle des GST d'algues. Ainsi, la séquence primaire des paralogues, apparus par duplication, est lentement altérée pour acquérir de nouvelles fonctions, et leur expression est également modifiée pour répondre à des situations spécifiques.

#### **3.3.3.1 Stress oxydant**

Chez *Ectocarpus*, le peroxyde d'hydrogène ne modifie pas la quantité de glutathion, mais divise par 2 l'activité GST totale après 3h et 6h de traitements. Cette molécule réprime globalement les gènes d'EsGST pendant les trois premières heures du traitement, puis une induction est mesurée au bout de 6h. Ce phénomène a été également observé pour l'expression de gènes de GST chez le copépode (Lee et al., 2007). Deux hypothèses peuvent expliquer ce constat. Soit le peroxyde d'hydrogène réprime la transcription des GST pendant les premières heures du traitement, puis la régulation s'inverse et la transcription est activée après 3h. Soit les transcrits sont dégradés par le peroxyde d'hydrogène ou des dérivés au cours du traitement, sans changement de la transcription (régulation post-transcriptionnelle); cette dégradation s'arrête après 3h, et on observe alors à nouveau un niveau élevé de transcrit. Comparé à l'activité enzymatique qui reste faible après 6h, cela suggère qu'il existe un décalage entre l'accumulation de transcrits et la synthèse de protéines.

Chez *L. digitata*, le traitement du thalle par des oligogulonates entraîne un burst oxydant dans les premières minutes de l'incubation. La quantité de peroxyde d'hydrogène présent dans le milieu diminue rapidement. Ce traitement induit l'accumulation des transcrits de *LdGST[1,2,4]*. Il aurait été intéressant de comparer l'expression des GST lors d'une incubation en présence de peroxyde d'hydrogène. Il est en effet probable que la production endogène d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et le traitement exogène n'aient pas le même effet sur l'intégrité cellulaire. Les oligogulonates n'induisent pas la production d'oxylipines chez *L. digitata* (Cosse et al., 2007), mais induisent la production d'aldéhydes (Goulitquer et al., 2008).

L'azide de sodium est un inhibiteur de cytochrome oxydase c, enzyme impliquée dans la chaîne de transport d'électron mitochondriale. L'incubation en présence de ce composé entraîne donc un arrêt de la respiration dans les mitochondries et génère un stress oxydant.

A la concentration utilisée, son effet n'est visible qu'après 6h et induit l'accumulation d'*EsGST12*, des GST microsomales et d'*Esi0047\_0117*. Les protéines codées par ces gènes pourraient donc être impliquées dans la détoxification de composés cytotoxiques générés par le stress oxydant.

### 3.3.3.2 Métaux lourds

Parmi les traitements avec des métaux lourds, le cuivre induit les variations les plus significatives. L'incubation avec du cuivre entraîne chez *E. siliculosus*, la synthèse de glutathion, l'activité des GST et l'accumulation de certains transcrits.

Le cuivre entraîne généralement un stress oxydant qui se traduit notamment par la production d'espèces actives de l'oxygène (Maksymiec, 1997; Ritter et al., 2008). Le cuivre bloque la chaîne de transport d'électrons de la photosynthèse au niveau des photosystèmes II et I. Ceci induit la production d'oxygène singulet ( $^1O_2$ ), précurseurs des radicaux hydroxyles ( $HO^\cdot$ ). Ces radicaux sont responsables de réactions de peroxydation en chaîne, impliquant les lipides membranaires (Fernandes and Henriques, 1991). Le glutathion est donc néo-synthétisé pour agir directement comme antioxydant, mais aussi pour servir de co-substrats aux enzymes de détoxification (GPx, GST, DHAR), et permettre la synthèse de phytochélatines.

Chez *Ectocarpus*, la synthèse du GSH en réponse au cuivre n'est pas immédiate, car il y a un temps de latence d'au moins 3h qui peut être dû au temps nécessaire entre la perception du stress engendré par le cuivre et l'induction des activités enzymatiques de synthèse du GSH. Le sulfate de cuivre, après 6h, entraîne à la fois une augmentation de l'activité GST totale et une induction de l'expression de certains gènes de GST. Ainsi, *EsGST3*, *EsGST1*, et *EsGST12* sont fortement induits après 6h de traitement. Il semble donc que l'accumulation des transcrits entraîne une augmentation de la synthèse protéique et donc une augmentation de l'activité enzymatique. Les traitements aigus par le cuivre induisent également l'accumulation des transcrits d'un gène de phytochélatine synthase au bout de 4h (Ritter, 2009). L'augmentation de la concentration intracellulaire en glutathion est donc corrélée avec la transcription de gènes codant pour des protéines dont il est le substrat.

Chez *L. digitata*, le cuivre induit l'accumulation des transcrits des gènes *LdGST[1,2,4]*. Chez cette algue, un stress chronique par le cuivre engendre la production d'oxylipines telles que les prostaglandines et le 12-oxo-PDA (Ritter et al., 2008). Ces GST Sigma pourraient être à l'origine de la synthèse d'oxylipines ou contrôler leur utilisation et leur dégradation par la conjugaison avec le glutathion.

Chez l'algue rouge *C. crispus*, 3h d'incubation avec des métaux lourds ne modifient pas l'accumulation de transcrits de GST. Cependant, chez *Ectocarpus*, l'effet de ces métaux est principalement visible après 6h. On ne peut donc pas exclure que les GST d'algues rouges interviennent aussi dans la réponse aux métaux lourds.

### 3.3.3.3 Herbicides

Parmi les herbicides utilisés, le Round Up® est le produit qui a le plus d'effet.

Après 6h de traitement, la quantité de transcrits des gènes *EsGST[1,12,3]*, *EsGST13*, *mEsGST1* et *Esi0047\_0117* est fortement augmentée. Dans ce même laps de temps, le pool de glutathion cellulaire n'est pas modifié, mais on observe une augmentation de l'activité GST. Celle-ci est multipliée par 3,5. Il semble donc que la transcription des gènes soit suivie d'une synthèse protéique.

Le Round Up® est la formule commerciale du glyphosate. Ce dernier est un herbicide qui inhibe l'énolpyruvyl shikimate phosphate synthase, enzyme impliquée dans la synthèse des acides aminés aromatiques (Marques et al., 2007). Le Round Up® contient des adjuvants qui permettent d'augmenter la pénétration du glyphosate dans les cellules. Les effets du glyphosate sur l'accumulation des transcrits de GST sont beaucoup moins importants, suggérant le rôle important de la formulation chimique sur l'action du principe actif. Les adjuvants, notamment le polyoxyéthylène amine, sont toxiques et engendrent une perturbation cellulaire qui a pour effet d'augmenter la peroxydation des lipides (Pieniasek et al., 2004).

Les GST, dont la synthèse est augmentée en réponse à l'herbicide formulé, pourraient donc être impliquées dans la détoxification des composés toxiques exogènes, comme les adjuvants et des composés endogènes, notamment des dérivés d'acides gras oxydés, formés par la perturbation des membranes.

Le Round Up® et le cuivre activent la transcription des mêmes gènes d'EsGST, *EsGST[1, 3, 12]*. Il est donc probable que ces deux composés entraînent des réactions dans lesquelles le rôle des GST est similaire. La synthèse d'oxylipines en réponse au Round Up® serait donc intéressante à observer pour permettre de comparer les traitements, leurs effets cellulaires et les gènes activés.

Aux concentrations utilisées, le diuron et l'atrazine ont peu d'influence sur l'accumulation des transcrits de GST d'*Ectocarpus*.

#### 3.3.3.4 Hydrocarbures

Dans les conditions expérimentales, l'incubation en présence d'essence sans plomb a très peu d'effet sur l'accumulation des transcrits de GST. Le fioul lourd entraîne après 3h une diminution de la quantité de transcrits des gènes *EsGST[2,13]* et *Esi0047\_0117*.

Chez l'huître *Crassostrea gigas*, l'expression des GST Sigma ne varie pas en réponse à un traitement par des hydrocarbures, et seule la classe Omega semble sensible à ces composés (Boutet et al., 2004). Les hydrocarbures ont certainement un effet sur les algues brunes, mais la réponse cellulaire n'implique pas l'activité des GST testées.

#### 3.3.3.5 Oxylipines

Que ce soit chez *Ectocarpus* ou *Laminaria*, les oxylipines ont très peu d'effet sur l'accumulation des transcrits des gènes de GST, à l'exception du 15-HETE. Ce dernier augmente la quantité de transcrits des gènes *LdGST3*, *EsGST2* et *EsGST13*. Les gènes *EsGST2* et *LdGST3* ont d'ailleurs des profils d'expression semblables et sont différents des autres GST Sigma. Leurs profils d'expression ne sont influencés ni par les traitements au cuivre, ni par le Round Up®. Ces deux gènes appartiennent au groupe B des GST Sigma d'algues brunes. Ceci est une indication de la néo-fonctionnalisation potentielle des gènes du groupe B par rapport aux gènes du groupe A.

A l'inverse des algues brunes, les oxylipines induisent une accumulation très forte des GST Sigma dans l'algue rouge *C. crispus*. Les oxylipines n'ont donc pas les mêmes effets sur ces espèces. Ceci suggère que les oxylipines sont plus facilement ou plus rapidement reconnues chez *C. crispus*. De plus, il a été montré que le traitement de *C. crispus* avec le MeJA induit la synthèse d'oxylipines telles que des hydroperoxydes organiques et des prostaglandines (Bouarab et al., 2004; Gaquerel et al., 2007). Les GST Sigma de *C. crispus* pourraient donc être à l'origine de la synthèse de ces oxylipines et/ou contrôler leur utilisation et leur dégradation par conjugaison avec le glutathion.

#### 3.3.3.6 Stress osmotique

L'incubation d'*Ectocarpus* dans des milieux de cultures dont la salinité est variable a très peu d'effet sur l'accumulation des transcrits de GST. Il est probable que l'algue soit relativement tolérante aux variations de salinités. Ce traitement n'entraîne donc pas une perturbation cellulaire nécessitant l'activité des GST.

### 3.3.4 Variations d'expression génique entre paralogues

Chez *Ectocarpus* et *Laminaria*, les paralogues d'un même groupe n'ont pas tous les mêmes profils d'expression. Ceci est cohérent avec l'évolution des gènes dupliqués. En effet, après la duplication, il est admis que l'une des copies conserve la fonction ancestrale tandis que l'autre copie diverge. Les modifications de la fonction d'un gène peuvent avoir lieu dans la séquence codante, entraînant ainsi des modifications de l'activité catalytique des protéines. Mais ces modifications peuvent également avoir lieu plus rapidement au niveau d'éléments de régulation du gène, entraînant ainsi des variations spatiales et temporelles de l'expression des paralogues (Gu et al., 2002).

Ainsi, les deux gènes de GST microsomaux ont des profils différents. La quantité de transcrits pour *mEsGST1* est globalement plus variable que pour *mEsGST2*. Le niveau de transcrits du gène codant pour *mEsGST1* est augmenté en présence de Round Up® et fortement diminué après 3h de traitement au cuivre et au 13-HpOTrE. Le gène *mEsGST2* est lui plus sensible à un traitement hyposalin.

Les gènes du groupe A, *EsGST3* et *EsGST9*, présentent aussi des profils d'expression différents, et l'accumulation d'*EsGST9* est beaucoup moins altérée en fonction des traitements. De même, dans le groupe B, *EsGST1* et *EsGST12*, ont des profils similaires, et *EsGST2* est beaucoup moins sensible aux variations engendrées par les traitements.

Les gènes *EsGST[1,3,12]* appartiennent à des groupes différents, mais présentent des similitudes dans leurs profils. Le cuivre et le Round Up® activent fortement leur expression après 6h.

### 3.4 Partenaires protéiques

Dans la cellule, les protéines peuvent former un grand nombre d'interactions avec plusieurs types de molécules, dont d'autres protéines. Ceci est notamment le cas pour certaines réactions enzymatiques, où des protéines sont proches des enzymes qui produisent leurs substrats et/ou proches de celles dont elles produisent le substrat. De plus, de nombreuses protéines régulent la fonction d'enzymes ou d'autres protéines en s'y attachant. Les protéines peuvent alors inhiber ou activer la fonction, ou stabiliser la structure d'un complexe macromoléculaire. Les GST des classes Mu et Pi sont capables de se fixer sur des kinases, inhibant ainsi leur activité de phosphorylation. De même, une étude a montré que chez le nématode *C. elegans*, une GST de la classe Nu interagit avec un complexe composé de kinases, de phosphatases, de protéines G et de protéines impliquées dans l'ubiquitination (Greetham et al., 2004). De plus, en condition de stress oxydant, la composition du complexe est modifiée.

La recherche de partenaires protéiques des GST de *L. digitata* a été effectuée en réalisant une approche de pull-down. Cependant, aucun partenaire n'a pu être identifié. Le problème n'est peut-être pas tant l'absence de partenaire pour ces GST que l'impossibilité d'obtenir un extrait protéique total de *L. digitata*, suffisamment concentré pour visualiser une interaction. En effet, cette technique nécessite une grande quantité d'appât (protéine surexprimée), mais surtout un extrait très concentré pour entraîner la formation d'un grand nombre de complexes afin que la protéine proie puisse être détectée sur gel. On considère qu'il faut entre 500 et 1000 fois plus d'extrait que d'appât (Mesiet-Cladiere et al., 2007). Or les meilleurs rapports entre appât et extrait protéique utilisés au cours de cette étude étaient de 1 pour 20. L'extraction de protéine est délicate chez *L. digitata* et les rendements sont généralement de 1mg de protéines totales pour 10g de thalle, ce qui ne permet pas d'obtenir suffisamment de protéines concentrées. Cependant, l'extraction de protéines chez *Ectocarpus* est plus aisée car il y a beaucoup moins de polysaccharides et les rendements sont de 1mg de protéines pour 1g de masse fraîche. Malheureusement, n'ayant pas obtenu de GST d'*Ectocarpus* soluble et active, je n'ai pas pu réaliser des analyses de pull-down chez cette espèce. Les perspectives sont quand même intéressantes avec cette technique, car l'identification des partenaires protéiques est un bon indicateur des voies métaboliques dans lesquelles une protéine peut-être impliquée.



**CONCLUSIONS  
ET  
PERSPECTIVES**

L'intégration des résultats d'approches bioinformatiques, moléculaires et biochimiques est la composante essentielle de l'étude d'une famille multigénique. Ainsi, la caractérisation d'un locus génomique, l'étude de sa transcription, l'analyse des activités enzymatiques et l'identification de partenaires protéiques constituent les piliers de la stratégie "du gène à la fonction". Le but ultime est de dépasser le niveau des gènes et des protéines, et d'intégrer les données des autres acteurs cellulaires, de les combiner à des approches de physiologie et d'écologie pour aboutir à la compréhension plus globale d'un système biologique dans son environnement. Cette étude sur la famille des GST, notamment chez *Ectocarpus*, est donc la première pierre d'un édifice en cours de réalisation.

Combinée aux observations réalisées au cours de l'étude des familles de GST chez les algues rouges, les résultats obtenus au cours de cette thèse éclairent notre vision de l'évolution des GST. Ainsi, la lignée du protiste à l'origine de la diversification des eucaryotes possédait probablement dans son génome les GST cytosoliques des classes Theta, Zeta et Sigma, au moins une GST microsomale MGST3 et une GST de type Kappa. L'ancestralité de la classe Sigma est confirmée par la conservation de la structure des gènes dans trois lignées indépendantes. L'évolution des lignées aurait ensuite favorisé l'apparition de nouvelles classes de GST, la perte de certaines et la diversification des classes existantes. Cette hypothèse explique notamment pourquoi certaines classes de GST ont des fonctions chevauchantes.

Les GST Sigma sont des acteurs de la voie de biosynthèse des oxylipines chez les mammifères. Chez les algues brunes et rouges, les gènes correspondant à ces enzymes sont fortement exprimés dans des conditions de traitements qui induisent l'accumulation d'oxylipines. De plus, l'activité enzymatique de CcGST2 sur la prostaglandine H<sub>2</sub> suggère très fortement que les GST Sigma d'algues, au moins chez les algues rouges, sont impliquées dans le métabolisme des oxylipines. Le rôle des oxylipines n'est pas bien compris chez les algues, mais l'analyse des GST Sigma et microsomales apporte une dimension évolutive et ancestrale à ces composés. Les GST apportent donc une base sur laquelle les recherches sur les oxylipines peuvent s'appuyer (Figure 104).

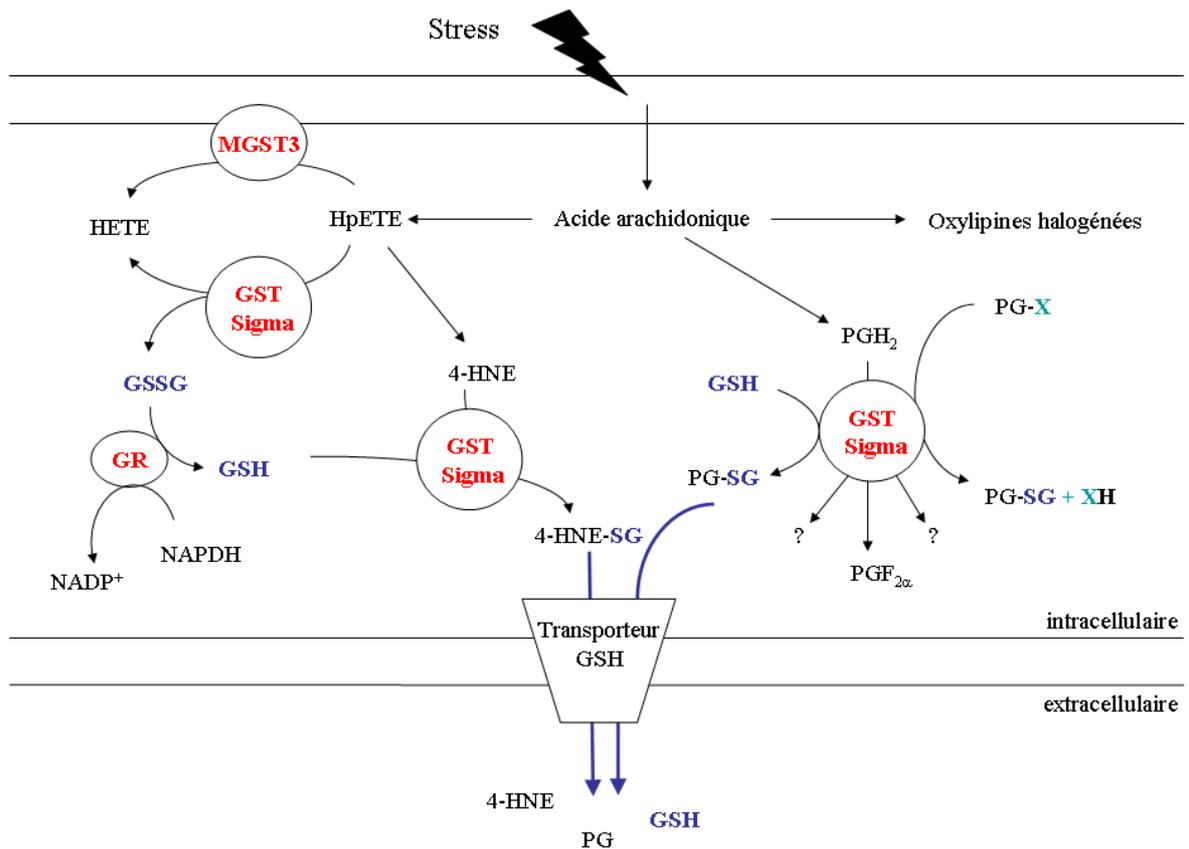


Figure 104: Schéma spéculatif des fonctions présumées des GST d'algues.

Les GST cytosoliques des algues brunes appartiennent toutes à la classe Sigma et les classes Theta et Zeta ont été perdues. Les GST Sigma forment une famille multigénique ayant évolué par des événements de duplication. Comparé aux autres organismes, les GST Sigma d'algues brunes (et d'oomycètes) sont très nombreuses, suggérant des fonctions diverses et un rôle essentiel pour ces organismes.

Pour compléter cette étude, il serait intéressant de comparer les profils de produits formés au cours de la réaction enzymatique de différentes GST Sigma d'algues (CcGST2, LdGST3, EsGST) en présence de prostaglandine H<sub>2</sub>. Cela permettrait certainement de voir apparaître des spécificités pour chacune des enzymes, que l'on pourrait alors relier aux divergences entre les séquences protéiques. La recherche d'oxylipines conjuguées au glutathion est également une piste à suivre pour identifier les substrats et décrypter l'activité des GST Sigma et microsomales.

Acteurs d'une voie de biosynthèse des oxylipines, les GST Sigma d'algues agissent certainement en synergie avec d'autres enzymes. Leur identification par des approches de pull-down est un moyen d'élucider les mécanismes de régulation de la synthèse des dérivés d'acides gras. De même, il serait intéressant de localiser les gènes de GST sur les chromosomes d'*Ectocarpus*, afin d'identifier des gènes proches pouvant potentiellement être impliqués dans des voies métaboliques communes. L'analyse à long terme devrait révéler la présence d'éléments de régulation dans les régions promotrices des différents gènes. Ceux-ci pourraient alors être comparés aux profils d'expression de gènes obtenus en réponse aux traitements exogènes.

Il serait également intéressant de comprendre la perte des GST Zeta et d'identifier s'il existe un acteur moléculaire remplaçant cette enzyme dans la lignée des algues brunes. De même, les GST Kappa sont absentes de la plupart des organismes et leur rôle biologique reste incertain. L'analyse approfondie du gène EsGST13 et de sa protéine devrait donc fournir des informations précieuses quant au rôle biologique de cette protéine chez les algues brunes mais aussi chez les plantes et les mammifères.



# **BIBLIOGRAPHIE**

- Agianian B, Tucker PA, Schouten A, Leonard K, Bullard B, Gros P** (2003) Structure of a *Drosophila* Sigma class glutathione S-transferase reveals a novel active site topography suited for lipid peroxidation products. *Journal of Molecular Biology* **326**: 151-165
- Allocati N, Casalone E, Masulli M, Ceccarelli I, Carletti E, Parker MW, Di Ilio C** (1999) Functional analysis of the evolutionarily conserved proline 53 residue in *Proteus mirabilis* glutathione transferase B1-1. *FEBS Letters* **445**: 347-350
- Alscher RG, Erturk N, Heath LS** (2002) Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *Journal of Experimental Botany* **53**: 1331-1341
- Amsler CD** (2008) Algal chemical ecology,
- Andersson C, Mosialou E, Weinander R, Morgenstern R** (1994) Enzymology of microsomal glutathione S-transferase. *Advances in Pharmacology; Conjugation-dependent carcinogenicity and toxicity of foreign compounds*: 19-35
- Arca P, Rico M, Brana AF, Villar CJ, Hardisson C, Suarez JE** (1988) Formation of an Adduct between Fosfomycin and Glutathione - a New Mechanism of Antibiotic-Resistance in Bacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **32**: 1552-1556
- Armstrong RN** (1997) Structure, catalytic mechanism, and evolution of the glutathione transferases. *Chem. Res. Toxicol.* **10**
- Arnold K, Bordoli L, Kopp J, Schwede T** (2006) The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics* **22**: 195-201
- Arnold TM, Targett NM, Tanner CE, Hatch WI, Ferrari KE** (2001) Evidence for methyl jasmonate-induced phlorotannin production in *Fucus vesiculosus* (Phaeophyceae). *Journal of Phycology* **37**: 1026-1029
- Baldauf S** (2003) The deep roots of eukaryotes. *Science* **300**: 1703 - 1706
- Bartling D, Radzio R, Steiner U, Weiler EW** (1993) A glutathione-S-transferase with glutathione-peroxidase activity from *Arabidopsis thaliana* - molecular-cloning and functional-characterization. *European Journal of Biochemistry* **216**: 579-586
- Beck A, Lenzian K, Oven M, Christmann A, Grill E** (2003) Phytochelatin synthase catalyzes key step in turnover of glutathione conjugates. *Phytochemistry* **62**: 423-431
- Benet H, Gall EA, Asensi A, Kloareg B** (1997) Protoplast regeneration from gametophytes and sporophytes of some species in the order Laminariales (Phaeophyceae). *Protoplasma* **199**: 39-48

- Berhane K, Widersten M, Engstrom A, Kozarich JW, Mannervik B** (1994) Detoxication of Base Propenals and Other Alpha,Beta-Unsaturated Aldehyde Products of Radical Reactions and Lipid-Peroxidation by Human Glutathione Transferases. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **91**: 1480-1484
- Blair IA** (2006) Endogenous glutathione adducts. Current Drug Metabolism **7**: 853-872
- Blée E** (2002) Impact of phyto-oxylipins in plant defense. Trends Plant Sci **7**: 315 - 321
- Board PG, Baker RT, Chelvanayagam G, Jermiin LS** (1997) Zeta, a novel class of glutathione transferases in a range of species from plants to humans. Biochemical Journal **328**: 929-935
- Board PG, Coggan M, Chelvanayagam G, Easteal S, Jermiin LS, Schulte GK, Danley DE, Hoth LR, Griffor MC, Kamath AV, Rosner MH, Chrnyk BA, Perregaux DE, Gabel CA, Geoghegan KF, Pandit J** (2000) Identification, characterization, and crystal structure of the omega class glutathione transferases. Journal of Biological Chemistry **275**: 24798-24806
- Bogaards JJP, Venekamp JC, vanBladeren PJ** (1997) Stereoselective conjugation of prostaglandin A(2) and prostaglandin J(2) with glutathione, catalyzed by the human glutathione S-transferases A1-1, A2-2, M1a-1a, and P1-1. Chemical Research in Toxicology **10**: 310-317
- Bolton JJ, Luning K** (1982) Optimal-Growth and Maximal Survival Temperatures of Atlantic *Laminaria* Species (Phaeophyta) in Culture. Marine Biology **66**: 89-94
- Boonprab K, Matsui K, Akakabe Y, Yotsukura N, Kajiwara T** (2003) Hydroperoxy-arachidonic acid mediated n-hexanal and (Z)-3- and (E)-2-nonenal formation in *Laminaria angustata*. Phytochemistry **63**: 669-678
- Booth J, Boyland E, Sims P** (1961) An enzyme from rat liver catalysing conjugations with glutathione. Biochemical Journal **79**: 516-&
- Borchardt SA, Allain EJ, Michels JJ, Stearns GW, Kelly RF, McCoy WF** (2001) Reaction of acylated homoserine lactone bacterial signaling molecules with oxidized halogen antimicrobials. Applied and Environmental Microbiology **67**: 3174-3179
- Bouarab K, Adas F, Gaquerel E, Kloareg B, Salaun J, Potin P** (2004) The innate immunity of a marine red alga involves oxylipins from both the eicosanoid and octadecanoid pathways. Plant Physiol. **135**: 1838-1848
- Bouarab K, Potin P, Correa J, Kloareg B** (1999) Sulfated oligosaccharides mediate the interaction between a marine red alga and its green algal pathogenic endophyte. Plant Cell **11**: 1635-1650

- Boutet I, Tanguy A, Moraga D** (2004) Characterisation and expression of four mRNA sequences encoding glutathione S-transferases pi, mu, omega and sigma classes in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* exposed to hydrocarbons and pesticides. *Marine Biology* **146**: 53-64
- Boyen C, Oudot MP, Loiseaux-De Goer S** (2001) Origin and evolution of plastids and mitochondria: the phylogenetic diversity of algae. *Cahiers De Biologie Marine* **42**: 11-24
- Bradford MM** (1976) Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**: 248-254
- Bresell A, Weinander R, Lundqvist G, Raza H, Shimoji M, Sun T-H, Balk L, Wiklund R, Eriksson J, Jansson C, Persson B, Jakobsson P-J, Morgenstern R** (2005) Bioinformatic and enzymatic characterization of the MAPEG superfamily. *FEBS Journal* **272**: 1688-1703
- Brigelius-Flohe R** (1999) Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. *Free Radical Biology and Medicine* **27**: 951-965
- Brown KM, Pickard K, Nicol F, Beckett GJ, Duthie GG, Arthur JR** (2000) Effects of organic and inorganic selenium supplementation on selenoenzyme activity in blood lymphocytes, granulocytes, platelets and erythrocytes. *Clinical Science* **98**: 593-599
- Bruns CM, Hubatsch I, Ridderstrom M, Mannervik B, Tainer JA** (1999) Human glutathione transferase A4-4 crystal structures and mutagenesis reveal the basis of high catalytic efficiency with toxic lipid peroxidation products. *Journal of Molecular Biology* **288**: 427-439
- Buetler TM, Eaton DL** (1992) Glutathione S-Transferases - Amino-Acid-Sequence Comparison, Classification and Phylogenetic Relationship. *Environmental Carcinogenesis & Ecotoxicology Reviews-Part C of Journal of Environmental Science and Health* **10**: 181-203
- Busenlehner LS, Codreanu SG, Holm PJ, Bhakat P, Hebert H, Morgenstern R, Armstrong RN** (2004) Stress sensor triggers conformational response of the integral membrane protein microsomal glutathione transferase 1. *Biochemistry* **43**: 11145-11152
- Caccuri AM, Antonini G, Nicotra M, Battistoni A, LoBello M, Board PG, Parker MW, Ricci G** (1997) Catalytic mechanism and role of hydroxyl residues in the active site of theta class glutathione S-transferases - Investigation of Ser-9 and Tyr-113 in a

- glutathione S-transferase from the Australian sheep blowfly, *Lucilia cuprina*. *Journal of Biological Chemistry* **272**: 29681-29686
- Cairrao E, Couderchet M, Soares AMVM, Guilhermino L** (2004) Glutathione-S-transferase activity of *Fucus spp.* as a biomarker of environmental contamination. *Aquatic Toxicology* **70**: 277-286
- Campbell AM, Teesdale-Spittle PH, Barrett J, Liebau E, Jefferies JR, Brophy PM** (2001) A common class of nematode glutathione S-transferase (GST) revealed by the theoretical proteome of the model organism *Caenorhabditis elegans*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* **128**: 701-708
- Cardozo KHM, Guaratini T, Barros MP, Falcão VR, Tonon AP, Lopes NP, Campos S, Torres MA, Souza AO, Colepicolo P, Pinto E** (2007) Metabolites from algae with economical impact. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* **146**: 60-78
- Carletti E, Luca AD, Urbani A, Sacchetta P, Ilio CD** (2003) Sigma-class glutathione transferase from *Xenopus laevis*: molecular cloning, expression, and site-directed mutagenesis. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **419**: 214-221
- Cavalier-Smith T** (2002) Chloroplast evolution: Secondary symbiogenesis and multiple losses. *Current Biology* **12**: R62-R64
- Cha CJ, Kim SJ, Kim YH, Stingley R, Cerniglia CE** (2002) Molecular cloning, expression and characterization of a novel class glutathione S-transferase from the fungus *Cunninghamella elegans*. *Biochemical Journal* **368**: 589-595
- Charrier B, Coelho SM, Le Bail A, Tonon T, Michel G, Potin P, Kloareg B, Boyen C, Peters AF, Cock JM** (2008) Development and physiology of the brown alga *Ectocarpus siliculosus*: two centuries of research. *New Phytologist* **177**: 319-332
- Chen JJ, Goldsbrough PB** (1994) Increased Activity of Gamma-Glutamylcysteine Synthetase in Tomato Cells Selected for Cadmium Tolerance. *Plant Physiology* **106**: 233-239
- Cho S-G, Lee YH, Park H-S, Ryoo K, Kang KW, Park J, Eom S-J, Kim MJ, Chang T-S, Choi S-Y, Shim J, Kim Y, Dong M-S, Lee M-J, Kim SG, Ichijo H, Choi E-J** (2001) Glutathione S-transferase mu modulates the stress-activated signals by suppressing apoptosis signal-regulating kinase 1. *J. Biol. Chem.* **276**: 12749-12755

- Choi J, Liu RM, Kundu RK, Sangiorgi F, Wu WC, Maxson R, Forman HJ** (2000) Molecular mechanism of decreased glutathione content in human immunodeficiency virus type 1 Tat-transgenic mice. *Journal of Biological Chemistry* **275**: 3693-3698
- Coelho S, Rijstenbil JW, Sousa-Pinto I, Brown MT** (2001) Cellular responses to elevated light levels in *Fucus spiralis* embryos during the first days after fertilization. *Plant Cell and Environment* **24**: 801-810
- Colin C, Leblanc C, Michel G, Wagner E, Leize-Wagner E, Van Dorsselaer A, Potin P** (2005) Vanadium-dependent iodoperoxidases in *Laminaria digitata*, a novel biochemical function diverging from brown algal bromoperoxidases. *Journal of Biological Inorganic Chemistry* **10**: 156-166
- Collén J, Davison IR** (1999a) Reactive oxygen metabolism in intertidal *Fucus spp.* (Phaeophyceae). *Journal of Phycology* **35**: 62-69
- Collén J, Davison IR** (1999b) Reactive oxygen production and damage in intertidal *Fucus spp.* (Phaeophyceae). *Journal of Phycology* **35**: 54-61
- Collén J, Davison IR** (1999c) Stress tolerance and reactive oxygen metabolism in the intertidal red seaweeds *Mastocarpus stellatus* and *Chondrus crispus*. *Plant Cell and Environment* **22**: 1143-1151
- Collén J, Hervé C, Guisle-Marsollier I, Leger JJ, Boyen C** (2006) Expression profiling of *Chondrus crispus* (Rhodophyta) after exposure to methyl jasmonate. *Journal of Experimental Botany* **57**: 3869-3881
- Collen J, Pedersen M** (1996) Production, scavenging and toxicity of hydrogen peroxide in the green seaweed *Ulva rigida*. *European Journal of Phycology* **31**: 265-271
- Collinson EJ, Grant CM** (2003) Role of yeast glutaredoxins as glutathione S-transferases. *Journal of Biological Chemistry* **278**: 22492-22497
- Copley SD, Novak WRP, Babbitt PC** (2004) Divergence of function in the thioredoxin fold suprafamily: Evidence for evolution of peroxiredoxins from a thioredoxin-like ancestor. *Biochemistry* **43**: 13981-13995
- Cosse A, Leblanc C, Potin P** (2007) Dynamic defense of marine macroalgae against pathogens: from early activated to gene regulated responses. *Adv Bot Res* **46**: 222 - 266
- Crépineau F, Roscoe, T., Kaas, R., Kloareg, B. and Boyen, C. ]** (2000) Characterisation of complementary DNAs from the expressed sequence tag analysis of life cycle stages of *Laminaria digitata* (Phaeophyceae). *Plant Molecular Biology* **43**: 503-513

- Cromer BA, Morton CJ, Board PG, Parker MW** (2002) From glutathione transferase to pore in a CLIC. *European Biophysics Journal with Biophysics Letters* **31**: 356-364
- Dalle-Donne I, Rossi R, Giustarini D, Colombo R, Milzani A** (2007) S-glutathionylation in protein redox regulation. *Free Radical Biology and Medicine* **43**: 883-898
- Davis TA, Volesky B, Mucci A** (2003) A review of the biochemistry of heavy metal biosorption by brown algae. *Water Research* **37**: 4311-4330
- Davison IR, Pearson GA** (1996) Stress tolerance in intertidal seaweeds. *Journal of Phycology* **32**: 197-211
- de Andrade LR, Farina M, Amado GM** (2002) Role of *Padina gymnospora* (Dictyotales, Phaeophyceae) cell walls in cadmium accumulation. *Phycologia* **41**: 39-48
- Dereeper A, Guignon V, Blanc G, Audic S, Buffet S, Chevenet F, Dufayard JF, Guindon S, Lefort V, Lescot M, Claverie JM, Gascuel O** (2008) Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist. *Nucleic Acids Research* **36**: W465-W469
- Dickinson DA, Forman HJ** (2002) Cellular glutathione and thiols metabolism. *Biochemical Pharmacology* **64**: 1019-1026
- Diesperger H, Sandermann H** (1979) Soluble and Microsomal Glutathione S-Transferase Activities in Pea-Seedlings (*Pisum sativum*). *Planta* **146**: 643-648
- Ding YC, Ortelli F, Rossiter LC, Hemingway J, Ranson H** (2003) The *Anopheles gambiae* glutathione transferase supergene family: annotation, phylogeny and expression profiles. *Bmc Genomics* **4**
- Dirr H, Reinemer P, Huber R** (1994) X-ray crystal-structures of cytosolic glutathione S-transferases - implications for protein architecture, substrate recognition and catalytic function. *European Journal of Biochemistry* **220**: 645-661
- Dirr HW, Reinemer P** (1991) Equilibrium unfolding of class-Pi glutathione-S-transferase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **180**: 294-300
- Dixon DP, Cummins I, Cole DJ, Edwards R** (1998) Glutathione-mediated detoxification systems in plants. *Current Opinion in Plant Biology* **1**: 258-266
- Dixon DP, Davis BG, Edwards R** (2002a) Functional divergence in the glutathione transferase superfamily in plants - Identification of two classes with putative functions in redox homeostasis in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry* **277**: 30859-30869
- Dixon DP, Laphorn A, Edwards R** (2002b) Plant glutathione transferases. *Genome Biology* **3**: reviews3004.3001 - reviews3004.3010

- Doi AM, Pham RT, Hughes EM, Barber DS, Gallagher EP** (2004) Molecular cloning and characterization of a glutathione S-transferase from largemouth bass (*Micropterus salmoides*) liver that is involved in the detoxification of 4-hydroxynonenal. *Biochemical Pharmacology* **67**: 2129-2139
- Dorion S, Lambert H, Landry J** (2002) Activation of the p38 signaling pathway by heat shock involves the dissociation of glutathione S-transferase Mu from Ask1. *Journal of Biological Chemistry* **277**: 30792-30797
- Dulhunty A, Gage P, Curtis S, Chelvanayagam G, Board P** (2001) The glutathione transferase structural family includes a nuclear chloride channel and a ryanodine receptor calcium release channel modulator. *Journal of Biological Chemistry* **276**: 3319-3323
- Edwards R, Dixon DP** (2005) Plant glutathione transferases *Methods in Enzymology*. In aLP Helmut Sies, ed, *Glutathione Transferases and Gamma-Glutamyl Transpeptidases*, Ed Volume 401. Academic Press, pp 169-186
- Edwards R, Dixon DP, Walbot V** (2000) Plant glutathione S-transferases: enzymes with multiple functions in sickness and in health. *Trends in Plant Science* **5**: 193-198
- Epp O, Ladenstein R, Wendel A** (1983) The Refined Structure of the Selenoenzyme Glutathione-Peroxidase at 0.2-Nm Resolution. *European Journal of Biochemistry* **133**: 51-69
- Evans DC, Baillie TA** (2005) Minimizing the potential for metabolic activation as an integral part of drug design. *Current Opinion in Drug Discovery & Development* **8**: 44-50
- Evans DC, Watt AP, Nicoll-Griffith DA, Baillie TA** (2004) Drug-protein adducts: An industry perspective on minimizing the potential for drug bioactivation in drug discovery and development. *Chemical Research in Toxicology* **17**: 3-16
- Fahey RC, Sundquist AR** (1991) Evolution of Glutathione Metabolism. *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology* **64**: 1-53
- Fernandes JC, Henriques FS** (1991) Biochemical, Physiological, and Structural Effects of Excess Copper in Plants. *Botanical Review* **57**: 246-273
- Fernandez-Canon JM, Penalva MA** (1998) Characterization of a fungal maleylacetoacetate isomerase gene and identification of its human homologue. *Journal of Biological Chemistry* **273**: 329-337
- Flanagan J, Rossjohn J, Parker M, Board P, Chelvanayagam G** (1999) Mutagenic analysis of conserved arginine residues in and around the novel sulfate binding pocket of the human Theta class glutathione transferase T2-2. *Protein Sci* **8**: 2205-2212

