



HAL
open science

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

Cécile Hervé

► **To cite this version:**

Cécile Hervé. 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. Biochimie, Biologie Moléculaire. Rennes 1, 2006. Français. NNT: . tel-01115423

HAL Id: tel-01115423

<https://hal.sorbonne-universite.fr/tel-01115423>

Submitted on 11 Feb 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.

Avertissement

Au vu de la législation sur les droits d'auteur, ce travail de thèse demeure la propriété de son auteur, et toute reproduction de cette oeuvre doit faire l'objet d'une autorisation de l'auteur. (cf Loi n°92-597; 1/07/1992. Journal Officiel, 2/07/1992)

N° Ordre : 3353
de la thèse

THÈSE
présentée

DEVANT L'UNIVERSITÉ DE RENNES 1

pour obtenir

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

Mention Biologie

par

Cécile HERVE

Équipe d'accueil : UMR7139, CNRS/UPMC, Station Biologique de Roscoff

École Doctorale : Vie Agronomie Santé

Composante universitaire : Université Pierre et Marie-Curie, Paris VI

**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**

Soutenue le 7 avril 2006 devant la commission d'Examen

Mme Françoise SIMON-PLAS, INRA, Dijon

M. Kamal BOUARAB, Université de Sherbrooke, Quebec

M. Daniel BOUJARD, Université de Rennes 1, Rennes

M. Fabrice MOREL, INSERM, Rennes

M. Chris BOWLER, CNRS, Paris

Mme Catherine BOYEN, CNRS, Roscoff

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examineur

Examineur

Directrice de thèse



QUE DIABLE FAIS-JE
ICI PAR UNE SI BELLE
JOURNÉE?! C'EST LA
SEULE VIE QUE J'AIE!



REMERCIEMENTS

J'aimerais tout d'abord remercier M. Bernard Kloareg pour m'avoir accueillie dans son laboratoire et m'avoir offert la possibilité de faire une thèse à Roscoff. Mes plus vifs et sincères remerciements à Catherine Boyen, ma directrice de thèse, pour sa confiance, sa bonne humeur, et pour m'avoir supportée aussi parfois !

J'adresse également toute ma reconnaissance à Mme Françoise Simon-Plas, M. Kamal Bouarab, M. Daniel Boujard, M. Fabrice Morel et M. Chris Bowler, qui me font l'honneur de juger ce travail.

Je voudrais exprimer toute ma gratitude à Mme Sandrine Lagarrigue, ma tutrice de thèse, pour sa disponibilité et son enthousiasme.

Je voudrais remercier ici toutes les personnes de l'UMR7139 de la Station Biologique de Roscoff, qui au cours de toutes ces années m'ont apporté leurs conseils et leur aide, et qui ont contribué à une dynamique de travail enrichissante. Un grand merci également pour tous ces bons moments passés ensemble, votre amitié et votre générosité : Sylvie, Delphine, Murielle, Audrey, Sabine, Thierry, Gurvan, Béné, Ludo, Alex, Jérôme, Andrès, PO, Maud, William, Tristan, Mirjam, Mark, Philippe, sans oublier Marion !

Je remercie également Emmanuel Gaquerel qui a soutenu sa thèse en décembre dernier et avec qui j'ai eut l'occasion de travailler. Dommage que nous ayons été pris par le temps, j'aurais aimé pouvoir interagir davantage.

Merci également à Fred avec qui j'ai partagé des moments si particuliers !

Un grand merci à Audrey pour sa grande générosité et son soutien. Je suis désolée d'avoir été si peu à l'écoute ces derniers temps ; mais j'aurais bientôt le temps de me rattraper ?

J'exprime également ma reconnaissance à toutes les personnes de la station et plus particulièrement à Manon, Erwan, Christine, Emmanuelle, Xavier. Merci aussi à ceux qui sont déjà partis de la station et avec qui j'ai partagé des bons moments : les pots du lundi chez Janie (un temps si malheureusement révolu !), les soirées à Santec ; merci à la grande Marie, Isa, Fabrice, Alexis, Carole, Pascale, Claudie.

Enfin un grand merci à mon *padawane*, PO Defranco, qui deviendra un jour, c'est sûr, un *grand maître Jedi* :-b ! Merci pour ta bonne humeur et ton enthousiasme. Travailler ensemble a vraiment été enrichissant. Merci aussi pour ton écoute, ta patience, pour les jours où tu m'as remonté le moral dans mes moments de doute. Merci aussi à Gilles qui a su te seconder avec brio dans cette tâche en ton absence. Merci aussi à Béné chez qui j'allais confier mes états d'âme à l'occasion (ah, ce fameux 81 rue de la Rive) !

Je remercie aussi tous les membres de l'Association des Jeunes Chercheurs de la station. Vos motivations font plaisir à voir et je suis sûre que l'asso a un bel avenir devant elle (sachons nous rendre indispensables !). J'ai été vraiment heureuse d'avoir pu contribuer à sa création et à la mise en place des activités (merci à Gilles d'ABC Sérigraphie d'avoir supporté mes exigences ;-)).

Je voudrais remercier toute la famille Kloareg pour leur accueil chaleureux et leur énergie à toute épreuve : Bernard, Maryse, Maela, Lyzig, Allan, Glen, Gwenn, Rosenn, Tanguy. Pour toutes ces entrevues si particulières passées à Roscoff, PAF ou ailleurs. Sans oublier Rosa : le destin s'acharne à nous empêcher de nous retrouver toutes les trois avec Maela. La prochaine occasion sera pour venir te supporter en équipe de France !

Je remercie également toute la troupe de l'Estacade de Roscoff, et en espérant vous retrouver un jour sur scène : Chantal & Patrick, Armelle, Madeleine, David, Aurore & Seb, Philippe, Sabrina, Françoise, Nathalie, Jean-François, Marco, Murielle, Jessica.

Un grand merci à tous mes cobayes de tatoos qui ont bien voulu laisser libre cours à mes délires créatifs : Delphine, Murielle, Ludo, Audrey, Fred & Aurore, Astrid & Vincent, PO & Sophie, Andrès, Paupiette, Jérôme, Alex, Béné.

Merci à Emilie de rester à l'écoute après tant d'années et malgré la distance.

J'adresse aussi ma reconnaissance aux halieutes 2002 et à cette brillante idée de Denis. Dommage que les nouvelles ont parfois du mal à être acheminées.

Je voudrais également remercier Hervé pour toutes ces années et pour avoir fait que les choses se soient passées si simplement ces derniers mois. Pour ces journées ensoleillées au Caplan, entre une limonade, une planche de surf et autre philosophie de la vie. Et tant d'autres... Bonne route !

J'adresse une pensée toute particulière à mes parents qui sont prêts à me croire sur parole que travailler sur les algues rouges (surtout *Chondrus* !) est un sujet de la plus haute importance. Merci aussi à Françoise et Régis, et aussi à Mélanie pour ses gazouillis d'encouragements.

Enfin un grand merci à tous mes correcteurs de dernière minute qui ont chacun apporté leur pierre à l'édifice !

Merci pour toutes ces années merveilleuses, passées dans ce pays si merveilleux !

SOMMAIRE

Chapitre I –Introduction

I.	Introduction générale : de la survie en milieu hostile !	1
II.	Rôle du burst oxydatif dans la réponse cellulaire	5
II.1	Métabolisme des formes actives de l'oxygène	5
II.1.1	Les formes actives de l'oxygène	5
II.1.1.1	Nature.....	5
II.1.1.2	Production basale des FAO.....	9
II.1.1.3	Rupture de l'équilibre : burst oxydatif	11
II.1.2	Effets sur les systèmes biologiques	12
II.1.2.1	Toxicité directe	12
II.1.2.2	Effets protecteurs des FAO produits par la plante	15
II.1.2.3	La réaction hypersensible.....	17
II.1.3	Enzymes impliquées dans la production de formes actives de l'oxygène	20
II.2	La NADPH oxydase	22
II.2.1	Mécanisme du burst oxydatif	22
II.2.1.1	Réaction catalysée	22
II.2.1.2	Cinétique du burst oxydatif.....	22
II.2.2	Structure de la NADPH oxydase.....	23
II.2.2.1	Structure du complexe actif chez les neutrophiles.....	24
II.2.2.2	Homologues à la NADPH oxydase chez les cellules non-phagocytaires	27
II.2.2.3	Structure de la NADPH oxydase chez les plantes.....	28
II.2.3	Parenté avec les ferriques réductases membranaires.....	29
II.2.3.1	Nature des ferriques réductases membranaires.....	29
II.2.3.2	Homologie de séquence.....	30
II.2.3.3	Homologie catalytique	30
II.3	Les peroxydases.....	31
II.3.1	Le groupe très diversifié des peroxydases.....	31
II.3.2	Les peroxydases animales à hème.....	32
II.3.2.1	Structure et biosynthèse des myéloperoxydases	33
II.3.2.2	Rôle des myéloperoxydases dans le burst oxydatif.....	34
II.3.3	Les haloperoxydases chez les algues	35
II.3.3.1	Les composés halogénés.....	35
II.3.3.2	Les haloperoxydases.....	36
II.3.3.3	Rôles biologiques des vHPO.....	37
III.	Les voies précoces de défense	39
III.1	Mécanisme de prévention.....	39
III.1.1	Piégeage des métaux.....	41
III.1.2	Molécules anti-oxydantes.....	41
III.1.3	Réactions enzymatiques	42
III.1.3.1	La glutathion peroxydase.....	43
III.1.3.2	La peroxiredoxine : glutathion peroxydase sélénium-indépendante	44

III.2	La voie des phénylpropanoïdes chez les plantes supérieures	46
III.3	Les voie des oxylipines : jasmonates et prostaglandines	48
III.3.1	Définition.....	48
III.3.2	Biosynthèse des oxylipines chez les mammifères	48
III.3.3	Biosynthèse des oxylipines chez les plantes supérieures	50
IV.	Détoxification active de composés xénobiotiques	52
IV.1	Le métabolisme de phase I	54
IV.1.1	Réactions mises en jeu	54
IV.1.1.1	Les réactions d'oxydation.....	54
IV.1.1.2	Réactions de réduction et d'hydrolyse	54
IV.1.2	Les cytochromes P450	56
IV.1.2.1	Fonction biologique	56
IV.1.2.2	Localisation cellulaire et structure du complexe	56
IV.1.2.3	Nomenclature.....	57
IV.2	Le métabolisme de phase II : conjugaisons.....	58
IV.2.1	Réactions et enzymes mises en jeu.....	58
IV.2.2	Les glutathion S-transférases.....	60
IV.2.2.1	Nature et fonctions biologiques	60
IV.2.2.2	Classification	61
IV.2.2.3	Régulation de l'expression des gènes.....	63
IV.3	Le métabolisme de phase III : élimination.....	64

Chapitre II -Problématique

I.	Modèle d'étude : <i>Chondrus crispus</i>	67
I.1	Position phylogénétique.....	67
I.2	Cycle biologique.....	69
I.3	Valorisations.....	71
II.	Stress oxydatif et protection cellulaire chez <i>C. crispus</i>	72
II.1	Burst oxydatif chez <i>C. crispus</i>	72
II.2	Les haloperoxydases	74
II.3	La voie des phénylpropanoïdes	75
II.4	Coexistence des deux voies de synthèse d'oxylipines	77
III.	Vers une meilleure compréhension des voies de défense chez <i>C. crispus</i>	80

Chapitre III -Matériel et méthodes

I.	Préparation du matériel végétal et traitement.....	83
I.1	Matières premières	83
I.1.1	Matériel végétal	83
I.1.2	Réactifs.....	84
I.2	Elicitation des gamétophytes de <i>C. crispus</i>	85
I.2.1	Expériences d'infection	85
I.2.2	Traitements chimiques	85
I.3	Mesure du burst oxydatif.....	86
II.	Analyses de biologie moléculaire	87
II.1	Extraction des ARN et de l'ADN génomique	87
II.1.1	Extraction des ARN	87
II.1.2	Extraction de l'ADN génomique	87
II.2	Clonage et séquençage des acides nucléiques d'intérêt	88
II.2.1	Clonage et séquençage de la NADPH oxydase	88
II.2.2	Identification des séquences génomiques des glutathion S-transférases	89
II.3	Southern blotting	90
II.4	Analyses transcriptionnelles	92
II.4.1	Northern blotting.....	92
II.4.2	RT-PCR quantitative	93
III.	Analyses bioinformatiques des séquences	95
III.1	Banques de données publiques.....	95
III.2	Alignements	95
III.3	Profils d'hydropathie	96
III.4	Phylogénie	96
III.5	Prédiction de la structure tridimensionnelle de CcGST1	98
IV.	Analyses biochimiques	99
IV.1	Analyse de protéines sauvages.....	99
IV.1.1	Extraction des protéines de <i>C. crispus</i>	99
IV.1.2	Dosage de protéines	99
IV.1.3	Electrophorèses PAGE et PAGE-SDS.....	100
IV.1.4	Immunodétection de la NADPH oxydase chez <i>C. crispus</i>	100
IV.1.4.1	Obtention des anticorps primaires	100
IV.1.4.2	Obtention des protoplastes.....	100
IV.1.4.3	Western-blotting et détection	101

IV.2	Expression hétérologue et caractérisation de protéines recombinantes	102
IV.2.1	Expression hétérologue.....	102
IV.2.2	Purification sur colonne de nickel et dialyse	102
IV.2.3	Chromatographie d'exclusion de taille	103
IV.2.4	Tests enzymatiques pour les activités transférases et peroxydases.....	103
IV.2.5	Effets du pH et de la température	105
IV.2.6	Détermination des paramètres cinétiques.....	105
IV.3	Etudes cristallographiques de la protéine CcGST2 recombinante	106

Chapitre IV -Résultats et discussion

I. Identification et caractérisation de gènes homologues à la NADPH oxydase chez les algues

I.1	Séquençage de l'ADNc pleine longueur <i>Ccrboh</i> chez <i>Chondrus crispus</i>	108
I.2	Identification de séquences homologues dans les banques de données d'algues	110
I.3	Mise en évidence d'une famille monogénique de NADPH oxydases chez <i>Chondrus crispus</i>	114
I.4	Organisations structurales et topologiques des homologues à la NADPH oxydase chez les algues	117
I.4.1	Etude des séquences primaires	117
I.4.2	Modèles structuraux	119
I.5	Analyses phylogénétiques de la NADPH oxydase et de ces homologues.....	124
I.6	Analyses transcriptionnelles de <i>Ccrboh</i>	132
I.7	Etudes immunologiques et enzymatiques	138
I.8	Bilan NADPH oxydase chez <i>C. crispus</i>	141

II. Identification moléculaire d'enzymes du stress oxydatif et de la défense chez *C. crispus*

II.1	Présentation du projet EST et analyse	144
II.2	Enzymes du stress oxydatif : NADPH oxydase et haloperoxydases.....	146
II.2.1	La NADPH oxydase.....	146
II.2.2	Les bromoperoxydases à vanadium	146
II.2.3	Les myéloperoxydases.....	148
II.3	Enzymes à activités anti-oxydantes : cas de la peroxiredoxine.....	153
II.4	Enzymes de détoxification active : cytochromes P450 et glutathion S-transférases	157
II.4.1	Les cytochromes P450	157
II.4.2	Les glutathion S-transférases.....	160

II.5	Profils d'expression des gènes identifiés	164
II.5.1	Le MeJA : une substance vitale chez les plantes supérieures	164
II.5.2	Le MeJA élicite des voies de défense chez <i>C. crispus</i>	165
II.5.3	Effets du MeJA sur l'induction de gènes chez <i>C. crispus</i>	166
II.6	Bilan de l'identification moléculaire de gènes de défense chez <i>C. crispus</i>	169
III.	Les glutathion S-transférases chez <i>C. crispus</i>	174
III.1	Identification et étude des gènes de glutathion S-transférases chez <i>C. crispus</i>	174
III.1.1	Analyse des séquences génomiques.....	174
III.1.2	Analyses phylogénétiques des GST d'algues.....	178
III.1.3	Analyses transcriptionnelles des GST de <i>C. crispus</i>	187
III.2	Etude d'une glutathion S-transférase recombinante de <i>C. crispus</i>	191
III.2.1	Expression hétérologue de CcGST2 et purification	191
III.2.2	Spécificité de substrat	194
III.2.3	Effet de la température et du pH sur l'activité enzymatique de CcGST2.....	197
III.2.4	Etudes cinétiques	198
III.3	Etudes cristallographiques de CcGST2.....	200
III.3.1	Prédiction de la structure tridimensionnelle de CcGST1	200
III.3.2	Cristallisation de la protéine recombinante CcGST2	202
III.4	Bilan de l'étude des GST chez <i>C. crispus</i>	203
Chapitre V –Conclusions et perspectives.....		205