- Foyer CH, Noctor G** (2005) Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses. *Plant Cell* **17**: 1866-1875
- Frova C** (2003) The plant glutathione transferase gene family: genomic structure, functions, expression and evolution. *Physiologia Plantarum* **119**: 469-479
- Frova C** (2006) Glutathione transferases in the genomics era: new insights and perspectives. *Biomolecular Engineering* **23**: 149-169
- Funk C** (2001) Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. *Science* **294**: 1871 - 1875
- Gaquerel E, Hervé C, Labrière C, Boyen C, Potin P, Salaün J-P** (2007) Evidence for oxylipin synthesis and induction of a new polyunsaturated fatty acid hydroxylase activity in *Chondrus crispus* in response to methyljasmonate. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* **1771**: 565-575
- Garcera A, Barreto L, Piedrafita L, Tamarit J, Herrero E** (2006) *Saccharomyces cerevisiae* cells have three Omega class glutathione S-transferases acting as 1-Cys thiol transferases. *Biochemical Journal* **398**: 187-196
- Geoffroy L, Teisseire H, Couderchet M, Vernet G** (2002) Effect of oxyfluorfen and diuron alone and in mixture on antioxidative enzymes of *Scenedesmus obliquus*. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **72**: 178-185
- Gerwick WH, Roberts MA, Vulpanovici A, Ballantine DL** (1999) Biogenesis and biological function of marine algal oxylipins. *Lipoxygenases and Their Metabolites* **447**: 211-218
- Ghezzi P, Di Simplicio P** (2007) Glutathionylation pathways in drug response. *Current Opinion in Pharmacology Cancer/Immunomodulation* **7**: 398-403
- Girardini J, Amirante A, Zemzoumi K, Serra E** (2002) Characterization of an omega-class glutathione S-transferase from *Schistosoma mansoni* with glutaredoxin-like dehydroascorbate reductase and thiol transferase activities. *European Journal of Biochemistry* **269**: 5512-5521
- Gossett DR, Banks SW, Millhollon EP, Lucas MC** (1996) Antioxidant response to NaCl stress in a control and an NaCl-tolerant cotton cell line grown in the presence of paraquat, buthionine sulfoximine, and exogenous glutathione. *Plant Physiology* **112**: 803-809

- Gouet P, Courcelle E, Stuart D, Metoz F** (1999) ESPript: analysis of multiple sequence alignments in PostScript. *Bioinformatics* **15**: 305-308
- Goultquer S, Ritter A, Thomas F, Ferec C, Salaün JP, Potin P** (2008) Release of volatile aldehydes by the brown algal kelp *Laminaria digitata* in response to both biotic and abiotic stresses. *Chembiochem*
- Greetham D, Morgan C, Campbell AM, van Rossum AJ, Barrett J, Brophy PM** (2004) Evidence of glutathione transferase complexing and signaling in the model nematode *Caenorhabditis elegans* using a pull-down proteomic assay. *Proteomics* **4**: 1989-1995
- Gschloessl B, Guermeur Y, Cock JM** (2008) HECTAR: A method to predict subcellular targeting in heterokonts. *Bmc Bioinformatics* **9**
- Gu ZL, Nicolae D, Lu HHS, Li WH** (2002) Rapid divergence in expression between duplicate genes inferred from microarray data. *Trends in Genetics* **18**: 609-613
- Guschina IA, Harwood JL** (2006) Lipids and lipid metabolism in eukaryotic algae. *Progress in Lipid Research* **45**: 160-186
- Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB** (1974) Glutathione S-transferases - First enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of Biological Chemistry* **249**: 7130-7139
- Hachey DL, Dawling S, Roodi N, Parl FF** (2003) Sequential Action of Phase I and II Enzymes Cytochrome P450 1B1 and Glutathione S-Transferase P1 in Mammary Estrogen Metabolism. *Cancer Res* **63**: 8492-8499
- Hall T** (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*: 95-98
- Harris JM, Meyer DJ, Coles B, Ketterer B** (1991) A Novel Glutathione Transferase (13-13) Isolated from the Matrix of Rat-Liver Mitochondria Having Structural Similarity to Class Theta-Enzymes. *Biochemical Journal* **278**: 137-141
- Harrop SJ, DeMaere MZ, Fairlie WD, Reztsova T, Valenzuela SM, Mazzanti M, Tonini R, Qiu MR, Jankova L, Warton K, Bauskin AR, Wu WM, Pankhurst S, Campbell TJ, Breit SN, Curmi PMG** (2001) Crystal structure of a soluble form of the intracellular chloride ion channel CLIC1 (NCC27) at 1.4-angstrom resolution. *Journal of Biological Chemistry* **276**: 44993-45000
- Hatton P, Edwards R, Cole DJ** (1995) Glutathione Transferases in Major Weed Species. *Pesticide Science* **43**: 173-175
- Haug A, Larsen B, Smidsrod O** (1974) Uronic acid sequence in alginate from different sources. *Carbohydrate Research* **32**: 217-225

- Hayes JD, Flanagan JU, Jowsey IR** (2005) Glutathione transferases. Annual Review of Pharmacology and Toxicology **45**: 51-88
- Hayes JD, Mantle TJ** (1986) Inhibition of Hepatic and Extrahepatic Glutathione S-Transferases by Primary and Secondary Bile-Acids. Biochemical Journal **233**: 407-415
- Hegazy UM, Mannervik B, Stenberg G** (2004) Functional role of the lock and key motif at the subunit interface of glutathione transferase P1-1. Journal of Biological Chemistry **279**: 9586-9596
- Henderson CJ, Smith AG, Ure J, Brown K, Bacon EJ, Wolf CR** (1998) Increased skin tumorigenesis in mice lacking pi class glutathione S-transferases. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **95**: 5275-5280
- Herbette S, Roeckel-Drevet P, Drevet JR** (2007) Seleno-independent glutathione peroxidases - More than simple antioxidant scavengers. Febs Journal **274**: 2163-2180
- Hervé C** (2006) Bases moléculaires de la réponse au stress et à la défense chez l'algue rouge *Chondrus crispus* et caractérisation d'une nouvelle classe de glutathion S-transférases. Université Rennes 1, Roscoff
- Hervé C, de Franco P-O, Tonon T, Groisillier A, Boyen C** (2007) Algae reveal new outlines in the glutathione S-transferases family. Febs Journal **274**: C4-14
- Hervé C, de Franco P-O, Groisillier A, Tonon T, Boyen C** (2008) New members of the glutathione transferase family discovered in red and brown algae. Biochem J **412**: 535-544
- Hervé C, Tonon T, Collén J, Corre E, Boyen C** (2006) NADPH oxidases in Eukaryotes: red algae provide new hints. Current Genetics **49**: 190-204
- Hirayoshi K, Lis JT** (1999) Nuclear run-on assays: Assessing transcription by measuring density of engaged RNA polymerases. In Chromatin, Vol 304. ACADEMIC PRESS INC, San Diego, pp 351-362
- Holm PJ, Bhakat P, Jegerschold C, Gyobu N, Mitsuoka K, Fujiyoshi Y, Morgenstern R, Hebert H** (2006) Structural basis for detoxification and oxidative stress protection in membranes. Journal of Molecular Biology **360**: 934-945
- Hong S-J, Kang S-Y, Chung Y-B, Chung M-H, Oh Y-J, Kang I, Bahk YY, Kong Y, Cho S-Y** (2000) *Paragonimus westermani*: A cytosolic glutathione S-transferase of a Sigma class in adult stage,. Experimental Parasitology **94**: 180-189
- Howe GA, Schillmiller AL** (2002) Oxylin metabolism in response to stress. Current Opinion in Plant Biology **5**: 230-236

- Ishikawa T** (1992) The ATP-dependent glutathione S-conjugate export pump. *Trends in Biochemical Sciences* **17**: 463-469
- Jakobsson PJ, Mancini JA, Ford-Hutchinson AW** (1996) Identification and characterization of a novel human microsomal glutathione S-transferase with leukotriene C-4 synthase activity and significant sequence identity to 5-lipoxygenase-activating protein and leukotriene C-4 synthase. *Journal of Biological Chemistry* **271**: 22203-22210
- Jakobsson PJ, Mancini JA, Riendeau D, Ford-Hutchinson AW** (1997) Identification and characterization of a novel microsomal enzyme with glutathione-dependent transferase and peroxidase activities. *J. Biol. Chem.* **272**: 22934-22939
- Jakobsson PJ, Morgenstern R, Mancini J, Ford-Hutchinson A, Persson B** (1999) Common structural features of MAPEG -- a widespread superfamily of membrane associated proteins with highly divergent functions in eicosanoid and glutathione metabolism. *Protein Sci* **8**: 689-692
- Jeppesen MG, Ortiz P, Shepard W, Kinzy TG, Nyborg J, Andersen GR** (2003) The crystal structure of the glutathione S-transferase-like domain of elongation factor 1B gamma from *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry* **278**: 47190-47198
- Ji XH, Vonrosenvinge EC, Johnson WW, Tomarev SI, Piatigorsky J, Armstrong RN, Gilliland GL** (1995) 3-dimensional structure, catalytic properties, and evolution of a sigma-class glutathione transferase from squid, a progenitor of the lens S-crystallins of cephalopods. *Biochemistry* **34**: 5317-5328
- Johansson AS, Mannervik B** (2001) Human glutathione transferase A3-3, a highly efficient catalyst of double-bond isomerization in the biosynthetic pathway of steroid hormones. *Journal of Biological Chemistry* **276**: 33061-33065
- Johnson KA, Angelucci F, Bellelli A, Herve M, Fontaine J, Tsernoglou D, Capron A, Trottein F, Brunori M** (2003) Crystal structure of the 28 kDa glutathione S-transferase from *Schistosoma haematobium*. *Biochemistry* **42**: 10084-10094
- Jones AM** (1994) Auxin-Binding Proteins. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **45**: 393-420
- Jowsey IR, Thomson AM, Flanagan JU, Murdock PR, Moore GBT, Meyer DJ, Murphy GJ, Smith SA, Hayes JD** (2001) Mammalian class Sigma glutathione S-transferases: catalytic properties and tissue-specific expression of human and rat GSH-dependent prostaglandin D-2 synthases. *Biochemical Journal* **359**: 507-516

- Jowsey IR, Thomson RE, Orton TC, Elcombe CR, Hayes JD** (2003) Biochemical and genetic characterization of a murine class Kappa glutathione S-transferase. *Biochemical Journal* **373**: 559-569
- Kanaoka Y, Ago H, Inagaki E, Nanayama T, Miyano M, Kikuno R, Fujii Y, Eguchi N, Toh H, Urade Y, Hayaishi O** (1997) Cloning and crystal structure of hematopoietic prostaglandin D synthase. *Cell* **90**: 1085-1095
- Kanaoka Y, Fujimori K, Kikuno R, Sakaguchi Y, Urade Y, Hayaishi O** (2000) Structure and chromosomal localization of human and mouse genes for hematopoietic prostaglandin D synthase - Conservation of the ancestral genomic structure of sigma-class glutathione S-transferase. *European Journal of Biochemistry* **267**: 3315-3322
- Karez CS, Pereira RC** (1995) Metal Contents in Polyphenolic Fractions Extracted from the Brown Alga *Padina gymnospora*. *Botanica Marina* **38**: 151-155
- Kawai H, Hanyuda T, Draisma SGA, Muller DG** (2007) Molecular phylogeny of *Discosporangium mesarthrocarpum* (Phaeophyceae) with a reinstatement of the order discosporangiales. *Journal of Phycology* **43**: 186-194
- Keppler D** (1999) Export pumps for glutathione S-conjugates. *Free Radical Biology and Medicine* **27**: 985-991
- Ketterer B** (2001) A bird's eye view of the glutathione transferase field. *Chemico-Biological Interactions* **138**: 27-42
- Kloareg B, Quatrano RS** (1987) Enzymatic removal of the cell-walls from zygotes of *Fucus distichus* (L) Powell (Phaeophyta). *Hydrobiologia* **151**: 123-129
- Kloareg B, Quatrano RS** (1988) Structure of the cell-walls of marine-algae and ecophysiological functions of the matrix polysaccharides. *Oceanography and Marine Biology* **26**: 259-315
- Kocsy G, von Ballmoos P, Suter M, Ruegsegger A, Galli U, Szalai G, Galiba G, Brunold C** (2000) Inhibition of glutathione synthesis reduces chilling tolerance in maize. *Planta* **211**: 528-536
- Kohlerstaub D, Leisinger T** (1985) Dichloromethane dehalogenase of *Hyphomicrobium sp* strain Dm2. *Journal of Bacteriology* **162**: 676-681
- Kondo T, Yoshida K, Urata Y, Goto S, Gasa S, Taniguchi N** (1993) Gamma-Glutamylcysteine Synthetase and Active-Transport of Glutathione S-Conjugate Are Responsive to Heat-Shock in K562 Erythroid-Cells. *Journal of Biological Chemistry* **268**: 20366-20372

- Konishi T, Kato K, Araki T, Shiraki K, Takagi M, Tamaru Y** (2005) Molecular cloning and characterization of Alpha-class glutathione S-transferase genes from the hepatopancreas of red sea bream, *Pagrus major*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* **140**: 309-320
- Koonin EV, Mushegian AR, Tatusov RL, Altschul SF, Bryant SH, Bork P, Valencia A** (1994) Eukaryotic translation elongation factor 1gamma contains a glutathione transferase domain--Study of a diverse, ancient protein superfamily using motif search and structural modeling. *Protein Sci* **3**: 2045-2054
- Krabs G, Watanabe M, Wiencke C** (2004) A monochromatic action spectrum for the photoinduction of the UV-absorbing mycosporine-like amino acid shinorine in the red alga *Chondrus crispus*. *Photochemistry and Photobiology* **79**: 515-519
- Kremer BP** (1975) Metabolism of mannitol in marine brown alga *Fucus serratus*. *Zeitschrift Fur Pflanzenphysiologie* **74**: 255-263
- Krupina MV, Dathe W** (1991) Occurrence of jasmonic acid in the red alga *Gelidium latifolium*. *Zeitschrift Fur Naturforschung C-a Journal of Biosciences* **46**: 1127-1129
- Küpper FC, Carpenter LJ, McFiggans GB, Palmer CJ, Waite TJ, Boneberg EM, Woitsch S, Weiller M, Abela R, Grolimund D, Potin P, Butler A, Luther GW, Kroneck PMH, Meyer-Klaucke W, Feiters MC** (2008) Iodide accumulation provides kelp with an inorganic antioxidant impacting atmospheric chemistry. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**: 6954-6958
- Küpper FC, Gaquerel E, Boneberg E-M, Morath S, Salaun J-P, 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**: 1991-1999
- Küpper FC, Kloareg B, Guern J, Potin P** (2001) Oligoguluronates elicit an oxidative burst in the brown algal kelp *Laminaria digitata*. *Plant Physiol.* **125**: 278-291
- Küpper FC, Muller DG, Peters AF, Kloareg B, Potin P** (2002) Oligoalginate recognition and oxidative burst play a key role in natural and induced resistance of sporophytes of laminariales. *Journal of Chemical Ecology* **28**: 2057-2081
- Küpper FC, Schweigert N, Gall EA, Legendre JM, Vilter H, Kloareg B** (1998) Iodine uptake in Laminariales involves extracellular, haloperoxidase-mediated oxidation of iodide. *Planta* **207**: 163-171

- Kuzniak E, Sklodowska M** (2001) Ascorbate, glutathione and related enzymes in chloroplasts of tomato leaves infected by *Botrytis cinerea*. *Plant Science* **160**: 723-731
- Ladner JE, Parsons JF, Rife CL, Gilliland GL, Armstrong RN** (2004) Parallel evolutionary pathways for glutathione transferases: structure and mechanism of the mitochondrial class Kappa enzyme rGSTK1-1. *Biochemistry* **43**: 352-361
- Lam BK, Austen KF** (2002) Leukotriene C-4 synthase: a pivotal enzyme in cellular biosynthesis of the cysteinyl leukotrienes. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators* **68-9**: 511-520
- Lam BK, Penrose JF, Xu KY, Baldasaro MH, Austen KF** (1997) Site-directed mutagenesis of human leukotriene C-4 synthase. *Journal of Biological Chemistry* **272**: 13923-13928
- Lamoureux GL, Rusness DG** (1986) Tridiphane 2-(3,5-Dichlorophenyl)-2-(2,2,2-Trichloroethyl)Oxirane an Atrazine Synergist - Enzymatic Conversion to a Potent Glutathione-S-Transferase Inhibitor. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **26**: 323-342
- Le Bail A, Dittami S, de Franco P-O, Rousvoal S, Cock M, Tonon T, Charrier B** (2008) Normalisation genes for expression analyses in the brown alga model *Ectocarpus siliculosus*. *BMC Molecular Biology* **9**: 75
- Leblanc C, Colin C, Cosse A, Delage L, La Barre S, Morin P, Fievet B, Voiseux C, Ambroise Y, Verhaeghe E, Amouroux D, Donard O, Tessier E, Potin P** (2006) Iodine transfers in the coastal marine environment: the key role of brown algae and of their vanadium-dependent haloperoxidases. *Biochimie* **88**: 1773-1785
- Lee DS, Nioche P, Hamberg M, Raman CS** (2008a) Structural insights into the evolutionary paths of oxylipin biosynthetic enzymes. *Nature* **455**: 363-U327
- Lee K-W, Raisuddin S, Rhee J-S, Hwang D-S, Yu IT, Lee Y-M, Park HG, Lee J-S** (2008b) Expression of glutathione S-transferase (GST) genes in the marine copepod *Tigriopus japonicus* exposed to trace metals. *Aquatic Toxicology* **89**: 158-166
- Lee YM, Lee KW, Park H, Park HG, Raisuddin S, Ahn IY, Lee JS** (2007) Sequence, biochemical characteristics and expression of a novel Sigma-class of glutathione S-transferase from the intertidal copepod, *Tigriopus japonicus* with a possible role in antioxidant defense. *Chemosphere* **69**: 893-902
- Legall Y, Brown S, Marie D, Mejjad M, Kloareg B** (1993) Quantification of Nuclear-DNA and G-C Content in Marine Macroalgae by Flow-Cytometry of Isolated-Nuclei. *Protoplasma* **173**: 123-132

- Lei AP, Wong YS, Tam NFY** (2003) Pyrene-induced changes of glutathione-S-transferase activities in different microalgal species. *Chemosphere* **50**: 293-301
- Lengqvist J, Svensson R, Evergren E, Morgenstern R, Griffiths WJ** (2004) Observation of an intact noncovalent homotrimer of detergent-solubilized rat microsomal glutathione transferase-1 by electrospray mass spectrometry. *Journal of Biological Chemistry* **279**: 13311-13316
- Leonarduzzi G, Robbesyn F, Poli G** (2004) Signaling kinases modulated by 4-hydroxynonenal. *Free Radical Biology and Medicine* **37**: 1694-1702
- Levonen AL, Dickinson DA, Moellering DR, Mulcahy RT, Forman HJ, Darley-Usmar VM** (2001) Biphasic effects of 15-deoxy-Delta(12,14)-prostaglandin J(2) on glutathione induction and apoptosis in human endothelial cells. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* **21**: 1846-1851
- Lewis RJ** (1996) Chromosomes of the brown algae. *Phycologia* **35**: 19-40
- Li J, Xia Z, Ding J** (2005) Thioredoxin-like domain of human Kappa class glutathione transferase reveals sequence homology and structure similarity to the Theta class enzyme. *Protein Sci* **14**: 2361-2369
- Lin XY, Kaul SS, Rounsley S, Shea TP, Benito MI, Town CD, Fujii CY, Mason T, Bowman CL, Barnstead M, Feldblyum TV, Buell CR, Ketchum KA, Lee J, Ronning CM, Koo HL, Moffat KS, Cronin LA, Shen M, Pai G, Van Aken S, Umayam L, Tallon LJ, Gill JE, Adams MD, Carrera AJ, Creasy TH, Goodman HM, Somerville CR, Copenhaver GP, Preuss D, Nierman WC, White O, Eisen JA, Salzberg SL, Fraser CM, Venter JC** (1999) Sequence and analysis of chromosome 2 of the plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **402**: 761-+
- Lion U, Wiesemeier T, Weinberger F, Beltran J, Flores V, Faugeron S, Correa J, Pohnert G** (2006) Phospholipases and galactolipases trigger oxylipin-mediated wound-activated defence in the red alga *Gracilaria chilensis* against epiphytes. *Chembiochem* **7**: 457-462
- Listowsky I, Abramovitz M, Homma H, Niitsu Y** (1988) Intracellular binding and transport of hormones and xenobiotics by glutathione S-transferases. *Drug Metabolism Reviews* **19**: 305-318
- Liu RM, Gao L, Choi JA, Forman HJ** (1998) gamma-glutamylcysteine synthetase: mRNA stabilization and independent subunit transcription by 4-hydroxy-2-nonenal. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* **19**: L861-L869

- LloydJones G, Lau PCK** (1997) Glutathione S-transferase-encoding gene as a potential probe for environmental bacterial isolates capable of degrading polycyclic aromatic hydrocarbons. *Applied and Environmental Microbiology* **63**: 3286-3290
- Lobban C, Harrison P** (1994) *Seaweed ecology and physiology*. Cambridge University Press
- Lohrmann NL, Logan BA, Johnson AS** (2004) Seasonal acclimatization of antioxidants and photosynthesis in *Chondrus crispus* and *Mastocarpus stellatus*, two co-occurring red algae with differing stress tolerances. *Biological Bulletin* **207**: 225-232
- Lu G, Moriyama EN** (2004) Vector NTI, a balanced all-in-one sequence analysis suite. *Brief Bioinform* **5**: 378-388
- Lu SC** (2000) Regulation of glutathione synthesis. *In Current Topics in Cellular Regulation*, Vol 36, Vol 36. ACADEMIC PRESS INC, San Diego, pp 95-116
- Lumjuan N, Stevenson BJ, Prapantadara LA, Somboon P, Brophy PM, Loftus BJ, Severson DW, Ranson H** (2007) The *Aedes aegypti* glutathione transferase family. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **37**: 1026-1035
- Luning K** (1992) Day and night kinetics of growth rate in green, brown, and red seaweeds. *Journal of Phycology* **28**: 794-803
- Luning K, Neushul M** (1978) Light and temperature demands for growth and reproduction of Laminarian gametophytes in Southern and Central California. *Marine Biology* **45**: 297-309
- Lynch M, Conery JS** (2000) The evolutionary fate and consequences of duplicate genes. *Science* **290**: 1151-1155
- Maksymiec W** (1997) Effect of copper on cellular processes in higher plants. *Photosynthetica* **34**: 321-342
- Mandal AK, Skoch J, Bacskai BJ, Hyman BT, Christmas P, Miller D, Yamin TD, Xu SH, Wisniewski D, Evans JF, Soberman RJ** (2004) The membrane organization of leukotriene synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**: 6587-6592
- Mannervik B, Board PG, Hayes JD, Listowsky I, Pearson WR** (2005) Nomenclature for mammalian soluble glutathione transferases *Methods in Enzymology*. *In* aLP Helmut Sies, ed, *Gluthione Transferases and Gamma-Glutamyl Transpeptidases*, Ed Volume 401. Academic Press, pp 1-8
- Margis R, Dunand C, Teixeira FK, Margis-Pinheiro M** (2008) Glutathione peroxidase family - an evolutionary overview. *Febs Journal* **275**: 3959-3970

- Marques MR, Pereira JH, Oliveira JS, Basso LA, de Azevedo WF, Santos DS, Palma MS** (2007) The inhibition of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase as a model for development of novel antimicrobials. *Current Drug Targets* **8**: 445-457
- Marrs KA** (1996) The functions and regulation of glutathione transferases in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **47**: 127-158
- Martin JL, Bardwell JCA, Kuriyan J** (1993) Crystal-Structure of the Dsba Protein Required for Disulfide Bond Formation in-Vivo. *Nature* **365**: 464-468
- Martinoia E, Klein M, Geisler M, Bovet L, Forestier C, Kolukisaoglu U, Muller-Rober B, Schulz B** (2002) Multifunctionality of plant ABC transporters - more than just detoxifiers. *Planta* **214**: 345-355
- Masters CJ** (1998) On the role of the peroxisome in the metabolism of drugs and xenobiotics. *Biochemical Pharmacology* **56**: 667-673
- Maximilien R, de Nys R, Holmstrom C, Gram L, Givskov M, Crass K, Kjelleberg S, Steinberg PD** (1998) Chemical mediation of bacterial surface colonisation by secondary metabolites from the red alga *Delisea pulchra*. *Aquatic Microbial Ecology* **15**: 233-246
- McFiggans G, Coe H, Burgess R, Allan J, Cubison M, Alfarra MR, Saunders R, Saiz-Lopez A, Plane JMC, Wevill DJ, Carpenter LJ, Rickard AR, Monks PS** (2004) Direct evidence for coastal iodine particles from *Laminaria* macroalgae - linkage to emissions of molecular iodine. *Atmospheric Chemistry and Physics* **4**: 701-713
- McGonigle B, Keeler SJ, Lau S-MC, Koeppe MK, O'Keefe DP** (2000) A genomics approach to the comprehensive analysis of the glutathione S-transferase gene family in soybean and maize. *Plant Physiology* **124**: 1105-1120
- Meister A, Anderson ME** (1983) Glutathione. *Annual Review of Biochemistry* **52**: 711-760
- Mesiet-Cladiere L, Norais C, Kuhn J, Briffotiaux J, Sloostra JW, Ferrari E, Hubscher U, Flament D, Myllykallio H** (2007) A novel proteomic approach identifies new interaction partners for proliferating cell nuclear antigen. *Journal of Molecular Biology* **372**: 1137-1148
- Meyer DJ, Muimo R, Thomas M, Coates D, Isaac RE** (1996) Purification and characterization of prostaglandin-H E-isomerase, a sigma-class glutathione S-transferase, from *Ascaridia galli*. *Biochem J.* **1996**: 223-227
- Mittova V, Theodoulou FL, Kiddle G, Gomez L, Volokita M, Tal M, Foyer CH, Guy M** (2003) Coordinate induction of glutathione biosynthesis and glutathione-metabolizing enzymes is correlated with salt tolerance in tomato. *FEBS Letters* **554**: 417-421

- Miura S, Kasuyaarai I, Mori H, Miyazawa S, Osumi T, Hashimoto T, Fujiki Y** (1992) Carboxyl-Terminal Consensus Ser-Lys-Leu-Related Tripeptide of Peroxisomal Proteins Functions In vitro as a Minimal Peroxisome-Targeting Signal. *Journal of Biological Chemistry* **267**: 14405-14411
- Moellering D, Mc Andrew J, Patel RP, Forman HJ, Mulcahy RT, Jo H, Darley-USmar VM** (1999) The induction of GSH synthesis by nanomolar concentrations of NO in endothelial cells: a role for gamma-glutamylcysteine synthetase and gamma-glutamyl transpeptidase. *Febs Letters* **448**: 292-296
- Moellering DR, Levonen AL, Go YM, Patel RP, Dickinson DA, Forman HJ, Darley-USmar VM** (2002) Induction of glutathione synthesis by oxidized low-density lipoprotein and 1-palmitoyl-2-arachidonoyl phosphatidylcholine: protection against quinone-mediated oxidative stress. *Biochemical Journal* **362**: 51-59
- Monaco R, Friedman FK, Hyde MJ, Chen JM, Manolatus S, Adler V, Ronai Z, Koslosky W, Pincus MR** (1999) Identification of a glutathione-S-transferase effector domain for inhibition of jun kinase, by molecular dynamics. *Journal of Protein Chemistry* **18**: 859-866
- Morel F, Rauch C, Coles B, Le Ferrec E, Guillouzo A** (2002) The human glutathione transferase alpha locus: genomic organization of the gene cluster and functional characterization of the genetic polymorphism in the hGSTA1 promoter. *Pharmacogenetics* **12**: 277-286
- Morel F, Rauch C, Petit E, Piton A, Theret N, Coles B, Guillouzo A** (2004) Gene and protein characterization of the human glutathione S-transferase Kappa and evidence for a peroxisomal localization. *J. Biol. Chem.* **279**: 16246-16253
- Morgenstern R, Depierre JW** (1983) Microsomal Glutathione Transferase - Purification in Unactivated Form and Further Characterization of the Activation Process, Substrate-Specificity and Amino-Acid-Composition. *European Journal of Biochemistry* **134**: 591-597
- Morgenstern R, Guthenberg C, Depierre JW** (1982) Microsomal Glutathione S-Transferase - Purification, Initial Characterization and Demonstration That It Is Not Identical to the Cytosolic Glutathione S-Transferase-a, S-Transferase-B and S-Transferase-C. *European Journal of Biochemistry* **128**: 243-248
- Mosialou E, Piemonte F, Andersson C, Vos RME, Vanbladeren PJ, Morgenstern R** (1995) Microsomal Glutathione Transferase - Lipid-Derived Substrates and Lipid Dependence. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **320**: 210-216

- Mtolera MSP, Collén J, Pedersen M, Ekdahl A, Abrahamsson K, Semesi AK** (1996) Stress-induced production of volatile halogenated organic compounds in *Eucheuma denticulatum* (Rhodophyta) caused by elevated pH and high light intensities. *European Journal of Phycology* **31**: 89-95
- Mulder GJ, OuwerkerkMahadevan S** (1997) Modulation of glutathione conjugation in vivo: How to decrease glutathione conjugation in vivo or in intact cellular systems in vitro. *Chemico-Biological Interactions* **105**: 17-34
- Muller DG, Kapp M, Knippers R** (1998) Viruses in marine brown algae. *Advances in Virus Research*, Vol 50 **50**: 49-67
- Murphy RC, Zarini S** (2002) Glutathione adducts of oxyeicosanoids. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators* **68-9**: 471-482
- Nathaniel C, Wallace LA, Burke J, Dirr HW** (2003) The role of an evolutionarily conserved cis-proline in the thioredoxin-like domain of human class Alpha glutathione transferase A1-1. *Biochem. J.* **372**: 241-246
- Navrot N, Collin V, Gualberto J, Gellhaye E, Hirasawa M, Rey P, Knaff DB, Issakidis E, Jacquot JP, Routhier N** (2006) Plant glutathione peroxidases are functional peroxiredoxins distributed in several subcellular compartments and regulated during biotic and abiotic stresses. *Plant Physiology* **142**: 1364-1379
- Nebert DW, Vasiliou V** (2004) Analysis of the glutathione S-transferase (GST) gene family. *Human Genomics* **1**: 460-464
- Noctor G, Foyer CH** (1998) Ascobate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **49**: 249-279
- O'Dowd CD, Jimenez JL, Bahreini R, Flagan RC, Seinfeld JH, Hameri K, Pirjola L, Kulmala M, Jennings SG, Hoffmann T** (2002) Marine aerosol formation from biogenic iodine emissions. *Nature* **417**: 632-636
- Ohno S** (1970) *Evolution by gene duplication*, Berlin
- Ohsawa N, Ogata Y, Okada N, Itoh N** (2001) Physiological function of bromoperoxidase in the red marine alga, *Corallina pilulifera*: production of bromoform as an allelochemical and the simultaneous elimination of hydrogen peroxide. *Phytochemistry* **58**: 683-692
- Ortelli F, Rossiter LC, Vontas J, Ranson H, Hemingway J** (2003) Heterologous expression of four glutathione transferase genes genetically linked to a major insecticide-resistance locus from the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Biochemical Journal* **373**: 957-963

- Palmer CJ, Anders TL, Carpenter LJ, Kupper FC, McFiggans GB** (2005) Iodine and halocarbon response of *Laminaria digitata* to oxidative stress and links to atmospheric new particle production. *Environmental Chemistry* **2**: 282-290
- Parker R, Song HW** (2004) The enzymes and control of eukaryotic mRNA turnover. *Nature Structural & Molecular Biology* **11**: 121-127
- Paul VJ, Puglisi MP, Ritson-Williams R** (2006) Marine chemical ecology. *Natural Product Reports* **23**: 153-180
- Pawlik-Skowronska B, Pirszel J, Brown MT** (2007) Concentrations of phytochelatins and glutathione found in natural assemblages of seaweeds depend on species and metal concentrations of the habitat. *Aquatic Toxicology* **83**: 190-199
- Pearson WR** (2005) Phylogenies of glutathione transferase families. *Methods in Enzymology* **401**: 186-204
- Pemble SE, Taylor JB** (1992) An evolutionary perspective on glutathione transferases inferred from class-theta glutathione transferase cDNA sequences. *Biochemical Journal* **287**: 957-963
- Pemble SE, Wardle AF, Taylor JB** (1996) Glutathione S-transferase class Kappa: Characterization by the cloning of rat mitochondrial GST and identification of a human homologue. *Biochemical Journal* **319**: 749-754
- Perally Sxr, LaCourse EJ, Campbell AM, Brophy PM** (2008) Heme transport and detoxification in nematodes: subproteomics evidence of differential role of glutathione transferases. *J. Proteome Res.*
- Peters A, Scornet D, Ratin M, Charrier B, Monnier A, Merrien Y, Corre E, Coelho S, Cock J** (2008) Life-cycle-generation-specific developmental processes are modified in the immediate upright mutant of the brown alga *Ectocarpus siliculosus*. *Development* **135**: 1503 - 1512
- Peters AF, Marie D, Scornet D, Kloareg B, Cock JM** (2004a) Proposal of *Ectocarpus siliculosus* (Ectocarpales, Phaeophyceae) as a model organism for brown algal genetics and genomics. *J Phycol* **50**: 1079 - 1088
- Peters AF, Scornet D, Muller DG, Kloareg B, Cock JM** (2004b) Inheritance of organelles in artificial hybrids of the isogamous multicellular chromist alga *Ectocarpus siliculosus* (Phaeophyceae). *European Journal of Phycology* **39**: 235-242
- Petterson PL, Johansson AS, Mannervik B** (2002) Transmutation of human glutathione transferase A2-2 with peroxidase activity into an efficient steroid isomerase. *Journal of Biological Chemistry* **277**: 30019-30022

- Pflugmacher S, Schroder P, Sandermann Jr. H** (2000) Taxonomic distribution of plant glutathione S-transferases acting on xenobiotics. *Phytochemistry* **54**: 267-273
- Piatigorsky J** (2003) Crystallin genes: specialization by changes in gene regulation may precede gene duplication. *J Struct Funct Genomics* **3**
- Pieniazek D, Bukowska B, Duda W** (2004) Comparison of the effect of Roundup Ultra 360 SL pesticide and its active compound glyphosate on human erythrocytes. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **79**: 58-63
- Pinto E, Sigaud-Kutner TCS, Leitao MAS, Okamoto OK, Morse D, Colepicolo P** (2003) Heavy metal-induced oxidative stress in algae. *Journal of Phycology* **39**: 1008-1018
- Ragan MA, Craigie JS** (1980) Quantitative Studies on Brown Algal Phenols .4. Ultraviolet Spectrophotometry of Extracted Polyphenols and Implications for Measuring Dissolved Organic-Matter in Sea-Water. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **46**: 231-239
- Ragan MA, Smidsrod O, Larsen B** (1979) Chelation of divalent metal ions by brown algal polyphenols. *Marine Chemistry* **7**: 265-271
- Rahman I, Bel A, Mulier B, Lawson MF, Harrison DJ, MacNee W, Smith CAD** (1996) Transcriptional regulation of gamma-glutamylcysteine synthetase-heavy subunit by oxidants in human alveolar epithelial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **229**: 832-837
- Ranson H, Hemingway J** (2005) Mosquito glutathione transferases, *Methods in Enzymology*. In aLP Helmut Sies, ed, *Gluthione Transferases and Gamma-Glutamyl Transpeptidases*, Ed Volume 401. Academic Press, pp 226-241
- Ritter A** (2009) Approches intégrés des mécanismes moléculaires de la tolérance au cuivre chez les algues brunes. UPMC, Paris
- Ritter A, Goullitquer S, Salaün JP, Tonon T, Correa JA, Potin P** (2008) Copper stress induces biosynthesis of octadecanoid and eicosanoid oxygenated derivatives in the brown algal kelp *Laminaria digitata*. *New Phytologist* **9999**
- Ritter A, Ubertini M, Romac S, Gaillard F, Delage L, Beltran J, Mann A, Tonon T, Correa JA, Potin P** (in prep) Copper stress proteomics highlights local adaptation of two strains of the model brown alga *Ectocarpus siliculosus*.
- Robinson A, Huttley GA, Booth HS, Board PG** (2004) Modelling and bioinformatics studies of the human Kappa-class glutathione transferase predict a novel third glutathione transferase family with similarity to prokaryotic 2-hydroxychromene-2-carboxylate isomerases. *Biochemical Journal* **379**: 541-552

- Roeder V, Collén J, Rousvoal S, Corre E, Leblanc L, Boyen C** (2005) Identification of stress genes transcripts in *Laminaria digitata* (Phaeophyceae) protoplast cultures by expressed sequence tag analysis. *Journal of Phycology* **41**: 1227-1235
- Rousseau F, de Reviere B** (1999) Circumscription of the order Ectocarpales (Phaeophyceae): bibliographical synthesis and molecular evidence. *Cryptogamie Algologie* **20**: 5-18
- Rowley AF, Vogan CL, Taylor GW, Clare AS** (2005) Prostaglandins in non-insectan invertebrates: recent insights and unsolved problems. *Journal of Experimental Biology* **208**: 3-14
- Russell G, Bolton JJ** (1975) Euryhaline ecotypes of *Ectocarpus siliculosus*. *Estuarine and Coastal Marine Science* **3**: 91-94
- Russell G, Morris OP** (1970) Copper tolerance in marine fouling alga *Ectocarpus siliculosus*. *Nature* **228**: 288-&
- Russell G, Veltkamp CJ** (1984) Epiphyte survival on skin-shedding macrophytes. *Marine Ecology-Progress Series* **18**: 149-153
- Saenko GN, Kravtsova YY, Ivanenko VV, Sheludko SI** (1978) Concentration of iodine and bromine by plants in seas of Japan and Okhotsk. *Marine Biology* **47**: 243-250
- Salgado LT, Andrade LR, Amado GM** (2005) Localization of specific monosaccharides in cells of the brown alga *Padina gymnospora* and the relation to heavy-metal accumulation. *Protoplasma* **225**: 123-128
- Samuelsson B** (1983) Leukotrienes - mediators of immediate hypersensitivity reactions and inflammation. *Science* **220**: 568-575
- Sanchez-Fernandez R, Davies TGE, Coleman JOD, Rea PA** (2001) The Arabidopsis thaliana ABC protein superfamily, a complete inventory. *Journal of Biological Chemistry* **276**: 30231-30244
- Sandermann H** (1992) Plant-Metabolism of Xenobiotics. *Trends in Biochemical Sciences* **17**: 82-84
- Sawicki R, Singh SP, Mondal AK, Benes H, Zimniak P** (2003) Cloning, expression and biochemical characterization of one Epsilon-class (GST-3) and ten Delta-class (GST-1) glutathione S-transferases from *Drosophila melanogaster*, and identification of additional nine members of the Epsilon class. *Biochemical Journal* **370**: 661-669
- Schmidt-Krey I, Kanaoka Y, Mills DJ, Irikura D, Haase W, Lam BK, Austen KF, Kuhlbrandt W** (2004) Human leukotriene C-4 synthase at 4.5 angstrom resolution in projection. *Structure* **12**: 2009-2014

- Schmidt-Krey I, Mitsuoka K, Hirai T, Murata K, Cheng Y, Fujiyoshi Y, Morgenstern R, Hebert H** (2000) The three-dimensional map of microsomal glutathione transferase 1 at 6 angstrom resolution. *Embo Journal* **19**: 6311-6316
- Schrenk C, Pflugmacher S, Bruggemann R, Sandermann H, Steinberg CEW, Kettrup A** (1998) Glutathione S-transferase activity in aquatic macrophytes with emphasis on habitat dependence. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **40**: 226-233
- Schuller DJ, Liu Q, Kriksunov IA, Campbell AM, Barrett J, Brophy PM, Hao Q** (2005) Crystal structure of a new class of glutathione transferase from the model human hookworm nematode *Heligmosomoides polygyrus*. *Proteins-Structure Function and Bioinformatics* **61**: 1024-1031
- Seelig GF, Meister A** (1985) Glutathione Biosynthesis - Gamma-Glutamylcysteine Synthetase from Rat-Kidney. *Methods in Enzymology* **113**: 379-390
- Shalata A, Tal M** (1998) The effect of salt stress on lipid peroxidation and antioxidants in the leaf of the cultivated tomato and its wild salt-tolerant relative *Lycopersicon pennellii*. *Physiologia Plantarum* **104**: 169-174
- Sheehan D, Meade G, Foley VM, Dowd CA** (2001) Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. *Biochemical Journal* **360**
- Shelton MD, Chock PB, Mieyal JJ** (2005) Glutaredoxin: Role in reversible protein S-glutathionylation and regulation of redox signal transduction and protein translocation. *Antioxidants & Redox Signaling* **7**: 348-366
- Singh SP, Coronella JA, Benes H, Cochrane BJ, Zimniak P** (2001) Catalytic function of *Drosophila melanogaster* glutathione S-transferase DmGSTS1-1 (GST-2) in conjugation of lipid peroxidation end products. *European Journal of Biochemistry* **268**: 2912-2923
- Smith AP, Nourizadeh SD, Peer WA, Xu JH, Bandyopadhyay A, Murphy AS, Goldsbrough PB** (2003) *Arabidopsis* AtGSTF2 is regulated by ethylene and auxin, and encodes a glutathione S-transferase that interacts with flavonoids. *Plant Journal* **36**: 433-442
- Snyder MJ, Maddison DR** (1997) Molecular phylogeny of glutathione-S-transferases. *DNA and Cell Biology* **16**: 1373-1384
- Soranzo N, Gorla MS, Mizzi L, De Toma G, Frova C** (2004) Organisation and structural evolution of the rice glutathione S-transferase gene family. *Molecular Genetics and Genomics* **271**: 511-521

- Stark AA, Porat N, Volohonsky G, Komlosch A, Bluvshstein E, Tubi C, Steinberg P** (2003) The role of gamma-glutamyl transpeptidase in the biosynthesis of glutathione (Reprinted from Thiol Metabolism and Redox Regulation of Cellular Functions). *Biofactors* **17**: 139-149
- Starr RC, Zeikus JA** (1993) The culture collection of algae at the University of Texas at Austin. *J Phycol* **29**: 90 - 95
- Studier FW** (2005) Protein production by auto-induction in high-density shaking cultures. *Protein Expression and Purification* **41**: 207-234
- Sun CN, Huang SY, Hu NT, Chung WY** (2001) Glutathione S-transferases and insect resistance to insecticides. *Biochemical Sites of Insecticide Action and Resistance*: 239-254
- Sun TH, Morgenstern R** (1997) Binding of glutathione and an inhibitor to microsomal glutathione transferase. *Biochemical Journal* **326**: 193-196
- Suzuki H, Sugiyama Y** (1998) Excretion of GSSG and glutathione conjugates mediated by MRP1 and cMOAT/MRP2. *Seminars in Liver Disease* **18**: 359-376
- Svartz J, Blomgran R, Hammarstrom S, Soderstrom M** (2003) Leukotriene C-4 synthase homo-oligomers detected in living cells by bioluminescence resonance energy transfer. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular and Cell Biology of Lipids* **1633**: 90-95
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S** (2007) MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* **24**: 1596-1599
- Tan KL, Chelvanayagam G, Parker MW, Board PG** (1996) Mutagenesis of the active site of the human Theta-class glutathione transferase GSTT2-2: Catalysis with different substrates involves different residues. *Biochemical Journal* **319**: 315-321
- Tang AH, Tu CPD** (1994) Biochemical characterization of *Drosophila* glutathione S-transferases D1 and D21. *Journal of Biological Chemistry* **269**: 27876-27884
- Tang JX, Siegfried BD, Hoagland KD** (1998) Glutathione-S-transferase and in vitro metabolism of atrazine in freshwater algae. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **59**: 155-161
- Thom R, Dixon DP, Edwards R, Cole DJ, Laphorn AJ** (2001) The structure of a zeta class glutathione S-transferase from *Arabidopsis thaliana*: Characterisation of a GST with novel active-site architecture and a putative role in tyrosine catabolism. *Journal of Molecular Biology* **308**: 949-962

- Thomson AM, Meyer DJ, Hayes JD** (1998) Sequence, catalytic properties and expression of chicken glutathione dependent prostaglandin D2 synthase, a novel class Sigma glutathione S-transferase. **333**: 317-325
- Thoren S, Weinander R, Saha S, Jegerschold C, Pettersson PL, Samuelsson B, Hebert H, Hamberg M, Morgenstern R, Jakobsson PJ** (2003) Human microsomal prostaglandin E synthase-1 - Purification, functional characterization, and projection structure determination. *Journal of Biological Chemistry* **278**: 22199-22209
- Todorovic R, Devanesan P, Higginbotham S, Zhao J, Gross ML, Rogan EG, Cavalieri EL** (2001) Analysis of potential biomarkers of estrogen-initiated cancer in the urine of Syrian golden hamsters treated with 4-hydroxyestradiol. *Carcinogenesis* **22**: 905-911
- Tomarev S, Zinovieva R, Piatigorsky J** (1992) Characterization of squid crystallin genes. Comparison with mammalian glutathione S-transferase genes. *J. Biol. Chem.* **267**: 8604-8612
- Tomarev SI, Zinovieva RD, Guo K, Piatigorsky J** (1993) Squid Glutathione-S-Transferase - Relationships with Other Glutathione S-Transferases and S-Crystallins of Cephalopods. *Journal of Biological Chemistry* **268**: 4534-4542
- Townsend DM** (2007) S-glutathionylation: indicator of cell stress and regulator of the unfolded protein response. *Mol. Interv.* **7**: 313-324
- Tu CPD, Akgul B** (2005) *Drosophila* glutathione S-transferases, *Methods in Enzymology*. In aLP Helmut Sies, ed, *Gluthione Transferases and Gamma-Glutamyl Transpeptidases*, Ed Volume 401. Academic Press, pp 204-226
- Turesky RJ** (2004) The role of genetic polymorphisms in metabolism of carcinogenic heterocyclic aromatic amines. *Current Drug Metabolism* **5**: 169-180
- Urade Y, Hayaishi O** (2000) Prostaglandin D synthase: structure and function. *In* *Vitamins and Hormones - Advances in Research and Applications*, Vol 58, Vol 58. ACADEMIC PRESS INC, San Diego, pp 89-120
- Urata Y, Yamamoto H, Goto S, Tsushima H, Akazawa S, Yamashita S, Nagataki S, Kondo T** (1996) Long exposure to high glucose concentration impairs the responsive expression of gamma-glutamylcysteine synthetase by interleukin-1 beta and tumor necrosis factor-alpha in mouse endothelial cells. *Journal of Biological Chemistry* **271**: 15146-15152
- Utomo A, Jiang XZ, Furuta S, Yun J, Levin DS, Wang YCJ, Desai KV, Green JE, Chen PL, Lee WH** (2004) Identification of a novel putative non-selenocysteine containing phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (NPGPx) essential for alleviating

- oxidative stress generated from polyunsaturated fatty acids in breast cancer cells.  
*Journal of Biological Chemistry* **279**: 43522-43529
- Vontas JG, Small GJ, Nikou DC, Ranson H, Hemingway J** (2002) Purification, molecular cloning and heterologous expression of a glutathione S-transferase involved in insecticide resistance from the rice brown planthopper, *Nilaparvata lugens*.  
*Biochemical Journal* **362**: 329-337
- Vreeland V, Waite JH, Epstein L** (1998) Polyphenols and oxidases in substratum adhesion by marine algae and mussels. *Journal of Phycology* **34**: 1-8
- Vuilleumier S** (1997) Bacterial glutathione S-transferases: what are they good for ? J.  
*Bacteriol.* **179**: 1431-1441
- Wagner U, Edwards R, Dixon DP, Mauch F** (2002) Probing the diversity of the *Arabidopsis* glutathione S-transferase gene family. *Plant Molecular Biology* **49**: 515-532
- Walker MA, McKersie BD** (1993) Role of the Ascorbate-Glutathione Antioxidant System in Chilling Resistance of Tomato. *Journal of Plant Physiology* **141**: 234-239
- Wanders RJA, van Grunsven EG, Jansen GA** (2000) Lipid metabolism in peroxisomes: enzymology, functions and dysfunctions of the fatty acid alpha- and beta-oxidation systems in humans. *Biochemical Society Transactions* **28**: 141-149
- Wang W, Ballatori N** (1998) Endogenous glutathione conjugates: Occurrence and biological functions. *Pharmacological Reviews* **50**: 335-355
- Weber H** (2002) Fatty acid-derived signals in plants. *Trends in Plant Science* **7**: 217-224
- Weinberger F, Friedlander M** (2000) Response of *Gracilaria conferta* (Rhodophyta) to oligoagars results in defense against agar-degrading epiphytes. *Journal of Phycology* **36**: 1079-1086
- West J, Kraft G** (1996) *Ectocarpus siliculosus* (Dillwyn) Lyngb. from Hopkins River Falls, Victoria - the first record of a freshwater brown alga in Australia. *Muelleria* **9**: 29-33
- Wongsantichon J, Ketterman AJ** (2006) An intersubunit lock-and-key 'Clasp' motif in the dimer interface of Delta class glutathione transferase. *Biochemical Journal* **394**: 135-144
- Woods JS, Ellis ME** (1995) Up-Regulation of Glutathione Synthesis in Rat-Kidney by Methyl Mercury - Relationship to Mercury-Induced Oxidative Stress. *Biochemical Pharmacology* **50**: 1719-1724
- Wu GY, Fang YZ, Yang S, Lupton JR, Turner ND** (2004) Glutathione metabolism and its implications for health. *Journal of Nutrition* **134**: 489-492

- Xia B, Vlamis-Gardikas A, Holmgren A, Wright PE, Dyson HJ** (2001) Solution structure of Escherichia coli glutaredoxin-2 shows similarity to mammalian glutathione-S-transferases. *Journal of Molecular Biology* **310**: 907-918
- Xiang C, Oliver DJ** (1998) Glutathione metabolic genes coordinately respond to heavy metals and jasmonic acid in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **10**: 1539-1550
- Yamamoto K, Miake F, Aso Y** (2007) Purification and characterization of a novel sigma-class glutathione S-transferase of the fall webworm, *Hyphantria cunea*. *Journal of Applied Entomology* **131**: 466-471
- Yang Y, Cheng JZ, Singhal SS, Saini M, Pandya U, Awasthi S, Awasthi YC** (2001) Role of glutathione S-transferases in protection against lipid peroxidation - Overexpression of hgsta2-2 in k562 cells protects against hydrogen peroxide-induced apoptosis and inhibits JNK and caspase 3 activation. *Journal of Biological Chemistry* **276**: 19220-19230
- Zenk MH** (1996) Heavy metal detoxification in higher plants - A review. *Gene* **179**: 21-30
- Zhang JZ** (2003) Evolution by gene duplication: an update. *Trends in Ecology & Evolution* **18**: 292-298
- Zhang K, Das NP** (1994) Inhibitory Effects of Plant Polyphenols on Rat-Liver Glutathione S-Transferases. *Biochemical Pharmacology* **47**: 2063-2068



# ANNEXES

## Liste des Annexes

### Publications:

**"New members of the glutathione transferase family discovered in red and brown algae".**

Cécile Hervé, Pierre-Olivier de Franco, Agnès Groisillier, Thierry Tonon, Catherine Boyen.  
*Biochemical Journal* (2008) 412, 535-544.

**"Whole genome survey of the glutathione transferase family in the brown algal model *Ectocarpus siliculosus*".**

Pierre-Olivier de Franco, Sylvie Rousvoal, Thierry Tonon, Catherine Boyen.  
*Marine Genomics* (2009) 1, 135-148.

**"Normalization genes for expression analyses in the brown algal model *Ectocarpus siliculosus*".**

Aude Le Bail, Simon Dittami, Pierre-Olivier de Franco, Sylvie Rousvoal, J. Mark, Cock, Thierry, Tonon, Bénédicte Charrier.  
*BMC Molecular Biology* 2008, 9:75.

### Posters :

**"A new class of glutathione S-transferase from algae?"**

PO de Franco, C. Hervé, T. Tonon, C. Boyen  
FESPB, Lyon, July 2006

**"Algae reveal new outlines in the glutathione S-transferases family"**

C. Hervé, PO de Franco, T. Tonon, A. Groisillier, E. Gaquerel, JP Salaun, C. Boyen  
FESPB, Vienna, July 2007

**"Stress response in seaweeds: functional analysis of glutathione transferase"**

PO de Franco, C. Hervé, E. Guevelou, T. Tonon, C. Boyen  
Workshop Marine Genomics, Crète, Octobre 2008

# New members of the glutathione transferase family discovered in red and brown algae

Cécile HERVÉ, Pierre-Olivier DE FRANCO, Agnès GROISILLIER, Thierry TONON and Catherine BOYEN<sup>1</sup>

UPMC Univ. Paris 6, UMR 7139 Végétaux Marins et Biomolécules, Station Biologique, F 29682, Roscoff, France, and CNRS, UMR 7139 Végétaux Marins et Biomolécules, Station Biologique, F 29682, Roscoff, France

The GSTs (glutathione transferases) are involved in the detoxification of a wide variety of hydrophobic substrates. These enzymes have been found in virtually all types of organisms, including plants, animals, nematodes and bacteria. In the present study, we report the molecular and biochemical characterization of algal GSTs. Phylogenetic analysis showed that most of them were distinct from previously described GST classes, but were most closely related to the Sigma class. Profiling of GST genes from the red alga *Chondrus crispus* and brown alga *Laminaria digitata* was undertaken after different chemical treatments and showed that they displayed contrasting patterns of transcription.

Recombinant algal GST from both species showed transferase activities against the common substrates aryl halides, but also on the  $\alpha,\beta$ -unsaturated carbonyl 4-hydroxynonenal. Also, they exhibit significant peroxidation towards organic hydroperoxides, including oxygenated derivatives of polyunsaturated fatty acids. Among a range of compounds tested, Cibacron Blue was the most efficient inhibitor of algal GSTs identified.

**Key words:** *Chondrus crispus*, glutathione transferase (GST), *Laminaria digitata*, methyl jasmonate, phylogenetic classification, recombinant protein.

## INTRODUCTION

Among the cellular defence systems, GSTs (glutathione transferases) (EC 2.5.1.18) form a highly diverse family of proteins with functions ranging from detoxification to cell signalling. They are named after their ability to catalyse the nucleophilic attack of GSH on electrophilic substrates. In this manner, they contribute to the metabolism of drugs, chemical carcinogens, pesticides and other xenobiotics [1]. Endogenous products formed as secondary metabolites during oxidative stress are also substrates for GST enzymes. In addition, several GSTs act as GSH-dependent peroxidases by catalysing the reduction of organic hydroperoxides to the less-toxic monohydroxy alcohols [2]. Beyond detoxification and involvement in various defence responses, there is increasing evidence indicating that GSTs may be implicated in many other physiological processes, including isomerization of specific metabolites [3], transportation of endogenous substrates [4], plant cell growth and development [5].

These proteins are found in almost all species and are divided into classes, based primarily on sequence similarity. Currently recognized classes of cytosolic GSTs in mammals include the Alpha, Mu, Omega, Pi, Sigma, Theta and Zeta classes [6]. GSTs from the last two classes have also been identified in plants and other organisms. Other distinct groups have been identified only in insects (Delta and Epsilon [7]), plants (Lambda, Phi and Tau [1]) or prokaryotes (Beta [8]). A Kappa class regroups mitochondrial GSTs, and a family of microsomal GSTs comprises the MAPEGs (membrane-associated proteins involved in eicosanoid and glutathione metabolism).

GST enzymes have been extensively purified from mammals, plants and invertebrates [9]. In contrast, the occurrence of GSTs has not been explored in some taxa, such as the marine algae. Algae currently encompass eight groups of photosynthetic eukaryotes which have evolved independently in the early history of life. These organisms have acquired their plastids through different endosymbiotic events. A first event involving a cyanobacterial ancestor gave rise to the red algae (Rhodophytae) and the green plants (green algae and land plants). Brown algae (Phaeophyceae) and diatoms stem from a secondary endosymbiotic event, and, together with the oomycetes, belong to the Heterokonts [10].

To date, there have been virtually no reports on the molecular characterization of GSTs in algae, particularly seaweed, mostly due to a lack of genomic information in these organisms. Previously, we have analysed cDNA catalogues from thallus and protoplasts of the red alga *Chondrus crispus* and of the brown alga *Laminaria digitata*, and provided the first genetic evidence of cytosolic GST sequences in both organisms [11,12]. In the present study, phylogenetic analyses demonstrate an unexpected link between macroalgal GSTs and a large animal GST cluster including the Sigma class GSTs. We thus propose that these red and brown algal GSTs, together with oomycete representatives, define a new group of GSTs closely related to the Sigma class. In addition, expression profiling of these genes showed that red and brown algal GSTs exhibit different patterns of transcription according to chemical treatments. Transferase and peroxidase activities of the recombinant proteins from both algae were determined in the presence of different categories of substrates,

Abbreviations used: CDNB, 1-chloro-2,4-dinitrobenzene; EST, expressed sequence tag; FDNB, 1-fluoro-2,4-dinitrobenzene; GST, glutathione transferase; 4-HNE, 4-hydroxynonenal; 13-HpODE, (13S)-hydroperoxyoctadeca-(9Z,11E)-dienoic acid; 13-HpOTE, (13S)-hydroperoxyoctadeca-(9Z,11E,15Z)-trienoic acid; 15-HETE, (15S)-hydroxyeicosa-(5Z,8Z,11Z,13E)-tetraenoic acid; MAPEG, membrane-associated protein involved in eicosanoid and glutathione metabolism; MeJA, methyl jasmonate; PUFA, polyunsaturated fatty acid.

<sup>1</sup> To whom correspondence should be addressed (email boyen@sb-roscoff.fr).

The nucleotide sequence data reported will appear in the DDBJ, EMBL, GenBank<sup>®</sup> and GSDB Nucleotide Sequence Databases under the accession numbers EF423557, EF423558 and EF423559 for *Chondrus crispus* glutathione transferases 1, 2 and 3 respectively, and EF422836, EF422837, EF422838 and EF422839 for *Laminaria digitata* glutathione transferases 1, 2, 3 and 4 respectively.

and Cibacron Blue was determined as the most effective inhibitor among the molecules tested.

## EXPERIMENTAL

### Plant material cultivation and chemical treatments

Gametophytic *Chondrus crispus* unialgal isolates and sporophytic *Laminaria digitata* unialgal isolates were cultivated at 13 °C in enriched seawater filtered medium C [13], using a photoperiod of 10 h of light and 14 h of darkness and a photon flux density of 40  $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ .

CuSO<sub>4</sub> and ZnCl<sub>2</sub> were purchased from Prolabo, and other chemicals were from Sigma. The derivatives of polyunsaturated fatty acids 13-HpODE [(13*S*)-hydroperoxyoctadeca-(9*Z*,11*E*)-dienoic acid], 13-HpOTE (13*S*-hydroperoxy-9*Z*,11*E*,15*Z*-octadecatrienoic acid), (±)12-HpETE [12-hydroperoxyeicosa-(5*Z*,8*Z*,10*E*,14*Z*)-tetraenoic acid], 15-HETE [(15*S*)-hydroxy-eicosa-(5*Z*,8*Z*,11*Z*,13*E*)-tetraenoic acid] and 4-HNE (4-hydroxynonenal) were obtained from Cayman Chemicals. Oligoguluronates were produced by enzyme degradation of sodium alginate [14].

To perform chemical treatments, algae were first maintained in Petri dishes with seawater for at least 18 h. Final concentrations of chemicals were as follows: 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; 500  $\mu\text{M}$  each tested pesticide; 100 or 200  $\mu\text{M}$  each heavy metal tested in *L. digitata* and *C. crispus* respectively; 100  $\mu\text{M}$  MeJA (methyl jasmonate); 25 or 50  $\mu\text{M}$  each PUFA (polyunsaturated fatty acid) derivative in *L. digitata* and *C. crispus* respectively; and 150  $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$  oligoguluronates. An equal volume of solvent was used in each corresponding control treatment. After 3 and 6 h of incubation for *C. crispus* and *L. digitata* respectively, tissues were harvested, frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C until use.

### DNA and RNA isolation

Extraction of genomic DNA and total RNA from gametophyte tissues of *C. crispus* and sporophyte tissues of *L. digitata* was performed using the two-phase partitioning protocol described by Hervé et al. [15]. To improve final yields with *L. digitata* tissues, an additional step of polysaccharide precipitation, consisting of slow addition of 0.3 vol. of 100% ethanol to the extraction mixture, was included in the protocol before RNA precipitation by LiCl.

### Identification of cDNA and corresponding genes encoding GSTs

EST (expressed sequence tags) encoding GSTs were identified in *C. crispus* and *L. digitata* through analysis of corresponding cDNA libraries [11,12,16]. To obtain the genomic sequence of *CcGST1*, *CcGST2* and *CcGST3* (from *Chondrus crispus*), *LdGST1*, *LdGST2* and *LdGST3* (from *Laminaria digitata*) genes, PCR amplifications were performed on genomic DNA using specific primers flanking the coding region of each gene. The genomic sequence of *LdGST4* could not be amplified in a single PCR, due to the presence of large introns. All the primers used in this study are reported in Supplementary Table S1 at <http://www.BiochemJ.org/bj/412/bj4120535add.htm>. PCR conditions consisted of an initial denaturation of 5 min at 95 °C, followed by 35 cycles of 45 s at 95 °C, 60 s at 58 °C and 100 s at 72 °C, and a final extension of 10 min at 72 °C. PCR products were recovered from agarose gels, purified using the Mini Elute Purification kit (Qiagen), and sequenced in both directions.

### Bioinformatic analysis

Protein alignment was initially performed using the MAFFT program at <http://bioinformatics.uams.edu/mafft/> and improved manually by comparison with a structural alignment of GST proteins with resolved crystal structures from the Sigma, Pi and Alpha classes. The alignment obtained was edited with ESPript at <http://esprict.ibcp.fr/ESPript/ESPript/>.

For phylogenetic analyses, full-length deduced amino acid sequences were aligned using the Muscle 3.6 software [17]. For the most exhaustive analysis, 130 sequences were selected from public databases and used as representative members of each of the known GST classes, excluding the microsomal MAPEGs and mitochondrial Kappa classes due to their extreme divergence. Oomycete (*Phytophthora ramorum* and *Phytophthora sojae*) and algal sequences (*Phaeodactylum tricoratum*, *Thalassiosira pseudonana*, *Ostreococcus tauri*, *Ostreococcus lucimarinus*, *Cyanidioschyzon merolae* and *Chlamydomonas reinhardtii*) were searched from genome projects or from public and restricted-access EST collections (*C. crispus*, *Gracilaria tenuistipitata*, *Gracilaria gracilis*, *Gracilaria lemaneiformis*, *Porphyra yezoensis*, *L. digitata*, *Laminaria japonica*, *Ectocarpus siliculosus*, *Fucus serratus*, *Fucus vesiculosus*, *Ulva linza* and *Fragilariopsis cylindrus*). The multiple-protein alignments were analysed using the neighbour-joining and maximum likelihood methods, based on distances derived from the PAM matrix, with Mega 3.1 [18] and Phylml 2.4.4 [19] programs respectively. The robustness of the branches was evaluated using bootstrap replicates.

Sequences selected from public databases and used for the phylogenetic analysis are listed in Supplementary Table S2 at <http://www.BiochemJ.org/bj/412/bj4120535add.htm>.

### Real-time PCR

Total RNA were reverse-transcribed using the Superscript II RT (reverse transcriptase) kit (Invitrogen), and real-time PCR was performed in a GeneAmp 5700 sequence detection system using the SYBR Green PCR master kit (Applied Biosystems) according to the manufacturer's instructions. The primers used in the reaction were recommended by Primers Express 1.0 software (Applied Biosystems) and are listed in Supplementary Table S1. All 40 PCR cycles were performed according to the following temperature regimen: 95 °C for 15 s and 60 °C for 60 s.

To generate a standard curve, genomic DNA of *C. crispus* and *L. digitata* were used as reference matrixes. Knowing the genome mass of the *C. crispus* gametophyte (0.16 pg) and the *L. digitata* sporophyte (1.4 pg), it was possible to determine the number of cDNA molecules present in each sample tested as described by Hervé et al. [15]. The quantity in unknown samples was expressed as a number of *C. crispus* or *L. digitata* genomes per ng of total RNA. Actin and tubulin genes were used as internal controls for *C. crispus* and *L. digitata* assays respectively, and corresponding primers were designed based on sequences deposited in GenBank® (accession numbers U03676 and AW400737 respectively).

The relative changes in the GST mRNA expression were calculated as *x*-fold changes relative to the appropriate control experiment for the different chemical treatments.

### Heterologous expression and protein purification

The open reading frames of the GST transcripts from *C. crispus* and *L. digitata* were amplified by PCR using the primers listed in Supplementary Table S1. These primers were designed to incorporate BamHI and EcoRI restriction sites into the 5'- and

3'-ends respectively. PCR conditions consisted of an initial denaturation of 5 min at 94°C, followed by 30 cycles of 30 s at 94°C, 30 s at 50°C and 2 min at 72°C, and a final extension step of 10 min at 72°C. The resulting PCR products were purified, digested with the appropriate restriction enzymes and subcloned into the pFO4 expression vector, a vector modified from pET15 (Novagen) to be compatible with the BamHI/EcoRI and BamHI/MfeI ligation strategies.

Recombinant plasmids were used to transform *Escherichia coli* strain BL21(DE3). Transformed colonies were grown at 37°C overnight in Luria–Bertani medium containing ampicillin. The culture was diluted 1:100 with auto-inducible ZYP (NZ-amine/yeast extract/phosphate) medium [20] containing ampicillin and subjected to further incubation at 20°C until the culture density reached saturation. After centrifugation at 5000 g for 10 min at 4°C, pelleted bacteria were resuspended in Tris/HCl (pH 7.5) buffer containing 300 mM NaCl and 60 mM imidazole and disrupted using a French press before centrifugation at 12000 rev./min for 90 min at 4°C using a Beckman JA-21 rotor. The resulting supernatant was applied onto a Chelating Fast Flow Sepharose column charged with 100 mM NiSO<sub>4</sub> (Amersham Biosciences). After washing, the bound proteins were eluted with a linear gradient of imidazole ranging from 60 to 300 mM. The protein eluted was collected and dialysed against a buffer containing 20 mM Tris/HCl (pH 7.5), 100 mM NaCl, 1 mM EDTA and 1 mM DTT (dithiothreitol). Glycerol was added to dialysed proteins to a final concentration of 20% (v/v) before storage at –80°C. Final protein concentrations were estimated by the Bradford method with reagents purchased from Bio-Rad. The apparent molecular mass of the purified recombinant proteins was evaluated by size-exclusion chromatography using a 1.6 cm × 60 cm Superdex 200 column (Amersham Biosciences). The column was equilibrated in 50 mM Tris/HCl (pH 7.5) buffer containing 100 mM NaCl. Molecular masses of standards used for calibration are: carbonic anhydrase, 29 kDa; BSA, 66 kDa; alcohol dehydrogenase, 150 kDa;  $\beta$ -amylase, 200 kDa; apoferritin, 443 kDa; thyroglobulin, 669 kDa; Blue Dextran, 2000 kDa.

### Enzyme assays

GST enzyme activity assays were carried out in a microplate Safire<sup>2</sup> UV spectrophotometer reader (Tecan), except for 4-HNE and *trans*-2-nonenal that used a UV-2401-PC spectrophotometer (Shimadzu). In all instances, the non-enzymatic reaction was measured and subtracted from the overall reaction rate. Assays were conducted at 30°C, and measures were performed for 10 min after the addition of the second substrate. Ethacrynic acid, *trans*-4-phenyl-3-buten-2-one, *p*-nitrophenyl acetate and cumene hydroperoxide were generously provided by Fabrice Morel (U620 Inserm, Rennes, France). Except for the PUFA hydroperoxides and the 4-HNE obtained from Cayman chemicals, all chemicals were purchased from Sigma.

Glutathione transferase and glutathione peroxidase activities were measured as reported by Thomson et al. [21]. Enzyme activity with the aldehydes 4-HNE and *trans*-2-nonenal was assessed as reported by Alin et al. [22]. Substrate concentrations for each test are given in Supplementary Table S3 at <http://www.BiochemJ.org/bj/412/bj4120535add.htm>. One unit of enzyme activity is defined as the amount of enzyme that catalyses the turnover of 1  $\mu$ mol of substrate per min. Specific activity is expressed in  $\mu$ mol · min<sup>-1</sup> per mg of enzyme. The apparent  $K_m$  value for GSH was determined using a GSH concentration ranging from 250  $\mu$ M to 2 mM, and a fixed CDNB (1-chloro-2,4-dinitrobenzene)

concentration of 2 mM. Kinetic parameters were calculated by the method of Lineweaver–Burk.

Inhibitory effects on enzyme activity were measured by pre-incubating the enzymes for 5 min in the presence of GSH (1 mM final concentration) and several quantities of inhibitor (from 0.05  $\mu$ M to 2 mM final concentration). Reactions were initiated by addition of CDNB (final concentration of 1 mM). The concentration of each inhibitor giving 50% inhibition (IC<sub>50</sub>) was determined graphically.

## RESULTS

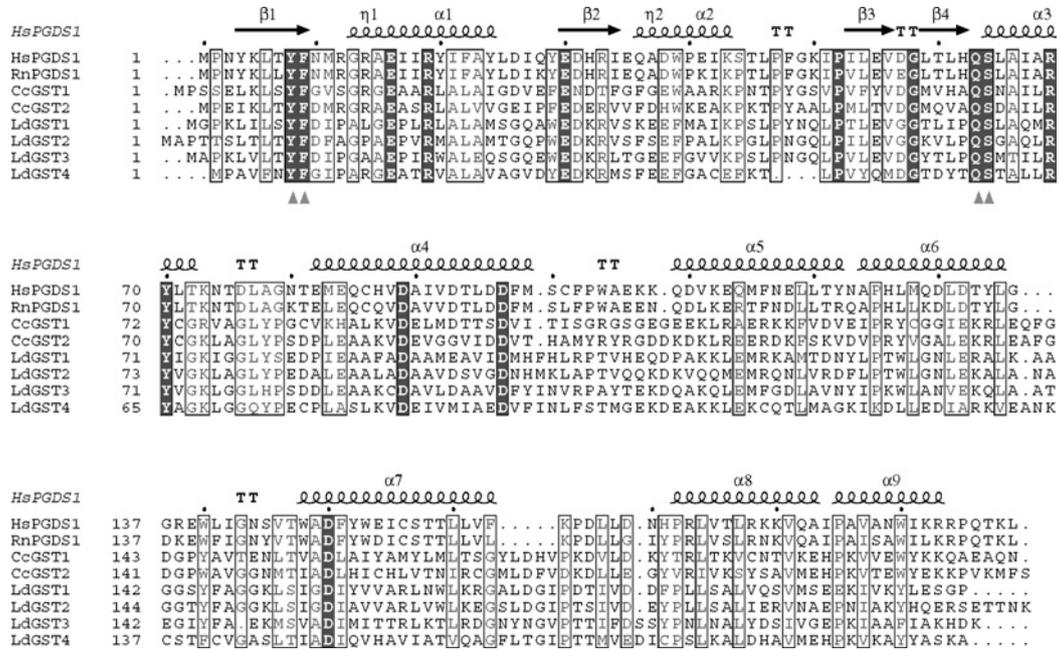
### Sequence analysis of cDNA-encoding algal GSTs

Seven putative cytosolic GSTs were identified through analysis of algal EST libraries: three from the rhodophyte *C. crispus* (CcGST1, CcGST2 and CcGST3) and four from the phaeophyte *L. digitata* (LdGST1, LdGST2, LdGST3 and LdGST4). Their length ranged from 201 to 230 amino acids. In both protoplast libraries, these GST genes were among the most represented sequences. The cDNA sequences corresponding to the complete coding regions of these GSTs have been deposited in GenBank<sup>®</sup> under the following accession numbers: EF423557 for *CcGST1*, EF423558 for *CcGST2*, EF423559 for *CcGST3*, EF422836 for *LdGST1*, EF422837 for *LdGST2*, EF422838 for *LdGST3* and EF422839 for *LdGST4*.

The GenBank<sup>®</sup> database was searched using the protein BLAST program and revealed that CcGST1, CcGST2, LdGST1, LdGST2, LdGST3 and LdGST4 were most similar to Sigma class enzymes, with a maximum of 33% identity. Conserved residues usually encountered in GST classes from mammals were also found in the algal sequences. Of significance was the highly conserved catalytic tyrosine found in the early N-terminal portion of most mammalian GSTs (Figure 1) [21]. In the mammalian Pi, Mu and Sigma classes, the glutamine and serine residues just before the  $\alpha$ 3-helix are also involved in the interaction with GSH [9]. Compared with other Sigma class GST members, the C-terminal domain of the algal sequences were highly divergent, which may indicate different substrate selectivities and specificities of the algal GSTs. In contrast with the other GSTs identified in this study, CcGST3 shared higher identities (25–26%) with sequences from the Zeta, Beta, Delta and Epsilon classes. Two tyrosine residues are found in the early N-terminal portion of the CcGST3 sequence and may be involved in GSH binding (see Supplementary Figure S1 at <http://www.BiochemJ.org/bj/412/bj4120535add.htm>).

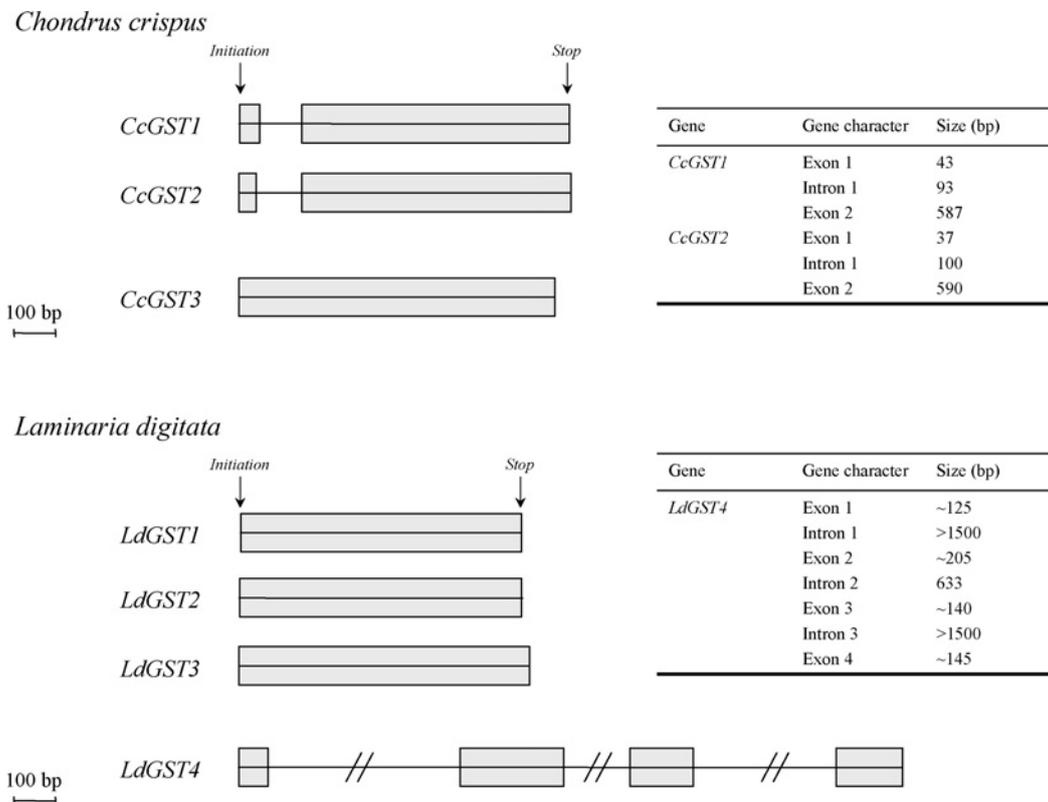
The similarity of amino acids between the six most-related algal sequences was 28–63%, indicating a high degree of heterogeneity. The highest identities were observed between CcGST1 and CcGST2 (51%), and between LdGST1, LdGST2 and LdGST3 (50–63%). LdGST4 was the most divergent among the *L. digitata* sequences, as CcGST3 was among the *C. crispus* sequences.

Although classification in different GST families can be based on sequence similarities alone, distinct gene structure provides additional supporting evidence [1,23]. Therefore the cDNA sequences of *C. crispus* and *L. digitata* GSTs were compared with their corresponding genomic DNA sequences. The genes encoding CcGST3, LdGST1, LdGST2 and LdGST3 were intronless. *CcGST1* holds an intron of 93 bp, whose size and position coincides exactly with those of the unique intron of 100 bp encountered in *CcGST2* (Figure 2). The *LdGST4* genomic sequence contains four exons and three introns. Their length could not be determined accurately owing to the low PCR-product yield



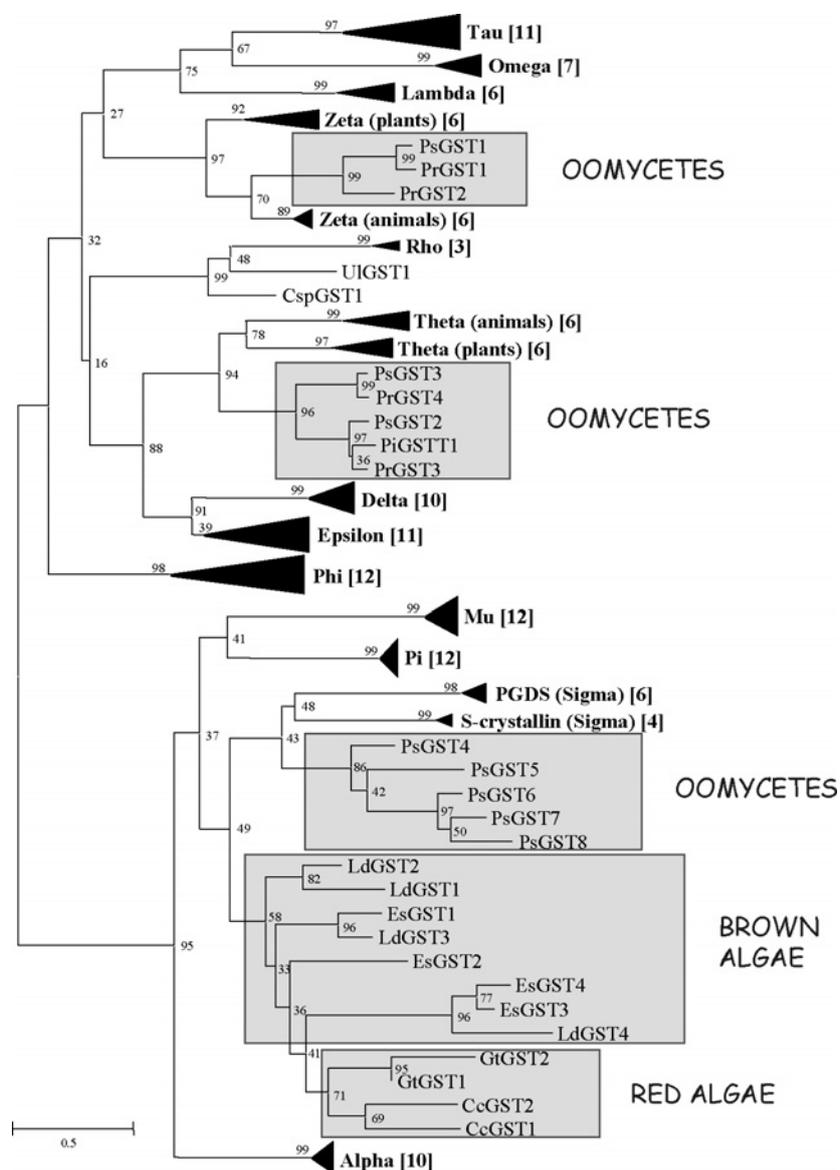
**Figure 1** Alignment of GST amino acid sequences from *C. crispus* and *L. digitata* with mammalian sequences from the Sigma class

Conserved amino acids highlighted in black are identical and those boxed in grey are similar. Known secondary structure of the human sequence HsGSTS1 is shown above the alignment.  $\alpha$ -Helices and  $\beta$ -strands are represented as helices and arrows respectively, and  $\beta$ -turns are marked with TT. Potential catalytically important residues involved in GSH binding are shown as filled arrowheads. This alignment was created using the sequences HsGSTS1 (*Homo sapiens*, GenBank® accession number AAH20734, PDB code 1YI) and RnGSTS1 (*Rattus norvegicus*, GenBank® accession number NP\_113832).