Bibliographie

Annexes

LISTE DES FIGURES

Chapitre I –Introduction

Figure 1 : Vue générale des différents types d'interactions hôte/pathogène chez les plantes supérieures.	2
Figure 2 : Formes actives de l'oxygène dérivées de l'oxygène moléculaire et générées lors de réactions ayant lieu dans les cellules végétales.....	5
Figure 3 : Production de formes actives de l'oxygène au niveau de la cellule végétale.....	10
Figure 4 : Effets néfastes des formes actives de l'oxygène sur les différents composants de la cellule végétale	14
Figure 5 : Evénements de signalisation et réponses de défense inductibles au niveau de la cellule végétale	19
Figure 6 : Cinétique d'accumulation du peroxyde d'hydrogène au niveau de la cellule au cours d'interactions plante/pathogène.....	23
Figure 7 : Modèle structural du complexe NADPH oxydase chez les cellules humaines de neutrophiles	25
Figure 8 : Structure dimérique de la myéloperoxydase humaine (HsMPO).....	33
Figure 9 : Structure dimérique de la bromoperoxydase de l'algue rouge <i>Corallina officinalis</i> (CoBPO)	35
Figure 10 : Systèmes anti-oxydants mis en place au niveau de la cellule végétale pour prévenir la production de formes actives de l'oxygène et radicaux libres	40
Figure 11 : Schéma de la réaction de type glutathion-peroxydase de la peroxiredoxine, en coordination avec les systèmes thiorédoxine/thiorédoxine réductase et glutathion/glutathion réductase	45
Figure 12 : Voies de biosynthèse de l'acide salicylique chez les plantes supérieures	47
Figure 13 : Biosynthèse des oxylipines chez les animaux et plantes supérieures	49
Figure 14 : Biotransformation de composés xénobiotiques au niveau de la cellule végétale.....	53
Figure 15 : Structure du glutathion	60

Chapitre II -Problématique

Figure 16 : Arbre phylogénétique consensus des eucaryotes	67
Figure 17 : Cycle biologique de l'algue rouge <i>Chondrus crispus</i>	70
Figure 18 : Planches photographiques de l'interaction <i>C. crispus</i> - <i>A. operculata</i>	72
Figure 19 : Emission d'un burst oxydatif par les gamétophytes de <i>C. crispus</i> élicités par des extraits acellulaires d' <i>A. operculata</i>	73
Figure 20 : Induction d'une nouvelle isoforme de bromoperoxydase en réponse à l'élicitation par des extraits acellulaires du pathogène <i>A. operculata</i> chez le gamétophyte de <i>C. crispus</i>	74
Figure 21 : Activités shikimate déshydrogénase et phénylalanine ammonia-lyase chez <i>C. crispus</i>	76
Figure 22 : Représentation spéculative de la distribution des acides gras polyinsaturés et de leurs dérivés cyclopentanones chez les eucaryotes	78

Chapitre III -Matériel et méthodes

Figure 23 : Gamétophytes de <i>C. crispus</i> cultivés au laboratoire (JC 001 PC-G) et exemple d'un plan d'élucitation	83
Figure 24 : Planche photographique de l'algue verte <i>A. operculata</i>	84

Chapitre IV -Résultats et discussion

Figure 25 : Séquence nucléotidique de <i>Ccrboh</i> et sa séquence protéique déduite	109
Figure 26 : Comparaison de la séquence protéique de <i>Ccrboh</i> de <i>C. crispus</i> avec des homologues de NADPH oxydases	113
Figure 27 : Analyse par Southern blotting du nombre de copies de gènes de NADPH oxydases chez <i>C. crispus</i>	115
Figure 28 : Profils d'hydropathie de la gp91 ^{phox} et de ses homologues chez les algues rouges : <i>Ccrboh</i> , <i>Pyrboh</i> , <i>Cmrboh1</i> et <i>Cmrboh2</i>	118
Figure 29 : Schémas structuraux de la sous-unité gp91 ^{phox} de la NADPH oxydase de neutrophiles et de ces homologues chez divers organismes.	121
Figure 30 : Phylogénie de la NADPH oxydase et de ses homologues, obtenue avec la méthode du Neighbor Joining sur les séquences complètes.	124
Figure 31 : Phylogénie de la NADPH oxydase et de ses homologues, obtenue avec la méthode du Neighbor Joining sur les sites catalytiques.	128
Figure 32 : Phylogénie de la NADPH oxydase et de ses homologues, obtenue avec la méthode du Maximum de Vraisemblance sur les sites catalytiques.	129
Figure 33 : Phylogénie de la NADPH oxydase et de ses homologues, obtenue avec la méthode du Maximum de Parcimonie sur les sites catalytiques.	130
Figure 34 : Analyse de l'expression du gène <i>Ccrboh</i> chez les gamétophytes de <i>C. crispus</i>	133
Figure 35 : Analyse par RT-PCR quantitative du niveau d'expression du transcrite <i>Ccrboh</i> lors d'une cinétique d'infection des gamétophytes de <i>C. crispus</i> par l'algue endophyte <i>A. operculata</i>	135
Figure 36 : Analyse par RT-PCR quantitative du niveau d'expression du transcrite <i>Ccrboh</i> après 3 heures de divers traitements chimiques.	137
Figure 37 : Etudes immunologiques et biochimiques de l'enzyme native.....	140
Figure 38 : Alignement des bromoperoxydases <i>CcBPO1</i> et <i>CcBPO2</i> de <i>C. crispus</i> avec des homologues d'algues rouges calcaires	147
Figure 39 : Alignement des myéloperoxydases <i>CcMPO1</i> , <i>CcMPO2</i> et <i>CcMPO3</i> de <i>C. crispus</i> avec une myéloperoxydase humaine et une peroxydase d'éosinophile humaine.....	150
Figure 40 : Alignement des peroxiredoxines <i>CcPrx1</i> et <i>CcPrx2</i> de <i>C. crispus</i> avec des homologues rencontrés chez l'homme et la drosophile.....	155
Figure 41 : Alignement des cytochromes P450 <i>CcCYPt1</i> , <i>CcCYPp1</i> et <i>CcCYPt2</i> de <i>C. crispus</i> avec des homologues correspondants chez <i>A. thaliana</i> et <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	159
Figure 42 : Alignement des glutathion S-transférases <i>CcGST1</i> , <i>CcGST2</i> et <i>CcGST7</i> de <i>C. crispus</i> avec des homologues des classes correspondantes.....	161
Figure 43 : Profils d'expression de 7 gènes de défense chez <i>C. crispus</i> , après traitement par deux oxylipines en C18	168
Figure 44 : Schéma cellulaire hypothétique des enzymes et événements impliqués dans la génération du stress oxydatif et la réponse au stress et à la défense chez l'algue rouge <i>C. crispus</i>	170

Figure 45 : Structure en intron/exon des gènes de glutathion S-transférases chez <i>C. crispus</i>	174
Figure 46 : Analyse par Southern blotting du nombre de copies de gènes de glutathion S-transférases chez <i>C. crispus</i>	178
Figure 47 : Phylogénie des glutathion S-transférases obtenue avec la méthode du Neighbor Joining, incluant les séquences de <i>C. crispus</i>	180
Figure 48 : Phylogénie des glutathion S-transférases obtenue avec la méthode du Maximum de Parcimonie, incluant les séquences de <i>C. crispus</i>	182
Figure 49 : Phylogénie des glutathion S-transférases obtenue avec la méthode du Neighbor Joining, incluant des séquences d'algues rouges et brunes.....	185
Figure 50 : Phylogénie des glutathion S-transférases obtenue avec la méthode du Maximum de Parcimonie, incluant des séquences d'algues rouges et brunes	186
Figure 51 : Analyse par RT-PCR quantitative du niveau d'expression des transcrits de glutathion S-transférases après 3 heures de divers traitements chimiques	188
Figure 52 : Analyse sur gel dénaturant de l'expression hétérologue de CcGST2	192
Figure 53 : Profil d'élution de la CcGST2 recombinante par chromatographie d'exclusion de taille	192
Figure 54 : Analyse sur gel dénaturant de l'expression hétérologue de CcGST7	193
Figure 55 : Profil d'élution de la CcGST7 recombinante par chromatographie d'exclusion de taille	194
Figure 56 : Détermination du pH optimal de la CcGST2 recombinante	197
Figure 57 : Thermostabilité de la CcGST2 recombinante	198
Figure 58 : Détermination des paramètres cinétiques de CcGST2 pour le glutathion par analyse de Lineweaver-Burk.....	199
Figure 59 : Représentation de la structure établie de HsGSTS et de la structure prédite de CcGST1	201
Figure 60 : Micro-cristaux de la protéine CcGST2 recombinante	202

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Principales réactions de biotransformations de phase I et II	55
Tableau 2 : Principales réactions de conjugaison du métabolisme de phase II	59
Tableau 3 : Les différentes classes de glutathion S-transférases et leur répartition majeure dans les différentes lignées du vivant	62
Tableau 4 : Gamme d'étalonnage réalisée pour les expériences de PCR quantitative.....	94
Tableau 5 : Exemples de transcrits isolés des banques EST, codant des enzymes du stress oxydatif, de la défense et de la détoxification.....	145
Tableau 6 : Activités spécifiques de CcGST2 de <i>C. crispus</i> et de la glutathion S-transférase de la classe sigma HsGSTS envers différents substrats	196

LISTE DES ABBREVIATIONS

AGPI	acides gras polyinsaturés
AOS	allène oxide synthase
BPO	bromoperoxydase
COX	cyclooxygénase
CPO	chloroperoxydase
CYP	cytochrome P450
EST	Etiquette de Séquence Transcrite
FAD	flavine adénine dinucléotide
FAO	formes actives de l'oxygène
FMN	flavine mononucléotide
GPx	glutathion peroxydase
GR	glutathion réductase
GSH	glutathion réduit
GSSG	glutathion oxydé
GST	glutathion S-transférase
H ₂ O ₂	peroxyde d'hydrogène
HETE	acide hydroxy-eicosatétraénoïque
HpETE	acide hydroperoxy-éicosatétraénoïque
HpODE	acide hydroperoxy-octadecadiénoïque
HpOTE	acide hydroperoxy-octadecatriénoïque
HRP	<i>horseraddish peroxidase</i>
IPO	iodoperoxydase
LOX	lipoxygénase
MAPEG	<i>membrane-associated proteins in eicosanoid and glutathione metabolism</i>
MeJA	méthyle jasmonate
MPO	myéloperoxydase
NADPH	nicotinamine adenine dinucleotide phosphate
NO	monoxyde d'azote
PG	prostaglandine
PIOX	<i>pathogen-induced oxygenase</i>
Prx	peroxiredoxine
rboh	<i>respiratory burst oxidase homologue</i>
SOD	superoxyde dismutase
SHAM	acide salicylhydroxamique
VHOC	<i>Volatile Halogenated Organic Compounds</i>
vHPO	haloperoxydase à vanadate

Chapitre I -Introduction

INTRODUCTION

Chapitre I -Introduction

I. Introduction générale : de la survie en milieu hostile !

Dans leur environnement naturel les plantes doivent faire face à de multiples agressions. Elles peuvent être d'origines nutritionnelles (carence ou excès de nutriments, stress hydrique), environnementales (sécheresse, froid) ou toxiques (pesticides, métaux lourds, hydrocarbures aromatiques polycycliques). On parle alors de **stress abiotiques**, par opposition aux **stress biotiques** qui font intervenir un second être vivant. Il peut s'agir d'un herbivore (insecte), ou d'un agent infectieux (champignons, virus, bactéries). Les interactions hôte/pathogène chez les plantes ont largement été documentées toutes ces dernières années, même si les réactions complexes aboutissant à la mise en place des résistances ne sont pas encore complètement élucidées.

Les interactions plante/pathogène peuvent suivre deux schémas. Les **réactions compatibles** aboutissent au succès de l'infection et à la maladie de la plante pouvant entraîner sa mort. Pour être infectieux le micro-organisme doit alors être capable à la fois de surmonter les défenses mécaniques passives de l'hôte (barrière cuticulaire) et posséder les armes nécessaires à l'agression (enzymes hydrolytiques, toxines) (Klarzynski et Fritig, 2001). La plante est alors dite sensible et le micro-organisme virulent. Mais la maladie est un processus plutôt rare chez une plante donnée, et la plupart des interactions appartiennent au groupe des **réactions incompatibles**, aboutissant au non développement de la maladie ou à la résistance de la plante au processus infectieux (Figure 1).

Les réactions incompatibles peuvent être de trois types, le cas le plus fréquent étant celui d'une **résistance** naturelle de la plante car considérée comme « **non-hôte** » par le micro-organisme. Lorsqu'un processus infectieux est déclenché, on distingue deux cas de réactions incompatibles. On assiste à la mise en place par la plante soit d'une **résistance générale** (également dénommée horizontale ou non-spécifique), polygénique et qui peut être induite par un large spectre de micro-organismes, soit d'une **résistance spécifique** (verticale) illustrée par le modèle de type gène-à-gène, où un gène *R* chez la plante code un récepteur interagissant avec un effecteur produit d'un gène *avr* chez le pathogène, et permet l'activation des réponses de défense. Dans ce dernier cas le micro-organisme contient lui-même l'information qui va conduire à sa propre perte. La plante est dite résistante et le micro-organisme avirulent. Si ni le pathogène ni l'hôte ne possèdent les

gènes *avr* et *R* correspondants, l'interaction aboutit généralement à la maladie (Cohn *et coll.*, 2001 ; Lateur, 2002).

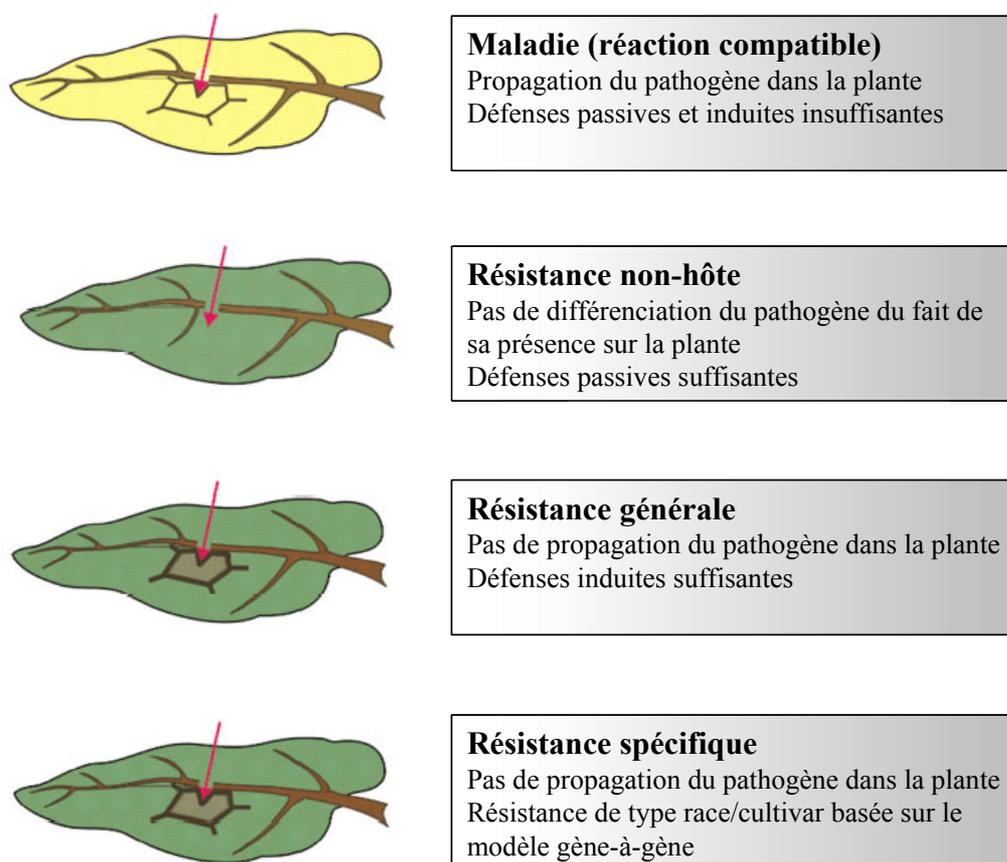


Figure 1 : Vue générale des différents types d'interactions hôte/pathogène chez les plantes supérieures (d'après Nurnberger *et coll.*, 2004).

La mise en place de la résistance active chez la plante implique la reconnaissance du pathogène, soit de façon spécifique (résistance gène-à-gène), soit par l'intermédiaire d'un de ces composants décrit en tant qu'éliciteur des voies de défense de l'hôte. **Les éliciteurs sont définis comme des composés chimiques pouvant induire des changements physiologiques chez l'organisme cible incriminé** ; ils n'ont pas d'activité antimicrobienne par eux-mêmes ou par un de leurs métabolites dérivés (Gozzo, 2003 ; Zhao *et coll.*, 2005). Au sens large ils peuvent également inclure les éliciteurs abiotiques tels que des ions métalliques, des composés organiques, mais ils trouvent généralement une origine biotique. Ils sont alors soit relargués par les herbivores, les bactéries, les virus ou

les champignons infectieux qui attaquent la plante (éliciteur exogène), soit issus de la dégradation pariétale où ils constituent des composés chimiques libérés par la plante au cours de l'attaque au niveau du lieu d'infection (éliciteur endogène) (Zhao *et coll.*, 2005). De nombreuses études reportent l'utilisation de différents composants qui peuvent se substituer totalement aux éliciteurs biotiques par les effets qu'ils induisent chez l'hôte. Ils sont de nature diverse : oligo- ou poly-saccharide (chitine, xyloglucane, laminarine), peptidiques ou protéiques (harpine, élicitines), dérivés lipidiques (Klarzynski et Fritig, 2001 ; Lateur, 2002 ; Nurnberger *et coll.*, 2004).