**Figure 2** Exon/intron structure of genes encoding GSTs in *C. crispus* and *L. digitata*

The genomic DNA sequences of coding regions are represented; solid rectangles denote exons.



**Figure 3** Unrooted neighbour-joining phylogenetic tree showing the relationship between GSTs from algae, oomycetes and the major GST classes

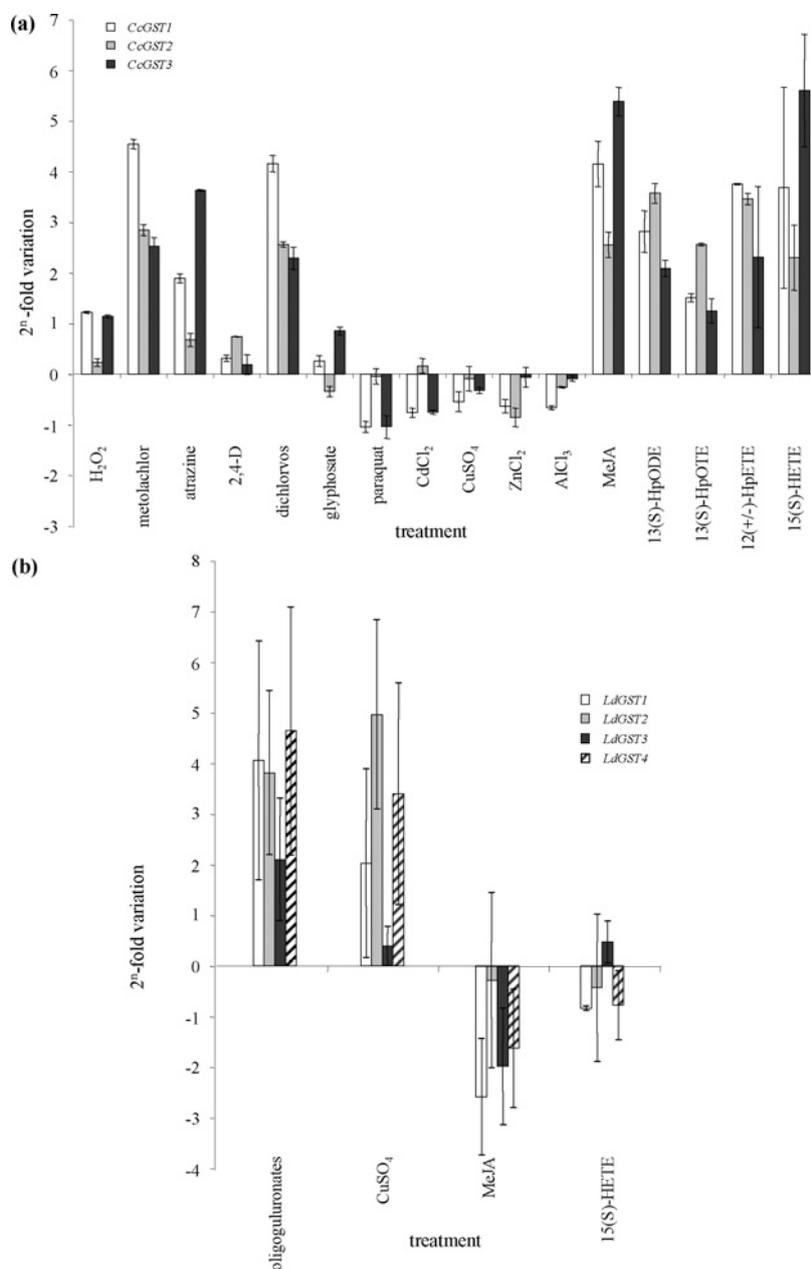
Clustering of proteins into GST classes is indicated. Numbers in square brackets refer to the number of sequences included for each class that have been collapsed in the Figure. The numbers on the branches indicate the percentages of node support from 1000 bootstrap replicates.

for this gene. This could be attributed to the presence of large introns in the sequence.

### Phylogenetic position of algal GSTs

In order to elucidate phylogenetic relationships between the identified algal GSTs with sequences from other organisms, we searched for additional GST genes using genomic resources available for micro- and macro-algae. Among the sequences identified, seven full-length putative cytosolic GST genes that are well supported by ESTs were considered for further analyses. These sequences were as follows: two from *G. tenuistipitata* (Rhodophyta), one from the green macroalga *U. linza* (Chlorophyta), and four for the brown macroalga *Ectocarpus siliculosus* (Phaeophyceae). Details are available from C.B. on request. Sequences from the oomycetes *P. sojae* and *P. ramorum*

were also taken into account. Two other previously identified GST sequences were also included: CspGST1 from the green unicellular alga *Coccomyxa* sp. [24] and PiGST1 from the oomycete *Phytophthora infestans* [25]. The red alga CcGST3 sequence was not included owing to its highly divergent pattern. In total, 155 sequences were integrated in a multiple protein alignment. Several optimal trees were then generated from both distance and maximum likelihood methods, and their topologies were essentially the same, with slight differences observed in the bootstrap values supporting the nodes. The most reliable tree is presented in Figure 3. Two major groups of GST proteins can be established, in agreement with previous studies [26,27]. The first group contains proteins specific to different eukaryotic organisms, as plants (Tau, Lambda and Phi classes), animals (Omega class) and insects (Delta and Epsilon classes). The Zeta and Theta classes have counterparts in plants and animals, and several sequences from the oomycetes *P. sojae* and *P. ramorum*



**Figure 4** Real-time PCR analysis of *C. crispus* and *L. digitata* GST genes after different chemical treatments

The relative gene expression ratios for the GST transcripts were calculated as described in the Experimental section. **(a)** Expression profile of GST transcripts from the red alga *C. crispus*. A set of 16 products was tested, including six pesticides, four heavy metals and five fatty acid derivatives. 2,4-D, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid; (±)12-HpETE, 12-hydroperoxyeicosa-(5Z,8Z,10E,14Z)-tetraenoic acid. **(b)** Expression profile of GST transcripts from the brown alga *L. digitata*. Oligoguluronates, known as endogenous oligosaccharide elicitors, were tested, as well as one heavy metal and two fatty acid derivatives. Results are means ± S.E.M. for two determinations from three independent biological samples.

can also be found close to these classes. This phylogeny confirms that the recently described Rho class, thought to be fish-specific, also contains green algal sequences [24]. The second major group includes the Alpha, Pi, Mu and Sigma classes, primarily encountered in mammals. Most of the newly isolated sequences from this study fall into this group and are closely related to the Sigma GST members. Because of this unexpected distribution, we undertook a more focused phylogenetic analysis, restricted to GSTs of the Alpha, Mu, Pi and Sigma classes and including the 'algae-oomycetes' sequences (see Supplementary Figure S2 at <http://www.BiochemJ.org/bj/412/bj4120535add.htm>). The overall topology already observed in the previous phylogenetic

tree was confirmed and a more detailed analysis is discussed in the Supplementary material.

#### Different transcription patterns for brown and red algal GSTs

In both *C. crispus* and *L. digitata*, GST sequences were identified through analysis of protoplast cDNA libraries and were among the most represented genes, suggesting a possible role of these enzymes in detoxification processes during protoplast generation. Changes in expression of these genes were investigated further under different chemical treatments and after short exposures (Figure 4).

In the red alga *C. crispus*, treatments with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, the auxin analogue 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid) and the herbicide glyphosate showed a slight increase of accumulation in GST transcripts (Figure 4A). Incubation in the presence of the herbicides metolachlor and atrazine, and the insecticide dichlorvos strongly induced expression of the three GST genes. The major effects were observed for *CcGST1* with 23-fold induction by metolachlor and 18-fold induction by dichlorvos. Heavy metals caused a modest repression effect on GST gene transcription, with a maximum of a 2-fold decrease. The most marked effects were observed after incubation in the presence of fatty acid derivatives. MeJA treatment induced a 6–43-fold change in transcript accumulation. Similar ranges of induction were observed with oxylipins, stronger effects being obtained with 13-HpODE on *CcGST2* (12-fold) for the C<sub>18</sub> derivatives, and with 15-HETE on *CcGST3* (80-fold) for the C<sub>20</sub> derivatives.

In the brown alga *L. digitata*, elicitors released after wounding and degradation of the cell wall such as oligoguluronates are recognized as defence signals and induce an oxidative burst in the alga [28]. *LdGST* genes were all induced by the oligoguluronates (4–24-fold), *LdGST4* being the most up-regulated gene (Figure 4B). A similar pattern of variation was obtained in the presence of copper, with *LdGST2* being the most up-regulated (30-fold). In the presence of fatty acid derivatives, slight changes of transcript levels were observed with 15-HETE, whereas MeJA caused a repression with a maximum of a 6-fold decrease for *LdGST1*.

### Biochemical studies of algal GST

In order to investigate the biochemical features and to determine the catalytic properties of the GST enzymes from both algae, the GST genes described in the present paper were assayed for heterologous expression in *E. coli*. Only *CcGST2* and *LdGST3* were selected for further investigation since they were the most highly expressed in the soluble fraction. Migration on SDS/PAGE gels of these enzymes showed that the purified proteins gave single bands of 26 kDa. Gel-filtration chromatography analysis showed a single peak with a molecular mass of 52 kDa for both GSTs, strongly suggesting that the active form of these enzymes exhibits homodimeric structures (see Supplementary Figure S3 at <http://www.BiochemJ.org/bj/412/bj4120535add.htm>).

The catalytic specificities of *CcGST2* and *LdGST3* were explored using a range of GST substrates. In the presence of the commonly used CDNB, the two algal GSTs exhibited moderate transferase activity (Table 1). Higher transferase activities towards several model aryl halide substrates were measured, as illustrated by the results obtained with *CcGST2* in the presence of FDNB (1-fluoro-2,4-dinitrobenzene) (20.34  $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ ). Slight transferase activities were also observed with one aldehyde of the  $\alpha,\beta$ -unsaturated carbonyls, 4-HNE. No activity was detected with the *p*-nitrophenyl acetate substrate. The algal GSTs were also incubated in the presence of the synthetic cumene hydroperoxide and *t*-butyl hydroperoxide substrates to ascertain their glutathione peroxidase activity. Results show that the recombinant enzymes exhibited similar moderate activity to reduce cumene hydroperoxide (Table 1). In addition, both proteins had activity towards hydroperoxides of C<sub>18</sub> polyunsaturated fatty acids (13-HpODE and 13-HpOTE).

The  $K_m$  values of *CcGST2* and *LdGST3* for GSH in the presence of CDNB were calculated to be 0.9 and 1.1 mM respectively (see Supplementary Table S4 at <http://www.BiochemJ.org/bj/412/bj4120535add.htm>). Measurement of GST activity over a wide pH range for the two purified recombinant enzymes indicated that optimal pH was 8 and 10 for *CcGST2* and *LdGST3*

**Table 1 Substrate specificities of the recombinant CcGST2 and LdGST3**

Results are means  $\pm$  S.D. of four determinations.

Substrate	Specific activity ( $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ of protein)	
	CcGST2	LdGST3
<b>Aryl halides</b>		
CDNB	1.56 $\pm$ 0.08	0.98 $\pm$ 0.10
BDNB (1-bromo-2,4-dinitrobenzene)	1.56 $\pm$ 0.08	3.34 $\pm$ 0.04
FDNB	20.34 $\pm$ 0.59	7.44 $\pm$ 0.66
IDNB (1-iodo-2,4-dinitrobenzene)	3.84 $\pm$ 0.12	1.29 $\pm$ 0.11
<i>p</i> -Nitrobenzoyl chloride	Not detected	Not detected
<b><math>\alpha,\beta</math>-Unsaturated carbonyls</b>		
Ethacrynic acid	Not detected	Not detected
<i>trans</i> -4-Phenyl-3-buten-2-one	Not detected	Not detected
4-HNE	0.20 $\pm$ 0.02	0.69 $\pm$ 0.01
<i>trans</i> -2-Nonenal	Not detected	Not detected
<b>Miscellaneous</b>		
<i>p</i> -Nitrophenyl acetate	Not detected	Not detected
<b>Organic hydroperoxides</b>		
Cumene hydroperoxide	0.15 $\pm$ 0.03	0.12 $\pm$ 0.01
<i>t</i> -Butyl hydroperoxide	0.04 $\pm$ 0.01	0.61 $\pm$ 0.12
13-HpODE	0.23 $\pm$ 0.01	0.06 $\pm$ 0.01
13-HpOTE	0.05 $\pm$ 0.01	0.08 $\pm$ 0.01

**Table 2 Inhibitor sensitivities of recombinant CcGST2 and LdGST3**

Results are means of four determinations.

Compound	Inhibitor concentration range ( $\mu\text{M}$ )	IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{M}$ )	
		CcGST2	LdGST3
Cibacron Blue	0–10	0.5	0.1
Chenodeoxycholic acid	0–1000	564	93
Lithocholic acid	0–1000	119	83
Indomethacin	0–1000	623	71
Acetylsalicylic acid	0–1000	>1000	>1000

respectively (see Supplementary Figure S4 at <http://www.BiochemJ.org/bj/412/bj4120535add.htm>).

To complete these data, inhibition assays were also performed, and results are presented in Table 2. Cibacron Blue, a typical ligandin-type inhibitor, showed the most potent inhibition effect (IC<sub>50</sub> of 0.5 and 0.1  $\mu\text{M}$  for *CcGST2* and *LdGST3* respectively), whereas chenodeoxycholic acid, lithocholic acid, indomethacin and acetylsalicylic acid did not show any marked inhibition effect on the activity of either enzyme.

### DISCUSSION

The soluble GSTs constitute a widespread enzyme superfamily that has been subdivided into an ever-increasing number of classes [29]. Although there are no clearly established criteria concerning the extent of sequence similarity required for placing a GST in a particular class, it is generally accepted that GSTs of the same class share more than  $\sim$ 50% sequence identity, whereas GSTs of different classes share less than  $\sim$ 30% identity [23,30]. Some of these classes are ubiquitous all the way up to the kingdom level, whereas others are found exclusively in particular groups of organisms such as mammals, plants or insects. As large-scale EST and genomic approaches are being applied to previously uninvestigated phyla, new GST genes and even new GST classes are being discovered. In the present study, we have identified

and characterized GST genes from two independent eukaryotic lineages: the Rhodophyta (red algae) and the Heterokonta (brown algae and oomycetes).

The phylogenetic analyses showed that the GST sequences from the red and brown algae, along with some oomycetes, fall into a distinctive newly identified group. Within this new cluster, sequences may be assigned to several subgroups: GtGST (from *G. tenuistipitata*) sequences are closely related to CcGST sequences, whereas EsGST3 and EsGST4 (from *Ectocarpus siliculosus*) and LdGST4 group together; LdGST1, LdGST2, LdGST3 and EsGST1 appear to form another group. This grouping is supported further by evidence for distinct gene structures. The *LdGST1*, *LdGST2* and *LdGST3* genes are intronless, whereas *CcGST1* and *CcGST2* genes contain a single intron, and the *LdGST4* gene has three introns. In addition, it is interesting to note that the brown algal sequences appear to be more closely related to the red algal enzymes than to the *P. sojae* sequences. Considering the common evolutionary history of oomycetes and brown algae in the heterokont lineage, their respective GST members were expected to group in the same cluster. The divergence among the sequences identified in the present study is also illustrated by long branch lengths, of great magnitude compared with the Alpha, Mu and Pi class clusters whose members are much more closely related to each other. This higher evolutionary rate may also reflect an adaptive response to habitat. It is tempting to suggest that this unexpected topology results from convergent evolution of algal enzymes in response to a specific adaptation to the marine environment.

This new set of GSTs are closely related to the Sigma GST enzymes which is encountered in both vertebrates and invertebrates, whereas the Alpha, Pi and Mu members are found only in vertebrates [31]. It was initially suggested that the Alpha class enzymes were the oldest members of this clade and that they had been subsequently lost in invertebrates [9,29,31]. In contrast, Frova [23] recently proposed that the Sigma class GSTs diverged before the Alpha, Mu and Pi group, and has evolved distinct functional properties in the diverse lineages. The occurrence of sequences closely linked to the Sigma class GSTs in algae and oomycetes supports this last hypothesis, suggesting that the entire Sigma class emerged before the eukaryotes split and diverged extensively later in independent lineages.

Among the GST genes isolated from the red algae, CcGST3 represents an intriguing sequence. It exhibits only low similarity with other GSTs from an algal origin. No intron was found in its gene sequence. Despite the fact that we cannot rule out a bacterial origin for this GST, several observations point towards CcGST3 being an endogenous algal sequence: a poly(A) tail is present at the end of the corresponding mRNA and the likely active-site residues of the encoded protein may be different from the ones encountered in prokaryotic GSTs. Indeed, GSH binding is known to involve a conserved cysteine residue in the N-terminal portion of the bacterial GSTs. Although no such residue is found in the putative GSH-binding domain of CcGST3 (see Supplementary Figure S1), two tyrosine residues are encountered in its N-terminal portion which may play this role. In addition, and as discussed below, *CcGST3* follows a transcription pattern similar to that of other *CcGSTs* and is sometimes the most affected during the treatments.

Biotic stress and chemicals are known to affect the expression of GSTs at the transcriptional level [1], therefore transcript accumulations for *C. crispus* and *L. digitata* genes were determined in response to various treatments. The seven identified genes were constitutively expressed in the two algae. The basal levels of expression were lower for the *LdGST* genes than for the *CcGST* genes. *CcGST2* was expressed at the same level as

the housekeeping gene actin, indicating that this GST protein plays a major role in the basic metabolism of *C. crispus*. *CcGST* genes were highly induced by the herbicides atrazine and metolachlor and the insecticide dichlorvos. This increase in gene expression was correlated with a higher GST activity in total extracts of the red alga treated for 24 h with metolachlor and dichlorvos (results not shown). The red macroalgae may therefore have the potential to remove xenobiotic pollutants from their environment.

In contrast with these results and considering what is known in higher plants [32], heavy metals such as cadmium, copper, zinc and aluminium caused a decrease in expression of the three *CcGST* genes. Opposite results were observed for the *LdGST* genes during treatment with CuSO<sub>4</sub>. Incubation of *L. digitata* sporophytes with oligoguluronates resulted in a strong induction of its GST genes. These oligosaccharides are recognized as endogenous elicitors by the alga, inducing oxidative burst production as part of the active defence system [28]. Copper has also been shown to activate transient massive release of reactive oxygen species in this alga (results not shown). Therefore the accumulation of *LdGST* transcripts may be mediated through induced H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production. This hypothesis is not relevant for *C. crispus*, since application of an oxidative stress seems to have almost no effect on the accumulation of *CcGST* transcripts.

Interestingly, contrasting results were also obtained for GST from both algae in the presence of oxylipins derived from C<sub>18</sub> and C<sub>20</sub> polyunsaturated fatty acids. Several oxylipin structures have been described so far in marine algae, some of them being closely related to, and even identical with, those identified in terrestrial plants (C<sub>18</sub> derivatives) [33] and mammals (C<sub>20</sub> derivatives) [34]. Their biological functions remain elusive, despite the fact that some of them have been demonstrated to act as potential defence and signalling mediators in red marine alga [35]. The present study has demonstrated that C<sub>18</sub> and C<sub>20</sub> oxylipins greatly increased levels of *CcGST* transcripts, confirming previous results obtained after treatment of *C. crispus* with MeJA. The precise roles of CcGST during these treatments are unknown. They may be expressed as active participants in a more global defence response to detoxify by-products released during biotic stresses. However, they could also have a more dedicated function, such as a potential involvement in fatty acid and oxylipin metabolism. Since the oxylipins tested had the opposite effect on *LdGST* genes, these molecules may have different roles in the two algae, and/or GSTs may not drive similar processes in the two lineages.

It is also worth noting that, despite structural differences in gene organization among GST genes within a species, all GSTs from the same alga exhibited a similar transcription profile. This probably suggests functional convergence of these enzymes within a species and their importance in specific metabolic pathways. Further experiments are required to identify the biological significance of this result.

Expression and purification of recombinant CcGST and LdGST enzymes in *E. coli* made it possible to characterize the properties of these proteins. The catalytic profile of CcGST2 was similar to that of LdGST3, but the red alga GST showed greater activity towards FDNB substrates. In contrast, LdGST3 exhibited a higher transferase activity in the presence of 4-HNE, an electrophilic end-product of lipid peroxidation. Both enzymes have no activity on the related compound *trans*-2-nonenal. In addition to their GST activity, both enzymes are able to reduce organic hydroperoxides of fatty acids. This peroxidase activity might play a role in the algae during oxidative stress, in preventing the production of cytotoxic aldehydes from the organic hydroperoxides. *K<sub>m</sub>* values for algal GSTs illustrate a moderate affinity for the substrate GSH. These results are, however, in agreement with published *K<sub>m</sub><sup>GSH</sup>* values for other GSTs [24,36–38].

In addition to detoxifying electrophilic compounds, there is growing evidence that GST members carry out additional functions. The GST activities are quite diverse, not only between, but also within classes, as demonstrated for members of the Sigma class. For example, in cephalopods, S-crystallin proteins are highly abundant in eye lenses, and have lost their GST activity owing to insertion of 11 residues between the conserved  $\alpha 4$  and  $\alpha 5$  helices [39]. In *Drosophila melanogaster*, Sigma-type GSTs have considerable activities towards  $\alpha, \beta$ -unsaturated carbonyl compounds derived from secondary lipid peroxidation [40]. In vertebrates, they are known as glutathione-dependent PGDSs (prostaglandin D synthases), catalysing the isomerization of prostaglandin H<sub>2</sub> to prostaglandin D<sub>2</sub> [21]. This activity is also conserved in the Sigma GST from the parasitic flatworms *Schistosoma* [41], despite their distinct phylogenetic position.

We described previously the production of cyclopentenonic prostaglandins of the A<sub>2</sub>, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> and E<sub>2</sub> series after various treatments in *C. crispus* [35]. In mammals, these molecules are produced by cyclo-oxygenases [42], and pharmacological studies have shown that acetylsalicylic acid and indomethacin specifically inhibit these enzymes [43]. In the red alga, the enzymatic machinery involved in the production of prostaglandins remains elusive. However, synthesis of these cyclopentenones in *C. crispus* is strongly affected in the presence of Cibacron Blue, while no alteration was monitored in the presence of either indomethacin or acetylsalicylic acid (results not shown). Interestingly, similar inhibitor action has been observed on CcGST2 activity. Therefore we are currently undertaking further experiments to determine whether this GST might play a role in prostaglandin synthesis in *C. crispus*.

To conclude, the increasing number of genomic projects dealing with previously uninvestigated lineages will probably greatly modify our current knowledge on the evolution diversity and function of GSTs in the near future. As illustrated in the present study with GSTs characterized from *C. crispus* and *L. digitata*, the challenge lies in identifying their functions, not necessarily associated with detoxification. Further investigations into these proteins, including structural biology approaches, may provide some clues to the catalytic specificities and physiological functions of these enzymes in macroalgae.

C. H. was supported by a BDI fellowship from the CNRS (Centre National de la Recherche Scientifique). P.-O.deF. was supported by the French Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche. We thank Dr G. Michel (UMR 7139 Végétaux Marins et Biomolécules) for technical support and helpful advice on structural alignment analyses. We are grateful to Dr F. Morel (INSERM U620, Université de Rennes 1, Rennes, France) for supplying GST substrates as well as for valuable discussion, and to Dr M.J. Cook (UMR 7139 Végétaux Marins et Biomolécules) for providing access to the *E. siliculosus* EST database. Part of this work was performed within the framework of the 'Marine Genomics Europe' NoE (Network of Excellence) (European Commission contract No. GOCE-CT-2004-505403).

## REFERENCES

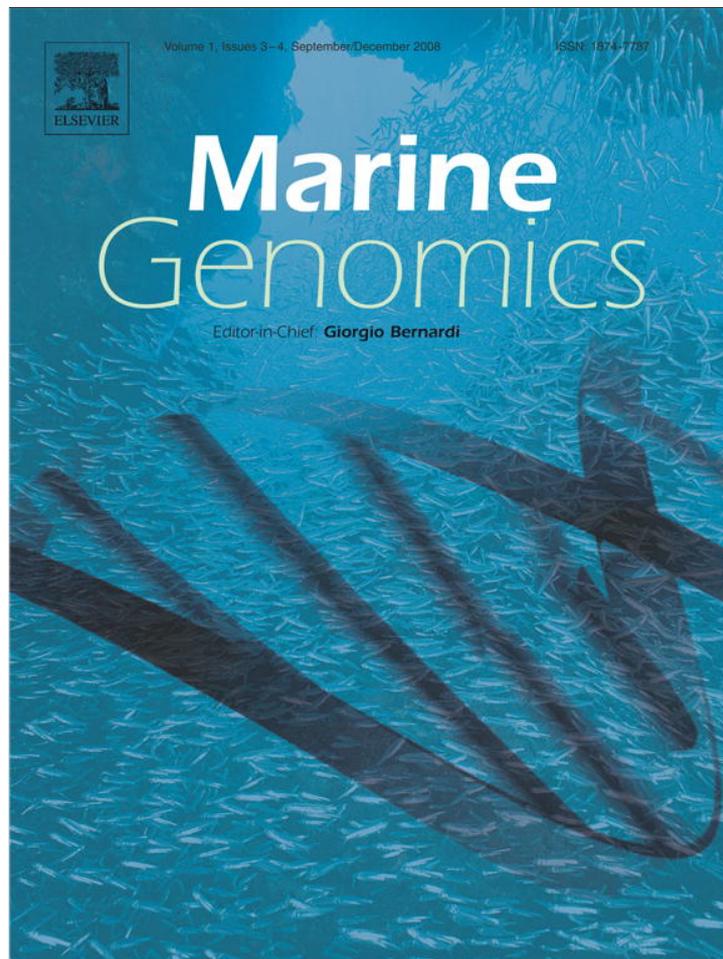
- Dixon, D. P., Laphorn, A. and Edwards, R. (2002) Plant glutathione transferases. *Genome Biol.* **3**, REVIEWS3004
- Roxas, V. P., Lodhi, S. A., Garrett, D. K., Mahan, J. R. and Allen, R. D. (2000) Stress tolerance in transgenic tobacco seedlings that overexpress glutathione S-transferase/glutathione peroxidase. *Plant Cell Physiol.* **41**, 1229–1234
- Thom, R., Dixon, D. P., Edwards, R., Cole, D. J. and Laphorn, A. J. (2001) The structure of a Zeta class glutathione S-transferase from *Arabidopsis thaliana*: characterisation of a GST with novel active-site architecture and a putative role in tyrosine catabolism. *J. Mol. Biol.* **308**, 949–962
- Mueller, L. A., Goodman, C. D., Slady, R. A. and Walbot, V. (2000) AN9, a *Petunia* glutathione S-transferase required for anthocyanin sequestration, is a flavonoid-binding protein. *Plant Physiol.* **123**, 1561–1570
- Gong, H., Jiao, Y., Hu, W. W. and Pua, E. C. (2005) Expression of glutathione-S-transferase and its role in plant growth and development *in vivo* and shoot morphogenesis *in vitro*. *Plant Mol. Biol.* **57**, 53–66
- Pearson, W. R. (2005) Phylogenies of glutathione transferase families. *Methods Enzymol.* **401**, 186–204
- Ranson, H., Rossiter, L., Ortell, F., Jensen, B., Wang, X., Roth, C. W., Collins, F. H. and Hemingway, J. (2001) Identification of a novel class of insect glutathione S-transferases involved in resistance to DDT in the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Biochem. J.* **359**, 295–304
- Rossjohn, J., Polekhina, G., Feil, S. C., Allocati, N., Masulli, M., Ilio, C. D. and Parker, M. W. (1998) A mixed disulfide bond in bacterial glutathione transferase: functional and evolutionary implications. *Structure* **6**, 721–734
- Armstrong, R. N. (1997) Structure, catalytic mechanism, and evolution of the glutathione transferases. *Chem. Res. Toxicol.* **10**, 2–18
- Baldauf, S. L., Roger, A. J., Wenk-Siefert, I. and Doolittle, W. F. (2000) A kingdom-level phylogeny of eukaryotes based on combined protein data. *Science* **290**, 972–977
- Collén, J., Roeder, V., Rousvoal, S., Collin, O., Kloareg, B. and Boyen, C. (2006) An expressed sequence tag analysis of thallus and regenerating protoplasts of *Chondrus crispus* (Gigartinales, Rhodophyceae). *J. Phycol.* **42**, 104–112
- Roeder, V., Collén, J., Rousvoal, S., Corre, E., Leblanc, C. and Boyen, C. (2005) Identification of stress genes transcripts in *Laminaria digitata* (Phaeophyceae) protoplast cultures by expressed sequence tag analysis. *J. Phycol.* **41**, 1227–1235
- Correa, J. A., Nielsen, R. and Grund, D. W. (1988) Endophytic algae of *Chondrus crispus* (Rhodophyta). II. *Acrochaete heteroclada* sp. nov., *A. operculata* sp. nov., and *Phaeophyla dendroides* (Chlorophyta). *J. Phycol.* **24**, 528–539
- Boyen, C., Kloareg, B., Polne-Fuller, M. and Gabor, A. (1990) Preparation of alginatase from marine molluscs for protoplast isolation in brown algae. *Phycologia* **29**, 173–181
- Hervé, C., Tonon, T., Collén, J., Corre, E. and Boyen, C. (2006) NADPH oxidases in Eukaryotes: red algae provide new hints! *Curr. Genet.* **49**, 190–204
- Collén, J., Hervé, C., Guisle-Marsollier, I., Leger, J. J. and Boyen, C. (2006) Expression profiling of *Chondrus crispus* (Rhodophyta) after exposure to methyl jasmonate. *J. Exp. Bot.* **57**, 3869–3881
- Edgar, R. C. (2004) MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* **32**, 1792–1797
- Kumar, S., Tamura, K. and Nei, M. (2004) MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Brief. Bioinformatics* **5**, 150–163
- Guindon, S., Lethiec, F., Duroux, P. and Gascuel, O. (2005) PHYML Online: a web server for fast maximum likelihood-based phylogenetic inference. *Nucleic Acids Res.* **33**, W557–W559
- Studier, F. W. (2005) Protein production by auto-induction in high density shaking cultures. *Protein Expression Purif.* **41**, 207–234
- Thomson, A. M., Meyer, D. J. and Hayes, J. D. (1998) Sequence, catalytic properties and expression of chicken glutathione-dependent prostaglandin D<sub>2</sub> synthase, a novel class Sigma glutathione S-transferase. *Biochem. J.* **333**, 317–325
- Alin, P., Danielson, U. H. and Mannervik, B. (1985) 4-Hydroxyalk-2-enals are substrates for glutathione transferase. *FEBS Lett.* **179**, 267–270
- Frova, C. (2006) Glutathione transferases in the genomics era: new insights and perspectives. *Biomol. Eng.* **23**, 149–169
- Konishi, T., Kato, K., Araki, T., Shiraki, K., Takagi, M. and Tamaru, Y. (2005) A new class of glutathione S-transferase from the hepatopancreas of the red sea bream *Pagrus major*. *Biochem. J.* **388**, 299–307
- Bryant, D., Cummins, I., Dixon, D. P. and Edwards, R. (2006) Cloning and characterization of a Theta class glutathione transferase from the potato pathogen *Phytophthora infestans*. *Phytochemistry* **67**, 1427–1434
- Marco, A., Cuesta, A., Pedrola, L., Palau, F. and Marin, I. (2004) Evolutionary and structural analyses of GDAP1, involved in Charcot-Marie-Tooth disease, characterize a novel class of glutathione transferase-related genes. *Mol. Biol. Evol.* **21**, 176–187
- Snyder, M. J. and Maddison, D. R. (1997) Molecular phylogeny of glutathione-S-transferases. *DNA Cell Biol.* **16**, 1373–1384
- Kupper, 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**, 278–291
- Sheehan, D., Meade, G., Foley, V. M. and Dowd, C. A. (2001) Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. *Biochem. J.* **360**, 1–16
- Hayes, J. D., Flanagan, J. U. and Jewsey, I. R. (2005) Glutathione transferases. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **45**, 51–88
- Pearson, W. R. (2005) Phylogenies of glutathione transferase families. *Methods Enzymol.* **401**, 186–204
- Elbekai, R. H. and El-Kadi, A. O. (2004) Modulation of aryl hydrocarbon receptor-regulated gene expression by arsenite, cadmium, and chromium. *Toxicology* **202**, 249–269

- 33 Krupina, M. and Dathe, W. (1991) Occurrence of jasmonic acid in the red alga *Gelidium latifolium*. *Z. Naturforsch. C J. Biosci.* **46**, 1127–1129
- 34 Sajiki, J. and Kakimi, H. (1998) Identification of eicosanoids in the red algae, *Gracilaria asiatica*, using high-performance liquid chromatography and electrospray ionization mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **795**, 227–237
- 35 Bouarab, K., Adas, F., Gaquerel, E., Kloareg, B., Salaun, J. P. and Potin, P. (2004) The innate immunity of a marine red alga involves oxylipins from both the eicosanoid and octadecanoid pathways. *Plant Physiol.* **135**, 1838–1848
- 36 Park, H. J., Cho, H. Y. and Kong, K. H. (2005) Purification and biochemical properties of glutathione S-transferase from *Lactuca sativa*. *J. Biochem. Mol. Biol.* **38**, 232–237
- 37 Urade, Y., Fujimoto, N., Ujihara, M. and Hayaishi, O. (1987) Biochemical and immunological characterization of rat spleen prostaglandin D synthetase. *J. Biol. Chem.* **262**, 3820–3825
- 38 Zeng, Q. Y., Lu, H. and Wang, X. R. (2005) Molecular characterization of a glutathione transferase from *Pinus tabulaeformis* (Pinaceae). *Biochimie* **87**, 445–455
- 39 Chang, H. C., Lin, T. L. and Chang, G. G. (2000) Molecular basis for the polymerization of octopus lens S-crystallin. *Biophys. J.* **78**, 2070–2080
- 40 Agianian, B., Tucker, P. A., Schouten, A., Leonard, K., Bullard, B. and Gros, P. (2003) Structure of a *Drosophila* Sigma class glutathione S-transferase reveals a novel active site topography suited for lipid peroxidation products. *J. Mol. Biol.* **326**, 151–165
- 41 Johnson, K. A., Angelucci, F., Bellelli, A., Herve, M., Fontaine, J., Tsernoglou, D., Capron, A., Trottein, F. and Brunori, M. (2003) Crystal structure of the 28 kDa glutathione S-transferase from *Schistosoma haematobium*. *Biochemistry* **42**, 10084–10094
- 42 Funk, C. D. (2001) Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. *Science* **294**, 1871–1875
- 43 Simmons, D. L., Botting, R. M. and Hla, T. (2004) Cyclooxygenase isozymes: the biology of prostaglandin synthesis and inhibition. *Pharmacol. Rev.* **56**, 387–437

Received 25 October 2007/3 March 2008; accepted 4 March 2008

Published as BJ Immediate Publication 4 March 2008, doi:10.1042/BJ20071464

Provided for non-commercial research and education use.  
Not for reproduction, distribution or commercial use.



This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/copyright>



Contents lists available at ScienceDirect

Marine Genomics

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

## Whole genome survey of the glutathione transferase family in the brown algal model *Ectocarpus siliculosus*<sup>☆</sup>

Pierre-Olivier de Franco<sup>a,b</sup>, Sylvie Rousvoal<sup>a,b</sup>, Thierry Tonon<sup>a,b,\*</sup>, Catherine Boyen<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup> UPMC Univ Paris 6, UMR 7139 Végétaux Marins et Biomolécules, Station Biologique, F 29682, Roscoff, France

<sup>b</sup> CNRS, UMR 7139 Végétaux Marins et Biomolécules, Station Biologique, F 29682, Roscoff, France

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 14 November 2008

Received in revised form 27 January 2009

Accepted 28 January 2009

#### Keywords:

Marine algae  
Stress response  
GST  
Sigma class  
Kappa class  
MAPEG  
Evolution  
Oxylipins

### ABSTRACT

We report here an exhaustive analysis of the glutathione transferases (GSTs) in the model brown alga *Ectocarpus siliculosus* using available genomic resources. A genome survey revealed the presence of twelve cytosolic GSTs, belonging to the Sigma class, two pseudogenes, one GST of the Kappa class, and three microsomal GSTs of the MGST3 family of membrane associated protein involved in eicosanoid and glutathione metabolism. Gene structure and phylogenetic analyses demonstrated the partition of the Sigma GSTs into two clusters which have probably evolved by duplication events. Gene expression profiling was conducted after the addition of high concentrations of chemicals, such as H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, herbicides, heavy metals, as well as fatty acid derivatives, in order to induce stress conditions and to monitor early response mechanisms. The results of these experiments suggested that *E. siliculosus* GST genes are recruited in different and specific conditions. In addition, heterologous expression in yeast of two *E. siliculosus* microsomal GST showed that these enzymes feature peroxidase rather than transferase activity. The potential involvement of *E. siliculosus* GST in the metabolism of oxygenated polyunsaturated fatty acids is discussed.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

Since the discovery in 1961 of the glutathione conjugation of xenobiotics compounds in rat liver (Booth et al., 1961; Combes and Stakelum, 1961), hundreds of glutathione transferases (GSTs, EC 2.5.1.18) have been identified in prokaryotes and eukaryotes. GSTs are the principal enzymes of the phase II detoxification process in plants and animals. Their main activity is to conjugate the tripeptide

glutathione (GSH:  $\gamma$ -Glu-Cys-Gly) with compounds containing an electrophilic center (Armstrong, 1997), forming more soluble, non-toxic peptide derivatives that are excreted or compartmentalised by phase III enzymes (Ishikawa, 1992; Coleman et al., 1997). Some GSTs also feature peroxidase, isomerase and thiol transferase activities (Bartling et al., 1993; Fernandez-Canon and Penalva, 1998; Board et al., 2000), or non-catalytic functions such as ligandins, or as modulators of signalling processes (Marrs, 1996; Monaco et al., 1999; Cho et al., 2001). The role of GSTs as enzymes detoxifying xenobiotics has been extended to the metabolism of endogenous compounds, such as prostaglandins and leukotrienes synthesis (Kanaoka et al., 1997; Jakobsson et al., 1999; Jowsey et al., 2001), and to the catabolism of aromatic amino acids (Thom et al., 2001).

In eukaryotes, three main families of GSTs are generally recognised: the cytosolic, the mitochondrial and the microsomal glutathione transferases (Hayes et al., 2005). Cytosolic GSTs are 25 kDa proteins, active in dimer form, and grouped in several classes based on sequence similarity. Alpha, Mu, Pi, Omega and Sigma classes are only found in animals (Pearson, 2005), while the Theta and Zeta classes also have members in plants and other organisms (Board et al., 1997; Sheehan et al., 2001). The Lambda, Phi and Tau classes are plant specific (Dixon et al., 2002; Soranzo et al., 2004), and the Delta and Epsilon classes are only encountered in insects (Sawicki et al., 2003; Ranson and Hemingway, 2005). The recently described Rho class has been reported to be specific to fish (Konishi et al., 2005). The Gamma and Nu classes are found in fungi and nematodes, respectively (Cha

**Abbreviations:** CDNB, 1-Chloro-2,4-dinitrobenzene; CuOOH, Cumene hydroperoxide; CDS, Coding sequence; EST, Expressed sequence tag; FLAP, 5-Lipoxygenase activating protein; GSH, Glutathione; GST, Glutathione transferase; 15-HETE, 15S-hydroxy-5Z,8Z,11Z,13E-eicosatetraenoic acid; 4-HNE, 4-Hydroxynonenal; 13-HpOTrE, 13S-hydroperoxy-9Z,11E,15Z-octadecatrienoic acid; LTC<sub>4</sub>, Leukotrienes C<sub>4</sub> synthase; MAPEG, Membrane associated protein involved in eicosanoid and glutathione metabolism; MeJA, Methyl jasmonate; mGST, Microsomal glutathione transferase; PAM, Point accepted mutation; PG, Prostaglandin; PGDS, Prostaglandin D synthase; qPCR, Quantitative polymerase chain reaction; UPGMA, Unweighted pair group method with arithmetic mean.

<sup>☆</sup> The *Ectocarpus siliculosus* GST sequences used in this study have been deposited under the accession number FP089530 (EsGSTS1), FP089529 (EsGSTS2), FP089528 (EsGSTS3), FP089527 (EsGSTS4), FP089526 (EsGSTS5), FP089525 (EsGSTS6), FP089524 (EsGSTS7), FP089522 (EsGSTS8a), FP089523 (EsGSTS8b), FP089521 (EsGSTS10), FP089520 (EsGSTS11), FP089519 (EsGSTS12), FP089518 (EsGSTK1), FP089517 (mEsGST1), FP089516 (mEsGST2), FP089515 (mEsGST3).

\* Corresponding author. Station Biologique, Place Georges Teissier, BP 74, 29682 Roscoff Cedex, France. Tel.: +33 02 98 29 23 30; fax: +33 02 98 29 23 85.

E-mail address: [tonon@sb-roscoff.fr](mailto:tonon@sb-roscoff.fr) (T. Tonon).

et al., 2002; Schuller et al., 2005). The mitochondrial GSTs refer to the Kappa class (Pemble et al., 1996), and evidence of peroxisomal location for some members of this class has been demonstrated (Morel et al., 2004). The microsomal GSTs belong to the superfamily of membrane associated proteins in eicosanoid and glutathione metabolism (MAPEG). The MAPEG superfamily contains structurally related membrane proteins with diverse functions. Members have been found in mammals, plants, fungi and bacteria (Jakobsson et al., 1999). MAPEG superfamily proteins are involved in detoxification processes and also in specific biosynthetic pathways of arachidonic acid metabolism. They are small proteins with an average length of 150 amino acids. They possess four membrane spanning domains and are active as homotrimers (Schmidt-Krey et al., 2000). Eukaryotic MAPEG are divided into six families: the microsomal glutathione transferase (MGST) 1, 2 and 3, the leukotrienes C4 synthase (LTC4), the 5-lipoxygenase activating protein (FLAP) and the prostaglandin E synthase (Bresell et al., 2005).

The filamentous marine brown alga *Ectocarpus siliculosus* (Phaeophyceae) belongs to the heterokonts, that also comprise diatoms and oomycetes, and is only distantly related to the well studied eukaryotic lineages of animals, fungi and green plants (Baldauf, 2003). Most brown algae are living in the intertidal zone where they are subjected to rapid and frequent variation in temperature, salinity and irradiance (Dring, 2006), and must often adapt to pollutions generated by human activities. Brown algae display various original metabolic, physiological, cellular and ecological characteristics (Bartsch et al., 2008; Charrier et al., 2008) probably developed during their independent evolutionary history. As an illustration, these organisms are able to produce both C18- (plant like) and C20- (animal like) oxygenated polyunsaturated fatty acid derivatives, known as oxylipins (Gerwick et al., 1999; Bouarab et al., 2004; Küpper et al., 2006; Ritter et al., 2008). Glutathione transferases of algae have been considered as biomarkers of environmental pollution, and GST activities toward xenobiotics have been measured in seaweeds exposed to abiotic stress (Pflugmacher et al., 2000; Cairrao et al., 2004).

The abundance of GST genes in stress cDNA libraries produced from the red alga *Chondrus crispus* (Collén et al., 2006) and the brown alga *Laminaria digitata* (Roeder et al., 2005) prompted us to characterize more in details some of these members. In a previous study based on a limited number of macroalgal sequences (Hervé et al., 2008), we demonstrated that these cytosolic GSTs are closely related to the Sigma class, previously only known from animals. The development of *E. siliculosus* as a genetic and genomic model for the brown algae (Peters et al., 2004; Charrier et al., 2008) gave access to the full genome sequence and to a collection of more than 90,000 ESTs. These new resources allowed us to carry out a whole genome survey and to perform an exhaustive inventory of gene families.

In this study, we report the analysis of the *E. siliculosus* GST (*EsGST*) multigenic family. The brown algal GSTs are compared to other sequenced genomes. The *EsGST* genes have been allocated in the diverse GST classes (cytosolic, Kappa, and MAPEG) according to their sequences, structures and phylogenetic position. Genomic location and gene organization have also been determined to further explore the evolution of this gene family. In addition, functional characterization of *EsGSTs* has been established by determining gene expression profiles of several GSTs under various chemical treatments, and by measuring the enzymatic activity of recombinant microsomal *EsGSTs*.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Algal material and cultivation treatments

The *E. siliculosus* (Ectocarpales, Phaeophyceae) strain 32 (CCAP accession 1310/4, origin San Juan de Marcona, Peru) was cultivated in 10 L plastic flasks at 14 °C using filtered and autoclaved natural

seawater enriched with Provasoli nutrients (Starr and Zeikus, 1993). Light was provided by Philips daylight fluorescence tubes with a photon flux density of 40  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  for 14 h/day. Cultures were bubbled with filtered air to avoid CO<sub>2</sub> depletion.

The chemical treatment experiments were performed in Petri dishes containing artificial seawater enriched with Provasoli. The algae were acclimatized for at least 18 h before treatments. They were then treated for 3 and 6 h with 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 0.83 mM NaN<sub>3</sub>, 10  $\mu\text{M}$  CuSO<sub>4</sub>, 10  $\mu\text{M}$  ZnSO<sub>4</sub>, 1 mM glyphosate, 1 mM equivalent glyphosate of a commercial formulated solution or 100  $\mu\text{M}$  methyl jasmonate (MeJA). Algae were also incubated during 3 h with 5  $\mu\text{M}$  13-HpOTrE, and 15-HETE. An equal volume of solvent was used in each corresponding control treatment. At least three biological replicates were performed for each treatment and for total RNA or protein extraction.

### 2.2. Nucleic acid extractions, cDNA synthesis and real time PCR

DNA and RNA extraction were carried out as described by Le Bail et al. (2008). From each RNA sample, 1.4  $\mu\text{g}$  was reverse transcribed to cDNA using oligo(dT)<sub>12–18</sub> and the Improm II Reverse transcription System (Promega, France) according to the manufacturer's instructions. First strand cDNAs were subsequently diluted with nuclease free water to a final concentration of 1 ng  $\mu\text{l}^{-1}$ .

For each gene, a pair of oligonucleotide sequences was designed in the 3'-end of the coding sequence using Beacon Designer 5.0 (Premier Biosoft International, USA). The oligonucleotide sequences are presented in supplementary Table S1. The qPCR reactions were performed and analysed as previously described by Le Bail et al. (2008). The reference genes used were the elongation factor 1 alpha (*EsEF1a*) and the tubulin alpha 2 (*EsTUA*), and relative changes in the *EsGST* mRNA expression were calculated as fold changes relative to the appropriate control experiment.

### 2.3. Protein extraction and GST activity

Approximately 0.5 g of fresh weight tissue was ground in liquid nitrogen and mixed with 0.5 mL of extraction buffer (25 mM MOPS pH 7.2, 15 mM MgCl<sub>2</sub>, 15 mM EGTA, 1 mM DTT, and 0.5% of PVP with an antiproteases cocktail (Roche, France)). Extracts were homogenised for 1 h at 4 °C and centrifuged at 10,000 g for 30 min. The supernatant was collected and total proteins content was quantified (Bradford, 1976). The conjugation activity of total protein extract toward CDNB was measured at 340 nm in a microplate Safire<sup>2</sup> UV spectrophotometer reader (Tecan, Switzerland). The reaction mix of 250  $\mu\text{L}$  contained 90  $\mu\text{L}$  of total protein extract (approximately 10  $\mu\text{g}$  of total proteins), 150  $\mu\text{L}$  of 120 mM Na phosphate buffer pH 7.5, 5  $\mu\text{L}$  of 50 mM GSH and 5  $\mu\text{L}$  of 50 mM CDNB. Assays were conducted at 30 °C and measures were performed every 20 s during 10 min. Spontaneous conjugation was measured in boiled extracts and subtracted from the overall reaction rate. Activities were expressed as nmol min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> of protein.

### 2.4. Screening of databases and sequence analysis

The exhaustive inventory of the glutathione transferase genes of *E. siliculosus* was carried out by BLAST search of the *E. siliculosus* EST database ([http://www.sb-roscoff.fr/SIG/blast/blast\\_private.html](http://www.sb-roscoff.fr/SIG/blast/blast_private.html)) and of the genome sequence (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/bogas/>, version 1 of the genome CDS prediction) with known GST sequences, including those from *L. digitata* and *C. crispus*. The identified cDNA (EST) and gDNA (supercontigs) sequences were loaded in Vector NTi software (Li and Moriyama, 2004). Gene structure was determined by alignment of cDNA and gDNA using Sim4 algorithm. When genes were not represented in the EST database, gene structures were manually refined considering the

5'GT–3'AG rule and by translating the individual exons. Percentages of identity between amino acids sequences have been evaluated using MatGAT 2.02 program downloaded at <http://www.bitincka.com/ledion/matgat/>. Protein alignments with secondary structures elements have been realised with the ClustalW2 program at <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>, improved manually with BioEdit (Hall, 1999) considering a structural alignment of GST proteins with resolved structure from the Alpha, Pi and Sigma classes, and edited with EsPript at <http://espript.ibcp.fr/ESPrIPT/ESPrIPT/>.

### 2.5. Phylogenetic analysis

Multiple protein alignments were performed with the ClustalW program and analysed using the neighbor-joining, the minimum evolution, the UPGMA and the maximum parsimony methods with the Mega 4.0 program (Tamura et al., 2007). In addition, the maximum likelihood analysis was performed using the suite of programs available at <http://www.phylogeny.fr/> (Dereeper et al., 2008). All distance-derived trees have been built using the amino acid substitution PAM matrix and the robustness of the branches was evaluated using 500 bootstraps replicates. Sequences selected from public databases and used for the phylogenetic analysis are listed in supplementary Table S2. Additional macroalgae GST sequences were retrieved from the website [http://gracilaria.ib.usp.br/cgi-bin/gracilaria/cap3/cluster\\_editor/gene\\_list.pl?categ=ALL](http://gracilaria.ib.usp.br/cgi-bin/gracilaria/cap3/cluster_editor/gene_list.pl?categ=ALL) for the red alga *Gracilaria tenuistipitata*, and from [http://www.sb-roscoff.fr/SIG/blast/blast\\_private.html](http://www.sb-roscoff.fr/SIG/blast/blast_private.html) for the brown algae *Fucus serratus*, *Fucus vesiculosus*, and *Sargassum binderi*.

### 2.6. Yeast expression, and activity of recombinant microsomal GSTs

The entire mEsGST1 and mEsGST2 coding region were amplified from clones of the immature sporophyte library with primers listed in the supplementary Table S1. The Pfu DNA polymerase (Promega, France) was employed to minimise potential PCR errors. The amplified products were gel purified and cloned into the pGEM® T Easy vector, to ensure sufficient synthesis of plasmid containing the mESGST genes. Recombinant plasmids were then restricted by *Bam*HI and *Eco*RI, and the fragments eluted after gel electrophoresis. They were ligated into the corresponding sites downstream the galactose-inducible GAL1 promoter of pYES2 (Invitrogen, France) to yield the plasmid pYmEsGST1 and pYmEsGST2. After sequencing for checking the integrity of the recombinant mEsGST genes in these plasmids, the vectors were transformed into *Saccharomyces cerevisiae* strain Invsc1 (Invitrogen, France) by lithium acetate method and transformants were selected on minimal medium plates lacking uracil.

For functional expression and preparation of fraction enriched in microsomes, recombinant yeast were cultivated during 2 days at 30 °C in a minimal medium enriched in raffinose (1%) and galactose (2%) to induce expression of the transgenes. One mL of culture was then centrifuged at 5,000 g for 10 min and resuspended in 600 µL of 150 mM Tris–HCl pH 8. Homogenate was lysed by vortexing in the presence of acid-washed glass beads (0.4–0.6 mm size, Sigma, France), and centrifuged at 10,000 g for 10 min at 4 °C. Phosphate buffer was then added to supernatant fractions to a final volume of 10 mL, which was centrifuged at 100,000 g for 2 h at 4 °C in a Beckman 45Ti rotor. The microsome-enriched fraction pellet was resuspended in 500 µL of activity buffer (120 mM sodium phosphate pH 7). Quantity of total proteins in these extracts was determined by measure of absorbance at 280 nm.

Glutathione transferase activity was measured on 40 µg of total proteins with 1 mM GSH and 1 mM CDNB. Test for glutathione peroxidase activity was performed on 10 µg of total protein with 0.25 units of GSH reductase, 1 mM GSH, 0.1 mM NADPH and 1 mM cumene hydroperoxide. Enzyme assays have been conducted at 30 °C. Values

obtained from yeast transformed with an empty vector were systematically subtracted.

### 2.7. Statistical analysis

Statistically significant differences among treatments were determined by the nonparametric Mann–Whitney *U*-test run on Statistica v5.1 software (StatSoft, USA). All conclusions are based on at least 5% level of significance ( $P < 0.05$ ).

## 3. Results

### 3.1. Total GST activity in response to chemical treatments

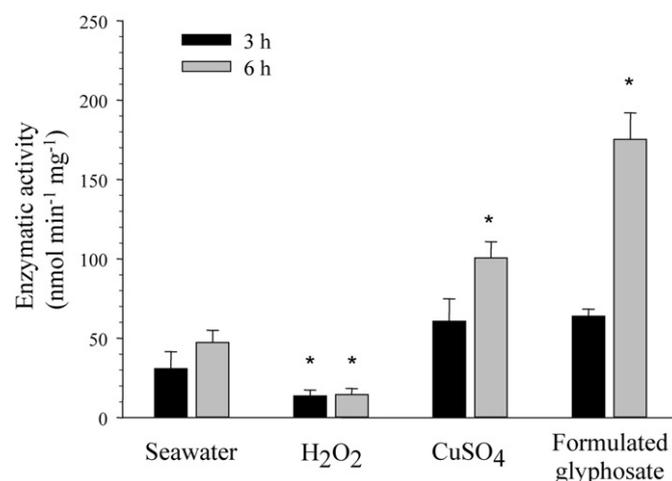
Measurements of total GST activity toward CDNB were performed on crude extracts of *E. siliculosus* treated with several compounds known to induce stress responses in algae, i.e. hydrogen peroxide, copper ions and formulated glyphosate applied at high but non-lethal concentrations. Treated and non-treated tissues were harvested after 3 h and 6 h of incubation.

As shown in Fig. 1, in non-treated algae, a basal level of GST activity of about 40 nmol min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> was found. The H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatments decreased enzyme activity to 14 nmol min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> whereas copper and formulated glyphosate enhanced GSH conjugation to CDNB in the 6 h treated alga to 100 and 175 nmol min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> respectively.

### 3.2. Inventory of *E. siliculosus* GST and genomic organization

An in silico analysis of the genomic resources of *E. siliculosus* led to an inventory of the glutathione transferases genes (Table 1). The availability of more than 90,000 expressed sequence tags (ESTs) and of the 10.5× coverage of the genome sequence permitted the identification of twelve cytosolic GSTs, two pseudogenes, one GST of the Kappa class and three microsomal GSTs. Thus, the three main families of glutathione transferases, encountered in most of the eukaryotic organisms, are present in *E. siliculosus*. In addition, the physical location of *EsGST* genes on the supercontigs was examined.

The genes were named according to the nomenclature system proposed by Edwards et al. (2000). *EsGSTS1*, *EsGSTS2*, *EsGSTS3*, *EsGSTS4*, *EsGSTS5*, *EsGSTS6*, *EsGSTS7*, *EsGSTS8a*, *EsGSTS8b*, *EsGSTS10*, *EsGSTS11* and *EsGSTS12* are cytosolic glutathione transferases,



**Fig. 1.** Total GST activity in *E. siliculosus* crude extracts measured in the presence of CDNB. Algae were treated with exogenous compounds during 3 h (black) and 6 h (grey). Values are the means of three independent biological replicates and four technical replicates, and are expressed in nmol of CDNB conjugate formed per minute and per mg of total protein. Values indicated with \* are significantly different from the control condition ( $P < 0.05$ ).

**Table 1**  
Characteristics and supercontig position of the 18 GST genes and pseudogenes identified in *E. siliculosus*.

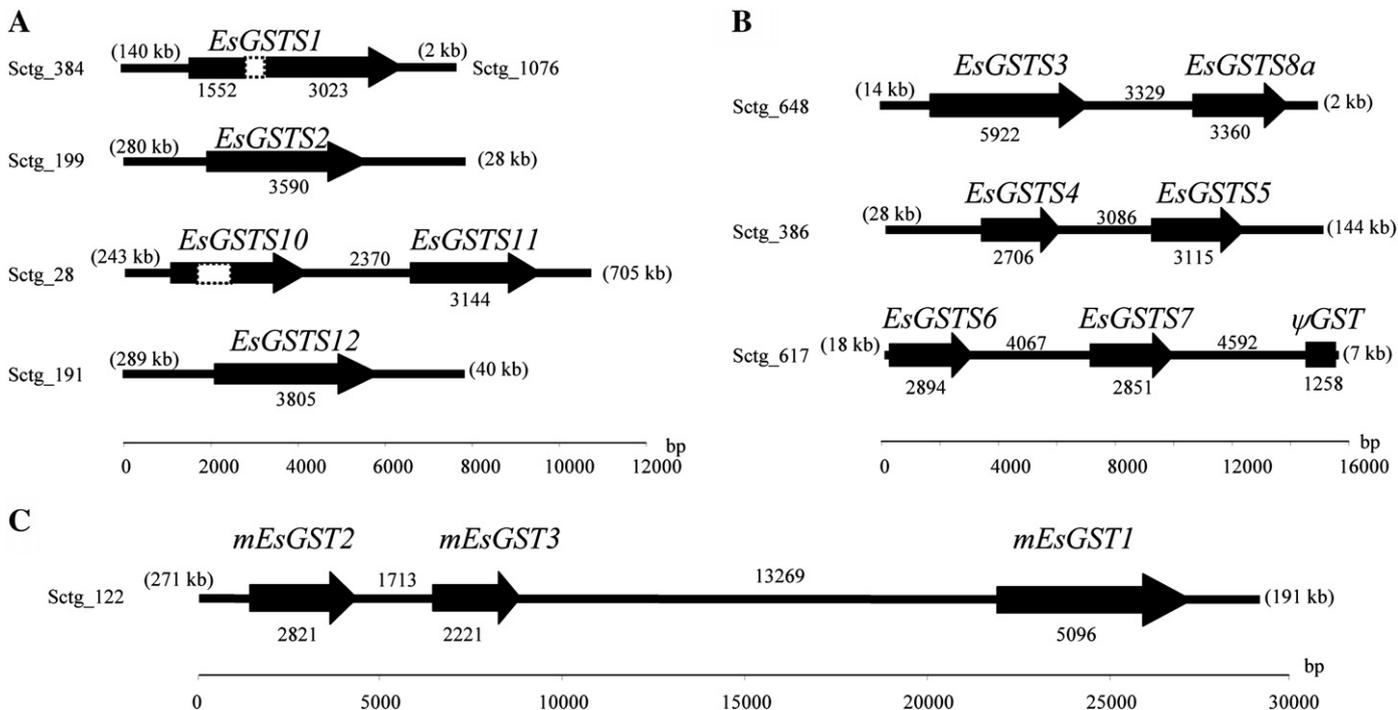
Gene	Accession number	Locus <sup>a</sup>	Number of independent ESTs	Length of gene (bp) <sup>b</sup>	Length of gene product (aa) <sup>c</sup>	Family <sup>d</sup>
<i>EsGSTS1</i>		Esi0384_0026 Esi1076_0002	16	–	205	Cytosolic GSTs
<i>EsGSTS2</i>		Esi0199_0061	14	3590	234	
<i>EsGSTS3</i>		Esi0648_0003	3	5910	201	
<i>EsGSTS4</i>		Esi0386_0004	3	2706	201	
<i>EsGSTS5</i>		Esi0386_0005	0	3122	201	
<i>EsGSTS6</i>		Esi0617_0003	0	2894	201	
<i>EsGSTS7</i>		Esi0617_0004	0	2851	201	
<i>Pseudogene</i>		Esi0617_0002	0	1258	120	
<i>EsGSTS8a</i>		Esi0648_0004	2	3360	228	
<i>EsGSTS8b</i>		Esi0648_0004	0	3289	201	
<i>EsGSTS10<sup>e</sup></i>		n.d.	4	n.d.	206	
<i>EsGSTS11</i>		Esi0028_0122	0	3144	207	
<i>EsGSTS12</i>		Esi0191_0054	0	3805	206	
<i>Pseudogene</i>		Esi0021_0028	0	689	44	
<i>EsGSTK1</i>		Esi0048_0023	2	5482	245	Kappa GSTs
<i>mEsGST1</i>		Esi0122_0060	5	5096	141	Microsomal GSTs
<i>mEsGST2</i>		Esi0122_0054	9	2821	142	
<i>mEsGST3</i>		Esi0122_0055	5	2221	141	

<sup>a</sup> Gene loci were named using the nomenclature proposed by Edwards et al. (2000). Locus name should be read as follow: the three letters Esi mean *Ectocarpus siliculosus*, the first four numbers indicate the supercontig name, and the last four numbers after the underscore sign represent the locus on the supercontig. <sup>b</sup>Lengths of genes, expressed in base pair (bp) were calculated from initiation codon to stop codon. <sup>c</sup>Protein sizes were deduced by translation of the coding sequence. <sup>d</sup>The GSTs were assigned to family based on the BLAST results. For *EsGSTS1*, the length of the gene could not be determined precisely because it spans on two different genomic supercontigs. <sup>e</sup>No locus was identified for *EsGSTS10* in the version 1 of the genome CDS prediction (n.d., not determined).

*EsGSTS8a* and *EsGST8b* being two splice variants of the same gene. BLAST analysis of the cytosolic GSTs and of the pseudogenes revealed that they are close to GSTs of the Sigma class. The best hits were with proteins from the macroalgae *L. digitata* and *C. crispus*, and with insect Sigma GST. *EsGSTK1* is a Kappa GST, and *mEsGST1*, *mEsGST2* and *mEsGST3* are microsomal glutathione transferases.

As shown in Table 1, six of the cytosolic GSTs have no counterpart in the EST collection, whereas *EsGSTS1* and *EsGSTS2* are highly represented. The microsomal GSTs were represented in the ESTs collections in an even way.

The size of the *EsGST* genes ranges from 2,221 bp to 5,910 bp, due to the presence of introns. The length of *EsGSTS1* and *EsGSTS10* could not be determined accurately: fragments corresponding to the gene encoding *EsGSTS1* were located on 2 different supercontigs, and genomic sequence of *EsGSTS10* contained a poorly sequenced region. Deduced protein sequences are 201–234 aa long, as commonly found for different classes of cytosolic GST. In contrast, the Kappa GST is 245 amino acids long and the microsomal *EsGSTs* have about 140 residues. Further BLAST analysis with *EsGST* sequences permitted to identify two pseudogenes in the algal genome, which represent only



**Fig. 2.** Localization of GST genes in the genome of *E. siliculosus*. Only fragments of supercontigs supporting GST genes (arrows) have been represented. Length of genes and intergenic region are indicated in base pair, respectively below and above lines and supercontig size apart both side of genes are indicated in kilobases. The supercontig number is also indicated (Sctg\_XXX). (A) Genes of cytosolic group B, (B) genes of cytosolic group A, (C) microsomal GSTs. In (A), the white squares within the black arrow for *EsGSTS1* and *EsGSTS10* stand for undefined regions in the *Ectocarpus* genome sequence. In Fig. 2B,  $\Psi$ GST represents a pseudogene.

partial coding sequences corresponding to the first three exons of the cytosolic GST, leading to truncated proteins of 120 and 44 aa respectively.

*EsGSTS1*, represented by a full-length EST, is located on two non-overlapping supercontigs and served to join together the supercontigs 386 and 1076 during the expert annotation of the genome sequence (Fig. 2A). *EsGSTS2* and *EsGSTS12* were identified on the supercontig 199 and 191 respectively. In contrast to these single isolated genes, most of the *EsGST* genes were found in a head to tail tandem organization (Fig. 2B). Interestingly, all those genes, except the pseudogene  $\Psi$ GST, and *EsGSTS8a*, are 201 amino acids long. This suggests that this group of genes have a common origin. A tandem conformation was also encountered for two of the cytosolic genes, *EsGSTS10* and *EsGSTS11*, as well as for the three microsomal *EsGSTs* (Fig. 2C). Moreover, intergenic regions tend to be relatively short between the *EsGST* genes, ranging from 2,370 to 4,592 bp, except for the sequence separating *mEsGST3* and *mEsGST1* which is 13,269 bp long.

### 3.3. Gene structure

The cDNA sequences of the *EsGSTs* were aligned with the corresponding genomic DNA sequences. The position and size of the introns and exons are given in Fig. 3. As currently encountered in

eukaryotic genomes, the ends of nuclear introns were defined by the 5'-GT and 3'-AG rule in the algal genome. All the cytosolic and Kappa GSTs present a gene structure with six exons and five introns in the coding sequence. However, deeper analysis of the gene structure reveals the division of cytosolic GST in two groups, mainly based on variation in the length of introns and exons. The group A, includes *EsGSTS[3–8b]*, where exon lengths are strictly conserved and are 162, 96, 102, 96, 120 and 30 bp, with the exception of the gene *EsGSTS8a*, which corresponds to an alternatively spliced form of the gene *EsGSTS8b*. The 3' splicing site of the fifth exon of *EsGSTS8a* is located 10 bp upstream of the identical one in the sequence of *EsGSTS8b*, and this specific location in *EsGSTS8a* induces a change in the open reading frame that shifts the stop codon and increases the length of the sixth exon. This last exon is therefore 30 bp long in *EsGSTS8b* and 111 bp in *EsGSTS8a*. The *EsGSTS8a* protein is thus 27 aa longer than other paralogs of the group A, and this C-terminal extension is mostly composed of hydrophobic residues. In addition, *EsGSTS8a* has two counterparts in the EST collection while no EST has been identified so far for *EsGSTS8b*.

The group B comprises *EsGSTS[1–2]* and *EsGSTS[10–12]*, the later displaying strictly conserved exons of 33, 100, 209, 41, 64 and 174 or 177 bp. *EsGSTS1* shows slight variations as its exons are 29, 107, 209, 41, 61 and 171 bp. The gene *EsGSTS2* has been assigned to the group B

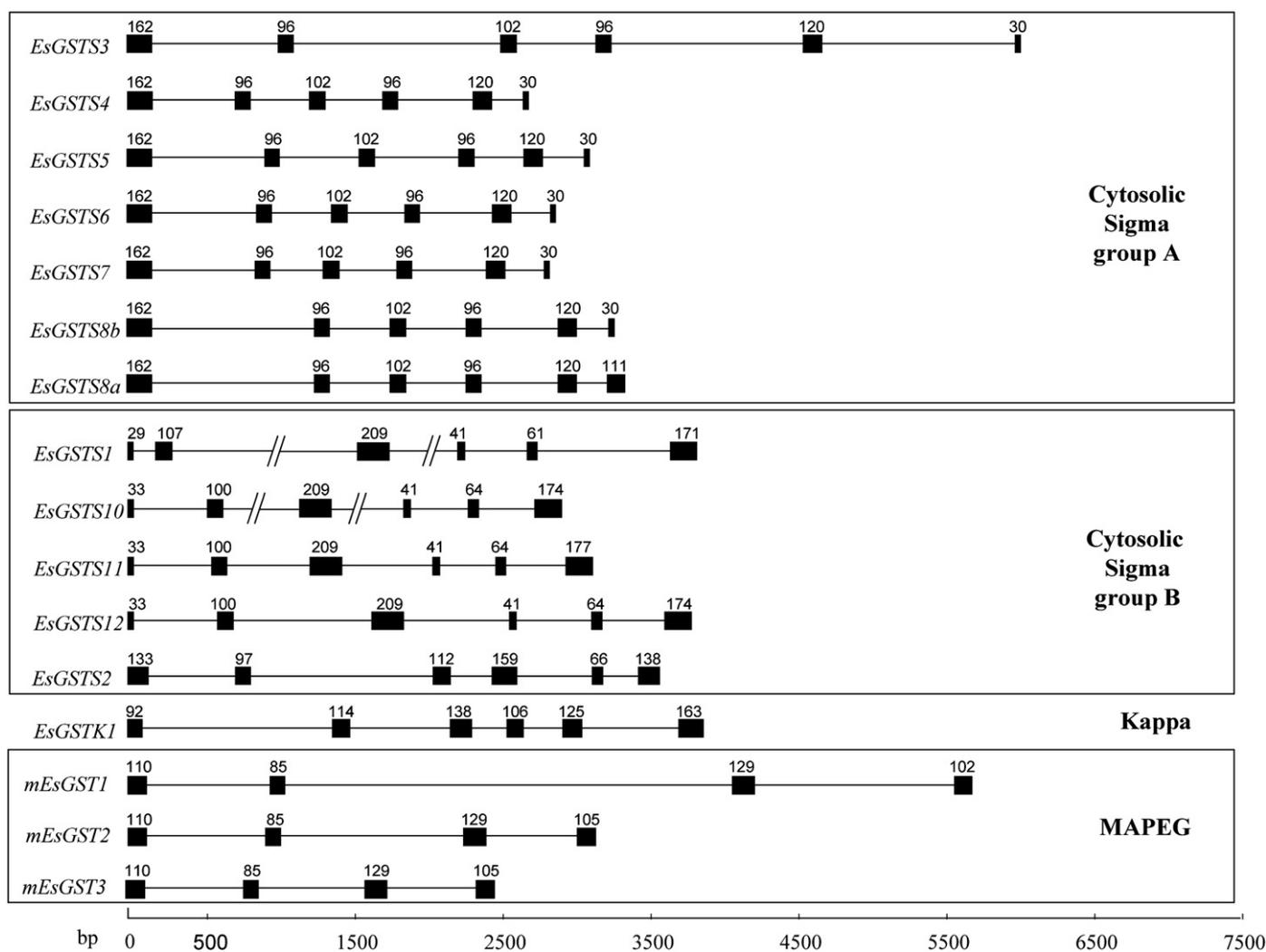
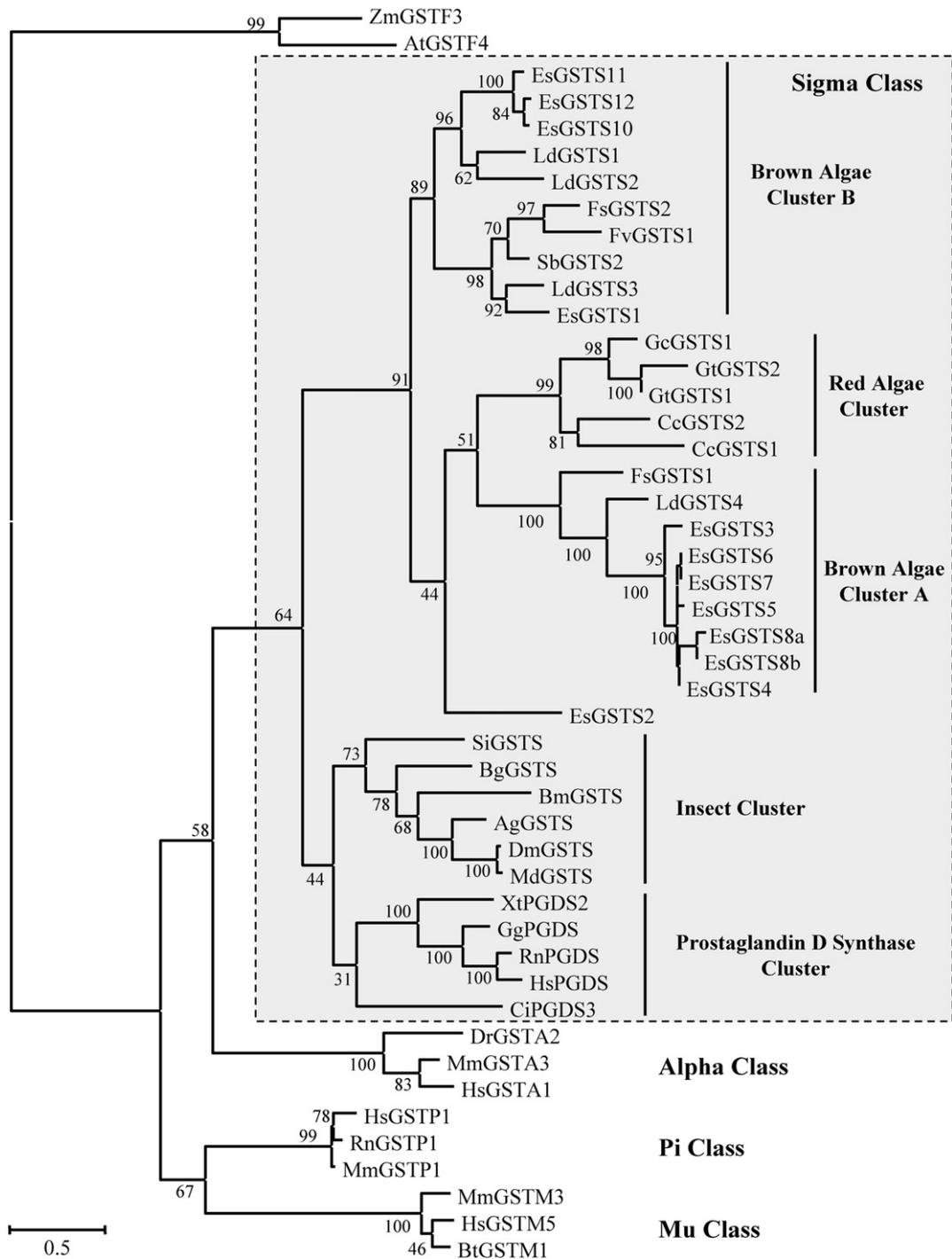


Fig. 3. Gene structure of *EsGST* genes. Exons are represented by black rectangles and introns as lines. Length in base pairs is indicated above exons. Overall size of gene is respected and scale is drawn at the bottom of the figure. Broken line for the genes *EsGSTS1* and *EsGSTS10* stands for introns for which the exact length could not be determined in this study.



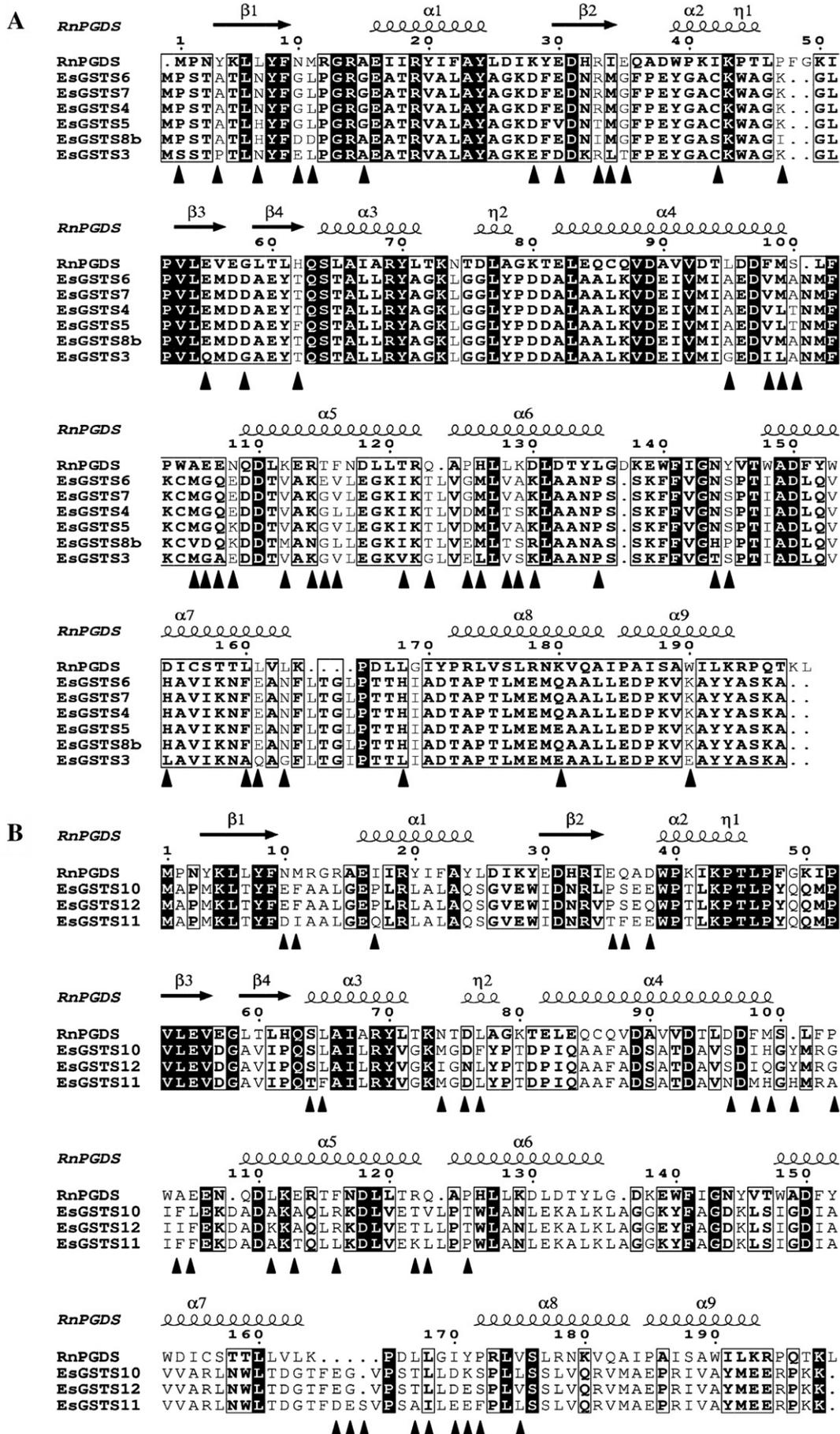
**Fig. 4.** Maximum likelihood phylogenetic tree showing the relationship of *E. siliculosus* cytosolic GSTs with the Sigma, Alpha, Mu, and Pi classes and other GSTs from macroalgae. The tree was rooted using Phi class sequences as outgroup. The numbers on the branches indicate the percentage of node supported from 500 bootstraps replicates.

because the length of exon 1 (133 bp) is strictly similar to the addition of exon 1 (33 bp) and exon 2 (100 bp) of the other group B genes. In the same way, addition of exon 2 (97 bp) and exon 3 (112 bp) from *EsGSTS2* gives the size of group B exon 3 (209 bp). These observations are confirmed when the amino acid sequences are aligned (data not shown). However, the exons 4, 5 and 6 of *EsGSTS2* are of different sizes when compared to other group B members. This different gene structure

may reflect an early duplication and an independent evolution that allowed accumulating mutation and variations in gene structure. Moreover, the *EsGSTS2* protein is 28 aa longer compared to other paralogs of the group B and this C-terminal extension contains 9 prolines, without obvious secondary structure.