La reconnaissance du pathogène et l'élicitation induisent une cascade de réactions qui va permettre la mise en place de lignes de défense impliquées dans la résistance de la plante à l'infection. La transduction du signal de reconnaissance va provoquer des changements physiologiques majeurs chez l'hôte, nécessaires à la protection : émission massive de formes actives de l'oxygène (burst oxydatif), flux d'ions et modification du pH intracellulaire, renforcement des barrières mécaniques, stimulation d'enzymes de défense et relargage de métabolites secondaires dont des composés anti-microbiens (phytoalexines, protéine PR), induction de l'expression de certains gènes (Cohn *et coll.*, 2001 ; Klarzynski et Fritig, 2001 ; Heil et Bostock, 2002 ; Lateur, 2002). Ces mécanismes de défense sont induits lors de l'infection. L'acide salicylique joue un rôle important dans la « prémunition » de la plante à l'infection (capacité à résister spécifiquement au micro-organisme incriminé au-delà de la zone d'infection) et dans la mise en place de la **résistance systémique acquise**, c'est-à-dire la capacité de la plante à résister aux attaques ultérieures de divers micro-organismes (Lateur, 2002). La voie de biosynthèse de l'acide salicylique interagit de façon étroite avec les voies de biosynthèse de l'acide jasmonique et de l'éthylène. Le processus de reconnaissance de l'agent infectieux, les cascades métaboliques stimulées, et la mise en place d'une résistance durable et généralisée chez la plante comportent des similitudes frappantes avec l'immunité innée chez les animaux (Cohn *et coll.*, 2001 ; Nurnberger *et coll.*, 2004).

Les événements précoces de défense, tels que le burst oxydatif, font partie des signatures les plus faciles à détecter et ils ont été mis en évidence chez d'autres organismes que les plantes supérieures et les animaux. Ainsi la production de formes actives de l'oxygène a été démontrée chez les macroalgues au cours de l'infection par des bactéries (Weinberger et Friedlander, 2000 ; Kupper *et coll.*, 2001 ; Weinberger *et coll.*, 2001) ou

des algues filamenteuses endophytes (Bouarab *et coll.*, 1999 ; Kupper *et coll.*, 2001 ; Kupper *et coll.*, 2002). Des éliciteurs issus d'une dégradation pariétale, et mimant ainsi l'attaque d'un pathogène tels que les oligoguluronates, induisent un burst oxydatif chez l'algue brune *Laminaria digitata* (Kupper *et coll.*, 2001). Les oligoagars provoquent une réponse similaire chez l'algue rouge *Gracilaria conferta* (Weinberger *et coll.*, 2001). Enfin, l'émission d'un burst oxydatif est également observée chez les gamétophytes de l'algue rouge *Chondrus crispus* lors de l'élicitation par des extraits acellulaires de son algue verte endophyte *Acrochaete operculata* (Bouarab *et coll.*, 1999). Si des études biochimiques et pharmacologiques sur ce dernier modèle ont permis de montrer l'activation de certaines voies de défenses, les données biochimiques et moléculaires des mécanismes mis en jeu restent globalement très fragmentaires chez les macroalgues, ou de nombreuses voies sont encore à explorer.

Au cours de cette introduction le rôle du burst oxydatif dans la réponse cellulaire et sa production seront présentés. Je poursuivrai sur les voies précoces de défense chez les plantes et la détoxification active de composés xénobiotiques. Je baserai mon étude essentiellement sur les systèmes végétaux, mais lorsque cela sera nécessaire pour étayer l'analyse où faciliter la compréhension du manuscrit, je ferai parfois référence aux systèmes animaux. L'étude bibliographique introduit la problématique de ce travail de thèse.

II. Rôle du burst oxydatif dans la réponse cellulaire

La génération d'un burst oxydatif est une des réponses de défense les plus précoces suivant l'infection. L'intensification d'une production latente des formes actives de l'oxygène (FAO) est une caractéristique importante des interactions hôte/pathogène. Ces composés vont avoir un effet toxique sur l'agent infectieux, mais vont également induire une cascade signalitique chez la plante.

II.1 Métabolisme des formes actives de l'oxygène

II.1.1 Les formes actives de l'oxygène

Les formes actives de l'oxygène regroupent l'ensemble des composés issus de la réduction de l'oxygène moléculaire, ainsi que les radicaux libres oxygénés.

II.1.1.1 Nature

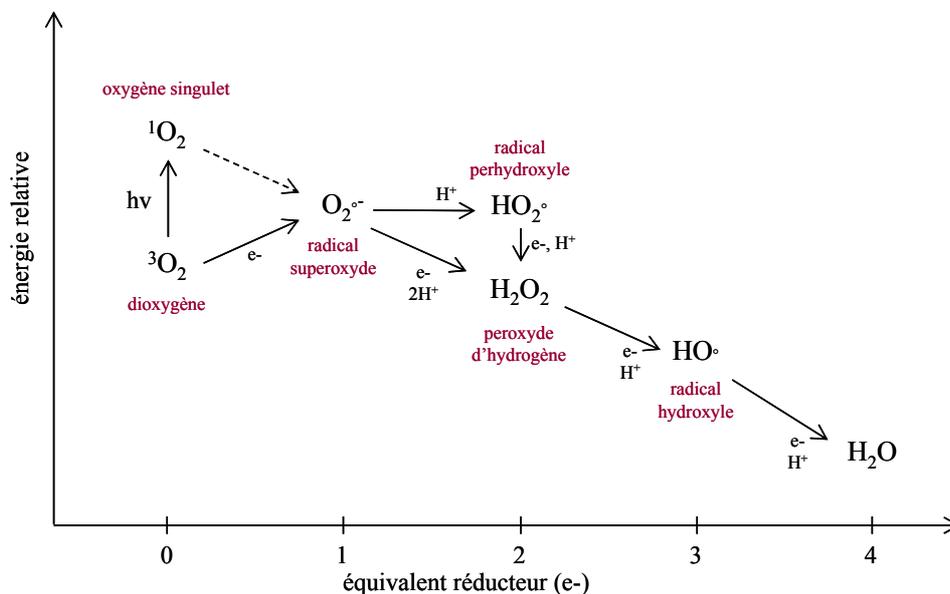


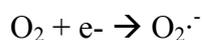
Figure 2 : Formes actives de l'oxygène dérivées de l'oxygène moléculaire et générées lors de réactions ayant lieu dans les cellules végétales

✚ **L'oxygène singulet**

L'oxygène moléculaire peut être transformé en formes actives de l'oxygène par transferts d'électrons ou transferts d'énergie (Figure 2). Une transformation par transfert d'énergie du dioxygène permet la production de l'oxygène singulet. Sa formation résulte généralement d'une excitation photochimique de l'oxygène. Sa présence a été démontrée chez les plantes, il ne semble pas être un produit majoritairement formé au cours des réactions présentées en Figure 2. Son implication dans la production de FAO au cours d'interactions hôte/pathogène n'a pas été démontrée (Baker et Orlandi, 1995).

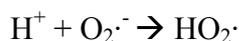
✚ **L'anion superoxyde $O_2^{\cdot-}$**

Le premier produit issu de la réduction de l'oxygène moléculaire est l'anion superoxyde $O_2^{\cdot-}$:

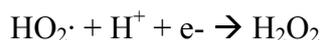


Cette réduction à un électron nécessite un léger apport d'énergie, souvent fourni par des systèmes enzymatiques à NAD(P)H. Les étapes de réduction ultérieures ne nécessitent pas d'énergie et peuvent intervenir spontanément (Baker et Orlandi, 1995). Au pH physiologique l'anion superoxyde est peu réactif en milieu aqueux, ce qui lui permet de se déplacer assez loin de son lieu de production. En revanche sa charge électrique le rend **incapable de diffuser à travers les membranes biologiques** (Lamb et Dixon, 1997). Il est produit à l'extérieur de la membrane plasmique par les systèmes enzymatiques tels que les NADPH oxydases.

A pH acide il est en équilibre avec sa forme protonée HO_2^{\cdot} , plus lipophile et donc capable de peroxyder les lipides (Baker et Orlandi, 1995) :



En solution aqueuse et à pH neutre où légèrement acide, tel qu'on le rencontre au niveau des parois cellulaires chez les végétaux, ces deux formes se dismutent spontanément en peroxyde d'hydrogène :

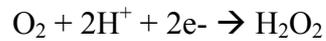


A pH neutre cette réaction est catalysée par des superoxyde dismutases au niveau du cytosol, des chloroplastes et des mitochondries.

Du fait de ces réactions, la production d'ions superoxyde s'accompagne toujours d'une production de peroxyde d'hydrogène. **L'anion superoxyde est probablement peu toxique par lui-même et intervient surtout comme générateur du radical hydroxyle.**

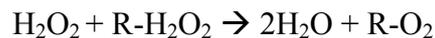
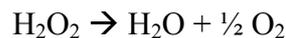
✚ **Le peroxyde d'hydrogène**

Le peroxyde d'hydrogène est une forme active de l'oxygène **plus stable et moins réactive** que l'ion superoxyde. Il se forme soit par réduction divalente de l'oxygène moléculaire, soit par dismutation de l'anion superoxyde.

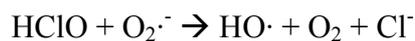


L'absence de charges électriques à sa surface le rend très lipophile et donc **capable de traverser les membranes biologiques**. Il peut donc atteindre des zones éloignées de son lieu de production (Wojtaszek, 1997).

Le peroxyde d'hydrogène est soit dégradé en eau et dioxygène, spontanément ou par l'intermédiaire de catalases, soit utilisé par des peroxydases telles que l'ascorbate peroxydase ou la glutathion peroxydase. Dans ce dernier cas il peut engendrer la production de radicaux, dont des radicaux hydroxyles très réactifs.



En présence de chlorure, le peroxyde d'hydrogène est transformé par des chloroperoxydases, telles que les myéloperoxydases chez les mammifères, en hypochlorite HOCl. Celui-ci, sous l'influence de l'ion superoxyde, est transformé en radical hydroxyle (Arnhold, 2004).

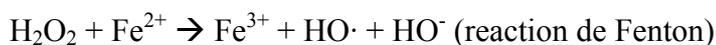
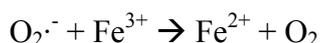


✚ **Le radical hydroxyle**

Le radical hydroxyle représente le plus puissant oxydant à un électron connu. Il est **extrêmement réactif** et interagit instantanément avec les sucres, les acides aminés, les acides nucléiques, les lipides et en particulier les phospholipides. De part sa capacité à initier des réactions radicalaires en chaîne, il est un **responsable majeur de modifications irréversibles de macromolécules et de dommages aux organites** (Wojtaszek, 1997). Son temps de demie vie est extrêmement court (10^{-9} seconde), il n'interagit donc qu'avec des molécules présentes dans son voisinage immédiat (Wojtaszek, 1997).

Il peut être formé directement à partir d'ions superoxyde ou de peroxyde d'hydrogène, mais en conditions normales ces réactions sont très lentes et inefficaces pour produire des quantités suffisantes de radicaux hydroxyles. En revanche des quantités

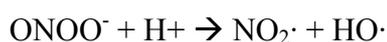
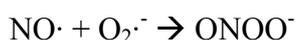
significatives peuvent être produites dans un environnement contenant des métaux tels que le fer Fe^{2+} ou le cuivre Cu^+ .



Les métaux agissant alors comme catalyseurs, leurs localisations et accessibilités sont probablement les facteurs déterminant la formation de radicaux hydroxyles à un site donné.

✚ **Le monoxyde d'azote**

Le monoxyde d'azote est un radical produit à partir de l'arginine par la NO-synthase chez les animaux. Chez les plantes les voies de biosynthèse restent en revanche non élucidées (Neill *et coll.*, 2002). En présence de l'ion superoxyde il donne l'anion peroxydinitrite ONOO^- qui en milieu acide génère deux radicaux $\text{NO}_2\cdot$ et $\text{HO}\cdot$:



Le peroxydinitrite est relativement stable et capable de traverser la membrane plasmique.

Il est désormais évident que l'oxyde nitrique NO, au même titre que le peroxyde d'hydrogène, joue des rôles signalitiques d'importance dans différents processus physiologiques chez les plantes supérieures, tels que l'induction de réponses de défense, la reproduction, la croissance et le développement (Grun *et coll.*, 2006).

✚ **Radicaux libres organiques**

Les radicaux libres sont caractérisés par une grande réactivité chimique et une courte durée de vie. L'oxygène est à l'origine de la plupart des radicaux libres formés dans l'organisme. Les radicaux libres de l'oxygène comportent un ou plusieurs atomes d'oxygène et se trouvent soit sous forme de radical libre, soit sous forme protonée.

Les radicaux peroxydes $\text{ROO}\cdot$ sont formés par l'addition d'oxygène moléculaire sur des radicaux libres de carbone. Ils sont peu réactifs mais capables de diffuser à travers les membranes biologiques. **Les hydroperoxydes organiques ROOH** sont les formes protonées des radicaux peroxydes. Ils sont très réactifs et se redécomposent en radicaux peroxydes ou en radicaux alcoxydes. **Les radicaux alcoxydes $\text{RO}\cdot$** sont formés lors de la dégradation des peroxydes organiques. Ils sont très réactifs avec une demie vie de 10^{-6} seconde.

II.1.1.2 Production basale des FAO

Les formes actives de l'oxygène sont produites de façon continue à l'intérieur de la cellule, en tant que sous-produits du métabolisme cellulaire (Figure 3).

✚ **Les chloroplastes**

Les métabolismes aérobies tels que la respiration et la photosynthèse conduisent inévitablement à la production de FAO, au niveau des chloroplastes, des mitochondries et des peroxisomes. Chez les plantes supérieures, **les FAO sont produites de façon continue, majoritairement dans les chloroplastes**. Les différents types de processus liés à cette production sont étroitement associés à la photosynthèse. Ils font intervenir le photosystème I qui permet la photoréduction directe de l'oxygène moléculaire, ainsi que les réactions liées au cycle photorespiratoire et faisant intervenir la Rubisco. Les radicaux superoxyde ainsi générés au niveau du chloroplaste sont rapidement convertis en peroxyde d'hydrogène par les CuZn-superoxyde dismutases. Enfin durant la photosynthèse, l'oxygène singulet est continuellement produit par le photosystème II. Au cours de stress lumineux entraînant la photoinhibition du photosystème II, la production de l'oxygène singulet augmente de façon drastique (Apel et Hirt, 2004).

✚ **Respiration mitochondriale**

La réduction de l'oxygène moléculaire par les cytochromes respiratoires s'accompagne d'une formation parallèle d'environ 2 % d'ions superoxyde, de peroxyde d'hydrogène et éventuellement de radicaux HO \cdot . La production mitochondriale de FAO dépend fort logiquement de la disponibilité en oxygène. Chez les mammifères les mitochondries sont la source majeure de FAO dans la cellule. Leur contribution chez les plantes supérieures est très faible, sans doute grâce à la présence de l'alternative oxydase (AOX). Celle-ci catalyse la réduction de l'oxygène moléculaire par l'ubiquinone, et entre de ce fait en compétition avec les cytochromes pour la consommation d'électrons. L'hypothèse de **l'implication de l'alternative oxydase dans la réduction de la production de FAO par les mitochondries** est notamment supportée par le fait que le peroxyde d'hydrogène induit l'expression de ces enzymes (Apel et Hirt, 2004).

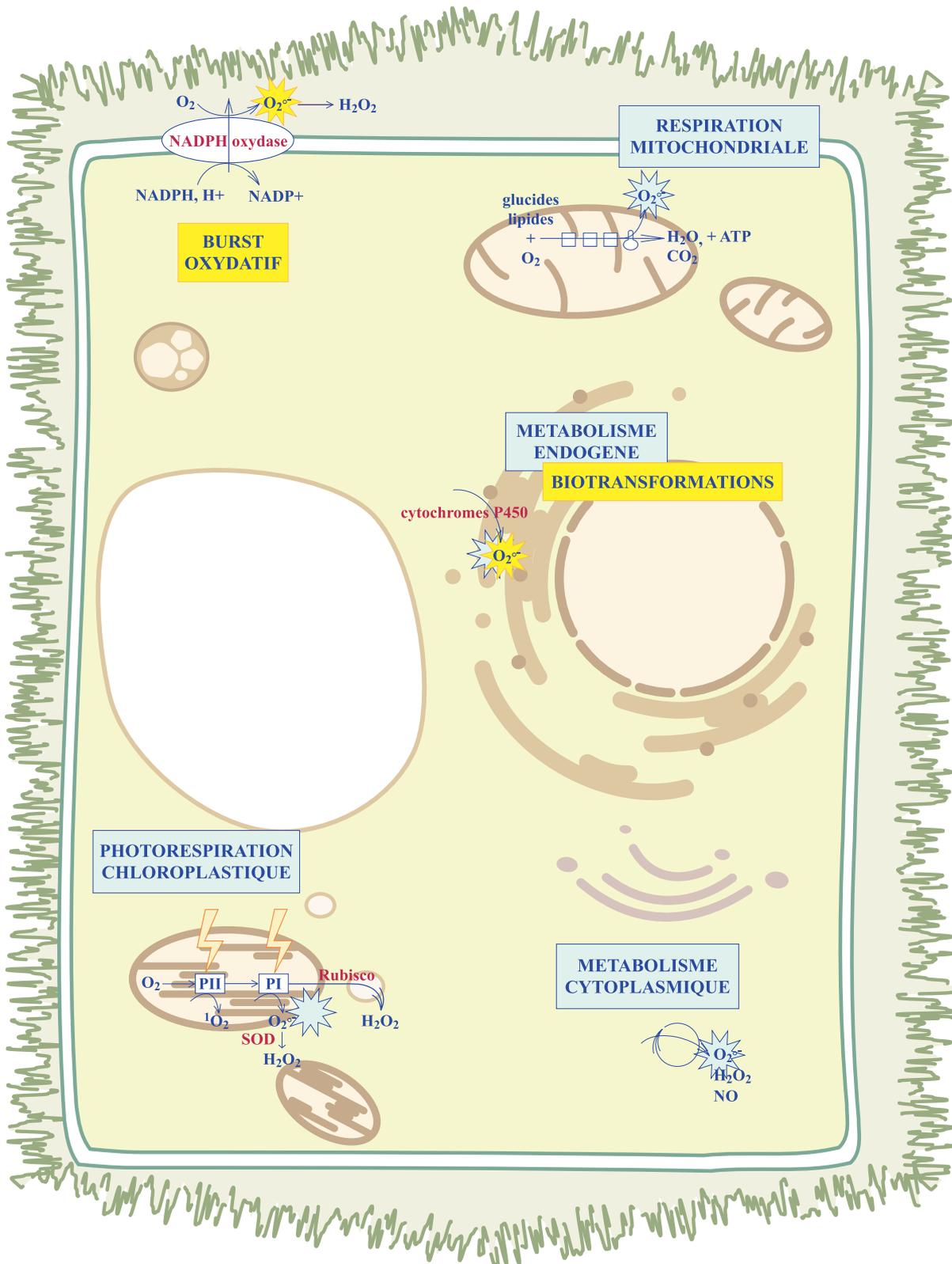


Figure 3 : Production de formes actives de l'oxygène au niveau de la cellule végétale

La production basale de FAO lors d'un métabolisme physiologique normal est indiquée sur fond bleu. Les biotransformations et burst oxydatif, indiqués sur fond jaune, illustrent les réactions cellulaires mises en place pour faire face à des agressions extérieures.

✚ **Métabolisme cytosolique**

Diverses réactions enzymatiques peuvent produire des radicaux superoxyde et du peroxyde d'hydrogène. Chez les organismes aérobies, l'anion superoxyde et le peroxyde d'hydrogène sont formés par la voie des pentoses phosphates, ainsi que dans le catabolisme des acides aminés et des acides gras. Le monoxyde d'azote est lui synthétisé à partir de l'arginine. **D'une manière générale toute réaction biochimique faisant intervenir de l'oxygène moléculaire est susceptible d'être à l'origine d'une production de FAO.** Chez les mammifères les peroxydes organiques sont des intermédiaires dans la synthèse des prostaglandines, des leucotriènes et des thromboxanes.

✚ **Interaction avec des agents étrangers**

Au-delà du métabolisme cellulaire normal, l'organisme doit faire face aux agressions présentes dans son environnement, qu'elles soient d'ordre biologique, chimique ou physique. **Les biotransformations enzymatiques de composés xénobiotiques**, qui impliquent généralement des cytochromes P450 situées au niveau des microsomes, vont s'accompagner d'une production de radicaux libres par activation de l'oxygène. De la même façon d'autres enzymes vont produire des radicaux libres lors de processus de défense tels que la phagocytose chez les mammifères. Dans ce cadre la NADPH oxydase membranaire joue un rôle majeur dans la propriété bactéricide des neutrophiles par la génération d'un **burst oxydatif**.

II.1.1.3 Rupture de l'équilibre : burst oxydatif

Le métabolisme cellulaire normal produit en permanence des formes actives de l'oxygène à un niveau basal. Le contrôle de leur formation et de leur élimination préserve les cellules de leurs effets nuisibles. Parfois sous l'influence de facteurs extérieurs comme des agents pathogènes, des produits polluants, des radiations ionisantes, de fortes températures ou divers stress biotiques et abiotiques, la production de ces molécules s'intensifie et les systèmes naturels de défense ou de réparation sont saturés. Lorsque l'équilibre est rompu entre la capacité anti-oxydante de la cellule et la quantité produite en formes actives de l'oxygène, on observe une accumulation de ces composés.

Le burst oxydatif se traduit par une augmentation forte et rapide de la teneur en FAO en réponse à un stimulus extérieur. Chez les mammifères il est également dénommé burst respiratoire, en référence à la forte consommation en oxygène accompagnant le phénomène (Wojtaszek, 1997). Chez les plantes un phénomène similaire peut être observé, atteignant une quantité accumulée en peroxyde d'hydrogène comparable à celle observée chez les neutrophiles de mammifères (1,2 mM) (Lamb et Dixon, 1997).

II.1.2 Effets sur les systèmes biologiques

II.1.2.1 Toxicité directe

Les radicaux libres sont extrêmement réactifs et peuvent réagir avec l'ensemble des molécules biologiques qu'ils rencontrent. Dans le cas d'une infection, leur toxicité vise directement à tuer le pathogène ou restreindre sa propagation ; les FAO inhibent dans ce cadre la germination des spores chez de nombreux pathogènes (Mehdy, 1994).

Peroxydation des lipides

La peroxydation des lipides résulte en une désorganisation des structures membranaires entraînant le dysfonctionnement des protéines qui y sont imbriquées, ainsi que 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 radicaux hydroxyles et l'oxygène singulet peuvent réagir avec les groupements méthyles des AGPI, formant des radicaux peroxydes et hydroperoxydes (Figure 4). Le radical peroxyde (AGPI-OO·) formé est très réactif et capable de propager une réaction en chaîne. Les hydroperoxydes de lipides (AGPI-OOH) produits peuvent subir un clivage réducteur par des métaux réduits et produire des radicaux lipidiques alkoxydes (AGPI-O·) pouvant initier à leur tour d'autres réactions en chaîne.

La composition et l'organisation des lipides au niveau de la membrane va influencer l'ampleur de la peroxydation lipidique (degré d'insaturation des AGPI, mobilité des lipides dans la bicouche lipidique, etc.) (Blokhina *et coll.*, 2003).

Depuis ces dix dernières années la peroxydation des lipides n'est plus perçue uniquement comme un processus destructif, mais pouvant également participer à la transduction de signaux dans la cellule via des hydroperoxydes lipidiques ou autres dérivés lipidiques oxygénés.

Dénaturation oxydative des acides aminés

La dénaturation oxydative des acides aminés conduit à la déstabilisation des structures secondaires et tertiaires des protéines, ainsi qu'à l'inactivation des enzymes. Les acides aminés peuvent subir des phénomènes de carbonylation, rendant les protéines ainsi modifiées sensibles aux protéases.

L'anion superoxyde réagit également avec les protéines contenant un cluster fer-soufre ou des groupements hémiques. Le peroxyde d'hydrogène peut quant à lui attaquer les groupements thiols des protéines ou du glutathion (Mehdy, 1994 ; Gozzo, 2003).

Modification des bases azotées

L'oxydation des bases azotées peut provoquer un arrêt ou une aberration de l'expression du message génétique des cellules. Elle favorise l'apparition de mutations. Les cinq bases azotées (thymine, cytosine, adénine, guanine, uracile) peuvent être soumises à des phénomènes d'oxydation. L'ADN mitochondrial est le plus sensible aux FAO de part sa présence à proximité de la chaîne respiratoire, l'absence d'histones le stabilisant, ainsi qu'une capacité de réparation moindre de l'ADN polymérase mitochondriale par rapport aux enzymes nucléaires. Globalement on observe dix fois plus de mutations sur l'ADN mitochondrial que sur l'ADN nucléaire. L'apparition de mutations au niveau de l'ADN mitochondrial peut introduire des perturbations dans le fonctionnement de la mitochondrie.

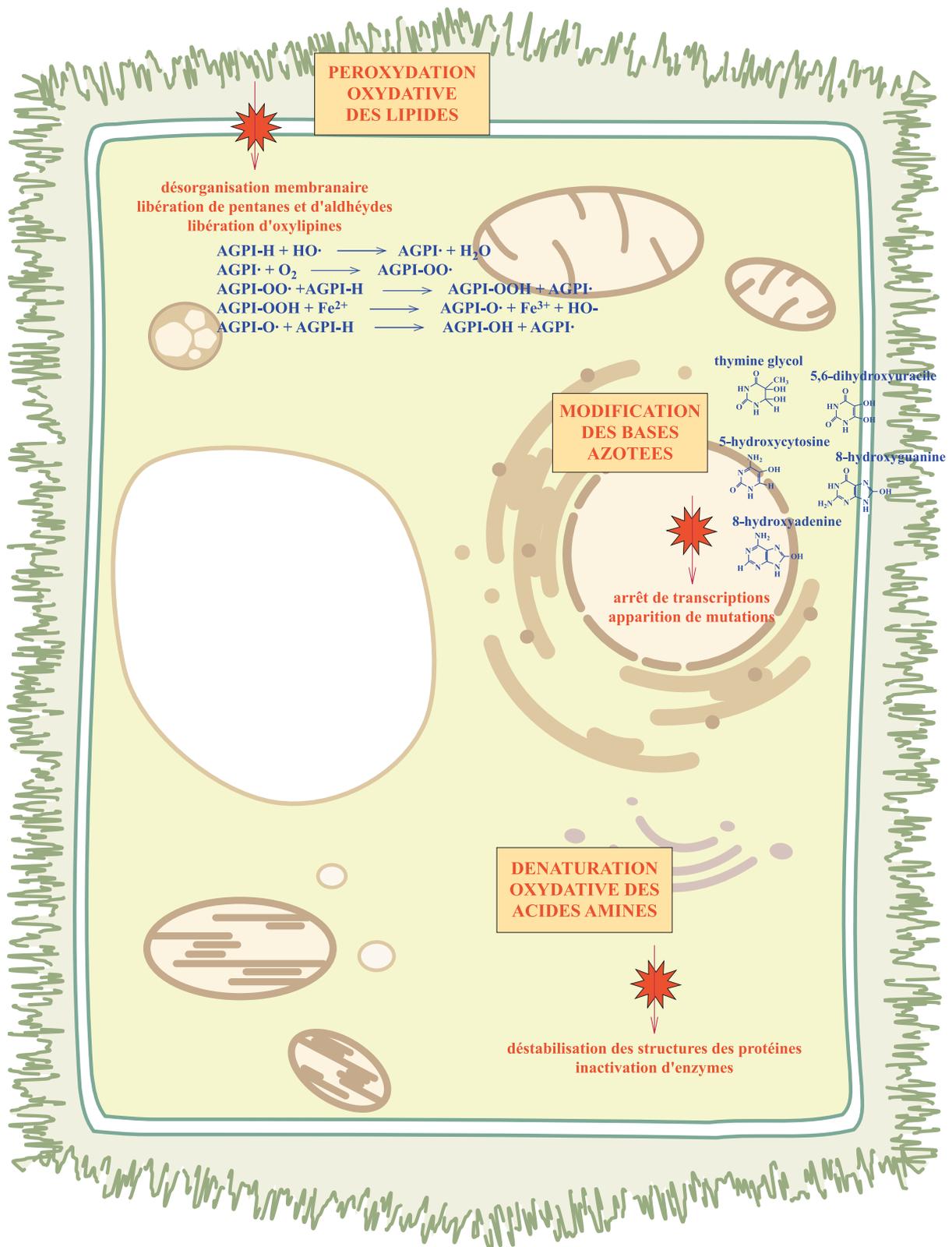


Figure 4 : Effets néfastes des formes actives de l'oxygène sur les différents composants de la cellule végétale

Alors que les organismes eucaryotes sont sur-équipés de mécanismes pour combattre l'augmentation des niveaux de FAO durant divers épisodes de stress, dans d'autres circonstances ils semblent volontairement les générer en tant que molécules de signalisation pour contrôler différents procédés tels que la défense contre les pathogènes ou la mort cellulaire programmée.

II.1.2.2 Effets protecteurs des FAO produits par la plante

La [Figure 5A](#) illustre de façon schématique les réactions séquentielles stimulées à la suite de la perception de l'éliciteur ou du pathogène. Seule une partie de ces réponses sera évoquée ici. Une entrée importante d'ions calcium et l'alcalinisation extracellulaire précède le burst oxydatif. A faibles doses la production de formes actives de l'oxygène par la plante hôte peut avoir des effets protecteurs sur ses propres cellules. Selon les doses en peroxyde d'hydrogène produites par l'hôte, on arrive à un système où le burst oxydatif stimule à la fois la mort et la protection cellulaire. Le renforcement des barrières mécaniques et l'activation de voies de défense latentes vont permettre de limiter la propagation de l'agent infectieux. Selon la teneur en peroxyde d'hydrogène produite, celui-ci va à la fois agir comme catalyseur de mort cellulaire chez le pathogène et les cellules infectées de la plante, et comme signal diffusible pour l'induction de défenses dans les cellules environnantes.

Densification pariétale

La production de formes actives de l'oxygène stimule le pontage pariétal ([Figure 5B](#)) : **la rapide réticulation oxydative de la paroi cellulaire de l'hôte ressemble à un mécanisme auto-scellant permettant de ralentir la progression et l'invasion du pathogène** pendant la mise en place de défenses nécessitant des phénomènes de transcription.

La cinétique de densification pariétale suit celle du burst oxydatif : dans des suspensions cellulaires de haricot et de soja, elle est observée 2 minutes après le début de l'élicitation et est terminée après 20-30 minutes ([Wojtaszek, 1997](#)). Le peroxyde d'hydrogène provoque l'insolubilisation de protéines pariétales, riches en tyrosine et en proline. Ce pontage isodityrosine est catalysé par des peroxydases et met en jeu des

liaisons covalentes. Cette réaction est H₂O₂ et pH dépendante. Un second mécanisme plus tardif serait pH indépendant et gouverné par les lipides (Wojtaszek, 1997). Les éliciteurs fongiques et les dommages mécaniques induiraient l'expression de gènes codant des protéines structurales de la paroi riche en tyrosine, tout en inhibant les gènes codant les versions pauvres en tyrosine (Lamb et Dixon, 1997).

✚ **Modification de la perméabilité membranaire**

La modification de la perméabilité membranaire et des flux d'ions résultants, est l'une des réponses les plus rapides suivant l'élicitation : chez des cellules de persil ces flux sont initiés 2 à 5 min après le début de l'élicitation et une alcalinisation transitoire extracellulaire est constatée. Les transferts affectés activent majoritairement les influx de Ca²⁺ et H⁺ et les efflux de K⁺ et Cl⁻ (Wojtaszek, 1997). **Les modifications de pH résultantes**, dans les différents compartiments cellulaires, **jouent un rôle important dans la régulation des réponses de défense**, et notamment sur la production de FAO. Le burst NADPH-dépendant serait ainsi induit par l'accumulation de calcium Ca²⁺.

✚ **Activation de voies de défense**

Chez les plantes supérieures, le peroxyde d'hydrogène peut provoquer une **augmentation de la production en acide salicylique**. Celui-ci agit en retour en inhibant la catalase, ce qui a pour effet de renforcer l'accumulation du H₂O₂ dans la cellule. Un tel effet n'est observé qu'au site d'infection. L'acide salicylique a la propriété d'être impliqué dans la mise en place d'une résistance locale et d'une réponse systémique acquise (RSA). Il engendre notamment la **synthèse des protéines-PR**. Le peroxyde d'hydrogène induit également la synthèse de ces protéines dans des proportions plus faibles (Lamb et Dixon, 1997).

Le peroxyde d'hydrogène a la propriété de **stimuler la production de phytoalexines**. Ces molécules de faibles poids moléculaires ont une activité antimicrobienne. Leur accumulation est activée par les FAO, même si celles-ci ne sont pas indispensables à leur production (Wojtaszek, 1997). Dans des suspensions cellulaires de tubercules de pomme de terre, le burst oxydatif précède en moyenne de 1 et 6 heures la mort cellulaire et la production de phytoalexines (Doke et coll., 1996).

Par ailleurs la formation d'ions superoxyde précède l'augmentation des teneurs en glutathion et éthylène, ainsi que l'induction des lipoxygénases et de la mort cellulaire

(Lamb et Dixon, 1997). Les FAO conduisent à la libération de peroxydes d'acides gras, qui servent de précurseurs à la synthèse de l'acide jasmonique chez les plantes (Mehdy, 1994).