The kappa GST gene has 6 exons, as the cytosolic GSTs, but presents a very different gene structure and cannot be related to any of the two

**Fig. 5.** Alignment of *Rattus norvegicus* prostaglandin D synthase with selected amino acids sequences from *E. siliculosus* Sigma cluster A (A) and Sigma cluster B (B). Known secondary structure of the rat Sigma GST (accession number NP8113832, PDB file 1PD2) is shown above the alignments. Alpha helices and beta strands are represented by helices and arrows respectively. Conserved amino acids are written in grey and highlighted in black, and residues written in black are similar. The black triangles below alignments indicate the divergent residues within *Ectocarpus* sequences.



mentioned groups. The three microsomal GSTs exhibit a very conserved gene structure with four exons and three introns.

### 3.4. Phylogenetic analysis of cytosolic GSTs

As previously described in Hervé et al. (2008), cytosolic GSTs from brown and red algae were found to be closely related to animal GSTs belonging to the class Sigma. In order to get a deeper insight into algal GST phylogeny, we undertook a focused analysis to compare them with representative members of the GST classes Alpha, Mu, Pi and Sigma. All the EsGSTs described in this work were considered, together with sequences from the brown algae *L. digitata* (LdGSTS1, LdGSTS2, LdGSTS3, LdGSTS4), *F. serratus* (FsGSTS1, FsGSTS2), *F. vesiculosus* (FvGSTS1), *S. binderi* (SbGSTS2), and from the red algae *C. crispus* (CcGSTS1, CcGSTS2), *G. tenuistipitata* (GtGSTS1, GtGSTS2) and *G. changii* (GcGSTS1) (Fig. 4). GSTs of the Sigma class were chosen among the prostaglandin D synthases (PGDS) of vertebrates and invertebrates, and from the insect Sigma GSTs.

The phylogenetic analysis of *E. siliculosus* cytosolic GSTs was performed using parsimony and distance methods, and both analyses show conserved overall topology. These analyses clearly allowed assigning these genes into the Sigma class (Fig. 4) and showed that brown and red algal GSTs fall into three clusters of the Sigma class, next to the known PGDS and insect GSTs. *E. siliculosus* GSTs are found in two of these clusters, corresponding to the previously described groups A and B, which also include other brown algal GST. The algal GST topology is supported by a high bootstrap value. The cluster A is composed of the paralogs *EsGSTS[3–8b]*, along with the orthologs *LdGSTS4* and *FsGSTS1*. Subclass A members exhibit amino acid sequence identities ranging from 56 to 99%. The cluster B groups the paralogs *EsGSTS1* and *EsGSTS[10–11]*, along with the orthologs *LdGSTS[1–3]*, *SbGSTS2*, *FvGSTS1* and *FsGSTS2* with amino acid sequence identities ranging from 40 to 93%. Phylogenetic position of *EsGSTS2* is assigned to cluster B when using UPGMA methods or Neighbor Joining with Poisson amino acids substitution matrix, while it roots to the cluster A when using maximum likelihood or parsimony methods. All of these topologies are supported with fairly low bootstraps values.

Red algae form a cluster in which amino acid sequences share 35 to 80% of identity. All the phylogenetic trees obtained in this study suggested that the red algal Sigma GST cluster is closer to the cluster A than to the cluster B of brown algae. The bootstrap value of the node between the brown algae cluster A GSTs and the red algae GSTs is significantly increased when *EsGSTS2* is not included in the phylogenetic analysis (data not shown).

Protein identity between cluster A and cluster B of brown algae ranges from 25 to 32% and red algae cluster shares 33 and 32% amino acid identity with cluster A and B respectively. Cluster A GSTs display 25 and 23 to 29% amino acid identity with PGDS cluster and insect cluster respectively. Cluster B GSTs shares 28 to 30 and 32 to 34% amino acid identity with PGDS and with insect Sigma GSTs respectively.

### 3.5. Identification of residues capable of driving functional diversification

The overall structure of cytosolic GSTs was conserved among the different classes. They are dimer proteins and each subunit is composed of two distinct domains: an N-terminal domain, consisting of  $\beta$ -strands and  $\alpha$ -helices that adopt a thioredoxin fold ( $\beta\alpha\beta\alpha\beta\alpha$ ), and a C-terminal domain of variable number of  $\alpha$ -helices.

The cluster A of Sigma GST includes seven *E. siliculosus* sequences sharing 67 to 99% of amino acid identity. The protein alignment of six EsGSTS of this cluster (excluding *EsGSTS8a*) with rat PGDS is displayed in Fig. 5A. Divergence between the amino acid sequences occurs at site specific positions and are mainly located in  $\beta$ 1 and  $\beta$ 2 strands, and in a region stretching from  $\alpha$ 4 helice terminal part to the middle of  $\alpha$ 6 helice.

The alignment of EsGSTS[10–12] protein sequences, which display more than 86% of amino acid identity with the rat PGDS (Fig. 5B), showed that the major divergences are located at the end of  $\beta$ 1 and  $\beta$ 2 strands, in a region stretching from  $\alpha$ 4 helice terminal part to the beginning of  $\alpha$ 6 helice, and in the loop between  $\alpha$ 7 and  $\alpha$ 8 helices. Strikingly, most of the amino acid variations within each EsGSTS group are situated in the same regions, with cluster B exhibiting also frequent amino acid variations in the C-terminal part of the protein sequence.

### 3.6. Phylogenetic analysis and biochemical characterization of *E. siliculosus* MAPEG

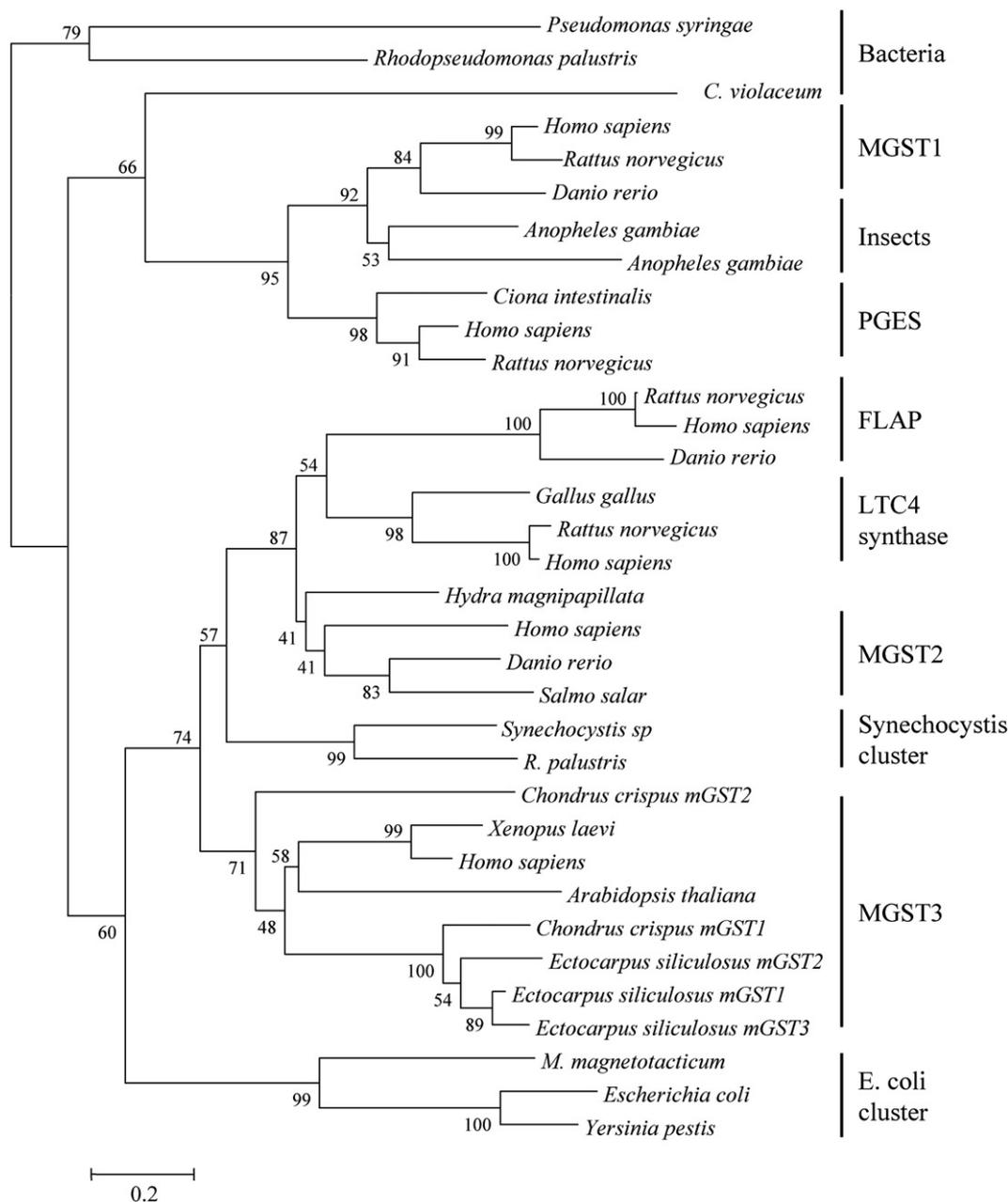
The three microsomal GSTs identified in the *E. siliculosus* genome share 74 to 87% of amino acid identity. They were compared with previously characterized MAPEG (Bresell et al., 2005) in order to establish their classification. As shown in Fig. 6, mEsGSTs, as well as the microsomal GST sequences identified from the *C. crispus* EST collection (Collén et al., 2006), belong to the MGST3 family which is also encountered in animals and plants.

With the aim to investigate their enzymatic activities, microsomal EsGSTs were expressed in a heterologous yeast system. Fraction enriched in microsomes prepared from yeast containing the plasmid pYmEsGST1 and pYmEsGST2 exhibited significant peroxidase activities in the presence of cumene hydroperoxide, with values of  $35.5 \pm 2.3$  and  $21.8 \pm 3.2$  nmol min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> of protein respectively. When the standard substrate CDNB was used, no transferase activity was detected.

### 3.7. Gene expression analysis

In order to determine expression profiles of *EsGST* genes in various stress conditions, laboratory cultured algae were incubated during 3 and 6 h in the presence of a wide range of chemical compounds. In addition to the treatments previously conducted for measuring total GST activity, algal tissues were also submitted to the action of sodium azide, an inhibitor of mitochondrial respiration generating an oxidative stress, of the heavy metal zinc, and of the herbicide glyphosate. Effects of MeJA were tested after 3 and 6 h of incubation, and effects of C18 (13-HpOTrE) and C20 (15-HETE) after 3 h of incubation. These molecules are oxygenated derivatives of polyunsaturated fatty acids which play major roles in defensive stress responses to infections, drugs and xenobiotics in plants and animals.

Specific primers pairs were designed in order to monitor change in expression of different members of the multigenic family. However, due to high similarities in coding sequences and UTR regions, expression profiles of some genes (*EsGSTS[4–7,8b]*, *EsGSTS[10–11]*, *mEsGST3*) have not been analysed. Transcript accumulation profiles were analysed by qPCR for *EsGSTS3* and *EsGSTS8a* from the Sigma cluster A, *EsGSTS1*, *EsGSTS2* and *EsGSTS12* from the Sigma cluster B, for the Kappa GST *EsGSTK1* and for *mEsGST1* and *mEsGST2* from the MAPEG family. The results obtained for *EsGSTS8a* may also reflect the transcription of *EsGSTS8b*. The results presented in Fig. 7 were normalized by the reference genes elongation factor 1 alpha and tubulin alpha 2 (Le Bail et al., 2008). *EsGSTS1* had the highest gene expression under control condition and was the best represented in the EST database. Most of the variations were detected after 6 h of treatment and patterns of expression were generally heterogeneous within and across the different GST families, except for *EsGSTS1* and *EsGSTS12* from cluster B which to some extent displayed similar expression profiles to *EsGSTS3* from cluster A. However, the compounds tested induced substantial differences in mRNA transcript levels for certain genes. Hydrogen peroxide generally decreased transcript amounts after 3 h of treatments and this effect was most of the time reverted after 6 h. As an example, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generated a 15-fold accumulation of *EsGSTS12* transcripts after 6 h when a strong decrease was observed after 3 h. Overall 6 h treatments with glyphosate and



**Fig. 6.** Neighbor Joining phylogeny illustrating the relationship between the *E. siliculosus* microsomal GSTs and the MAPEG superfamily. Nodes are supported by 1000 bootstraps replication. Overall topology is similar to the one published by Bresell et al. (2005).

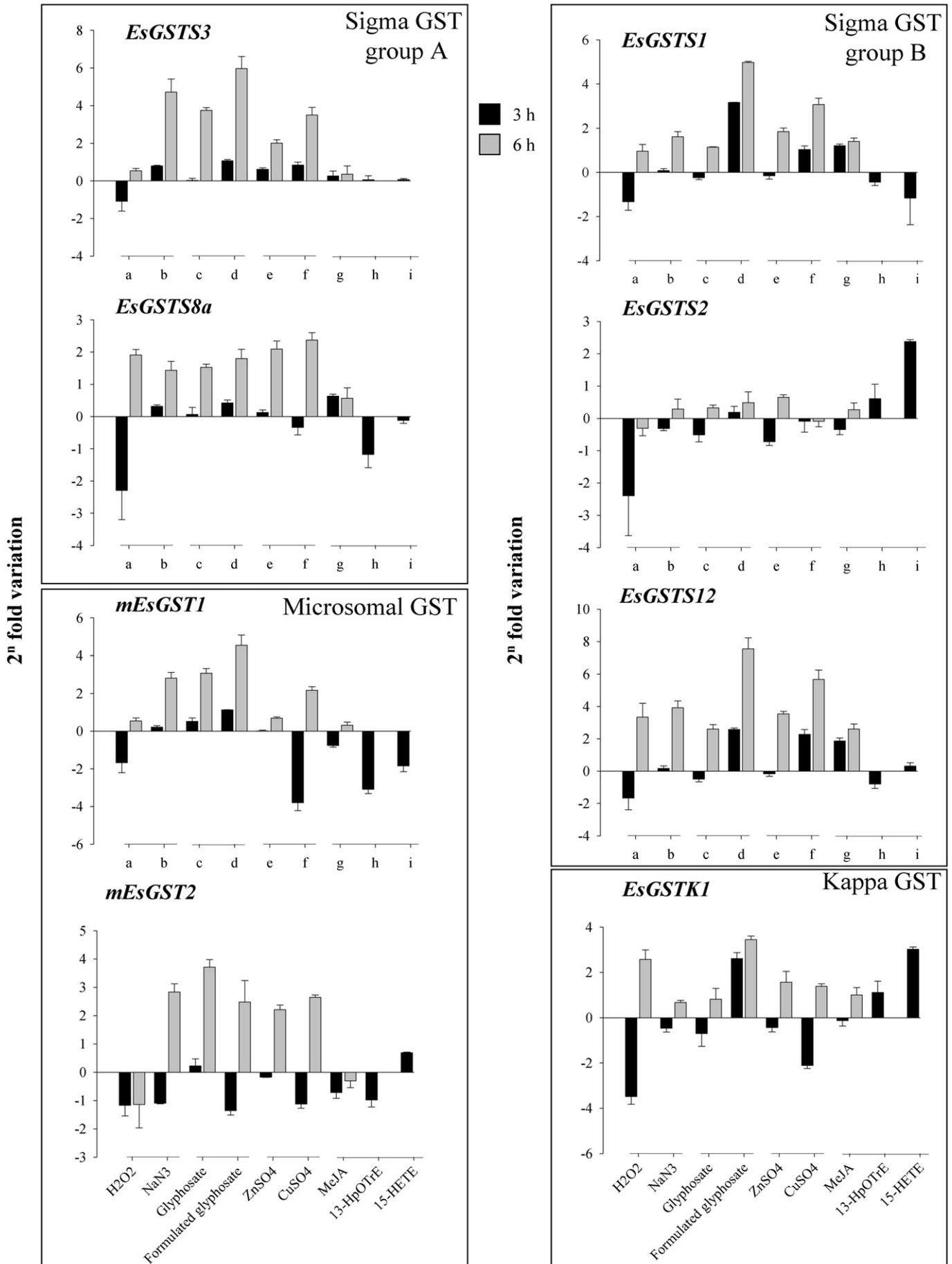
formulated glyphosate induced transcript accumulation in all the genes analysed with the exception of *EsGSTS2* that showed slight variations in all the conditions tested. Zinc and copper usually generated *EsGST* transcripts accumulation, the most striking effect was observed for *EsGSTS12* where copper induced a 60-fold accumulation after a 6 h treatment. Fatty acids derivatives mostly decreased expression in the case of *EsGSTS3*, or had no effects on gene expression for *EsGSTS8a* and for *mEsGST1-2*. However, 15-HETE 3 h treatment induced 3.5- and 4-fold increases in respectively *EsGSTS2* and *EsGSTK1* expression, and MeJA generated slight transcript accumulation for *EsGSTS1* and *EsGSTS12*.

#### 4. Discussion

Often considered as biomarker of environmental contamination, GSTs have also been shown in previous studies to be over-represented

in stress-related EST libraries of brown and red algae (Roeder et al., 2005; Collén et al., 2006), and could therefore be relevant candidates for analysis of stress responses in macroalgae.

In a first step, the level of total GST activity was measured in crude extracts of *E. siliculosus* exposed to several exogenous chemicals known as abiotic stressors such as  $H_2O_2$ , copper ions and glyphosate (Fig. 1).  $H_2O_2$  is a reactive oxygen species that can oxidize intracellular molecules and that is produced in increased quantities by many organisms, notably seaweeds, under biotic and abiotic stresses (Collén and Davison, 1999; Dring, 2006). Moreover, the brown alga *L. digitata* responds to elicitors by producing transiently a high quantity of hydrogen peroxide, a phenomenon known as an oxidative burst (Küpper et al., 2001). Copper is a heavy metal pollutant in marine environment (Correa et al., 1999) and formulated glyphosate is an herbicide that acts through the inhibition of the shikimic acid pathway which controls aromatic amino acids synthesis in plants; it



**Table 2**  
Cytosolic GSTs content in selected eukaryotic sequenced genomes.

Organism	Cytosolic GST content	References
<i>Ectocarpus siliculosus</i>	Sigma (12) <sup>a</sup>	This work
<i>Homo sapiens</i>	Theta (2), Zeta (1), Omega (2), Alpha (5), Mu (5), Pi (1), Sigma (1)	(Nebert and Vasiliou, 2004)
<i>Anopheles gambiae</i>	Theta (2), Zeta (1), Omega (1), Delta (12), Epsilon (8), Sigma (1)	(Ding et al., 2003)
<i>Drosophila melanogaster</i>	Theta (4), Zeta (2), Omega (4), Delta (11), Epsilon (14), Sigma (1)	(Tu and Akgul, 2005)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Theta (3), Zeta (2), Phi (13), Tau (28), Lambda (2)	(Wagner et al., 2002)
<i>Oryza sativa</i>	Theta (2), Zeta (3), Phi (16), Tau (40)	(Soranzo et al., 2004)

<sup>a</sup> The number of genes within each class is indicated in brackets.

has been shown to affect the survival of aquatic macrophytes and green algae (Cedergreen and Streibig, 2005).

The results presented here reveal the constitutive presence of GST in algal cells and a modulation of GST activity after treatments (Fig. 1). Addition of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> decreased the total GST activity in *E. siliculosus* tissues whereas formulated glyphosate and copper had an opposite effect. We deduced from these data that copper and glyphosate generate cellular perturbations and toxic by-products that require GST activity for detoxifying the cells, which was not the case under the hydrogen peroxide treatment.

The recent availability of the genome sequence of the new brown algal model *E. siliculosus* gave us the unique opportunity to perform an exhaustive analysis of the GST gene family and allowed to identify twelve cytosolic, one Kappa and three microsomal GSTs. As shown in the Table 2, genomes of vertebrates, invertebrates and plants contain several classes of cytosolic GSTs. Interestingly, the entire set of cytosolic glutathione transferases present in *E. siliculosus* fall in a single class, the Sigma class. Moreover, the number of genes in this class is significantly higher in *E. siliculosus* than what is generally found in other organisms (Table 2). It is usually admitted (Frova, 2006) that amino-acid sequence mean identity within a class of soluble GSTs is >40%, and identity <21–25% normally separates two different classes. Nevertheless, this criterion is not really applied in the Sigma class which comprises proteins from vertebrates and invertebrates with quite low protein identities. As an example, protein identities between mammals-haematopoietic prostaglandin D synthase and insects-Sigma GSTs range between 30 and 40% although they define two subfamilies of the same Sigma class (Jowsey et al., 2001; Singh et al., 2001; Valles et al., 2006).

The twelve GST genes of the Sigma class form a multigenic family that has probably evolved from an ancestral gene (Nei and Rooney, 2005). This is confirmed by the phylogenetic analysis (Fig. 4) that indicate first, that all Sigma GSTs are derived from a common gene ancestor and second, that brown and red algae GSTs form three additional independent clusters among the Sigma class, in addition to the prostaglandin D synthases cluster and to the insect cluster. It is also confirmed by the conservation of some intron positions in mammal and nematode PGDS (Kanaoka et al., 2000), in the cluster B of EsGSTS, in the cluster A of LdGSTS and in *C. crispus* GSTS (data not shown). Each gene cluster has evolved and diversified independently within each species. Multigenic families are usually formed via genes duplication events which give rise to paralogous genes. Gene duplication can result from unequal crossing over, retroposition or genome duplication (Zhang, 2003). Some parts of the paralog genes sequences can be under the influence of a strong purifying selection

that give conserved amino acid sequences and only allow nucleotide sequences to diverge by silent mutation (Nei et al., 2000). At the opposite, some specific parts of the sequence can be submitted to a relaxed purifying selection allowing nonsynonymous mutations.

In the genomes of plants and animals, GST genes of the same class are forming clusters on chromosomes (Ding et al., 2003; Soranzo et al., 2004). The organization of the cytosolic Sigma GSTs in the genome of *E. siliculosus* was investigated to identify the evolutionary forces that have raised the actual multigenic family. Head to tail conformation of the *E. siliculosus* Sigma-GST cluster A genes strongly suggest an evolution process through duplication mechanisms from individual genes or even tandem genes. The conserved structure of the genes corroborates the evolution by duplication of a progenitor gene. The copied genes may have evolved a new function or acquire different activities, and different stimuli for regulation of gene expression.

*E. siliculosus* protein sequences are highly conserved between cluster A members and divergences are located at specific positions (Fig. 5A). The same feature is observed within identical proteins of the cluster B (Fig. 5B). According to Kanaoka et al. (1997), in rat PGDS (Sigma class), residues involved in GSH binding, and forming the G-site, are located in  $\beta$ 1 (Y8, F9),  $\alpha$ 2 (W39, K43), just prior to  $\beta$ 3 (K50, I51, P52), between  $\beta$ 4 and  $\alpha$ 3 (Q63, S64), and at the end of  $\alpha$ 4 (D97). Based on the alignment (Fig. 5), most of the residues involved in GSH binding are highly conserved in EsGSTS and this amino acid homogeneity probably results from strong functional constraints. On the other hand, catalytic residues involved in PGH<sub>2</sub> activation of RnPGDS, forming the H-site, are located between  $\beta$ 1 and  $\alpha$ 1 (M11, R12, G13), in  $\alpha$ 1 (E16, E17), at the end of  $\alpha$ 4 (D96, M99, S100), between  $\alpha$ 4 and  $\alpha$ 5 (W104), and in  $\alpha$ 7 (Y152, I155, C156, T159). As indicated in the alignments (Fig. 5) these regions concentrate amino acid divergences in EsGSTS sequences. Thus, most of the diversity observed within the *E. siliculosus* Sigma iso-enzymes resides in the potential area of second substrate binding and activation. The multigenic family formation may thus have been led by versatility in substrate recognition. The most divergent gene of the group A is EsGSTS8a which represents an alternative splicing form of EsGSTS8b. This change induces the presence of a hydrophobic C-terminal extension at the end of the protein that may play a role in enzyme localization and activity. The Sigma cluster B gene family includes more divergent genes, with the exception of EsGSTS10, EsGSTS11 and EsGSTS12 which shares overall high identity levels but divergences at site specific positions. Moreover, EsGSTS10 and EsGSTS11 are in a head to tail conformation and are therefore supposed to have evolved through duplication.

To complete our analyses, we choose to apply treatments with high concentrations of chemicals and fatty acids derivatives during a relatively short time in order to induce acute stress conditions and to monitor early response mechanisms. For all genes tested, treatment with hydrogen peroxide decreased the transcript accumulation in the first 3 h and this observation is consistent with the decrease in total GST activity. By contrast, copper treatments strongly induced the expression of EsGSTS1, EsGSTS3 and EsGSTS12. Interestingly, EsGSTS1, EsGSTS3 and EsGSTS12 were also highly induced by formulated glyphosate treatments. Compared to glyphosate, the formulated commercial preparation contains many adjuvants (notably polyoxyethylene amine) that improve active-molecule penetration in cells. Toxic effects of the adjuvants are suspected and may generate a great perturbation in cell membranes, increasing the level of products of lipid peroxidation (Pieniazek et al., 2004). Treatment of algae with formulated glyphosate most likely induced a stress condition that led to the recruitment of specific Sigma GST genes.

**Fig. 7.** Expression profiles of *E. siliculosus* GST genes. Algae were treated during 3 h (black) and 6 h (grey) with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10 mM (a), NaN<sub>3</sub> 54 mg L<sup>-1</sup> (b), glyphosate 1 mM (c), formulated glyphosate eq. 1 mM (d), ZnSO<sub>4</sub> 10  $\mu$ M (e), CuSO<sub>4</sub> 10  $\mu$ M (f), MeJA 100  $\mu$ M (g), 13-HpOTrE 5  $\mu$ M (h), 15-HETE 5  $\mu$ M (i). Calculations are based on three biological replicates and technical duplicates.

All biochemically characterized GSTs of the Sigma class from animals have a role in the metabolism of oxygenated fatty acids derivatives and are thus not considered as just detoxification enzymes. Vertebrate Sigma GSTs have been well studied, notably mammals ones, and their catalytic activity in the biosynthesis of prostaglandins has been resolved by crystallographic analysis (Kanaoka et al., 1997; Thomson et al., 1998; Jowsey et al., 2001). In animals, prostaglandins and fatty acids derivatives are involved in immunity processes and play major roles in inflammatory response, reproductive biology and cell development (Funk, 2001; Rowley et al., 2005; Stanley, 2006). Insect Sigma class GSTs are thought to be involved in the detoxification of lipid peroxidation products (Singh et al., 2001; Agianian et al., 2003). A Sigma GST isolated from the webworm *Hyphantria cunea* presents significant activity toward the aldehyde 4-hydroxynonenal (4-HNE) (Yamamoto et al., 2007). A Sigma GST from the parasitic nematode *Ascaridia galli* is involved in prostaglandin biosynthesis by catalyzing isomerisation of PGH<sub>2</sub> to PGE<sub>2</sub> (Meyer et al., 1996). Metabolism of C20 oxygenated polyunsaturated fatty acids derivatives is a shared feature in red and brown algae (Cosse et al., 2007), and even if presence of oxylipins has not been investigated in *E. siliculosus*, this alga is closely related to *Laminaria* where oxylipins have been found. Effectively, in *L. digitata*, stresses and in particular copper ions, triggered the biosynthesis of C18 and C20 fatty acid derivatives, notably prostaglandins (Küpper et al., 2006; Ritter et al., 2008). The production of these molecules has been also demonstrated in the red alga *C. crispus* pre-treated with MeJA (Bouarab et al., 2004; Gaquerel et al., 2007). However, biosynthetic pathways of oxylipins remain elusive in red and brown macroalgae. In addition, marine algae are able to form C9 aldehydes from polyunsaturated C20 fatty acids (Cosse et al., 2007). In both algae *L. digitata* and *C. crispus*, Sigma GSTs exhibit transferase activity toward the aldehyde 4-HNE and peroxidase activity with fatty acids derivatives while copper stress and MeJA were shown to induce the expression of Sigma GST genes in *L. digitata* and *C. crispus* respectively (Hervé et al., 2008).

This large data body prompted us to look at the influence of C18 and C20 oxylipins on the expression of the *EsGST* genes. *EsGSTS2* and *EsGSTK1* on one side and *EsGSTS1* and *EsGSTS12* on the other side were shown to be sensitive to 15-HETE and MeJA, respectively. However, one cannot state that the fatty acids derivatives used in this study really generated noteworthy transcripts accumulation of the other *EsGST* genes investigated in this study. The qPCR data rather indicate that the oxylipins tested here have no specific and direct effect on the expression of Sigma *EsGSTs* after 3 and 6 h of exposure, which does not preclude a possible indirect effect via other compounds, and/or an effect on gene expression occurring later than assessed in our study. We may also suggest that accumulation of *EsGSTS3*, *EsGSTS1*, *EsGSTS12*, *mEsGST1* and *mEsGST2* transcripts during copper treatment could be correlated with the production of oxylipins, since heavy metals have been shown to induce oxylipin production in brown algae (Ritter et al., 2008).

It is to be noticed that the three *E. siliculosus* microsomal GSTs (*mEsGST*) are the first MAPEG described in brown algae. In this study the phylogenetic analyses showed that *mEsGST* belong to the MGST3 family. Whilst many families of MAPEG are present in most of organisms, only MGST3 is represented in the brown algal genome. The three genes are physically close and evolution by duplication is thus indicated. The MGST3 MAPEG family is thought to be involved in leukotriene synthesis in human and members possess the ability to catalyze the conjugation of GSH to LTA<sub>4</sub>, thus forming LTC<sub>4</sub> (Jakobsson et al., 1997; Jakobsson et al., 1999). These authors report the peroxidase activity of human MGST3 catalyzing the GSH-dependent reduction of 5-HpETE to 5-HETE. In contrast, the *Arabidopsis* MGST3 enzyme expressed in yeast does not seem to have peroxidase activity toward cumene hydroperoxide (Bresell et al., 2005). Due to these activities, MGST3 proteins may play roles in the detoxification of xenobiotics and in cell protection against damage. Therefore, since two of *E. siliculosus* MGST3 MAPEGs feature GSH dependant

peroxidase activities in the presence of cumene hydroperoxide, we can put forward a putative role of *mEsGST* in oxygenated polyunsaturated fatty acids derivatives biosynthesis.

This study is, to our knowledge, the first description of an eukaryotic organism that do not contain cytosolic GSTs from the Theta and Zeta classes, and of the first photosynthetic organism presenting a Kappa class GST.

## 5. Conclusion

In this study we have retrieved and analysed the GST genes from the genome of the brown alga *E. siliculosus*. Plants, animals and fungi typically have several cytosolic GST families, each including a limited number of genes. However, a unique large cytosolic GST family comprising twelve members and falling into the Sigma class was identified in *E. siliculosus*. Sigma GSTs were until recently only found in animals; it is striking that brown and red algae are the only known photosynthetic organisms that also contain this class of GSTs. The Sigma class is an ancient and complex class clustering proteins from different organisms but with related functions, such as the prostaglandins D synthase cluster in animals. We expected Sigma GSTs of algae to have a role in prostaglandin synthesis and/or in detoxification of products of lipid peroxidation. The expression studies carried out in this study do not confirm nor invalidate this assumption. The heterogeneous expression patterns rather suggest that *EsGST* genes from the Sigma class are recruited in very different and specific conditions, an observation that could reflect the fact that only the cytosolic GST Sigma class is represented in *E. siliculosus*. In other words, the class diversity found in other organisms for coping with cellular detoxification is substituted with gene diversity within a single class in *E. siliculosus*. The involvement of Sigma *EsGSTs* in oxylipins metabolism might hence have to be investigated at the protein level and the data from the *E. siliculosus* MGST3 enzymes expressed in yeast are in that sense promising.

Finally, a better knowledge of red algal GSTs might help to understand the evolution, diversification and role of this enzyme family in marine macroalga. This should be possible in a near future when the sequencing of the *C. crispus* genome will have been completed and that it will be therefore possible to have an exhaustive view of the GST family in the red alga as well.

## Acknowledgements

P.-O. de F. was supported by the French Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche. We are grateful to Dr J.M. Cock for providing access to the *E. siliculosus* genomic resources, and to J. Collén for critical reading of the manuscript. Part of this work was performed within the framework of the 'Marine Genomics Europe' NoE (Network of Excellence) (European Commission contract No. GOCE-CT-2004-505403).

## Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.margen.2009.01.003.

## References

- Agianian, B., Tucker, P.A., Schouten, A., Leonard, K., Bullard, B., Gros, P., 2003. Structure of a *Drosophila* Sigma class glutathione S-transferase reveals a novel active site topography suited for lipid peroxidation products. *J. Mol. Biol.* 326, 151–165.
- Armstrong, R.N., 1997. Structure, catalytic mechanism, and evolution of the glutathione transferases. *Chem. Res. Toxicol.* 10, 2–18.
- Baldauf, S., 2003. The deep roots of eukaryotes. *Science* 300, 1703–1706.
- Bartling, D., Radzio, R., Steiner, U., Weiler, E.W., 1993. A glutathione-S-transferase with glutathione-peroxidase activity from *Arabidopsis thaliana* – molecular cloning and functional characterization. *Eur. J. Biochem.* 216, 579–586.