✚ **Stimulation de l'expression de gènes de défense**

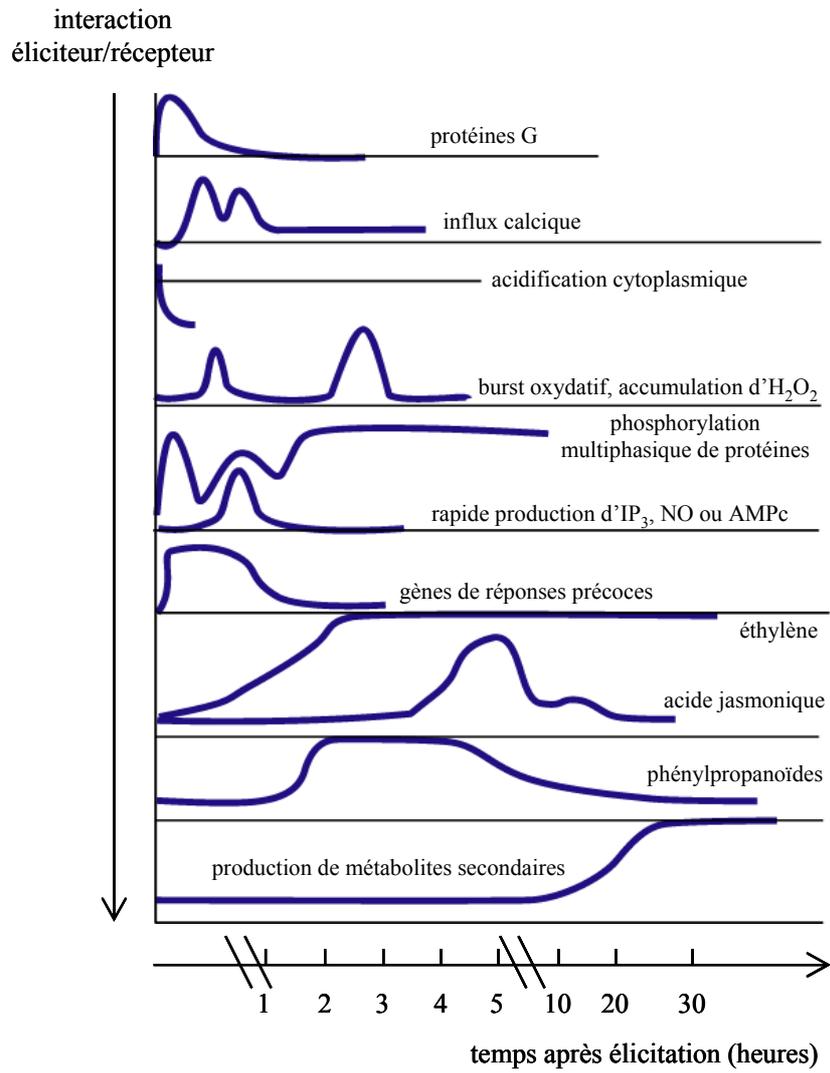
Le peroxyde d'hydrogène induit l'expression de gènes de défense. Ainsi il provoque une faible accumulation des transcrits codant la **phénylalanine ammonia-lyase** et la **chalcone synthase**, tandis qu'il provoque une rapide induction de ceux codants les **glutathion S-transférases**, **glutathion peroxydases**, et polyubiquitine. L'induction de gènes de défense tels que ceux codants les glutathion peroxydases, va permettre de diminuer les teneurs en H₂O₂ à des doses inférieures à celles provoquant la mort cellulaire. Le système est donc régulé de telle façon que le burst induise la mort cellulaire dans les cellules infectées ou stimulées, tandis qu'il constitue un signal diffusible provoquant la transcription d'agents empêchant la mise en place de la mort cellulaire dans les cellules avoisinantes (Lamb et Dixon, 1997).

Les molécules oxydées et réduites du glutathion, GSSG et GSH, sont également affectées par l'augmentation des teneurs en FAO. Elles sont connues pour être des molécules régulatrices d'expression de gènes : le GSH induit l'expression de la phénylalanine ammonia-lyase et de la chalcone synthase, tandis que la modification de l'équilibre GSH/GSSG stimule l'activité phénylalanine ammonia-lyase et l'accumulation de phytoalexines (Mehdy, 1994).

II.1.2.3 La réaction hypersensible

La réaction d'hypersensibilité est la réponse de défense la plus extrême mise en place par la plante suite à l'agression, au cours de laquelle la mort de quelques cellules est observée au profit de la survie de l'organisme entier. Elle est caractérisée par une **nécrose rapide et localisée des tissus envahis par le pathogène, conduisant au confinement de ce dernier au niveau des sites d'infection**. Chez les végétaux supérieurs l'infection de tissus par des agents pathogènes conduit à des morts cellulaires comportant une grande similitude avec le phénomène d'apoptose observé chez les animaux (mort cellulaire génétiquement programmée), notamment une fragmentation de l'ADN nucléaire, et l'induction d'enzymes spécifiques. La réaction hypersensible est par ailleurs l'expression la plus visible de la reconnaissance par la plante hôte de son pathogène (réactions incompatibles) (Lamb et Dixon, 1997).

A.



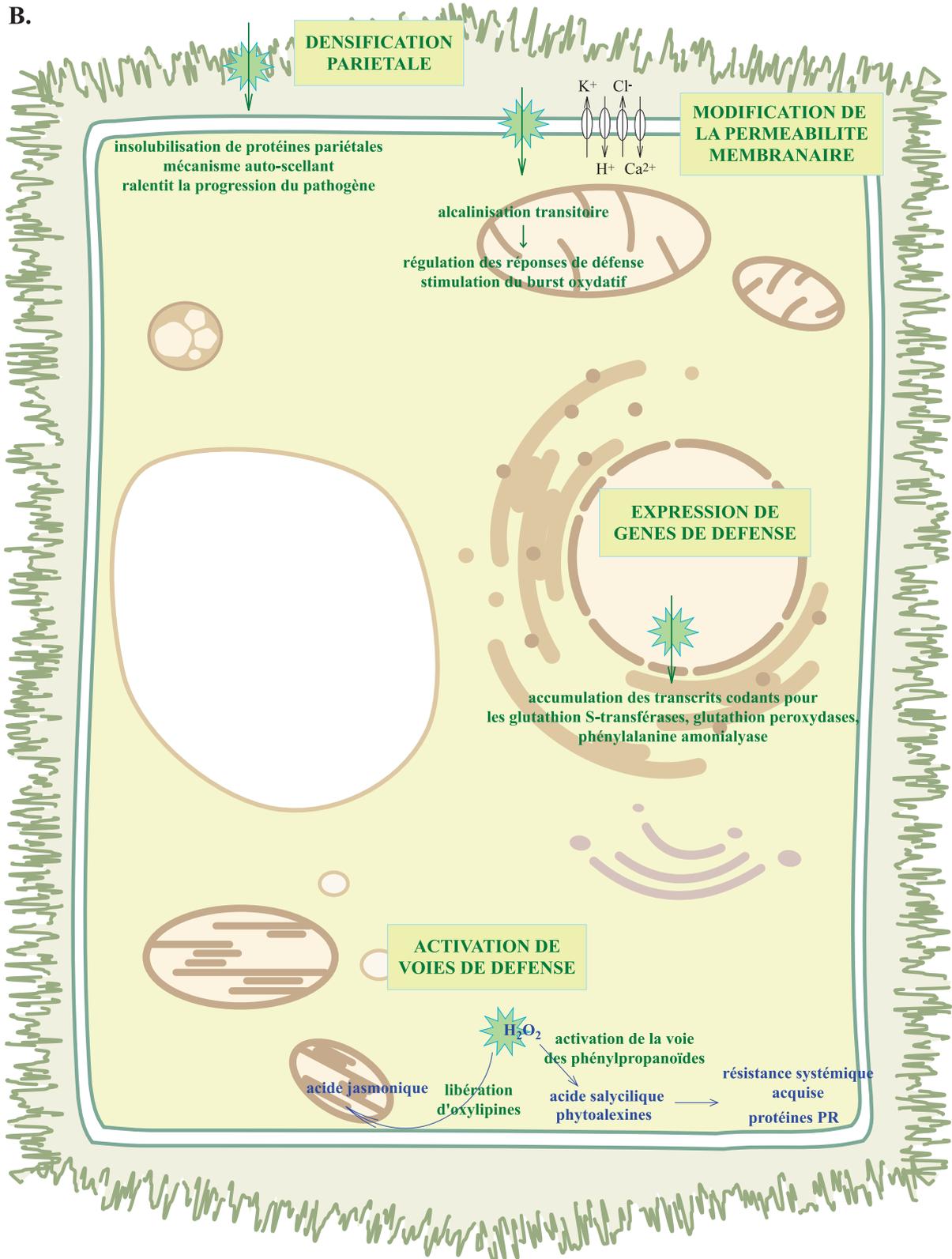


Figure 5 : Evénements de signalisation et réponses de défense inductibles au niveau de la cellule végétale

- A. Illustration schématique des réactions de défense séquentielles induites par des éliciteurs chez les plantes supérieures (d'après Zhao *et coll.*, 2005).
- B. Effets protecteurs des formes actives de l'oxygène au niveau de la cellule végétale.

La production de FAO est un des événements indispensables conduisant à la réaction hypersensible, même si le burst oxydatif n'est pas capable d'induire seul une telle réaction. Il semble exister une relation de cause à effet entre le burst oxydatif et la mort cellulaire, basée sur le dépassement de seuils endogènes de teneurs en radicaux oxygénés. L'induction de l'expression de gènes de défense en réponse à des doses en H₂O₂ plus faibles que celles nécessaires à l'induction de la mort cellulaire, tend à prouver l'existence d'un système finement régulé.

II.1.3 Enzymes impliquées dans la production de formes actives de l'oxygène

Plusieurs enzymes sont impliquées dans la production des formes actives de l'oxygène, notamment les NAD(P)H oxydases, certaines peroxydases et lipoxygénases, et dans une moindre mesure diverses oxydases apoplastiques ou extracellulaires (xanthine oxydases, glucose oxydases, germin-like oxydases).

Le burst oxydatif est majoritairement attribué à l'activation d'une NADPH oxydase située dans la membrane plasmique. En présence de dioxygène et de NADPH cytoplasmique, elle libère des ions superoxyde dans le milieu extérieur, qui vont rapidement se dismuter en peroxyde d'hydrogène. Si le rôle de la NADPH oxydase dans la génération du burst oxydatif est connu depuis longtemps chez les animaux, la première mise en évidence de cas similaires chez les végétaux date seulement de 1983 (Doke, 1983).

Les peroxydases semblent également catalyser l'oxydation du NAD(P)H pour permettre la formation d'ions superoxyde, puis du peroxyde d'hydrogène nécessaire à la lignification. De nombreuses peroxydases sont **localisées au niveau de l'espace apoplastique**, et sont liées de façon covalente ou anionique aux polymères de la paroi (Apel et Hirt, 2004). Une telle localisation conforte le rôle majeur de la NADPH oxydase dans la génération du burst oxydatif au détriment des peroxydases : en effet si la production de FAO est généralement abolie par des inhibiteurs spécifiques de la NADPH oxydase, des protoplastes dépourvus de paroi sont également capables de générer un burst (Lamb et Dixon, 1997). L'acidification transitoire de la cellule induirait l'activation de ces peroxydases.

Les lipoxygénases sont quant à elles souvent à l'origine de la synthèse de radicaux libres et libèrent des formes actives de l'oxygène par hydroperoxydation d'acides gras tels que l'acide linoléique et l'acide linoléique. Les peroxydes lipidiques libérés lors de ces réactions serviraient de précurseurs à la synthèse de l'acide jasmonique. Toutefois l'implication des lipoxygénases dans le déroulement du burst oxydatif n'apparaît pas aussi clairement que celles de la NADPH oxydase et des peroxydases. En effet la production de FAO précède généralement la peroxydation des lipides et les réactions de type lipoxygénase seraient sans doute davantage déterminées par la disponibilité en acides gras libres qu'une réelle stimulation de l'activité (Baker et Orlandi, 1995).

II.2 La NADPH oxydase

La NADPH oxydase possède un rôle majeur dans la mise en place du burst oxydatif chez les plantes.

II.2.1 Mécanisme du burst oxydatif

II.2.1.1 Réaction catalysée

La NADPH oxydase membranaire catalyse l'oxydation du NADPH selon la réaction :



Les électrons sont transférés du NADPH cellulaire à l'oxygène extracellulaire. L'anion superoxyde relargué à l'extérieur de la cellule est rapidement dismuté en peroxyde d'hydrogène.

II.2.1.2 Cinétique du burst oxydatif

Le burst oxydatif suit une cinétique à 2 phases (Figure 6). La phase I a lieu immédiatement après le début de l'élicitation et se traduit par une accumulation modérée et transitoire de FAO. Cette phase est dite non spécifique car elle est observée dans des réactions de type compatible et incompatible. La phase II se traduit par une production massive et prolongée de FAO, et s'observe uniquement dans le cas de réactions incompatibles. La mise en place de cette 2^{ème} phase fait appel à des protéines nouvellement synthétisées (Yoshioka *et coll.*, 2001) ; l'expression de gènes de la NADPH oxydase serait par ailleurs indispensable à l'élaboration de ce second burst et nécessaire à l'établissement de la réaction hypersensible (Yoshioka *et coll.*, 2003).

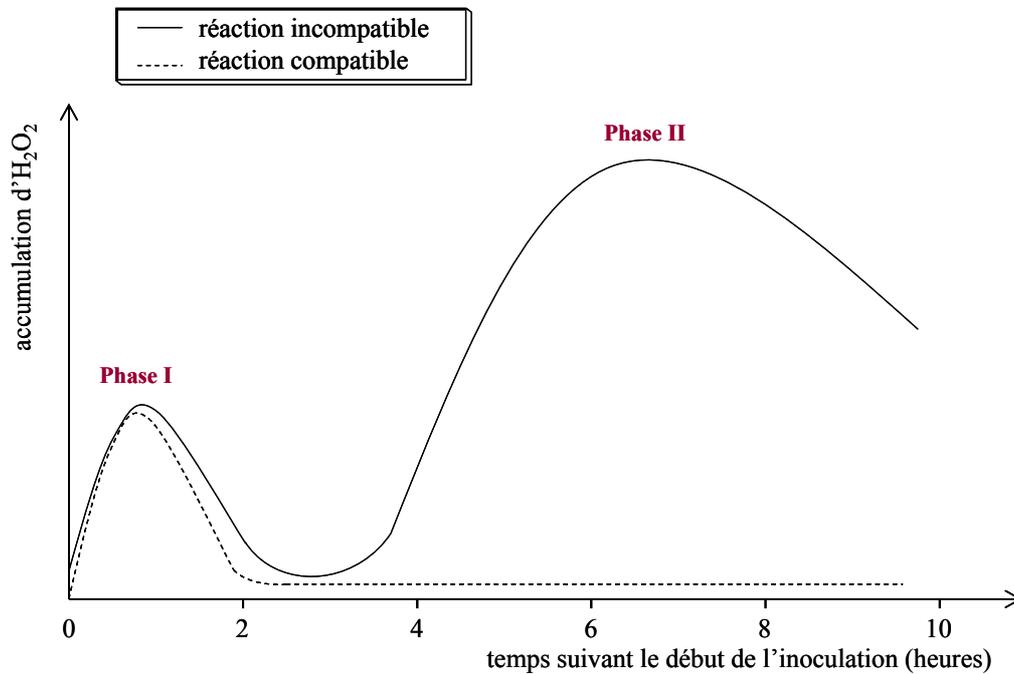


Figure 6 : Cinétique d'accumulation du peroxyde d'hydrogène au niveau de la cellule au cours d'interactions plante/pathogène

Les réactions incompatibles comprennent les interactions avec des pathogènes avirulents ; les réactions compatibles font référence aux pathogènes virulents qui provoquent la maladie chez la plante.

II.2.2 Structure de la NADPH oxydase

Avant d'être mis en évidence chez les plantes supérieures, le complexe NADPH oxydase a largement été étudié chez les mammifères, notamment chez les neutrophiles. Pour mieux comprendre les particularités du système chez les végétaux, il est tout d'abord nécessaire de connaître le complexe et son mode d'activation chez les mammifères.

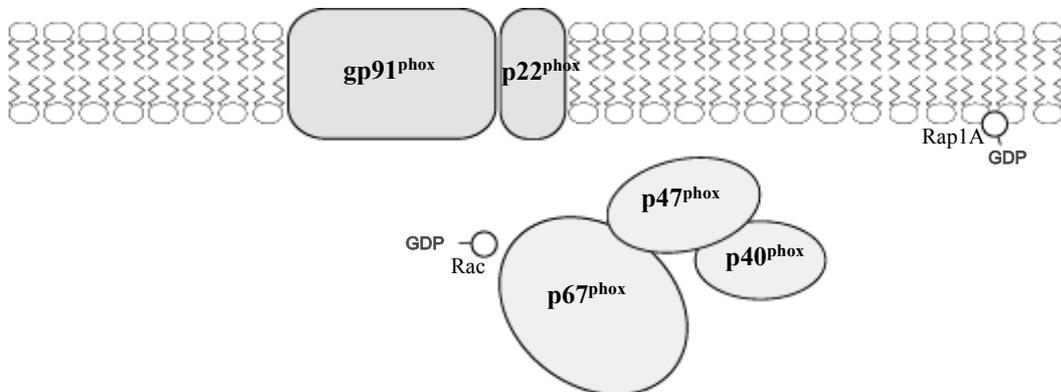
II.2.2.1 Structure du complexe actif chez les neutrophiles

La NADPH oxydase des neutrophiles de mammifères est un complexe enzymatique constitué d'un flavocytochrome b_{558} enchâssé dans la membrane. Cet hétérodimère comprend la glycoprotéine gp91^{phox} (sous-unité β , également nommée Nox2) et la protéine p22^{phox} (sous-unité α). Des protéines cytosoliques de régulation s'associent à ce cytochrome pour générer un complexe actif (Figure 7). Chez les neutrophiles, le cytochrome b_{558} au repos est majoritairement localisé au niveau de la membrane de granules spécifiques, une petite fraction seulement (10-20 %) étant présente au niveau de la membrane plasmique cellulaire. Lors de l'activation du complexe les granules migrent au niveau de la membrane cellulaire et fusionnent avec elle, de telle façon qu'elle se trouve alors enrichie en cytochromes b_{558} . Lorsque le pathogène est phagocyté par le neutrophile, les flavocytochromes se concentrent au niveau de la membrane vacuolaire. Dans le cas de macrophages les NADPH oxydases sont déjà essentiellement présentes au niveau de la membrane cellulaire car ils ne contiennent pas de granules (Vignais, 2002).