- Bartsch, I., Wiencke, C., Bischof, K., Buchholz, C.M., Buck, B.H., Eggert, A., Feuerpfeil, P., Hanelt, D., Jacobsen, S., Karez, R., Karsten, U., Molis, M., Røleda, M.Y., Schubert, H., Schumann, R., Valentin, K., Weinberger, F., Wiese, J., 2008. The genus *Laminaria* sensu lato: recent insights and developments. *Eur. J. Phycol.* 43, 1–86.
- Board, P.G., Baker, R.T., Chelvanayagam, G., Jermini, L.S., 1997. Zeta, a novel class of glutathione transferases in a range of species from plants to humans. *Biochem. J.* 328, 929–935.
- Board, P.G., Coggan, M., Chelvanayagam, G., Easteal, S., Jermini, L.S., Schulte, G.K., Danley, D.E., Hoth, L.R., Griffior, M.C., Kamath, A.V., Rosner, M.H., Chrnyk, B.A., Perregaux, D.E., Gabel, C.A., Geoghegan, K.F., Pandit, J., 2000. Identification, characterization, and crystal structure of the omega class glutathione transferases. *J. Biol. Chem.* 275, 24798–24806.
- Booth, J., Boyland, E., Sims, P., 1961. An enzyme from rat liver catalysing conjugations with glutathione. *Biochem. J.* 79, 516–524.
- Bouarab, K., Adas, F., Gaquerel, E., Kloareg, B., Salaun, J., Potin, P., 2004. The innate immunity of a marine red alga involves oxylipins from both the eicosanoid and octadecanoid pathways. *Plant Physiol.* 135, 1838–1848.
- Bradford, M.M., 1976. Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- Bresell, A., Weinander, R., Lundqvist, G., Raza, H., Shimoji, M., Sun, T.-H., Balk, L., Wiklund, R., Eriksson, J., Jansson, C., Persson, B., Jakobsson, P.-J., Morgenstern, R., 2005. Bioinformatic and enzymatic characterization of the MAPEG superfamily. *FEBS J.* 272, 1688–1703.
- Cairrao, E., Couderchet, M., Soares, A.M.V.M., Guilhermino, L., 2004. Glutathione-S-transferase activity of *Fucus* spp. as a biomarker of environmental contamination. *Aquat. Toxicol.* 70, 277–286.
- Cedergreen, N., Streibig, J.C., 2005. The toxicity of herbicides to non-target aquatic plants and algae: assessment of predictive factors and hazard. *Pest Manag. Sci.* 61, 1152–1160.
- Cha, C.J., Kim, S.J., Kim, Y.H., Stingley, R., Cerniglia, C.E., 2002. Molecular cloning, expression and characterization of a novel class glutathione S-transferase from the fungus *Cunninghamella elegans*. *Biochem. J.* 368, 589–595.
- Charrier, B., Coelho, S.M., Le Bail, A., Tonon, T., Michel, G., Potin, P., Kloareg, B., Boyen, C., Peters, A.F., Cock, J.M., 2008. Development and physiology of the brown alga *Ectocarpus siliculosus*: two centuries of research. *New Phytol.* 177, 319–332.
- Cho, S.-G., Lee, Y.H., Park, H.-S., Ryo, K., Kang, K.W., Park, J., Eom, S.-J., Kim, M.J., Chang, T.-S., Choi, Y., Shim, J., Kim, Y., Dong, M.-S., Lee, M.-J., Kim, S.G., Ichijo, H., Choi, E.-J., 2001. Glutathione S-transferase mu modulates the stress-activated signals by suppressing apoptosis signal-regulating kinase 1. *J. Biol. Chem.* 276, 12749–12755.
- Coleman, J.O.D., Randall, R., Blake-Kalff, M.M.A., 1997. Detoxification of xenobiotics in plant cells by glutathione conjugation and vacuolar compartmentalization: a fluorescent assay using monochlorobimane. *Plant Cell Environ.* 20, 449–460.
- Collén, J., Davison, I.R., 1999. Reactive oxygen metabolism in intertidal *Fucus* spp. (Phaeophyceae). *J. Phycol.* 35, 62–69.
- Collén, J., Roeder, V., Rousvoal, S., Collin, O., Kloareg, B., Boyen, C., 2006. An expressed sequence tag analysis of thallus and regenerating protoplasts of *Chondrus crispus* (Gigartinales, Rhodophyceae). *J. Phycol.* 42, 104–112.
- Combes, B., Stakelum, G.S., 1961. A liver enzyme that conjugates sulfobromophthalein sodium with glutathione. *J. Clin. Invest.* 40, 981–988.
- Correa, J., Castilla, J., Ramirez, M., Varas, M., Lagos, N., Vergara, S., Moenne, A., Roman, D., Brown, M., 1999. Copper, copper mine tailings and their effect on the marine algae in Northern Chile. *J. Appl. Phycol.* 11, 57–67.
- Cosse, A., Leblanc, C., Potin, P., 2007. Dynamic defense of marine macroalgae against pathogens: from early activated to gene regulated responses. *Adv. Bot. Res.* 46, 222–266.
- Dereeper, A., Guignon, V., Blanc, G., Audic, S., Buffet, S., Chevenet, F., Dufayard, J.F., Guindon, S., Lefort, V., Lescot, M., Claverie, J.M., Gascuel, O., 2008. Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist. *Nucleic Acids Res.* 36, 465–469.
- Ding, Y.C., Ortell, F., Rossiter, L.C., Hemingway, J., Ranson, H., 2003. The *Anopheles gambiae* glutathione transferase supergene family: annotation, phylogeny and expression profiles. *BMC Genomics* 4, 35–50.
- Dixon, D.P., Laphorn, A., Edwards, R., 2002. Plant glutathione transferases. *Genome Biol.* 3, 3004.1–3004.10.
- Dring, M., 2006. Stress resistance and disease resistance in seaweeds: the role of reactive oxygen metabolism. *Adv. Bot. Res.* 43, 176–207.
- Edwards, R., Dixon, D.P., Walbot, V., 2000. Plant glutathione S-transferases: enzymes with multiple functions in sickness and in health. *Trends Plant Sci.* 5, 193–198.
- Fernandez-Canon, J.M., Penalva, M.A., 1998. Characterization of a fungal maleylacetate isomerase gene and identification of its human homologue. *J. Biol. Chem.* 273, 329–337.
- Frova, C., 2006. Glutathione transferases in the genomics era: new insights and perspectives. *Biomol. Eng.* 23, 149–169.
- Funk, C., 2001. Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. *Science* 294, 1871–1875.
- Gaquerel, E., Hervé, C., Labrière, C., Boyen, C., Potin, P., Salaün, J.-P., 2007. Evidence for oxylipin synthesis and induction of a new polyunsaturated fatty acid hydroxylase activity in *Chondrus crispus* in response to methyljasmonate. *Biochim. Biophys. Acta-Mol. Cell Biol. Lipids* 1771, 565–575.
- Gerwick, W.H., Roberts, M.A., Vulpanovici, A., Ballantine, D.L., 1999. Biogenesis and biological function of marine algal oxylipins. *Adv. Exp. Med. Biol.* 447, 211–218.
- Hall, T., 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, pp. 95–98.
- Hayes, J.D., Flanagan, J.U., Jowsey, I.R., 2005. Glutathione transferases. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 45, 51–88.
- Hervé, C., de Franco, P.-O., Croisillier, A., Tonon, T., Boyen, C., 2008. New members of the glutathione transferase family discovered in red and brown algae. *Biochem. J.* 412, 535–544.
- Ishikawa, T., 1992. The ATP-dependent glutathione S-conjugate export pump. *Trends Biochem. Sci.* 17, 463–469.
- Jakobsson, P.J., Mancini, J.A., Riendeau, D., Ford-Hutchinson, A.W., 1997. Identification and characterization of a novel microsomal enzyme with glutathione-dependent transferase and peroxidase activities. *J. Biol. Chem.* 272, 22934–22939.
- Jakobsson, P.J., Morgenstern, R., Mancini, J., Ford-Hutchinson, A., Persson, B., 1999. Common structural features of MAPEG – a widespread superfamily of membrane associated proteins with highly divergent functions in eicosanoid and glutathione metabolism. *Protein Sci.* 8, 689–692.
- Jowsey, I.R., Thomson, A.M., Flanagan, J.U., Murdock, P.R., Moore, G.B.T., Meyer, D.J., Murphy, G.J., Smith, S.A., Hayes, J.D., 2001. Mammalian class Sigma glutathione S-transferases: catalytic properties and tissue-specific expression of human and rat GSH-dependent prostaglandin D-2 synthases. *Biochem. J.* 359, 507–516.
- Kanaoka, Y., Ago, H., Inagaki, E., Nanayama, T., Miyano, M., Kikuno, R., Fujii, Y., Eguchi, N., Toh, H., Urade, Y., Hayaishi, O., 1997. Cloning and crystal structure of hematopoietic prostaglandin D synthase. *Cell* 90, 1085–1095.
- Kanaoka, Y., Fujimori, K., Kikuno, R., Sakaguchi, Y., Urade, Y., Hayaishi, O., 2000. Structure and chromosomal localization of human and mouse genes for hematopoietic prostaglandin D synthase – conservation of the ancestral genomic structure of sigma-class glutathione S-transferase. *Eur. J. Biochem.* 267, 3315–3322.
- Konishi, T., Kato, K., Araki, T., Shiraki, K., Takagi, M., Tamaru, Y., 2005. A new class of glutathione S-transferase from the hepatopancreas of the red sea bream *Pagrus major*. *Biochem. J.* 388, 299–307.
- Küpper, F.C., Kloareg, B., Guern, J., Potin, P., 2001. Oligogulonates elicit an oxidative burst in the brown algal kelp *Laminaria digitata*. *Plant Physiol.* 125, 278–291.
- Küpper, F.C., Gaquerel, E., Boneberg, E.-M., Morath, S., Salaun, J.-P., 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, 1991–1999.
- Le Bail, A., Dittami, S., de Franco, P.-O., Rousvoal, S., Cock, M., Tonon, T., Charrier, B., 2008. Normalisation genes for expression analyses in the brown alga model *Ectocarpus siliculosus*. *BMC Mol. Biol.* 9, 75.
- Li, G., Moriyama, E.N., 2004. Vector NTI, a balanced all-in-one sequence analysis suite. *Brief. Bioinform.* 5, 378–388.
- Marrs, K.A., 1996. The functions and regulation of glutathione transferases in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 47, 127–158.
- Meyer, D.J., Muirio, R., Thomas, M., Coates, D., Isaac, R.E., 1996. Purification and characterization of prostaglandin-H E-isomerase, a sigma-class glutathione S-transferase, from *Ascaridia galli*. *Biochem. J.* 196, 223–227.
- Monaco, R., Friedman, F.K., Hyde, M.J., Chen, J.M., Manolatus, S., Adler, V., Ronai, Z., Koslosky, W., Pincus, M.R., 1999. Identification of a glutathione-S-transferase effector domain for inhibition of jun kinase, by molecular dynamics. *J. Protein Chem.* 18, 859–866.
- Morel, F., Rauch, C., Petit, E., Piton, A., Theret, N., Coles, B., Guillouzo, A., 2004. Gene and protein characterization of the human glutathione S-transferase Kappa and evidence for a peroxisomal localization. *J. Biol. Chem.* 279, 16246–16253.
- Nebert, D.W., Vasiliou, V., 2004. Analysis of the glutathione S-transferase (GST) gene family. *Hum. Genomics* 1, 460–464.
- Nei, M., Rooney, A.P., 2005. Concerted and birth-and-death evolution of multigene families. *Annu. Rev. Genet.* 39, 121–152.
- Nei, M., Rogozin, I.B., Piontkivska, H., 2000. Purifying selection and birth-and-death evolution in the ubiquitin gene family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 10866–10871.
- Pearson, W.R., 2005. Phylogenies of glutathione transferase families. *Methods Enzymol.* 401, 186–204.
- Pemble, S.E., Wardle, A.F., Taylor, J.B., 1996. Glutathione S-transferase class Kappa: characterization by the cloning of rat mitochondrial GST and identification of a human homologue. *Biochem. J.* 319, 749–754.
- Peters, A.F., Marie, D., Scornet, D., Kloareg, B., Cock, J.M., 2004. Proposal of *Ectocarpus siliculosus* (Ectocarpales, Phaeophyceae) as a model organism for brown algal genetics and genomics. *J. Phycol.* 50, 1079–1088.
- Pflugmacher, S., Schroder, P., Sandermann Jr., H., 2000. Taxonomic distribution of plant glutathione S-transferases acting on xenobiotics. *Phytochemistry* 54, 267–273.
- Pieniazek, D., Bukowska, B., Duda, W., 2004. Comparison of the effect of Roundup Ultra 360 SL pesticide and its active compound glyphosate on human erythrocytes. *Pestic. Biochem. Physiol.* 79, 58–63.
- Ranson, H., Hemingway, J., 2005. Mosquito glutathione transferases. *Methods Enzymol.* 401, 226–241.
- Ritter, A., Goulitquer, S., Salaün, J.P., Tonon, T., Correa, J.A., Potin, P., 2008. Copper stress induces biosynthesis of octadecanoid and eicosanoid oxygenated derivatives in the brown algal kelp *Laminaria digitata*. *New Phytol.* 180, 809–821.
- Roeder, V., Collén, J., Rousvoal, S., Corre, E., Leblanc, L., Boyen, C., 2005. Identification of stress genes transcripts in *Laminaria digitata* (Phaeophyceae) protoplast cultures by expressed sequence tag analysis. *J. Phycol.* 41, 1227–1235.
- Rowley, A.F., Vogan, C.L., Taylor, G.W., Clare, A.S., 2005. Prostaglandins in non-insectan invertebrates: recent insights and unsolved problems. *J. Exp. Biol.* 208, 3–14.
- Sawicki, R., Singh, S.P., Mondal, A.K., Benes, H., Zimniak, P., 2003. Cloning, expression and biochemical characterization of one Epsilon-class (GST-3) and ten Delta-class (GST-1) glutathione S-transferases from *Drosophila melanogaster*, and identification of additional nine members of the Epsilon class. *Biochem. J.* 370, 661–669.
- Schmidt-Krey, I., Mitsuoka, K., Hirai, T., Murata, K., Cheng, Y., Fujiyoshi, Y., Morgenstern, R., Hebert, R., 2000. The three-dimensional map of microsomal glutathione transferase 1 at 6 Ångstrom resolution. *EMBO J.* 19, 6311–6316.
- Schuller, D.J., Liu, Q., Kriksunov, I.A., Campbell, A.M., Barrett, J., Brophy, P.M., Hao, Q., 2005. Crystal structure of a new class of glutathione transferase from the model human hookworm nematode *Heligmosomoides polygyrus*. *Proteins* 61, 1024–1031.

- Sheehan, D., Meade, G., Foley, V.M., Dowd, C.A., 2001. Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. *Biochem. J.* 360, 1–16.
- Singh, S.P., Coronella, J.A., Benes, H., Cochrane, B.J., Zimniak, P., 2001. Catalytic function of *Drosophila melanogaster* glutathione S-transferase DmGSTS1-1 (GST-2) in conjugation of lipid peroxidation end products. *Eur. J. Biochem.* 268, 2912–2923.
- Soranzo, N., Gorla, M.S., Mizzi, L., De Toma, G., Frova, C., 2004. Organisation and structural evolution of the rice glutathione S-transferase gene family. *Mol. Genet. Genomics* 271, 511–521.
- Stanley, D., 2006. Prostaglandins and other eicosanoids in insects: biological significance. *Annu. Rev. Entomol.* 51, 25–44.
- Starr, R.C., Zeikus, J.A., 1993. The culture collection of algae at the University of Texas at Austin. *J. Phycol.* 29, 90–95.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S., 2007. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* 24, 1596–1599.
- Thom, R., Dixon, D.P., Edwards, R., Cole, D.J., Lapthorn, A.J., 2001. The structure of a zeta class glutathione S-transferase from *Arabidopsis thaliana*: characterisation of a GST with novel active-site architecture and a putative role in tyrosine catabolism. *J. Mol. Biol.* 308, 949–962.
- Thomson, A.M., Meyer, D.J., Hayes, J.D., 1998. Sequence, catalytic properties and expression of chicken glutathione dependent prostaglandin D2 synthase, a novel class Sigma glutathione S-transferase. *Biochem. J.* 333, 317–325.
- Tu, C.P.D., Akgul, B., 2005. *Drosophila* glutathione S-transferases. *Methods Enzymol.* 401, 204–226.
- Valles, S.M., Perera, O.P., Strong, C.A., 2006. Gene structure and expression of the glutathione S-transferase, SIGSTS1, from the red imported fire ant, *Solenopsis invicta*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 61, 239–245.
- Wagner, U., Edwards, R., Dixon, D.P., Mauch, F., 2002. Probing the diversity of the *Arabidopsis* glutathione S-transferase gene family. *Plant Mol. Biol.* 49, 515–532.
- Yamamoto, K., Miake, F., Aso, Y., 2007. Purification and characterization of a novel sigma-class glutathione S-transferase of the fall webworm, *Hyphantria cunea*. *J. Appl. Entomol.* 131, 466–471.
- Zhang, J.Z., 2003. Evolution by gene duplication: an update. *Trends Ecol. Evol.* 18, 292–298.

Methodology article

Open Access

## Normalisation genes for expression analyses in the brown alga model *Ectocarpus siliculosus*

Aude Le Bail<sup>†1,2</sup>, Simon M Dittami<sup>†1,2</sup>, Pierre-Olivier de Franco<sup>1,2</sup>,  
Sylvie Rousvoal<sup>1,2</sup>, Mark J Cock<sup>1,2</sup>, Thierry Tonon<sup>1,2</sup> and  
Bénédicte Charrier\*<sup>1,2</sup>

Address: <sup>1</sup>UPMC Univ Paris 6, UMR 7139 Végétaux marins et Biomolécules, Station Biologique, F 29682, Roscoff, France and <sup>2</sup>CNRS, UMR 7139 Végétaux marins et Biomolécules, Station Biologique, F 29682, Roscoff, France

Email: Aude Le Bail - lebail@sb-roscoff.fr; Simon M Dittami - dittami@sb-roscoff.fr; Pierre-Olivier de Franco - defranco@sb-roscoff.fr; Sylvie Rousvoal - rousvoal@sb-roscoff.fr; Mark J Cock - cock@sb-roscoff.fr; Thierry Tonon - tonon@sb-roscoff.fr; Bénédicte Charrier\* - charrier@sb-roscoff.fr

\* Corresponding author †Equal contributors

Published: 18 August 2008

Received: 24 February 2008

BMC Molecular Biology 2008, 9:75 doi:10.1186/1471-2199-9-75

Accepted: 18 August 2008

This article is available from: <http://www.biomedcentral.com/1471-2199/9/75>

© 2008 Le Bail et al; licensee BioMed Central Ltd.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

### Abstract

**Background:** Brown algae are plant multi-cellular organisms occupying most of the world coasts and are essential actors in the constitution of ecological niches at the shoreline. *Ectocarpus siliculosus* is an emerging model for brown algal research. Its genome has been sequenced, and several tools are being developed to perform analyses at different levels of cell organization, including transcriptomic expression analyses. Several topics, including physiological responses to osmotic stress and to exposure to contaminants and solvents are being studied in order to better understand the adaptive capacity of brown algae to pollution and environmental changes. A series of genes that can be used to normalise expression analyses is required for these studies.

**Results:** We monitored the expression of 13 genes under 21 different culture conditions. These included genes encoding proteins and factors involved in protein translation (ribosomal protein 26S, EF1alpha, IF2A, IF4E) and protein degradation (ubiquitin, ubiquitin conjugating enzyme) or folding (cyclophilin), and proteins involved in both the structure of the cytoskeleton (tubulin alpha, actin, actin-related proteins) and its trafficking function (dynein), as well as a protein implicated in carbon metabolism (glucose 6-phosphate dehydrogenase). The stability of their expression level was assessed using the Ct range, and by applying both the geNorm and the Normfinder principles of calculation.

**Conclusion:** Comparisons of the data obtained with the three methods of calculation indicated that EF1alpha (EF1a) was the best reference gene for normalisation. The normalisation factor should be calculated with at least two genes, alpha tubulin, ubiquitin-conjugating enzyme or actin-related proteins being good partners of EF1a. Our results exclude actin as a good normalisation gene, and, in this, are in agreement with previous studies in other organisms.

## Background

Brown algae (Phaeophyceae) are multi-cellular marine organisms that grow along temperate, tropical and polar coasts. Many of them are subject to frequent changes in their local environment, because they are uncovered at low tide, and are hence exposed to desiccation, and to variations in osmotic pressure due to rain or evaporation. In addition, pollution of the coasts, due to human activities, constitutes an additional source of abiotic stress, to which they must develop adaptive mechanisms. Expression analyses of genes involved in the perception of the stress, and in the establishment of the appropriate responses, provide a means to decipher the molecular mechanisms potentially involved in such adaptations. Despite the availability of medium scale cDNAs libraries for several different species of the brown algae (*Laminaria*, *Sargassum*, and *Fucus*), this task has been hindered by the lack of genome-scale resources. In 2004, Peters et al. [1] have compared a range of features in several species of Phaeophyceae and concluded that *Ectocarpus siliculosus* was the best candidate to consider for such developments. Recently, the genome of this alga has been sequenced, offering a unique opportunity to survey the expression of gene families in brown algae (Genoscope, J.M. Cock, unpublished data). *E. siliculosus* is a small filamentous alga, extensively studied over the last two centuries for its complex life cycle and its physiological features (reviewed in [2]). The genome is currently being annotated, allowing the initiation of both large scale and targeted surveys of the *Ectocarpus* genes, such as microarrays or real-time RT-PCR respectively.

Compared to high-throughput microarray techniques, real-time quantitative RT-PCR only allows assays of gene expression to be carried out at relatively low throughput (10–20 genes in 10–50 samples). Nonetheless, this technique has been adopted by a large community as a standard method for gene expression studies, because of its high reliability, and its rapidity of execution [3,4]. This technique is now widely used for a large number of animal and plant organisms, as well as for bacteria and viruses.

A few years after the emergence of this technique, a need for a reliable normalisation method became insistent. Different methods of identifying normalisation genes, such as geNorm [5], NormFinder [6] and BestKeeper [7], were then developed. This was followed by a wave of reports on the identification of the best normalisation genes from a broad range of species and specific tissues. These biological materials included human tissues [8-10] and viruses [11], as well as tissues from a variety of animals such as cow [12], pig [13], horse [14], dolphin [15], fishes [16,17], worm [18] and others. In parallel, a similar extension of the use of this technique was observed in plant

research, for rice [19], poplar [20], potato [21], grapevine [22], and for plant pathogens [23].

In the brown alga *E. siliculosus*, the expression level of 20 genes specific to the two generations in the life-cycle of this alga was recently reported in a mutant impaired in development [24]. Additional developmental and physiological studies are underway, including studies aimed at assessing the resistance of this alga to environmental changes. Hence, the availability of a set of housekeeping genes for normalising the expression levels of genes of interest is a pre-requisite to any valuable conclusion, especially since this organism lives in a frequently changing environment.

In this paper, we propose optimal normalisation genes for expression analyses in *E. siliculosus*. Thirteen housekeeping genes that have been reported to be good potential candidates in the previously cited literature, were chosen for this task. Their expression was examined by Q-RT-PCR in a diversity of algal samples corresponding to growth kinetic series, osmotic stress experiments, and chemical treatments. Namely, the candidate genes are involved in the synthesis and the dynamics of the cytoskeleton, in the synthesis, folding and degradation of proteins, and in the metabolism of carbon, all of these processes being known to be only moderately affected by the fluctuation of growth conditions.

## Results

### Treatments applied to *E. siliculosus* and choice of housekeeping genes

Several different stresses were tested in this study. Chemical agents tested included H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, a reactive oxygen species produced by many organisms, including seaweeds, under conditions of abiotic and biotic stresses [25]. We also tested heavy metals such as copper, which are among the most significant pollution actors in marine environments worldwide. Diuron and atrazine are herbicides that inhibit photosynthesis by blocking the d1 protein of photosystem II [26,27]. Diuron is also an additive of antifouling paints, which prevent growth of organisms on ships' hulls. In addition pathogen or grazer attacks were mimicked by wounding *E. siliculosus* tissues with a razor blade. We also tested the effect of oxylipins. These are oxygenated derivatives of polyunsaturated fatty acids which play a major role in inflammatory processes, allergies, and, in a wide sense, defensive stress responses to infection, drugs, and xenobiotics [28]. In land plants, C18 derived jasmonates play a pivotal role in defense induced mechanisms [29]. In mammals, oxidation of the C20 arachidonic acid produces derivatives such as leukotriens and prostaglandins. As brown algae are able to produce oxylipins typical of both land plants and animals [30], their putative action on the induction of stress signalling path-

ways is of particular interest. Finally, as the metabolism and the physiology of brown algae are regulated to a large extent by diurnal rhythms, a time series of samples taken over a single day was also analysed.

RNA was extracted from biological triplicates of algae that had received the above treatments resulting in a total of 63 samples for 21 different treatments (see Table 1, and Methods for details on concentration and timing). Single strand cDNA was synthesised simultaneously from each of the 63 extracts in order to minimize any variation during this step of the process. The abundance of the transcripts of 13 potential housekeeping genes was then assayed on these cDNAs. The genes tested included commonly used genes such as a ribosomal protein and translation initiation or elongation factors (eIF2A, eIF4E, EF1a, 26S ribosomal protein), cytoskeleton proteins (tubulin alpha, actin and actin-related proteins), and proteins involved in the protein degradation process (ubiquitin and ubiquitin-conjugating enzyme). In addition, cyclophilin, two actin-related proteins, a tubulin molecular motor (dynein) and an enzyme involved in the pentose phosphate pathway (glucose 6-phosphate dehydrogenase) were included in this study. The genes tested are listed in Table 2.

**Table 1: Culture conditions and duration.**

Type of treatment	Final concentration	Duration
Diurnal cycle		0 h
Diurnal cycle		6 h
Diurnal cycle		12 h
Diurnal cycle		18 h
Diurnal cycle		24 h
ASW	450 mM NaCl	3 h
DMSO	1% (V:V)	3 h
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	10 mM	3 h
CuSO <sub>4</sub>	10 μM	3 h
Atrazine	55 μg. L <sup>-1</sup>	3 h
13-HOTrE	5 μM	3 h
15-HEPE	5 μM	3 h
ASW	450 mM NaCl	6 h
Ethanol	0.2% (V:V)	6 h
CuSO <sub>4</sub>	10 μM	6 h
Diuron	42 μg.L <sup>-1</sup>	6 h
Wounding		6 h
ASW	450 mM NaCl	6 h
Hyposaline	60 mM	6 h
Hypersaline	1,5 M	6 h
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	1 mM	6 h

Treatments were applied under light (see Material and Methods for details). ASW: artificial sea water; DMSO: dimethyl sulfoxide; 13-HOTrE: 13-hydroxyoctadecatrienoic acid; 15(S)-HEPE: 15-hydroxyeicosapentaenoic acid.

### Quantification and data analysis

In order to assess whether the transcripts of these 13 genes remained at comparable levels in the different samples tested, we calculated the variation in the Ct value for each gene. Figure 1A shows that the transcripts of these genes exhibited different levels of abundance, with *CYC* being expressed at the lowest level, and *UBQ* being expressed the most strongly. Variation in transcript accumulation across the 21 culture conditions was not the same for all the genes tested. *EF1a* showed the weakest variation, while *G6PD* expression seemed to be strongly influenced by the treatments, its range of expression level exceeding 10 Ct (Figure 1B).

In order to test the robustness of these data, we performed the geNorm pairwise analysis, which was first described by Vandesompele et al. [5], and has since been widely used to evaluate the stability of expression of genes from many organisms. The results of this analysis (Figure 2) were slightly different from those obtained with the Ct value calculation. The two calculation methods identified the same least and most stably expressed genes (*G6PD* and *CYC* were the least stable, and *TUA*, *EF1a* and *Dyn* were the most stable), but the intermediate genes were ordered differently. This was particularly striking for *ARP2.1* and *UBCE*, which the geNorm analysis indicated were the most stably expressed genes, and which the Ct value analysis indicated to be among the least stably expressed. In order to test whether averaging the biological triplicates had an effect on the final result, we performed the geNorm analysis using the transcript abundances measured in the 63 individual cDNA samples, as previously described [31]. This analysis identified the same genes as having either highly variable (*CYC*, *G6PD* and *ACT*) or very stable (*ARP2.1*, *UBCE*, *TUA*, *EF1a* and *Dyn*) transcript abundances, but the order of the six remaining genes was again different (data not shown). Thus, averaging the biological replicates modified the results of the analysis for the intermediate genes, but not for the most and the least stable genes. A one-way ANOVA test showed that for most of the genes considered individually, the variance between the different culture conditions is significantly higher than the variance between the biological replicates for a given condition (see Additional file 1). Therefore, averaging on the three biological replicates should not introduce any significant distortion.

NormFinder is another approach that has been used to assess the stability of expression of housekeeping genes [6]. When NormFinder was applied to the data obtained in this study, it indicated that the genes with the most stable levels of transcript abundance were *TUA*, *ARP2.1*, *EF1a* and *Dyn* (Table 3). These were almost the same genes as the ones identified by geNorm, with the exception that *Dyn* performed better than *UBCE*. Therefore,

**Table 2: Candidate housekeeping genes tested in this study.**

Gene symbol	Homologous to	Description of trace archive	Accession number	Oligonucleotides – Forward – Reverse	E (%)	R2	Tm product	PCR product length (bp)
ACT	Actin	KY0AIB94YO18AHMI	I927036313	CCCAGATCATGTTTCGAGACGTT CACGCCGTACCCGAGTC	91	1.000	87.80	119
ARP2.1	p34-arc subunit of the actin-related protein complex ARP2/3	KY0AFIPA38YJ23RMI	I927195696	GAAGGAGTTCTGCCGGGAAG ACAAAGCAGCAACGCAGAGA	98	0.994	84.50	121
ARP2.2	ARP2 subunit of the actin-related protein complex ARP2/3	KY0AIB269YJ02AHMI	I929831232	GAAGAAGTCAAGCTCAACATCGA CCGCACCCCAATGAAA	104	0.998	80.90	68
CYC	Cyclophilin	KY0ADB29YF06FMI	I291599781	AGACGGCGGTGCAAGTAGG GTGAGTCACGGCTGCTTTTATG	92	0.997	84.80	101
Dyn	Dynein light chain protein	KY0AEB344YP09RMI	I306215256	GGAACAAAGCATGGTGACAACA CGGTGCCTATCCAAGCT	100	0.999	81.20	65
EF1alpha	Translation elongation factor 1 alpha	KY0AEC342YI10RMI	I291335619	GCAAGGGCCTCAGCTCTG ACAAGCCGCTCTGGGTATATGTTAGC	92	0.997	81.50	160
G6PD	Glucose 6 phosphate dehydrogenase	KY0AEF243YN02RMI	I299896231	GTGAGGATGTTCCAGTCCCAG GTGGAAGACCCGGTGAGGT	90	0.996	84.50	101
IF2A	Translation initiation factor eIF2 alpha	KY0AIB251YB11AHMI	I918199315	GCGGTACGTGATGGACACC CCCCGACTCGATGATCTTT	94	0.991	84.80	101
IF4E	Translation initiation factor eIF4E	KY0ADA42YE14FMI	I291478318	TCCGATTTCGAGGTTTGAGTA CAAACGCTGCGGCAGC	100	0.991	82.40	71
R26S	Ribosomal protein 26S	KY0AEC624YL15RMI	I300144654	GCTAGGCTTGCCTTTGTGTG GGCGAGACAGAAAGATTCCG	93	0.995	85.40	101
TUA	Alpha tubulin	KY0AEC614YE14RMI	I299935912	TTTGAGGAGTTTCGTGCGGAGAT CACACAGCGCAAAACGGC	92	0.999	83	140
UBCE	Ubiquitin conjugating enzyme	KY0AFIPA87YJ24RMI	I917772478	AACAATGGCCTTTGCGAAAA GCGTACGCTTGAAGCCAG	95	0.997	84.50	101
UBQ	Ubiquitin C	KY0AEC576YH18FMI	I306241438	CAACGCCATGATTGTTTAC GATTATCCCATCCACGGCA	100	0.997	82.70	101
mN	Intron amplification	KY0AEF302YN21FMI	I306150449	TCATTTTTCATGTGGAGGTCTCTG GCCAAACAACAACCCCTC	83	0.981	84.80	93

The identity of the sequences (gene name, function) is indicated in the left part of the table. The trace corresponds to trace archive at NCBI [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Traces/trace.cgi?cmd=retrieve&val=species\\_code%3D%22ECTOCARPUS+SILICULOSUS%22](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Traces/trace.cgi?cmd=retrieve&val=species_code%3D%22ECTOCARPUS+SILICULOSUS%22). Parameters on the corresponding amplified product (oligonucleotides, amplicon Tm and size, reaction efficiency and reliability) are indicated in the right part.

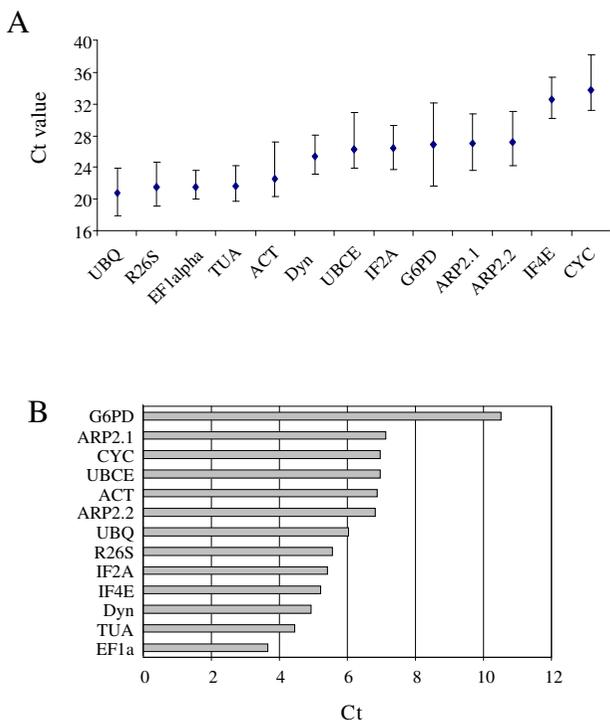
there was a very good correlation between the results obtained from geNorm and NormFinder, despite the fact that the methods of calculation are fundamentally different.

In order to test whether the normalisation genes identified above were also the best choices for specific conditions, we performed expression stability measurements on distinct series of treatments *i.e.* osmotic stresses, chemical treatments and diurnal rhythm. Figure 3 shows that with both the geNorm and NormFinder calculation methods (A and B) the optimal choice of normalisation gene depended on the type of experiments. Thus, although *EF1a* remained among the most stable genes, variations in the identity of the other very stable genes were observed depending on the treatment. This was particularly striking for the *ACT* gene, the abundance of its transcript showing a high level of variability following all the treatments except osmotic stresses. The transcript of the *TUA* gene varied significantly in abundance in the diurnal sample series (see Additional file 2), but remained at a stable level in the abiotic stress treatments. Note that *CYC* and *G6PD*, which showed the greatest variability in transcript abundance in the global analyses, were also highly variable in each of the different classes of experiment.

To calculate the number of normalisation genes necessary to obtain the normalisation factor we determined, using geNorm, the pairwise variation between sets of normalisation factors obtained when using two, three or more genes for normalisation. Figure 4 shows that the normalisation factors are only modified slightly when a third (or more) gene is added (pairwise variation of 0.13 for 3 genes). Vandesompele et al. [5] recommended that additional normalisation genes be included if the pairwise variation between the normalisation factors is higher than 0.15. According to geNorm, measuring the expression levels of *ARP2.1* and *UBCE* is sufficient to normalise the expression of genes of interest in these samples.

### Discussion

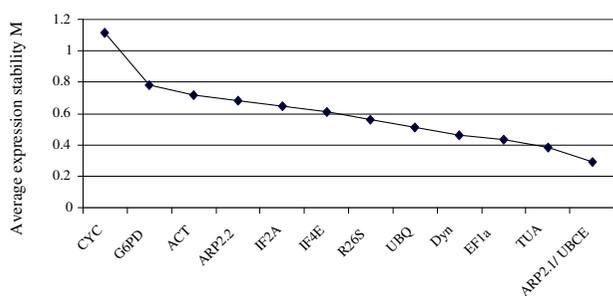
In this study, the three methods used to identify the best normalisation genes were concordant, as previously reported in other studies [10]. Comparison of the three methods indicates that *EF1a* is the most reliable gene to normalise gene expression in experiments aiming at quantitatively measuring the transcriptional response to abiotic stresses and chemical treatments. The V pairwise analysis shows that two genes are sufficient for a proper expression normalisation. The choice of the second gene, however, will depend on the type of experiment that is being carried out. For osmotic stresses and chemical treat-



**Figure 1**  
**Expression level of 13 housekeeping genes.** A: The range of the expression level of the 13 genes over the 21 culture conditions is expressed in Ct values. The black diamond represents the arithmetic mean. B: Variations observed in the range of Ct values.

ments, *TUA* can be used reliably, while for the diurnal cycle *ARP2.2* is more relevant.

As a brown alga, *E. siliculosus* is member of the kingdom of the Heterokonta, which is phylogenetically very distant from animals and land plants [32]. Interestingly, and



**Figure 2**  
**Global ranking of the 13 housekeeping genes using geNorm analysis.** The M value was calculated with the geNorm software [5]. Low values of M indicate that a gene is expressed very stably.

**Table 3: Normfinder analysis of the expression stability of the 13 genes.**

Gene name	Stability value
TUA	0.099
ARP2.1	0.182
EF1a	0.220
Dyn	0.227
UBCE	0.240
UBQ	0.401
IF4E	0.403
IF2A	0.406
ARP 2.2	0.422
R26S	0.479
ACT	0.558
G6PD	0.655
CYC	1.964

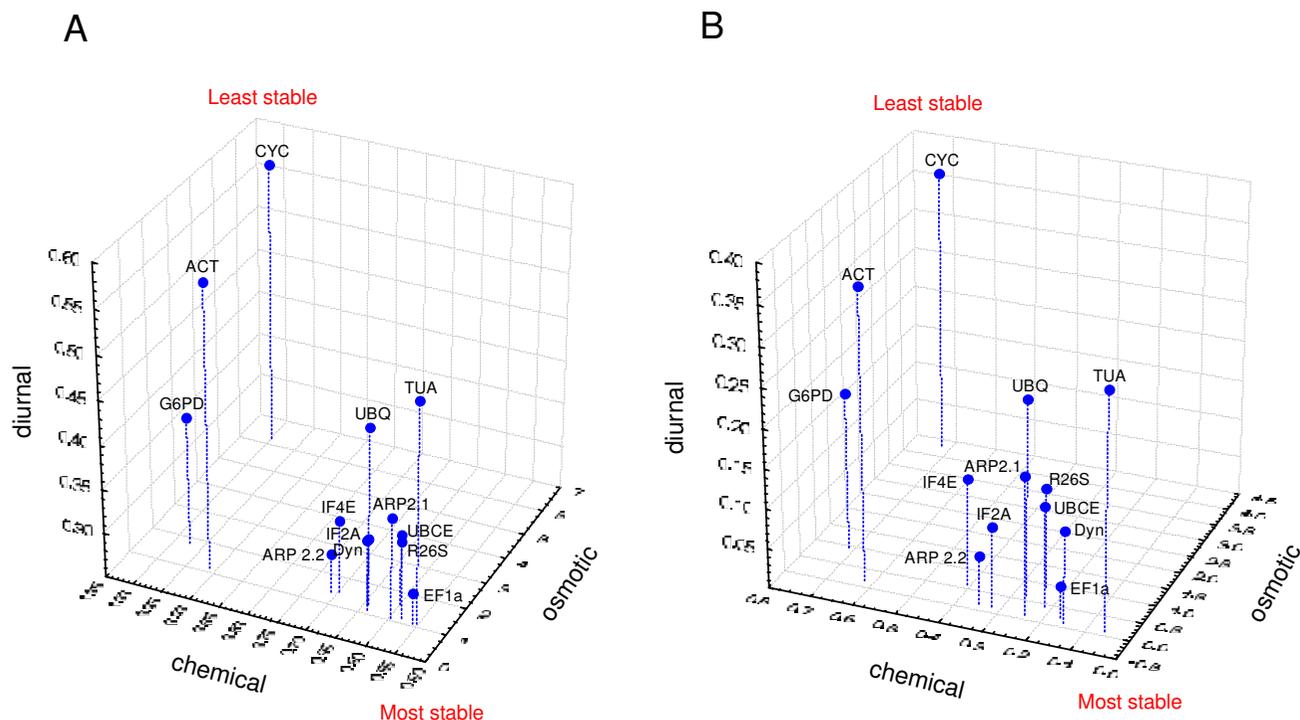
The stability of expression of the 13 genes was calculated using the Normfinder method designed by Andersen et al.[6]

despite this evolutionary distance, a consensus seems to emerge from similar analyses performed in organisms belonging to distant lineages. The gene coding for the elongation factor of protein translation *EF1a* was shown to be the best reference genes in salmon [17] and in several plants such as in rice [19], grapevine [22] and potato [21]. The alpha tubulin encoding gene was also reported to be one of the best reference genes for horse tissues [13] and in poplar [19]. On the other hand, actin genes have been very often reported as exhibiting highly variable levels of expression in both human and animals tissues [10,12,16-18], and in plants [19]. In this study, we have shown that this is also true for *E. siliculosus*.

Despite the fact that ubiquitin and related enzymes (UBCE) are not commonly used as normalisation genes, in this study, they were found to be quite suitable. Interestingly, Czechowski et al. [31] showed, using microarray analysis, that genes of the ubiquitin complex, comprising an ubiquitin conjugating enzyme such as UBCE, and several E3-ubiquitin protein ligases, were very stably expressed. They also pointed out that genes with fairly low levels of expression such as *UBCE* may be of particular interest for normalising expression levels of genes that are expressed at moderate to low levels, such as transcription factors. This latter example illustrates how microarray analyses may be useful to find additional normalisation genes, which can be then tested by Q-PCR for their suitability.

**Conclusion**

*E. siliculosus* is recognised as the genomic and genetic model of brown macroalgae [1,2]. As the genome sequence is currently in the phase of expert annotation, the community interested in *E. siliculosus* is likely to grow in the near future. The results presented in this paper pave



**Figure 3**  
**Ranking of the 13 housekeeping genes over the three different series of culture conditions.** Both geNorm (A) and Normfinder (B) were used to order the housekeeping genes according to three axes, corresponding to the three series of culture conditions/treatments. The position of each gene in the 3-D graph indicates its suitability as a reference gene. The front bottom position corresponds to the most stable gene, the far top position to the most regulated gene. Note the different scales on the axes.

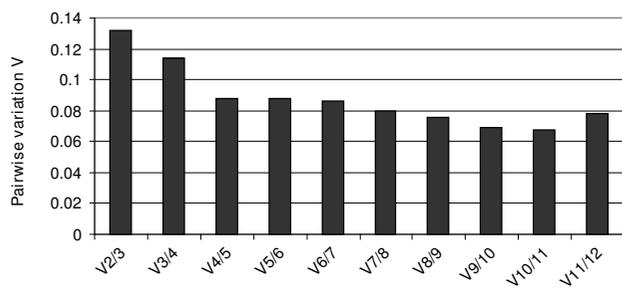
the way for further studies on different aspects of *E. siliculosus* biology including development/morphogenesis and abiotic/biotic stress responses. In addition, they will be helpful for comparison with results from microarray hybridizations, which are currently in progress.

**Methods**

**Culture conditions and treatments**

*E. siliculosus* (Ectocarpales, Phaeophyceae) unialgal strain 32 (CCAP accession 1310/4, origin san Juna de Marcona, Peru) was cultivated in 10 L plastic flasks in a culture room at 14°C using filtered and autoclaved natural seawater enriched in Provasoli nutrients [33]. Light was provided by Philips daylight fluorescence tubes with a photon flux density of 40 μmol. m<sup>-2</sup>. s<sup>-1</sup> for 14 hours per day. Cultures were bubbled with filtered (0.22 μm) compressed air to avoid CO<sub>2</sub> depletion. To conduct the chemical treatment experiments, algal tissues were transferred into Petri dishes containing artificial seawater enriched with Provasoli (ASW) for at least 18 h before treatments in order to acclimatize the cultures to the change of growth conditions. They were then treated with different chemi-

cals for 3 and/or 6 h (see Table 1) during the light phase. The treatments were 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (final concentration), 42 μg.L<sup>-1</sup> Diuron, 55 μg.L<sup>-1</sup> atrazine, 5 μM 13-HOTrE and 15(S)-HEPE. Algae were also incubated in 10 μM CuSO<sub>4</sub> for 3 and 6 h. An equal volume of solvent (ASW or DMSO 1%) was used in each corresponding control treatment. Wounding was carried out by damaging the tissues with a razor blade. To perform saline stress and an additional H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment, tissues were transferred to ASW for one week before applying the stress. The NaCl concentration in control ASW was 450 mM, while it was 60 mM and 1.5 M in ASW used to submit the alga to hyposaline and hypersaline conditions respectively. In addition, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was added at 1 mM final concentration to the control ASW for generating oxidative stress. Treatments were applied for 6 h before harvesting the tissues for RNA extraction. To collect samples through the diurnal cycle, algae were incubated in ASW and tissue harvested every 6 h during one day. The first sample was taken 30 min after the beginning of the light period. The summary of the culture conditions is presented in Table 1.



**Figure 4**  
**Determination of the optimal number of control genes for normalisation.** The pairwise variation V of the normalisation factors was calculated for the 21 different culture conditions for the 13 housekeeping genes with the geNorm software [5].

Three biological replicates were obtained for each treatment and these were used for total RNA extraction.

#### RNA extraction

The protocol used for RNA extraction was based on the method developed by Apt et al. [34] with some modifications. Frozen tissue was ground in liquid nitrogen and immediately incubated in the presence of extraction buffer (100 mM Tris-HCl pH 7.5, 2% CTAB, 1.5 M NaCl, 50 mM EDTA, 50 mM DTT). The sample was shaken at room temperature for 30 min, then one volume of chlorophorm:isoamyl alcohol (24:1, V/V) was added and the sample shaken again for 25 min. After centrifugation, the upper phase was transferred to a new tube and mixed with 0.3 V of absolute ethanol to precipitate the polysaccharides, and extracted with 1 V of chlorophorm. After centrifugation the upper phase was transferred to a fresh tube and RNA was precipitated by addition of 0.25 V of 12 M LiCl and  $\beta$ -mercapto-ethanol to 1% final concentration, overnight at  $-20^{\circ}\text{C}$ . After centrifugation, the pellet was resuspended for DNase treatment by an RNase-free DNase I (Turbo DNase, Ambion) according to the manufacturer's instructions, in order to eliminate any residual genomic DNA from the preparation. An extraction was then carried out by adding Phenol-Chlorophorm (1:1, V/V). After centrifugation the upper phase was transferred to a fresh tube, and extracted with 1 V of chlorophorm:isoamyl alcohol (24:1, V/V) and centrifuged again. The upper phase was precipitated with 0.3 M NaAc pH 5.5 and 75% ice cold ethanol by incubating overnight at  $20^{\circ}\text{C}$ . After centrifugation, the supernatant was removed, and the pellet washed with 80% ethanol. After centrifugation and drying on ice, the pellet was resuspended in an appropriate volume of RNase-free water.

#### Quantification of RNAs and cDNA synthesis

Nucleic acid concentrations were measured by the absorbance at  $\text{OD}_{260}$  using a NanoDrop ND-1000 spectrophotometer. The purity of the RNA samples was assessed by measuring the ratio  $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$  and  $\text{OD}_{230}/\text{OD}_{260}$  (see Additional file 3). RNA integrity was then verified on 1.5% agarose gel stained with ethidium bromide (see Additional file 4). From each RNA sample, 1.4  $\mu\text{g}$  was reverse transcribed to cDNA using oligo(dT)<sub>12-18</sub> and the Superscript™ First Strand synthesis for RT-PCR (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions, and subsequently diluted with nuclease free water to 1  $\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$  cDNA.

#### Protocol for DNA extraction

Frozen tissue was ground in liquid nitrogen and then in a wheaton potter with 15 ml of extraction buffer (100 mM Tris-HCl pH7.5; 1.5 M NaCl; 2% CTAB; 50 mM EDTA; 50 mM DTT) per g of wet tissue. The suspension was then mixed vigorously at room temperature for at least 30 min. Proteins were degraded with 25 units of proteinase K for 2 h at  $55^{\circ}\text{C}$ , and then extracted with chlorophorm/isoamyl alcohol for several minutes. Polysaccharides were precipitated with progressive addition of 0.2 – 0.3 V of ethanol, and then extracted with 1 V of chloroform after spinning at 10,000 g and  $20^{\circ}\text{C}$  for 20 min. Nucleic acids were recovered from the upper phase by addition of 0.25 V of 12 M LiCl and 1% of  $\beta$ -mercaptoethanol, incubation at  $-20^{\circ}\text{C}$  overnight and spinning at 10,000 g and  $4^{\circ}\text{C}$  for 1 h. The supernatant was precipitated with 0.6 V isopropanol, 0.3 M NaAc pH 5.2, left at  $4^{\circ}\text{C}$  for 30 min, and then spun down for 30 min at 13,000 g. The pellet was then dissolved in 400  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$ , and precipitated again with ethanol and NaAc. DNA was dissolved in 500  $\mu\text{l}$  of TE (10 mM Tris-HCl pH 8.0; 1 mM EDTA), 5.4 M CsCl (density 1.66) and 250  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  of ethidium bromide. Spinning at 90,000 g for 24 h at room temperature allowed the recovery of a band containing ultrapure genomic DNA under UV. Ethidium bromide was extracted 4–5 times with TE-saturated butanol and CsCl eliminated by successive ethanol precipitations.

#### Real-time PCR

All the genes were quantified on the same lot of cDNAs, to minimize experimental variation that could be due to cDNA synthesis. For each gene, a pair of oligonucleotide sequences was designed in the 3' UTR of the genes when the sequence was known, or in the 3' coding sequence using Primer Express TM1.0 (PE Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) (Table 2). The Q-PCR reactions were performed in a 96-well thermocycler (Biorad, Opticon) with SYBRgreen reaction mix from ABgene (AB-1162/B), for 15 min at  $95^{\circ}\text{C}$ , followed by 41 runs of 15 sec at  $95^{\circ}\text{C}$  and 1 min at  $60^{\circ}\text{C}$ . Each sample was technically duplicated. *E. siliculosus* genomic DNA was used as a quantifica-

tion reference. A dilution series ranging from 37 to 48671 copies of the *E. siliculosus* genome was prepared and tested for each gene. The amplification efficiency was tested using this dilution series (Table 2). The specificity of amplification was checked with a dissociation curve obtained by heating the samples from 65°C to 95°C (Table 2). In addition to the DNase-I treatments of RNAs, the absence of a genomic DNA contaminants was checked, by amplifying an intron sequence on the cDNAs. The number of copies of contaminant gDNA was subtracted from all other values, prior to any further analyses.

### Abbreviations

13-HOTrE: 13-hydroxyoctadecatrienoic acid; 15(S)-HEPE: 15-hydroxyeicosapentaenoic acid; ACT: actin; ARP2: actin-related protein 2/3; ASW: artificial sea water; CYC: cyclophilin; DMSO: dimethyl sulfoxide Dyn: dynein; EF1a: translation elongation factor alpha; G6PD: glucose 6-phosphate dehydrogenase; IF2A: translation initiation factor 2 A; IF4E: translation initiation factor 4E; R26S: ribosomal protein 26S; TUA: tubulin alpha; UBCE: ubiquitin conjugating enzyme; UBIQ: ubiquitin.

### Authors' contributions

P-O dF, SR and SD extracted the RNAs. SR provided *Ectocarpus* genomic DNA. TT tested the quality of the RNAs and performed the cDNA synthesis. MC gave access to the *E. siliculosus* genomic resources. BC chose the housekeeping genes, found homologues in the *Ectocarpus* databases and designed the oligonucleotides for Q-PCR. ALB and SD carried out the Q-PCR experiments. Analyses of the data were performed equally by ALB, SD, TT & BC. The MS was written by TT and BC, and approved by all the authors.

### Additional material

#### Additional file 1

One-way ANOVA test for the significance of the biological triplicate averaging. An ANOVA was performed on the three biological replicates of all the data, with the groups corresponding to the different treatments. The resulting p-values are shown in the table.

Click here for file

[http://www.biomedcentral.com/content/supplementary/1471-2199-9-75-S1.pdf]

#### Additional file 2

Gene expression during the diurnal cycle.

Click here for file

[http://www.biomedcentral.com/content/supplementary/1471-2199-9-75-S2.xls]

#### Additional file 3

Quantification and quality of the RNAs used in this study.

Click here for file

[http://www.biomedcentral.com/content/supplementary/1471-2199-9-75-S3.pdf]

#### Additional file 4

RNA extracts considered in this study. From the 83 RNAs run on the gel, the ones used for the cDNA synthesis are labelled in red. Between 400 to 900 ng of RNA were loaded on the gel.

Click here for file

[http://www.biomedcentral.com/content/supplementary/1471-2199-9-75-S4.pdf]

### Acknowledgements

We thank Julia Morales (Station Biologique de Roscoff) for her help concerning the identification of the IF2A and EF1a genes, and Bernard Billoud (Atelier de Bioinformatique de l'Université Pierre et Marie Curie Paris-6) for his assistance with statistical analyses. ALB and P-O dF are granted by the French Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche. SD has received funding from the European community's Sixth Framework Programme (ESTeam n° contract MESTCT 2005-020737).

### References

- Peters AF, Marie D, Scornet D, Kloareg B, Cock JM: **Proposal of *Ectocarpus siliculosus* (Ectocarpales, Phaeophyceae) as a model organism for brown algal genetics and genomics.** *J Phycol* 2004, **50**:1079-1088.
- Charrier B, Coelho S, Le Bail A, Tonon T, Michel G, Potin P, Kloareg B, Boyen C, Peters AF, Cock JM: **Development and physiology of the brown alga *Ectocarpus siliculosus*: two centuries of research.** *New Phytol* 2008, **177**:319-332.
- Gachon C, Mingam A, Charrier B: **Real-time PCR: What relevance to plant studies?** *J Exp Bot* 2004, **55**:1445-1454.
- Bustin SA, Benes V, Nolan T, Pfaffl MW: **Quantitative real-time RT-PCR – a perspective.** *J Mol Endocrinol* 2005, **34**:597-601.
- Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paep A, Speleman F: **Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes.** *Genome Biol* 2002, **3(7)**:RESEARCH0034.
- Andersen CL, Jensen JL, Ørntoft TF: **Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets.** *Cancer Res* 2004, **64**:5245-5250.
- Pfaffl MW, Tichopád A, Prgomet C, Neuvians TP: **Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper – Excel-based tool using pair-wise correlations.** *Biotechnol Lett* 2004, **26**:509-515.
- McNeill RE, Miller N, Kerin MJ: **Evaluation and validation of candidate endogenous control genes for real-time quantitative PCR studies of breast cancer.** *BMC Mol Biol* 2007, **8**:107.
- Perez S, Royo LJ, Astudillo A, Escudero D, Alvarez F, Rodriguez A, Gomez E, Otero J: **Identifying the most suitable endogenous control for determining gene expression in hearts from organ donors.** *BMC Mol Biol* 2007, **8**:114.
- Pombo-Suarez M, Calaza M, Gomez-Reino JJ, Gonzalez A: **Reference genes for normalization of gene expression studies in human osteoarthritic articular cartilage.** *BMC Mol Biol* 2008, **9**:17.
- Watson S, Mercier S, Bye C, Wilkinson J, Cunningham AL, Harman AN: **Determination of suitable housekeeping genes for normalisation of quantitative real time PCR analysis of cells infected with human immunodeficiency virus and herpes viruses.** *Viral J* 2007, **4**:130.
- Goossens K, Van Soom A, Van Poucke M, Vandaele L, Vandesompele J, Van Zeveren A, Peelman LJ: **Identification and expression analysis of genes associated with bovine blastocyst formation.** *BMC Dev Biol* 2007, **7**:64.
- Kuijk EW, du Puy L, van Tol HT, Haagsman HP, Colenbrander B, Roelen BA: **Validation of reference genes for quantitative RT-PCR studies in porcine oocytes and preimplantation embryos.** *BMC Dev Biol* 2007, **7**:58.

14. Bogaert L, Van Poucke M, De Baere C, Peelman L, Gasthuys F, Martens A: **Selection of a set of reliable reference genes for quantitative real-time PCR in normal equine skin and in equine sarcoids.** *BMC Biotechnol* 2006, **6**:24.
15. Spinsanti G, Panti C, Lazzeri E, Marsili L, Casini S, Frati F, Fossi CM: **Selection of reference genes for quantitative RT-PCR studies in striped dolphin (*Stenella coeruleoalba*) skin biopsies.** *BMC Mol Biol* 2006, **7**:32.
16. Hibbeler S, Scharsack JP, Becker S: **Housekeeping genes for quantitative expression studies in the three-spined stickleback *Gasterosteus aculeatus*.** *BMC Mol Biol* 2008, **9**:18.
17. Ingerslev HC, Pettersen EF, Jakobsen RA, Petersen CB, Wergeland HI: **Expression profiling and validation of reference gene candidates in immune relevant tissues and cells from Atlantic salmon (*Salmo salar* L.).** *Mol Immunol* 2006, **43**:1194-1201.
18. Hoogewijs D, Houthoofd K, Matthijssens F, Vandesompele J, Vanfleteren JR: **Selection and validation of a set of reliable reference genes for quantitative sod gene expression analysis in *C. elegans*.** *BMC Mol Biol* 2008, **9**:9.
19. Jain M, Nijhawan A, Tyagi AK, Khurana JP: **Validation of housekeeping genes as internal control for studying gene expression in rice by quantitative real-time PCR.** *Biochem Biophys Res Commun* 2006, **345**:646-651.
20. Brunner AM, Yakovlev IA, Strauss SH: **Validating internal controls for quantitative plant gene expression studies.** *BMC Plant Biol* 2004, **4**:14.
21. Nicot N, Hausman JF, Hoffmann L, Evers D: **Housekeeping gene selection for real-time RT-PCR normalization in potato during biotic and abiotic stress.** *J Exp Bot* 2005, **56**:2907-2914.
22. Reid KE, Olsson N, Schlosser J, Peng F, Lund ST: **An optimized grapevine RNA isolation procedure and statistical determination of reference genes for real-time RT-PCR during berry development.** *BMC Plant Biol* 2006, **6**:27.
23. Takle GW, Toth IK, Brurberg MB: **Evaluation of reference genes for real-time RT-PCR expression studies in the plant pathogen *Pectobacterium atrosepticum*.** *BMC Plant Biol* 2007, **7**:50.
24. Peters AF, Scornet D, Ratin M, Charrier B, Monnier A, Merrien Y, Corre E, Coelho SM, Cock JM: **Life-cycle-generation-specific developmental processes are modified in the immediate upright mutant of the brown alga *Ectocarpus siliculosus*.** *Development* 2008, **135**:1503-1512.
25. Dring M: **Stress Resistance and Disease Resistance in Seaweeds: The Role of Reactive Oxygen Metabolism.** *Adv Bot Res* 2006, **43**:176-207.
26. Giacomazzi S, Cochet N: **Environmental impact of diuron transformation: a review.** *Chemosphere* 2004, **56**:1021-1032.
27. Graymore M, Stagnitti F, Allinson G: **Impacts of atrazine in aquatic ecosystems.** *Environ Int* 2001, **26**:483-495.
28. Funk CD: **Prostaglandins and Leukotrienes: Advances in Eicosanoid Biology.** *Science* 2001, **294**:1871-1875.
29. Blée E: **Impact of phyto-oxylipins in plant defense.** *Trends Plant Sci* 2002, **7**:315-21.
30. Cosse A, Leblanc C, Potin P: **Dynamic Defense of Marine Macroalgae Against Pathogens: From Early Activated to Gene Regulated Responses.** *Adv Bot Res* 2007, **46**:222-266.
31. Czechowski T, Stitt M, Altmann T, Udvardi MK, Scheible WR: **Genome-wide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization in *Arabidopsis*.** *Plant Physiol* 2005, **139**:5-17.
32. Baldauf SL: **The deep roots of eukaryotes.** *Science* 2003, **300**:1703-1706.
33. Starr RC, Zeikus JA: **The culture collection of algae at the University of Texas at Austin.** *J Phycol* 1993, **29**:90-95.
34. Apt KE, Clendennen SK, Powers DA, Grossman AR: **The gene family encoding the fucoxanthin chlorophyll proteins from the brown alga *Macrocystis pyrifera*.** *Mol Gen Genet* 1995, **246**:455-464.

Publish with **BioMed Central** and every scientist can read your work free of charge

"BioMed Central will be the most significant development for disseminating the results of biomedical research in our lifetime."

Sir Paul Nurse, Cancer Research UK

Your research papers will be:

- available free of charge to the entire biomedical community
- peer reviewed and published immediately upon acceptance
- cited in PubMed and archived on PubMed Central
- yours — you keep the copyright

Submit your manuscript here:  
[http://www.biomedcentral.com/info/publishing\\_adv.asp](http://www.biomedcentral.com/info/publishing_adv.asp)



# A new class of glutathione S-transferase from algae ?

Pierre-Olivier de Franco, Cécile Hervé, Thierry Tonon and Catherine Boyen

CNRS-UPMC, UMR 7139 "Marine Plants and Biomolecules", Station Biologique, F-29682 Roscoff Cedex, France  
defranco@sb-roscoff.fr

**Glutathione transferases (GSTs)** are ubiquitous enzymes mainly involved in the **cellular detoxification**. They are a superfamily of phase II enzymes that use glutathione in reactions contributing to the biotransformation and disposition of a wide range of exogenous and endogenous compounds (1). GSTs from different origin have been separated in **several classes** mainly based on amino acids sequence (2). Here, we report the first studies on macroalgae GSTs considering sequences from the red one *Chondrus crispus* and the brown ones *Laminaria digitata* and *Ectocarpus siliculosus*.

## 1 – Identification of red and brown algae GST

Search for GST sequences was carried out on *C. crispus* and *L. digitata* EST libraries generated from different alga tissues (3) (4). Number of introns was determined by comparison of EST sequences and fragment generated by PCR on genomic DNA. Number of copy for CcGST was obtained by Southern Blot experiment (Hervé et al. in preparation).

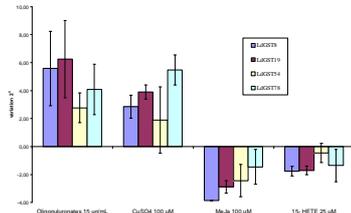
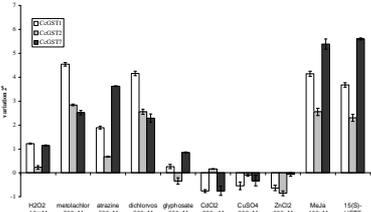
For *Ectocarpus siliculosus*, the emergent model for brown algae (5), data come from the Ectocarpus Genome Project.

	Gene size (bp)	ORF (bp)	Introns in coding region	Number of copy in the genome
<i>Chondrus crispus</i>				
CcGST 1	947	633	1	1
CcGST 2	1058	630	1	1
CcGST 7	776	693	0	>1
<i>Laminaria digitata</i>				
LdGST 8	1550	618	0	nd
LdGST 19	>3000	606	3	nd
LdGST 54	1111	621	0	nd
LdGST 78	926	639	0	nd
<i>Ectocarpus siliculosus</i>				
EsGST 588	2538	618	5	1
EsGST 658	3586	705	5	1
EsGST 2959	12292	606	5	2

These results show that **size of the genes** is different in brown and red algae while **ORF length** is equivalent. In addition, *Ectocarpus* genes contain more **introns** than *C. crispus* and *L. digitata*.

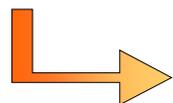
## 3 – Response of GST genes to various treatment

Quantitative RT-PCR have been performed to monitor changes in GST expression in response to different treatments. For *Laminaria*, treatment with oligoguluronates was conducted to mimic pathogen attack.



In *C. crispus*, herbicides, insecticides and fatty acids derivatives increase transcript accumulation of the 3 GSTs, in contrast to influence of metals.

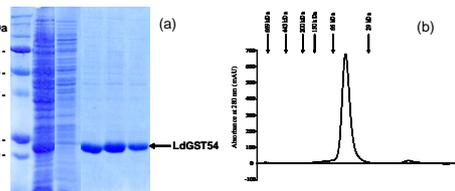
In *L. digitata*, fatty acids derivatives decrease GST transcript accumulation while treatment with oligoguluronates and CuSO4, that induce an oxidative burst in *L. digitata*, increase it



**Opposite** profiles of transcript accumulation suggest a different **regulation of GST expression** between the two species.

## 4 – Recombinant algal GSTs exhibit both transferase and peroxidase activities

Heterologous expression of His-tag recombinant protein have been carried out in *E. coli*. Purification was then performed by affinity chromatography.



LdGST54 and CcGST2 are both soluble (a) and produced as 52 kDa homodimers (b). LdGST 8, 19 and 78 are mainly produced in the insoluble fraction.

Substrate	Specific activity ( $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ of protein)	
	CcGST2	LdGST54
<b>Aryl halides</b>		
1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB)	1,05 +/- 0,07	0,58 +/- 0,01
1-fluoro-2,4-dinitrobenzene	20,34 +/- 0,59	1,65 +/- 0,04
<b>Organic hydroperoxides</b>		
Cumene hydroperoxide	5,50 +/- 0,21	6,12 +/- 0,13
13-HpODE	0,71 +/- 1,31	1,62 +/- 0,14
13-HpOTE	1,36 +/- 0,69	1,92 +/- 0,09
<b>Compound</b>	<b>Inhibitor concentration range (<math>\mu\text{M}</math>)</b>	<b>IC<sub>50</sub> (<math>\mu\text{M}</math>)</b>
Cibracon Blue	0-10	0,5
Chenodeoxycholic acid	0-1000	564
Lithocholic acid	0-1000	119
Indomethacin	0-1000	623
Acetyl salicylic acid	0-1000	>1000

CcGST2 shows higher **transferase activity** towards DNB derivatives than LdGST54 while both have **peroxidase activity** with hydroperoxides and C 18 polyunsaturated fatty acids.

The activity on CDNB is **strongly inhibited** by Cibracon Blue.

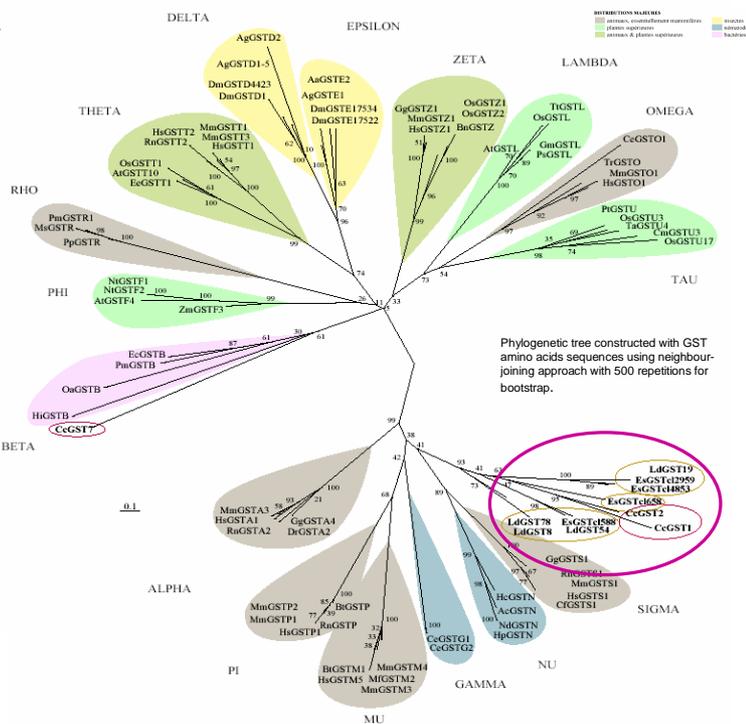
## 5 – Conclusion

Phylogenetic analyses suggest the **identification of a new algal-specific GST class**. The challenge is now to **identify the endogenous substrate** for these enzymes in order to depict the function of these GSTs. Moreover, pull-down experiments will be performed to identify potential protein partners. Transcriptomic and biochemistry should be combined to elucidate the **role of GST in algae metabolism**. To this aim, the **Ectocarpus Genome Project** represent a very promising context to have a **global approach** of GSTs in algal cells .

### References:

- (1)Hayes et al., Glutathione transferase. Annual review of pharmacology and toxicology, 2005
- (2) Mannervik and Danielson, Glutathione transferases – structure and catalytic activity. CRC critical reviews in biochemistry, 1988
- (3) Collen et al., An expressed sequence tag analysis of thallus and regenerating protoplasts of *Chondrus crispus* (Gigartinales, Rhodophyceae). Journal of phycoogy, 2006
- (4) Roesler et al., Identification of stress genes transcripts in *Laminaria digitata* (Phaeophyceae) protoplast cultures by expressed sequence tag analysis. Journal of phycoogy, 2005
- (5) Peters et al., Proposal of *Ectocarpus siliculosus* (Ectocarpales Phaeophyceae) as a model organism for brown algal genetics and genomics. Journal of phycoogy, 2004

## 2 – Algae GSTs : an unknown cluster



Phylogenetic tree constructed with GST amino acids sequences using neighbour-joining approach with 500 repetitions for bootstrap.

Phylogenetic studies suggest that **algal GST**, sharing 30 to 60 % amino acids identity, formed at least one **new class** .

# Algae reveal new outlines in the glutathione S-transferases family

C. Hervé, P-O. Defranco, T. Tonon, A. Groisillier, E. Gaquerel, J-P. Salaun, C. Boyen  
 CNRS/UPMC, UMR7139 Marine Plants and Biomolécules  
 Station Biologique de Roscoff, F-29682 FRANCE

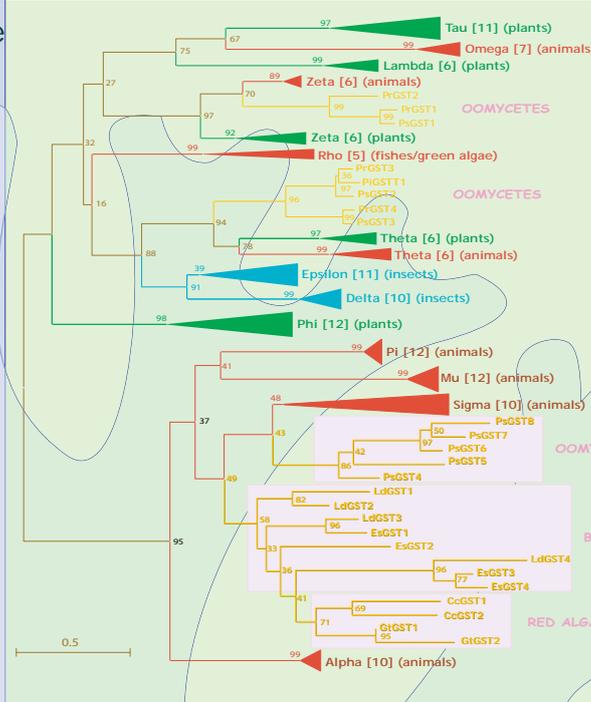
Glutathione S-transferases (GSTs) have a major role in cell-protection, acting through the detoxification process of xenobiotics.

Despite a wide range of GST sequences recovered from diverse phyla, none have been clearly identified from algae.

Algae which are frequently mistakenly regarded as plants, belong to eight independent photosynthetic eukaryotic lineages:

- Red algae (Rhodophyta) are considered to be a sister group to green plants.
- Brown algae belong to the major group of Heterokonta, also comprising the oomycetes.

## GST in algae-oomycetes: a new class, a new function?

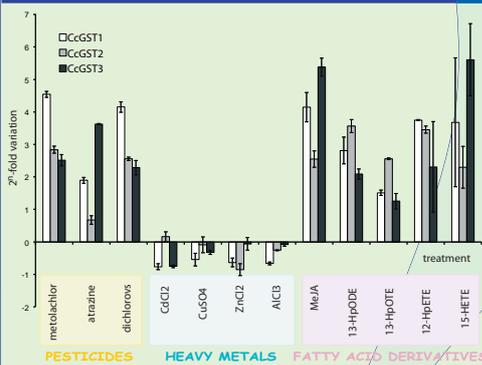


GST proteins compose a large superfamily divided into classes. Their classification does not follow the classical tree of life but a functional clustering.

- Despite their independent lineages, red and brown algal GSTs are grouped in the same cluster.
- they form a new class of GSTs in the large animal cluster,
  - they share a common ancestor with the Sigma class, which includes members that have a prostaglandin D2 synthase activity,
  - considering the functional clustering, they may have additional functions.

Unrooted neighbor-joining phylogenetic tree (1,000 bootstrap replicates) showing the relationship between GSTs from algae, oomycetes and the major GST classes.

## Prostaglandin synthesis and expression of GST genes: induced by the same MeJA treatment in the red alga

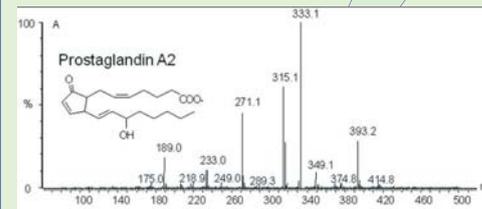


Treatments with methyl jasmonate (MeJA) and fatty acid derivatives induce the expression of the GST genes in the red alga *Chondrus crispus*.

Real-time PCR analysis of *C. crispus* GST genes in response to chemical treatments

MeJA treatment also induces the synthesis of prostaglandin A2 and 15-keto-prostaglandin E2 in the red alga *C. crispus*.

LC-MS detection of the production of prostaglandin A2 in *C. crispus* treated by MeJA

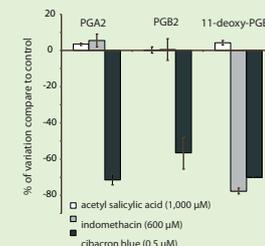


## Prostaglandin synthesis and activity of a recombinant GST show similar inhibition patterns

The *CcGST2* gene has been heterologously expressed. The enzyme has a glutathione S-transferase and a glutathione peroxidase activity.

Compound	IC <sub>50</sub> (µM)
cibacron blue	0.5
chenodeoxycholic acid	564
lithocholic acid	119
indomethacin	623
acetyl salicylic acid	>1,000

Inhibitor sensitivity of recombinant *CcGST2*.



Inhibitor sensitivity of the production of prostaglandins in *C. crispus* treated by

The *CcGST2* enzyme is strongly inhibited by cibacron blue. By contrast, indomethacin and acetyl salicylic acid do not show any significant inhibiting effect.

Cibacron blue also shows strong inhibiting effects on prostaglandin production in the red alga, while no effect is observed with acetyl salicylic acid and indomethacin.

Our results demonstrate the particular phylogenetic distribution of the algal GSTs within the large animal GST cluster. We propose that these red and brown algal GSTs, together with those of oomycetes define a new evolutionary Iota-class of GSTs.

In the red alga *C. crispus*, these GSTs may have a new function in prostaglandin metabolism or in a larger context of fatty acids metabolism. Although further experiments are required, these data provide a new starting point for biological investigations.

C. Hervé, P-O. Defranco, T. Tonon, A. Groisillier, C. Boyen. Phylogeny, molecular characterization and biochemical properties of glutathione S-transferases from Red and Brown algae, *submitted*

E. Gaquerel, C. Hervé, C. Boyen, P. Potin, J.P. Salaun (2007) Evidence for oxylipin synthesis and induction of a new polyunsaturated fatty acid hydroxylase activity in *Chondrus crispus* during the early response to methyljasmonate. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1771, 565-575.

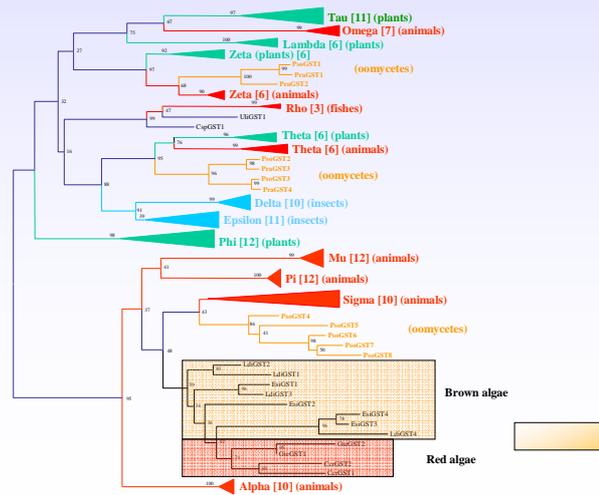
# Stress Response in Seaweeds: Functional analysis of Glutathione S-Transferase

Pierre-Olivier de Franco, Cécile Hervé, Eric Guévelou, Thierry Tonon, Catherine Boyen

Abiotic Stress and Functional Genomics in Seaweeds, UMR 7139 CNRS-UPMC  
Station Biologique, Roscoff, France  
defranco@sb-roscoff.fr

Workshop Marine Genomics "An Ocean of Techniques", October 8-12, 2007, Crete

## 1. Phylogeny of eukaryotic GSTs



The marine environment is often affected by the presence of environmental xenobiotic compounds and macroalgae have developed efficient mechanisms to live in stress conditions. (1)

Species	Genomic resources	Number of GST
<i>Chondrus crispus</i>	EST (Sporophyte, protoplasts)	3
<i>Laminaria digitata</i>	EST (Sporophyte, protoplasts)	4
<i>Ecotarpus siliculosus</i>	EST (sporophyte) full-genome	15

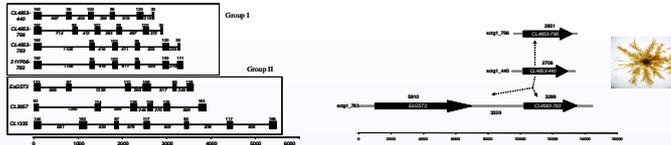
Analysis of Expressed Sequence Tag from stressed red and brown macroalgae have shown the high expression of glutathione S-transferase (GST) genes. (2)

GSTs are known for their major roles in detoxification of a wide variety of hydrophobic and cytotoxic substrates, the glutathione conjugates being less toxic and more water soluble. (3)

GST families of red and brown algae define a novel evolutionary class within the animal cluster and share common ancestor with the Sigma class involved in prostaglandin synthesis. (4)

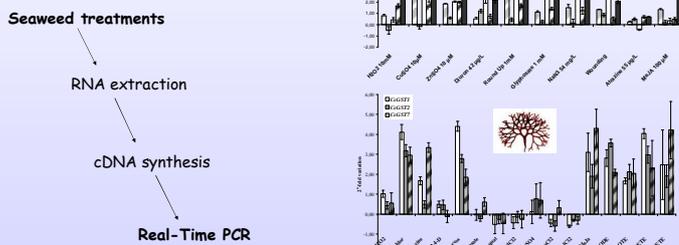
What is the function of this new class of GST in Seaweeds?

## 2. Genes characterization



*Ecotarpus siliculosus* genome have been explored to determine size and localization of GST genes, exon/intron structures, duplication events and alternative splicing.

## 3. Transcripts accumulation

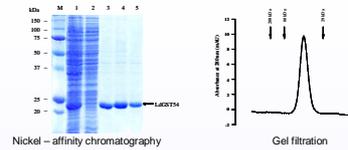


Treatments with herbicides, heavy metals and hydroxy fatty acids have pointed out conditions that modify gene transcription. Since hydroxy fatty acids increase GST expression in *Chondrus crispus*, they are tested as potential substrates.

## 4. Proteins characterization

Heterologous expression

Protein purification



Enzyme activity

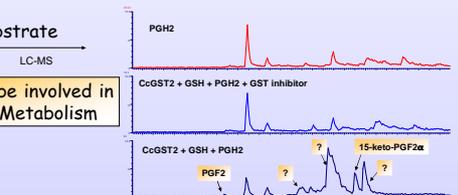
Common Substrates

Spectrophotometry

Substrate	Specific activity (μmol min <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup> of protein)		
	LdGST54	LdGST78	CcGST2
<b>Aryl halides</b>			
1-chloro-2,4-dinitrobenzene	0.98 ± 0.1	0.08 ± 0.01	1.05 ± 0.07
1-bromo-2,4-dinitrobenzene	3.34 ± 0.04	0.10 ± 0.05	3.56 ± 0.08
1-fluoro-2,4-dinitrobenzene	7.44 ± 0.66	0.68 ± 0.31	20.34 ± 0.59
1-iodo-2,4-dinitrobenzene	1.29 ± 0.11	not detected	3.84 ± 0.12
para-nitrobenzoyl chloride	not detected	not detected	not detected
<b>Organic hydroperoxides</b>			
Cumene hydroperoxide	0.122 ± 0.012	0.102 ± 0.040	0.146 ± 0.030
t-butyl hydroperoxide	0.611 ± 0.122	not detected	0.055 ± 0.014
13-HpODE	0.064 ± 0.014	-	0.230 ± 0.010
13-HpOTE	0.075 ± 0.009	-	0.050 ± 0.010

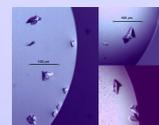
Recombinant GSTs are active and exhibit transferase and peroxidase activity.

Specific Substrate



CcGST2 may be involved in prostaglandin Metabolism

Cristallography



First crystals of Seaweed GSTs obtained by Cécile Hervé. To be continued during my last year of PhD ..

(1) M. Dring. Stress resistance and disease resistance in seaweeds. *Advances in botanical research*, 43 (2006)  
 (2) V. Roeder, J. Collen, S. Rousvoal, E. Corre, C. Leblanc, C. Boyen. Identification of stress gene transcripts in *Laminaria digitata* (phaeophyceae) protoplast cultures by expressed sequence tag analysis. *Journal of phycology* 41 (2005)  
 (3) C. Frova. Glutathione transferase in the genomic era: new insights and perspectives. *Biomolecular engineering* 23 (2006) review  
 (4) C. Hervé, PO de Franco, T. Tonon, A. Groisillier, C. Boyen. Red and brown algae revealed new outlines in the glutathione S-transferases family. *submitted*





## Résumé

Parmi les systèmes de défense cellulaire, les glutathion S-transférases (GST) constituent plusieurs familles de protéines ayant des fonctions biologiques variées. Chez les algues brunes *Laminaria digitata* et *Ectocarpus siliculosus*, les trois principales familles de GST ont été identifiées et annotées. La famille des GST cytosoliques est constituée de 12 gènes chez *E. siliculosus*, et à ce jour, de 4 gènes chez *L. digitata*, tous appartenant à la classe Sigma. Cette classe est essentiellement rencontrée chez les métazoaires, où elle joue un rôle dans le métabolisme des dérivés d'acides gras oxydés (oxylipines). La famille des GST microsomales, appartenant à la superfamille des MAPEG (*Membrane Associated Protein in Eicosanoid and Glutathione metabolism*), est représentée par trois gènes chez *E. siliculosus*, qui appartiennent à la classe MGST3. Cette classe est la seule à être présente dans la plupart des lignées eucaryotes. La famille des GST Kappa a été identifiée chez *E. siliculosus*, et représente le premier gène de ce type identifié chez un organisme photosynthétique.

L'analyse des génomes, les reconstructions phylogénétiques, et la conservation de la position d'introns dans les gènes de GST Sigma, suggèrent que le protiste ancestral commun aux lignées eucaryotes possédait dans son génome des GST cytosoliques Theta, Zeta et Sigma, des MAPEG de type MGST3, et une GST Kappa. L'organisation génomique des gènes de GST dans le génome d'*E. siliculosus* est révélateur d'événements de duplications multiples ayant conduit à la diversification des familles multigéniques. L'analyse des profils d'expression obtenus par PCR quantitative, et les tests d'activités enzymatiques menés sur des protéines recombinantes tendent à démontrer que les GST sont impliquées dans le métabolisme des oxylipines chez les algues brunes et rouges.

**Mots clés:** Algues, *Ectocarpus siliculosus*, *Laminaria digitata*, glutathion S-transférases, génome, évolution, réponse au stress, oxylipines, PCR quantitative, protéines recombinantes

## Abstract

Among the cellular defense systems, glutathione transferases (GST) form a highly diverse family of protein with various biological functions. The three main families of GST have been identified and annotated in the brown algae *Ectocarpus siliculosus* and *Laminaria digitata*. The cytosolic GSTs are represented by 12 genes in the brown algal model and to date, by four genes in *L. digitata*. All of these genes belong to the Sigma class, which is mainly found in metazoan and involved in the oxylipins metabolism. Three genes of the MGST3, one of the classes among the MAPEG family of GST, have been identified in *E. siliculosus*. This class is suggested to be ancestral as it is conserved in different eukaryotic lineages. Moreover, the *Ectocarpus* genome contains one gene of the Kappa class, giving the first evidence of such a gene in a photosynthetic organism.

Genome content, phylogenetic analyses and the conserved position of introns in Sigma GST genes suggest that the ancestral eukaryotic protist contains at least the cytosolic GST of the Theta, Zeta and Sigma class, the microsomal MGST3, and the Kappa class. Genomic organization of GST genes in *E. siliculosus* genome reveals multiple duplication events that have extended the diversity of the multigenic families. Transcripts accumulation profiling and enzymatic activities of recombinant proteins tend to demonstrate that GST may be involved in oxilipins metabolism in red and brown algae.

**Keywords:** Algae, *Ectocarpus siliculosus*, *Laminaria digitata*, glutathione S-transferases, genome, evolution, stress response, oxylipins, quantitative PCR, recombinant proteins