🚩 La sous-unité β : gp91^{phox}

La sous-unité β , ou gp91^{phox} (*phox* pour *phagocyte oxidase*), conserve toute la machinerie catalytique nécessaire à l'oxydation du NADPH et à la production des ions superoxyde : le site de fixation du FAD, les deux sites de fixation du NADPH et les deux centres hémiques. Elle possède 6 domaines transmembranaires, dont deux possèdent les couples d'histidine nécessaires à la fixation des hèmes. Les sites de fixation du FAD et du NADPH seraient cytosoliques. Les électrons seraient tout d'abord transférés du NADPH cytosolique vers le FAD, puis vers les centres hémiques avant d'atteindre l'oxygène extracellulaire. Chez l'homme cette sous-unité contient 570 acides aminés pour une masse moléculaire d'environ 91 kDa. La gp91^{phox} est fortement glycosylée, la masse des oligosaccharides représentant près d'un tiers de la masse totale (Vignais, 2002).

A. Complexe NADPH oxydase au repos



B. Complexe NADPH oxydase à l'état activé

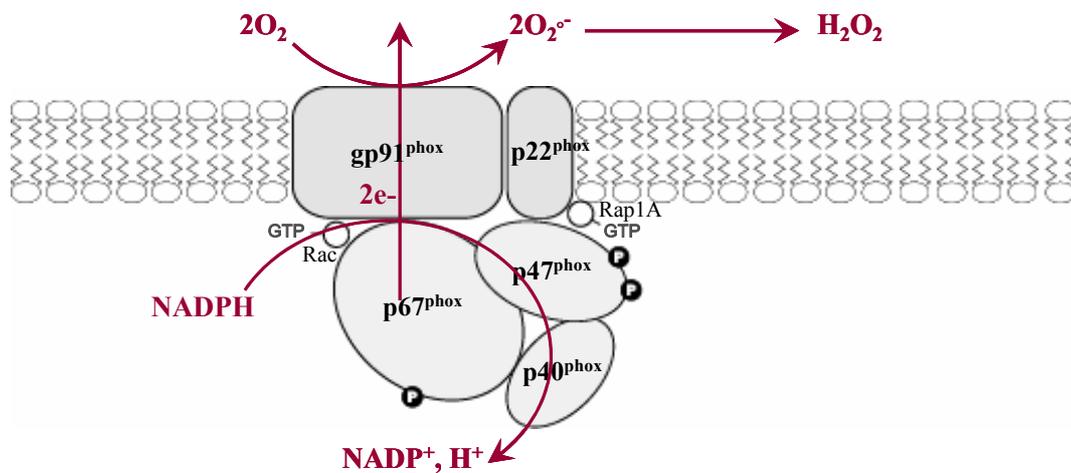


Figure 7 : Modèle structural du complexe NADPH oxydase chez les cellules humaines de neutrophiles

- A.** Complexe NADPH oxydase dans des cellules au repos.
Les facteurs de régulation sont déjà présents et assemblés dans le cytosol, mais non fixés aux deux sous-unités membranaires essentielles du complexe. Les deux protéines G sont liées au GDP.
- B.** Complexe NADPH oxydase dans des cellules stimulées, conduisant à l'assemblage de l'oxydase et à la production d'ions superoxyde.
Les protéines cytosoliques de régulation sont liées au cytochrome membranaire. Cette fixation fait intervenir des phosphorylations au niveau des différentes protéines, ainsi que l'intervention des protéines G liées au GTP.

✚ **La sous-unité α : p22^{phox}**

La sous-unité α , ou p22^{phox} contient 195 acides aminés avec des domaines hydrophobes en N-terminal. Elle contient en C-terminal une région riche en proline, représentant un site potentiel de fixation de domaines SH3 (*Src homology domain 3*), tels qu'ils sont rencontrés au niveau des facteurs cytosoliques.

✚ **Les protéines cytosoliques de régulation**

Les protéines cytosoliques de régulation agissent en tant qu'activatrices de la NADPH oxydase ; la capacité à produire des ions superoxyde étant régie par le flavocytochrome (Leusen *et coll.*, 1996). Elles se transloquent à la membrane après stimulation pour former le complexe actif. Les **trois protéines cytosoliques majeures p40^{phox}, p47^{phox} et p67^{phox}** (de poids moléculaires respectifs de 40, 47 et 67 kDa) seraient déjà liées entre elles dans le cytoplasme puis subiraient une réorganisation et diverses phosphorylations avant de s'associer au cytochrome membranaire. Chaque séquence protéique contient au moins un motif SH3 et une région riche en proline. Ces domaines jouent un rôle notable dans les interactions entre composants cytosoliques et dans l'assemblage du complexe enzymatique.

L'unité p67^{phox} contient 526 acides aminés et serait liée à la sous-unité β du flavocytochrome via un premier domaine SH3. La présence de p47^{phox} au niveau du complexe membranaire serait indispensable à la fixation de p67^{phox}. La fixation de cette dernière sous-unité faciliterait le flux d'électrons du NADPH vers le centre flavinique.

L'unité p47^{phox} contient 390 acides aminés et au moins six sites potentiels de phosphorylation pour la protéine kinase C. Elle se lierait à une région polyproline de la sous-unité α , via deux domaines SH3. Elle permet le transfert des électrons du FAD réduit vers les deux centres hémiques du flavocytochrome jusqu'à l'oxygène.

L'unité p40^{phox} contient 339 acides aminés et fut mise en évidence plus tardivement. Son rôle dans l'activation du complexe est plus subtil : sa présence permettrait en effet d'augmenter l'affinité de p47^{phox} pour le flavocytochrome, mais de trop fortes concentrations en p40^{phox} auraient un effet inhibiteur (Cross, 2000). Son domaine SH3 est lié à la région polyproline de p47^{phox}, tandis que sa région N-terminale est elle-même liée à p67^{phox}.

Deux protéines G jouent également un rôle important dans l'activation du complexe : **Rap1A et rac**, de poids moléculaires respectifs de 26 et 21 kDa. Au repos elles

sont toutes deux liées au GDP, puis sous leur forme active liée au GTP lors de l'activation du complexe. Rap1A s'associerait au flavocytochrome tandis que rac permettrait la fixation de p47^{phox} à la membrane, suivie de p67^{phox} (Leusen *et coll.*, 1996).

II.2.2.2 Homologues à la NADPH oxydase chez les cellules non-phagocytaires

Chez les cellules phagocytaires de mammifères telles que les neutrophiles, la production d'anions superoxyde fait partie intégrante des mécanismes bactéricides. Cette fonction est largement assumée par la NADPH oxydase membranaire.

Des études plus récentes ont montré que **les cellules non-phagocytaires possèdent également des homologues** à la sous-unité catalytique de la NADPH oxydase. Ils définissent ce que l'on nomme communément la **famille « Nox »**. Nox1, localisée dans le colon et la barrière intestinale, jouerait un rôle dans la défense immunitaire innée (Bokoch *et Knaus*, 2003) ainsi que dans la croissance et la régulation cellulaire (Banfi *et coll.*, 2001). L'expression de Nox3 est limitée aux tissus fœtaux où elle semble jouer un rôle dans la transduction du signal lié au développement (Bokoch *et Knaus*, 2003). Nox4 est, en revanche, exprimée dans des tissus bien spécifiques : on la rencontre dans le rein, l'utérus (Edens *et coll.*, 2001), les ostéoclastes (Yang *et coll.*, 2001) et les cellules adipeuses sensibles à l'insuline (Mahadev *et coll.*, 2004). Il s'agit également de l'isoforme la plus fréquemment rencontrée dans les cellules cancéreuses (Cheng *et coll.*, 2001). Nox1 et Nox4 ont la particularité d'être exprimées de façon constitutive (Edens *et coll.*, 2001). En revanche la présence de facteurs cytosoliques ou de sous-unités membranaires associées à ces différentes isoformes est assez peu documentée dans la littérature. Si certaines protéines cytosoliques semblent être nécessaires à l'activité NADPH oxydase de Nox1, en revanche dans le cas de Nox4 il est très probable que de tels facteurs ne soient pas indispensables à son activité (Banfi *et coll.*, 2001 ; Bokoch *et Knaus*, 2003).

Nox5 est l'homologue le plus divergent de cette famille, de part son **extension caractéristique en N-terminal contenant 3 motifs EF-hands** pour la fixation du calcium. En terme d'activité Nox5 se rapproche de la gp91^{phox}, puisqu'elle nécessite une stimulation pour être active. De plus, tout comme la gp91^{phox} et contrairement à Nox1 ou Nox4, elle peut produire de grandes quantités d'anions superoxyde (Banfi *et coll.*, 2001). Elle serait essentiellement exprimée dans les spermatocystes d'une part, où elle jouerait un rôle dans les premiers stades de la spermatogénèse impliquant des phénomènes de division cellulaire

et de compaction de l'ADN, et dans les régions riches en lymphocytes B et T d'autre part, où elle pourrait permettre l'activation, la prolifération et la différenciation de ces cellules. Confirmant sa particularité, Nox5 semble être strictement régulée par la disponibilité en calcium, et ne génère pas d'anions superoxyde lorsqu'elle est dépourvue de ses motifs de fixation du calcium. Elle peut également fonctionner comme une pompe à protons, mais contrairement à la gp91^{phox}, uniquement lorsque la concentration cellulaire en Ca²⁺ augmente (Banfi *et coll.*, 2001).

Les membres de la **famille « Duox »** (pour *Dual oxidases*) possèdent des caractéristiques structurales communes à Nox5 puisqu'ils disposent également d'une **extension en N-terminal, contenant 2 sites EF-hands pour la fixation du calcium, un domaine transmembranaire supplémentaire suivi d'un domaine peroxydase** (Banfi *et coll.*, 2001 ; Edens *et coll.*, 2001 ; Bokoch et Knaus, 2003). Chez ces enzymes, le peroxyde d'hydrogène généré suite à l'activité du domaine NADPH oxydase, pourrait servir de substrat au domaine peroxydase (Edens *et coll.*, 2001). Des homologues aux Duox humaines ont par ailleurs été identifiés chez le porc, la drosophile et les nématodes (Banfi *et coll.*, 2001 ; Edens *et coll.*, 2001). Chez *Caenorhabditis elegans*, les Duox auraient un rôle dans la genèse de la cuticule par pontage de résidus tyrosine (Edens *et coll.*, 2001).

II.2.2.3 Structure de la NADPH oxydase chez les plantes

Un burst oxydatif similaire à celui constaté chez les mammifères est observé chez les plantes supérieures après élicitation par des extraits de pathogènes. Cette production de FAO s'observe au niveau des fractions membranaires des cellules et est inhibée par le DPI (diphénylène ionodium), un inhibiteur classique de flavocytochromes tels que les NADPH oxydases chez les mammifères. **L'existence d'homologues à la NADPH oxydase de neutrophiles a donc été suspectée chez les plantes supérieures, puis confirmée au début des années 1990 avec l'identification d'une série de transcrits présentant de fortes homologies à la gp91^{phox} humaine.** Ces homologues alors dénommés rboh pour *respiratory burst oxidase homologue*, sont rencontrés chez le riz (Groom *et coll.*, 1996 ; Torres *et coll.*, 1998), *Arabidopsis thaliana* (Desikan *et coll.*, 1998 ; Keller *et coll.*, 1998 ; Torres *et coll.*, 1998), la tomate (Amicucci *et coll.*, 1999), la pomme de terre (Yoshioka *et coll.*, 2001) et le tabac (Simon-Plas *et coll.*, 2002 ; Yoshioka *et coll.*, 2003). Il a été montré que la plupart de ces homologues sont impliqués dans l'accumulation de formes actives de l'oxygène lors d'interactions incompatibles entre plantes résistantes et pathogènes

avirulents. Ces enzymes seraient donc impliquées dans l'activation de réponses de défense chez la plante.

Des anticorps dirigés contre les composants humains p22^{phox}, p47^{phox} et p67^{phox}, détectent des protéines de tailles similaires dans des extraits de plantes (Desikan *et coll.*, 1996). Pourtant, aucun gène codant pour ces sous-unités n'a depuis été identifié chez les plantes supérieures, et leur présence n'a pas été révélée dans le génome entièrement séquencé d'*Arabidopsis thaliana*. Par ailleurs, Sagi et Fluhr (2001) ont montré que le composant membranaire de la NADPH oxydase chez la tomate était capable de produire des ions superoxyde en absence de composants cytosoliques additionnels. De ce fait **la large sous-unité homologue à la gp91^{phox}, semble être le seul élément requis pour la mise en place d'une activité NADPH oxydase chez les plantes.** En revanche les isoformes végétales ont toutes la particularité de posséder une extension N-terminale d'environ 350 acides aminés et située dans le cytosol, au niveau de laquelle on retrouve deux motifs de fixation du calcium (motifs EF-hands). La fixation des ions Ca²⁺ au niveau de ces sites a été démontrée chez l'isoforme AtrbohF d'*Arabidopsis thaliana* (dénommée AtrbohA par l'auteur) par Keller *et coll.* (1998), suggérant une régulation directe de l'enzyme par le calcium chez les plantes supérieures.

II.2.3 Parenté avec les ferriques réductases membranaires

Des ferrique réductases membranaires, identifiées chez les levures et les plantes supérieures, possèdent des ressemblances frappantes avec les NADPH oxydases.

II.2.3.1 Nature des ferriques réductases membranaires

Les ferriques réductases membranaires permettent la réduction extracellulaire des ions ferriques Fe³⁺ en ions ferreux Fe²⁺, avant leur absorption à l'intérieur de la cellule via des transporteurs membranaires. Elles jouent un rôle important dans l'alimentation de la plante en augmentant la disponibilité du fer du sol, présent essentiellement sous forme Fe³⁺-chélaté souvent insoluble. Ces enzymes sont généralement induites lors de périodes de carence. On les rencontre chez les levures et les plantes à stratégies I, par opposition aux plantes à stratégies II (graminées) qui réduisent le fer dans le cytoplasme après importation d'un complexe Fe³⁺-sidérophore (Schmidt, 2003 ; Cohen *et coll.*, 2004).

Le génome d'*Arabidopsis thaliana* contiendrait au moins cinq membres de ferriques réductases membranaires (FRO), dont FRO1 et FRO2 qui ont été étudiées plus précisément (Robinson *et coll.*, 1999 ; Waters *et coll.*, 2002). Sept gènes ont été identifiés chez *Saccharomyces cerevisiae* (FRE1 à 7) où les enzymes Fre1 et Fre2 sont responsables de plus de 99 % de l'activité ferrique réductase *in vivo* (Schroder *et coll.*, 2003).

II.2.3.2 Homologie de séquence

Les ferriques réductases membranaires présentent une structure topologique et catalytique conservée par rapport aux NADPH oxydases. Les six domaines transmembranaires identifiés chez la gp91^{phox} sont conservés chez l'ensemble des ferriques réductases membranaires. Chez la levure, la séquence légèrement plus longue possède un domaine hydrophobe N-terminal supplémentaire. La machinerie catalytique est également conservée : les deux sites de fixation du NADPH, le site de fixation du FAD ainsi que les deux centres hémiques.

II.2.3.3 Homologie catalytique

Le mécanisme catalytique de la réduction des ions Fe³⁺ est extrêmement similaire au mécanisme catalytique de réduction de l'oxygène cytosolique par les NADPH oxydases : l'enzyme utilise également le NADPH cytosolique comme donneur d'électrons, puis le transfère à lieu du NADPH vers le FAD, avant d'atteindre les centres hémiques et le fer extracellulaire. Shinyashiki *et coll.* (2004) ont pu montrer que la FRE1 de *S. cerevisiae* était, tout comme la NADPH oxydase, inhibée par le NO et, de ce fait, faisait de cette enzyme un bon modèle d'étude de l'interaction du NO avec la NADPH oxydase. Fineglod *et coll.* (1996) ont également montré que l'intégrité des deux hèmes est indispensable au bon fonctionnement des deux enzymes.

Par analogie à la NADPH oxydase, il est probable que l'anion superoxyde soit généré par la ferrique réductase membranaire, comme produit intermédiaire avant la réduction du fer (Schroder *et coll.*, 2003). En revanche il n'existe pas d'homologie de régulation de ces deux enzymes, les ferriques réductases membranaires étant spécifiquement induites dans le cas de carences en fer ou en cuivre.

II.3 Les peroxydases

Les peroxydases apoplastiques chez les plantes supérieures ont un rôle moindre que celui de la NADPH oxydase dans la génération du burst oxydatif. En revanche chez certains organismes d'autres peroxydases ont un rôle plus important. C'est le cas des myeloperoxydases chez les neutrophiles de mammifères, dont le rôle est considéré d'égale importance à celui des NADPH oxydases, dans l'activité bactéricide de ces cellules. La production de composés halogénés toxiques par les haloperoxydases chez les algues marines vient s'ajouter à la production des FAO du burst oxydatif dans la lutte contre l'agent infectieux.

II.3.1 Le groupe très diversifié des peroxydases

D'une façon générale les peroxydases catalysent la réduction du peroxyde d'hydrogène en utilisant divers donneurs d'électrons organiques ou inorganiques. La diversité des substrats utilisés et donc des réactions catalysées, expliquent leur implication dans de nombreux processus physiologiques tels que la croissance cellulaire, la lignification chez les plantes supérieures, mais également la synthèse hormonale, l'oxydation de certains xénobiotiques chez les mammifères et la participation aux voies de défense contre les pathogènes. Dans ce dernier cas les haloperoxydases génèrent, à partir du peroxyde d'hydrogène, des composés halogénés toxiques pour les micro-organismes. Les peroxydases sont présentes chez la plupart des organismes vivants, la grande majorité d'entre elles étant des enzymes à hèmes, présentant une protoporphyrine IX comme groupement prosthétique.

Les peroxydases à hèmes sont généralement divisées en deux grandes familles qui souvent sont dénommées par extension, et de façon contestable, les peroxydases animales et les peroxydases végétales. Elles illustrent deux origines ancestrales différentes. La première grande famille (**peroxydases animales**) est essentiellement rencontrée chez les mammifères, et fait référence à l'ensemble de la famille des myeloperoxydases et de ses plus proches homologues. Les peroxydases de la seconde grande famille (**peroxydases végétales**) sont réparties en trois classes selon leur localisation cellulaire et leur fonction. **La classe I** regroupe des peroxydases intracellulaires, elles sont rencontrées chez les

plantes supérieures et les champignons. Certains membres de cette classe ont une activité catalase-peroxydase, les autres membres ayant une forte spécificité de substrat (cytochrome *c* oxydase, ascorbate peroxydase, etc.). **La classe II** fait référence à des peroxydases fongiques extracellulaires, dont certaines sont impliquées dans des processus de dégradation de la lignine. Les peroxydases de **classe III** sont des enzymes extracellulaires, représentées chez les animaux, les plantes supérieures et les micro-organismes.

Parmi les enzymes non répertoriées dans ces deux grandes familles il y a notamment d'autres **haloperoxydases**, essentiellement rencontrées chez les champignons, les bactéries et les algues. Elles peuvent ne posséder aucun groupement prosthétique tel qu'on le rencontre chez les bactéries, ou utiliser le vanadate en tant que co-facteur comme dans le cas des eucaryotes marins (Conesa *et coll.*, 2002 ; Zamocky, 2004). **Les peroxydases thiol-dépendantes** forment une dernière famille de peroxydases rencontrées chez les mammifères, les plantes supérieures, les champignons et les bactéries. Elles ne possèdent pas d'hèmes mais une cystéine catalytique (glutathion peroxydases et peroxiredoxines).

II.3.2 Les peroxydases animales à hème

Les myéloperoxydases appartiennent à la famille des peroxydases de mammifères, étendue depuis quelques années à la famille **des peroxydases animales** après la découverte de nouveaux homologues chez les invertébrés. Les myéloperoxydases font donc partie d'une large famille de peroxydases animales incluant également les peroxydases d'éosinophiles (*eosinophil peroxidases*), les lactoperoxydases (*lactoperoxidases*), les peroxydases de la thyroïde (*thyroid peroxidases*), les ovoperoxydases (*ovoperoxidases*) et les peroxydases salivaires (*salivary peroxidases*). Au-delà de leur dénomination courante et discutable de « peroxydases animales », on rencontre ces enzymes non seulement chez les mammifères, les insectes, les nématodes, mais également chez les champignons, certaines bactéries et cyanobactéries. En revanche aucun homologue n'a jamais été répertorié chez les plantes supérieures.

II.3.2.1 Structure et biosynthèse des myéloperoxydases

Les peroxydases animales sont des enzymes homodimériques à hème, d'environ 140-200 kDa. Les monomères sont constitués d'environ 600-700 acides aminés, avec une fixation covalente à l'hème, contrairement aux peroxydases végétales, qui en plus des différences au niveau du site catalytique, sont souvent plus courtes (environ 300 acides aminés) et où l'hème est fixé de façon non-covalente. **Chaque monomère est par ailleurs composé de deux chaînes polypeptidiques** : une chaîne légère d'environ 100 acides aminés, et une chaîne lourde d'environ 500 acides aminés. Ces deux chaînes résultent de l'excision post-transcriptionnelle d'un seul polypeptide précurseur. Les deux sous-unités d'un même monomère sont liées de façon covalente par des ponts disulfures (Figure 8).

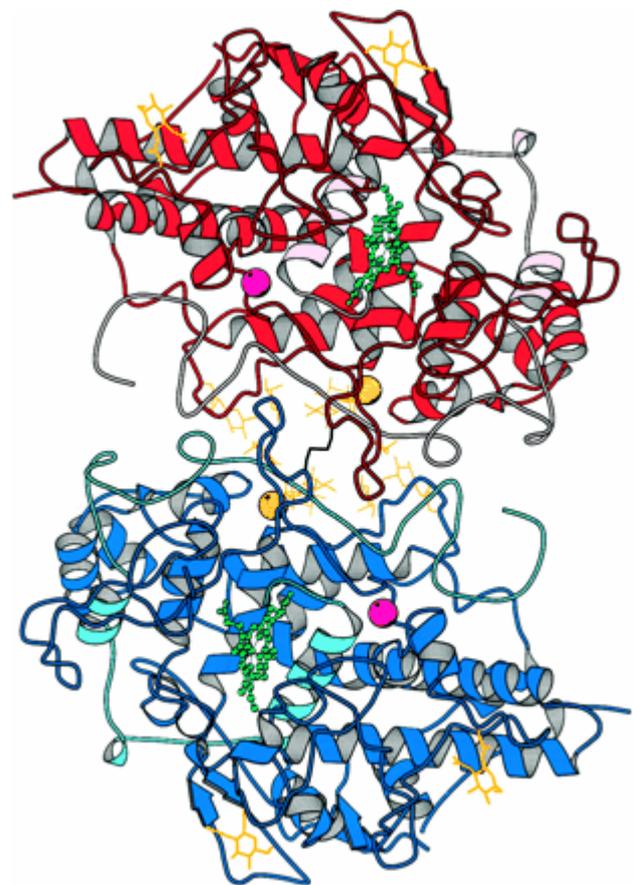


Figure 8 : Structure dimérique de la myéloperoxydase humaine (HsMPO)

Les chaînes lourdes des deux monomères sont représentées en rouge et bleu, avec les chaînes légères représentées dans une tonalité plus claire de la même couleur. Les autres couleurs font référence aux hèmes (vert), carbohydrates (orange), calcium (rose) et chlorure (jaune). Au centre de la molécule le pont disulfure est représenté en noir (d'après Fiedler *et coll.*, 2000).

II.3.2.2 Rôle des myéloperoxydases dans le burst oxydatif

Avec la NADPH oxydase membranaire, la myéloperoxydase est impliquée dans la formation de formes actives de l'oxygène et dans l'oxydation du matériel biologique. **Elle constitue la protéine la plus abondante des granules de neutrophiles.** Les peroxydases animales oxydent les halogénures (haloperoxydases). **La myéloperoxydase oxyde préférentiellement le chlore** (chloroperoxydase), tandis que les peroxydases d'éosinophiles et lactoperoxydases oxydent préférentiellement le brome (bromoperoxydase). Les concentrations physiologiques des différents halogènes sont par ailleurs largement en faveur de l'ion chlorure (140 mM Cl⁻, 20-100 μM Br⁻, 100-500 nM I⁻) (O'Brien, 2000). Quand les neutrophiles sont activés, les myéloperoxydases utilisent le peroxyde d'hydrogène issu du burst oxydatif pour oxyder le chlore et produire de l'hypochlorite HOCl, cinquante fois plus toxique pour les micro-organismes.



Cette enzyme intervient donc directement en aval du burst oxydatif, après la production par la NADPH oxydase d'ions superoxyde, rapidement dismutés en peroxyde d'hydrogène : certaines études ont ainsi montré les rôles d'égale importance des myéloperoxydases et NADPH oxydases dans certains mécanismes de réponse à l'infection.

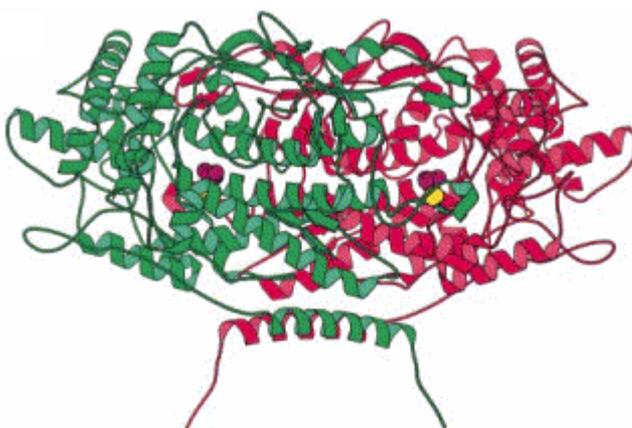
La myéloperoxydase peut également oxyder d'autres composés biologiques que le peroxyde d'hydrogène pour donner des radicaux libres très réactifs : thiocyanate, oxyde nitrique, ascorbate, urate, tyrosine. Elle aurait chez certains organismes d'autres fonctions, notamment la peroxydation des lipides par les produits libérés et l'adhésion à certaines protéines de surface cellulaire (Arnhold, 2004).

II.3.3 Les haloperoxydases chez les algues

D'autres organismes possèdent également des peroxydases impliquées dans la production de composés toxiques lors de la lutte contre l'agent infectieux. Les macroalgues marines ont ainsi mis à profit leur environnement et les teneurs élevées en halogènes du milieu marin (140 mM Cl⁻, 0,84 μM Br⁻, 0,47 nM I⁻) pour développer des activités haloperoxydases conduisant à la production de composés halogénés volatils toxiques. Dans le cas des algues se sont des haloperoxydases à vanadate (Figure 9).

Figure 9 : Structure dimérique de la bromoperoxydase de l'algue rouge *Corallina officinalis* (CoBPO)

Les deux monomères sont représentés en rouge et vert. L'ion magnésium et le phosphate inorganique sont représentés en jaune et rouge respectivement (d'après *Isupov et coll., 2000*).



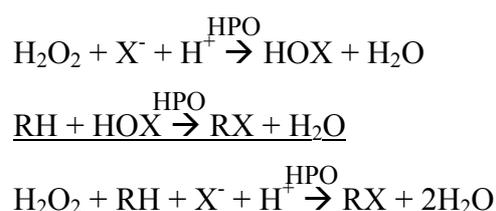
II.3.3.1 Les composés halogénés

Le fluor, le chlore, le brome, l'iode, forment le groupe des halogènes communément rencontrés dans le milieu naturel. Ils entrent dans la composition des composés inorganiques ou organiques halogénés. Dans le cas des composés inorganiques, le fluor est l'élément le plus rencontré, essentiellement dans la croûte terrestre. Le chlore est majoritairement retrouvé dans les océans sous forme de chlorure NaCl. Le brome et l'iode sont présents à de plus faibles quantités, essentiellement dans l'océan sous forme d'ions. La plupart des composés organiques halogénés contiennent du chlore. Ils sont formés à partir des halogènes inorganiques, soit par des processus abiotiques (feux de forêts, éruptions volcaniques), soit par divers organismes vivants (bactéries, champignons, algues, etc.), d'autres composés ont une origine anthropique (la majorité des métabolites chlorés et fluorés). Les métabolites bromés et iodés qui prédominent dans l'environnement

marin ont majoritairement des sources naturelles de production. Enfin les composés halogénés constitués d'un à trois carbones peuvent être volatils : ce sont les composés halogénés volatils ou VOHC (*Volatile Halogenated Organic Compounds*). **Dans le cycle biogéochimique de production des halogènes, les algues constituent un compartiment d'importance pour la production naturelle de VOHC**, réémis ensuite vers l'atmosphère (Colin, 2004).

II.3.3.2 Les haloperoxydases

Les haloperoxydases (HPO) présentes chez la plupart des règnes du vivant, sont impliquées dans l'halogénéation d'un nombre important de composés organiques. **Elles sont capables, en présence de peroxyde d'hydrogène, d'oxyder les halogénures** (X^- pour Cl^- , Br^- ou I^-), et éventuellement de produire des composés organiques halogénés.



L'acide hypohalogéneux HOX peut également être réduit par un second peroxyde d'hydrogène pour conduire à la formation de l'halogénure :



Les haloperoxydases sont nommées suivant l'halogénure le plus électronégatif qu'elles sont capables d'oxyder : une **chloroperoxydase (CPO)** oxyde le chlorure, le bromure et l'iodure, une **bromoperoxydase (BPO)** oxyde le bromure et l'iodure, tandis qu'une **iodoperoxydase (IPO)** oxyde spécifiquement l'iodure. Un très grand nombre d'activités CPO, BPO et IPO ont pu être mises en évidence chez des bactéries, des lichens, des champignons, des algues marines, des invertébrés marins, et des animaux terrestres (Colin, 2004). Les haloperoxydases ne présentant aucun groupement prosthétique sont présentes chez de nombreuses bactéries. Les organismes terrestres possèdent essentiellement des haloperoxydases à hème (cas des myéloperoxydases chez les mammifères). **Les activités haloperoxydases utilisant le vanadate VO_4^{3-} comme cofacteur (vHPO) sont majoritairement retrouvées chez les eucaryotes marins**, et sont

soient des bromoperoxydases, soient des iodoperoxydases. La première activité vBPO a été caractérisée chez l'algue brune *Ascophyllum nodosum*, depuis de nombreuses activités vBPO ont été identifiées chez les algues vertes, les algues brunes et les algues rouges. Les haloperoxydases de l'algue brune *Laminaria digitata* et de l'algue rouge *Chondrus crispus*, font l'objet d'études plus approfondies au niveau moléculaire et biochimique, au sein du laboratoire, par l'équipe « Biochimie des défenses des algues » dirigée par Philippe Potin.

II.3.3.3 Rôles biologiques des vHPO

✚ **Absorption d'halogénures**

La majorité des macroalgues a la capacité de concentrer soit le brome soit l'iode. En particulier les algues brunes appartenant à l'ordre des Laminariales représentent le plus grand réservoir d'iode parmi les organismes vivants. Ces algues ont d'ailleurs été longtemps exploitées comme source d'iode. L'absorption des halogénures ferait intervenir des processus de diffusion facilitée, mettant en jeu des enzymes extracellulaires de type haloperoxydases (Colin, 2004).

✚ **Détoxication du peroxyde d'hydrogène**

De la même façon que chez les mammifères ou les plantes supérieures, lorsque les algues marines sont soumises à des stress biotiques ou abiotiques, elles génèrent des quantités massives de formes actives de l'oxygène. Si elles possèdent des systèmes anti-oxydants similaires à ceux rencontrés chez les mammifères ou les plantes supérieures (molécules anti-oxydantes telles que le glutathion, l'acide ascorbique, ou enzymes à activité anti-oxydante telles que les superoxyde dismutases, les catalases), **les haloperoxydases pourraient également avoir un rôle dans la détoxification du peroxyde d'hydrogène, tout en produisant des VHOC.**

Production de composés halogénés toxiques

Chez les algues marines la production de composés halogénés, et en particulier de composés halogénés volatils (bromoforme, chloroforme, bromométhane, etc.) semblent faire partie des stratégies mises en place par l'algue pour se protéger contre les épiphytes, ou faire face à l'attaque de pathogènes. Ces composés ont des propriétés antimicrobiennes et agissent également contre les herbivores. Chez l'algue brune *Laminaria digitata*, l'application de fragments de sa propre paroi, les oligoalginates, mime l'attaque d'un pathogène et provoque l'émission d'un burst oxydatif. Un efflux d'iodures est simultanément au burst oxydatif et est suivi par une augmentation de l'émission de composés organiques volatils iodés (Kupper *et coll.*, 2001). L'élicitation par des oligoagars de l'algue rouge *Gracilaria conferta* provoque une émission massive de peroxyde d'hydrogène, précédant la stimulation immédiate d'une activité haloperoxydase. Chez l'algue rouge *Chondrus crispus* des extraits acellulaires de son algue verte endophyte *A. operculata* induit la génération d'un burst oxydatif suivi par l'émission de VOHC potentiellement toxiques pour l'endophyte (Bouarab, 2000).

III. Les voies précoces de défense

Les formes actives de l'oxygène utilisées par l'organisme pour tuer des micro-organismes envahissants, peuvent au même moment endommager les cellules environnantes de l'hôte. La cellule doit savoir se prémunir des effets néfastes d'une telle production.

III.1 Mécanisme de prévention

Les systèmes anti-oxydants de la cellule comprennent (Figure 10) des molécules susceptibles de piéger les métaux réducteurs catalyseurs de la production de FAO, des antioxydants de faible poids moléculaires, et enfin des enzymes capturant les FAO ou ayant un rôle dans la détoxification des produits issus de la peroxydation des lipides (Blokhina *et coll.*, 2003).

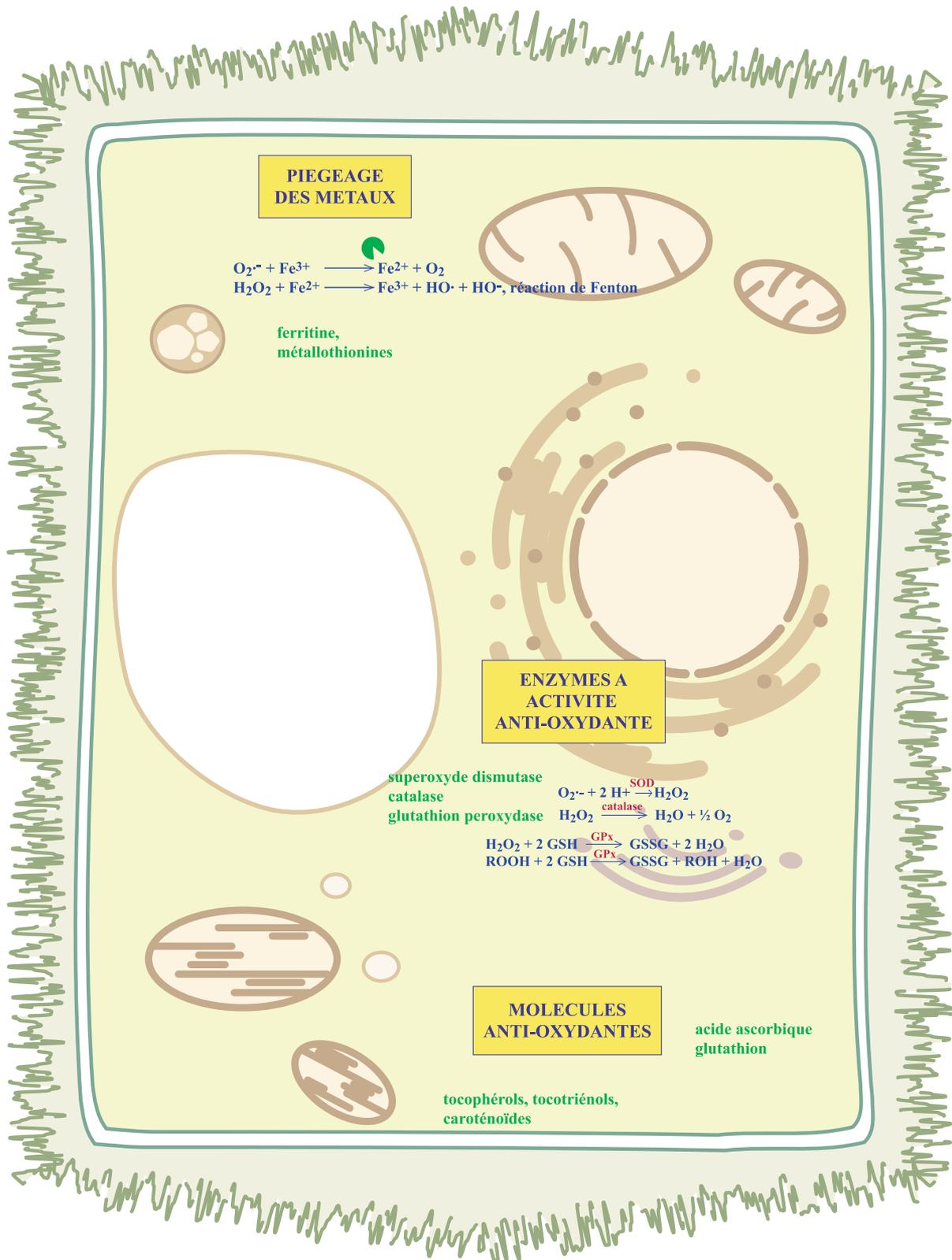


Figure 10 : Systèmes anti-oxydants mis en place au niveau de la cellule végétale pour prévenir la production de formes actives de l'oxygène et de radicaux libres

III.1.1 Piégeage des métaux

Les métaux à l'état réduit sont susceptibles de faciliter la production de formes actives de l'oxygène, et en particulier du radical hydroxyle très réactif (réaction de Fenton et d'Haber-Weiss). **Les molécules réduisant la disponibilité en métaux préviennent ainsi la surproduction de radicaux libres de l'oxygène.** Cette ligne de défense comprend des protéines chélatrice et/ou de stockage des métaux : métallothionines, ferritine, siderophores (cas des graminées). La ferritine est une protéine capable de stocker jusqu'à 4500 atomes de fer, et est généralement utilisée par la plante pour augmenter la teneur cellulaire en fer dans le cas de carences nutritionnelles (Grotz et Guerinot, 2002). Ainsi l'oxydation du cuivre de leur état cuivreux Cu^+ et ferreux Fe^{2+} , vers leur état cuivrique Cu^{2+} et ferrique Fe^{3+} , diminue leur toxicité.

III.1.2 Molécules anti-oxydantes

Un certain nombre de substances anti-oxydantes s'opposent à la propagation des réactions radicalaires, très souvent en formant à partir d'un radical très réactif, un autre radical beaucoup moins réactif. Les anti-oxydants liposolubles sont présents surtout au niveau des membranes : vitamine E (tocotriénols), vitamine A (caroténoïdes), quinones. Les anti-oxydants hydrosolubles sont l'acide ascorbique, le glutathion.

Les tocophérols et tocotriénols sont des composés regroupés sous le terme de vitamine E. Ils sont capables de réparer directement des radicaux oxydés, prévenant ainsi la propagation de réactions en chaîne durant l'auto-oxydation des lipides. Les tocophérols et tocotriénols sont des constituants essentiels des membranes ; ils sont synthétisés uniquement par les organismes photosynthétiques (Blokhina *et coll.*, 2003).

L'acide ascorbique est un anti-oxydant très puissant, mais il possède également un rôle pro-oxydant. Il est oxydé en monodehydroascorbate (MDA) et déhydroascorbate (DHA). Il retourne sous forme d'ascorbate à travers le cycle ascorbate-glutathion (Blokhina *et coll.*, 2003 ; Apel et Hirt, 2004).

Le glutathion est un tripeptide abondant dans tous les tissus et présent au niveau de tous les compartiments cellulaires (cytosol, réticulum endoplasmique, vacuole, mitochondrie). Le glutathion est la forme majeure de stockage du sulfure dans la cellule. Le glutathion réduit GSH est oxydé par les FAO pour former le glutathion oxydé GSSG.

En plus de pouvoir interagir directement avec certains radicaux libres, il est nécessaire à l'activité de la glutathion peroxydase et de la glutathion S-transférase qui catalyse la conjugaison de composés électrophiles potentiellement toxiques pour la cellule (Blokhina *et coll.*, 2003 ; Apel et Hirt, 2004).

III.1.3 Réactions enzymatiques

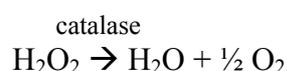
Les enzymes à activité anti-oxydante permettent une réduction directe de la concentration en ions superoxyde et en peroxyde d'hydrogène. Il s'agit d'enzymes telles que les superoxyde dismutases, les catalases, les glutathion peroxydases et les ascorbate peroxydases.

Les superoxyde dismutases (SOD) constituent la première ligne de défense contre les FAO en catalysant la transformation des ions superoxyde en peroxyde d'hydrogène. Elles accélèrent jusqu'à 10^{10} fois la réaction spontanée de dismutation (Lamb et Dixon, 1997).



Elles sont présentes dans tous les compartiments cellulaires. Contrairement à la plupart des organismes, les plantes ont de multiples gènes codant des superoxyde dismutases et ascorbate peroxydases. Différentes isoformes sont spécifiquement dédiées aux chloroplastes, mitochondries, peroxysomes (Apel et Hirt, 2004). Les trois types d'enzymes sont classifiées suivant leur cofacteur métallique : les deux premières, FeSOD chez les chloroplastes et MnSOD chez les mitochondries, possèdent une structure similaire, la troisième, Cu/Zn-SOD est retrouvée dans le cytosol et le chloroplaste. La superoxyde dismutase est inductible : sa biosynthèse est augmentée par l'hyperoxygénation et par certains toxiques, tel que le pesticide paraquat.

La catalase est présente dans le cytosol et dans les peroxysomes. Elle fonctionne par formation d'un complexe intermédiaire catalase- H_2O_2 . Son activité aboutit à la destruction du peroxyde d'hydrogène.



Cependant en présence d'un substrat approprié elle peut néanmoins agir en tant que peroxydase et produire des radicaux hydroxyles (Blokhina *et coll.*, 2003).

La glutathion peroxydase (GPx) est présente dans le cytosol et la mitochondrie. Elle détruit le peroxyde d'hydrogène et les hydroperoxydes en utilisant le glutathion comme substrat.



Le maintien de l'activité de la glutathion peroxydase nécessite la régénération du glutathion réduit GSH, assurée par la glutathion réductase à partir du NADPH. Certaines glutathion S-transférases possèdent également une activité glutathion peroxydase, et ne transforment que les hydroperoxydes organiques.

La superoxyde dismutase a un effet protecteur contre les réactions radicalaires dans la mesure où la catalase et la glutathion peroxydase sont suffisantes pour détruire le peroxyde d'hydrogène libéré. Dans le cas contraire, surtout en présence de métaux, cela conduit à la formation des radicaux hydroxyles extrêmement toxiques.

III.1.3.1 La glutathion peroxydase

La glutathion peroxydase assure la dégradation du peroxyde d'hydrogène ainsi que celle des hydroperoxydes organiques formés par oxydation des acides gras en alcools. C'est une peroxydase GSH-dépendante et enzyme à sélénium. Le glutathion réduit est oxydé au cours de la réaction, puis régénéré grâce à l'intervention de la glutathion réductase.



Le rôle de la glutathion peroxydase est très important dans la plupart des tissus **où elle réalise la quasi totalité de l'élimination du peroxyde d'hydrogène**. Chez les mammifères elle participe pour 70 % à la réduction des peroxydes organiques et à plus de 94 % du peroxyde d'hydrogène au niveau du foie. Plusieurs études suggèrent que la baisse des teneurs cellulaires en glutathion peroxydase et superoxyde dismutase seraient impliquées dans les processus de vieillissement et de ses maladies associées.

Actuellement toutes les glutathion peroxydases connues sont des enzymes à sélénium. Ces enzymes ont le plus souvent une structure homotétramérique, chaque monomère possédant un atome de sélénium dans son site actif, très fortement lié à la chaîne peptidique puisque incorporé sous forme de sélénocystéine dans la séquence primaire : le soufre de la cystéine (groupement thiol SH) est remplacé par le sélénium (groupement séléniol SeH) selon un processus complexe où un codon habituellement non-sens va permettre l'incorporation de cet acide aminé à un endroit strictement déterminé.

Il existe quatre isoformes de glutathion peroxydases rencontrées chez les eucaryotes : la GPx1 est retrouvée au niveau du cytoplasme et de la mitochondrie, la GPx2 est une forme cytosolique, la GPx3 est extracellulaire, la GPx4 (ou HPGPx pour *hydroperoxide glutathione peroxidase*) est en contact étroit avec les membranes intercellulaires. Cette dernière catalyse la régénération des hydroperoxydes de phospholipides présents dans les membranes et serait monomérique (Brigelius-Flohe *et coll.*, 1994).

III.1.3.2 La peroxiredoxine : glutathion peroxydase sélénium-indépendante

Les peroxiredoxines sont des protéines ayant une activité de type glutathion peroxydase mais avec la particularité de ne pas utiliser de métaux au niveau de leur site actif (ni hème, ni sélénium). La cystéine du site actif de la peroxiredoxine et la sélénocystéine du site actif de la glutathion peroxydase sont structurellement équivalentes. De même que les glutathion peroxydases, les peroxiredoxines sont capables de réduire le peroxyde d'hydrogène et les hydroperoxydes organiques (ROOH) respectivement en eau et en l'alcool correspondant (ROH). Même si leurs séquences primaires sont assez différentes, peroxiredoxines et glutathion peroxydases à sélénium ont une structure tertiaire extrêmement similaire. Les peroxiredoxines ont été identifiées dans tous les organismes et constituent un groupe phylogénétique ancien avec une fonction dans la détoxification des peroxydes cellulaires toxiques. Cette famille comprend six membres chez les mammifères et neuf chez *Arabidopsis thaliana* (Knoops *et coll.*, 1999 ; Dietz *et coll.*, 2002).

Toutes les peroxiredoxines sont caractérisées par un ou deux résidus cystéine, situés dans des zones structurales conservées de la protéine et sont indispensables à la

réaction catalytique. **Les peroxiredoxines sont directement substrat de la réaction d'oxydo-réduction** : la cystéine du site actif est oxydée, soit en disulfure soit en acide sulfénique (-SOH), par le peroxyde qui est alors détruit. L'enzyme oxydée a alors besoin d'être régénérée sous sa forme réduite active, en général par la thiorédoxine. La thiorédoxine étant elle-même réduite par la thiorédoxine réductase. La réaction globale aboutit à la réduction des peroxydes au détriment du NADPH (Figure 11). Pour être fonctionnel, le système peroxiredoxine a donc besoin à la fois de la peroxiredoxine, de la thiorédoxine et de la thiorédoxine réductase. Les peroxiredoxines, du fait de leur système de régénération, sont également appelées des peroxydases thiorédoxine-dépendantes.

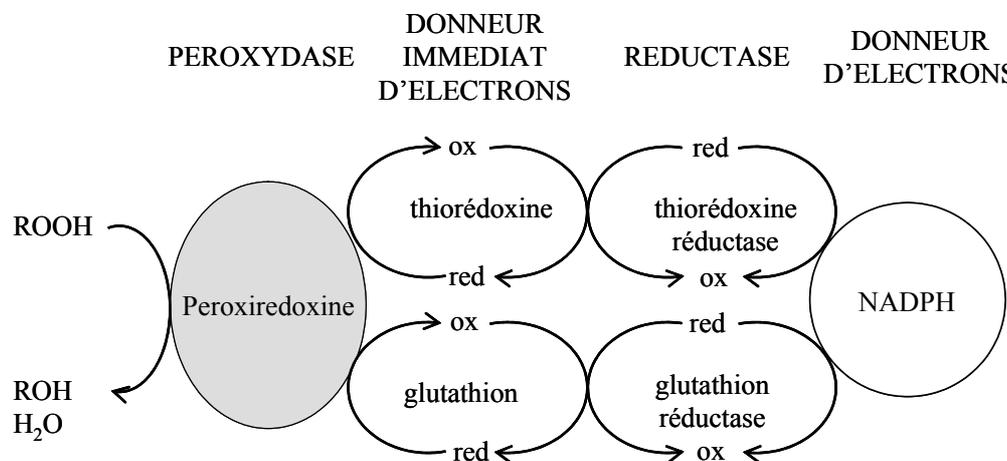


Figure 11 : Schéma de la réaction de type glutathion-peroxydase de la peroxiredoxine, en coordination avec les systèmes thiorédoxine/thiorédoxine réductase et glutathion/glutathion réductase (d'après **Fujii et Ikeda, 2002**)

L'enzyme peut réduire en présence de glutathion le peroxyde d'hydrogène, de courtes chaînes organiques, des acides gras et des hydroperoxydes de phospholipides. Certaines formes de peroxiredoxines sont des enzymes bifonctionnelles avec deux sites actifs distincts et possèdent ainsi une activité de type phospholipase A2 Ca²⁺-indépendante, en plus de leur activité glutathion peroxydase. Cette propriété catalytique bifonctionnelle est compatible avec un rôle simultané de la protéine dans la régulation du turn-over des phospholipides et dans la protection contre les dommages oxydatifs (**Chen et coll., 2000**).

III.2 La voie des phénylpropanoïdes chez les plantes supérieures

L'**acide salicylique** est un composé phénolique naturel, dont l'aspirine est le dérivé acétylé. Chez les plantes supérieures, les taux d'acide salicylique et de ses conjugués augmentent de façon significative lors d'épisodes infectieux, s'accumulant rapidement au site d'infection avant de se répandre dans les autres parties de la plante. **On lui attribue un rôle important dans la transduction du signal aboutissant à la mise en place des résistances locales et systémiques** (Gozzo, 2003 ; Yang *et coll.*, 2004). La **résistance systémique acquise (RSA)** confère à la plante la capacité de réagir et de résister plus facilement à des infections ultérieures, qu'elles aient lieu au niveau du premier site d'infection ou ailleurs dans la plante. Une fois établie la RSA peut durer assez longtemps, de quelques semaines à quelques mois (Yang *et coll.*, 2004). Des études récentes attribueraient un rôle majeur à un dérivé lipidique dans la mise en place de la RSA, dont la structure exacte et l'implication réelle dans la RSA restent à déterminer (Durrant et Dong, 2004).

La mise en place de cette résistance est caractérisée par l'augmentation de l'expression de nombreux gènes-PR (*pathogenesis-related*), la majorité des **protéines-PR** ayant des propriétés anti-microbiennes. Par ailleurs l'acide salicylique aurait la capacité d'activer l'expression des gènes régulant sa propre biosynthèse, ainsi que de gènes impliqués dans la biosynthèse de certaines classes de métabolites secondaires tels que les alcaloïdes (Zhao *et coll.*, 2005). Il peut également se fixer à différentes protéines et modifier leur activité, mais également influencer d'autres mécanismes de défense telle que la voie de signalisation de l'acide jasmonique.

La biosynthèse de l'acide salicylique, longtemps attribuée de façon quasi-exclusive à la voie des phénylpropanoïdes impliquant la phénylalanine ammonia-lyase, serait en réalité régulée plus finement. **La voie des phénylpropanoïdes**, conduisant par ailleurs à la biosynthèse de **phytoalexines**, de flavonoïdes, de pigments, de lignine et de composés phénoliques, serait stimulée dès le début de l'infection pour une production rapide de l'acide salicylique. Par la suite le maintien de cette production serait assuré par une voie de synthèse similaire à celle rencontrée chez certaines bactéries, avec à partir du **chorismate et via l'isochorismate**, synthèse de l'acide salicylique (Shah, 2003). Les deux voies de biosynthèse utilisent comme substrat précurseur le shikimate et font intervenir la shikimate déshydrogénase (Figure 12).

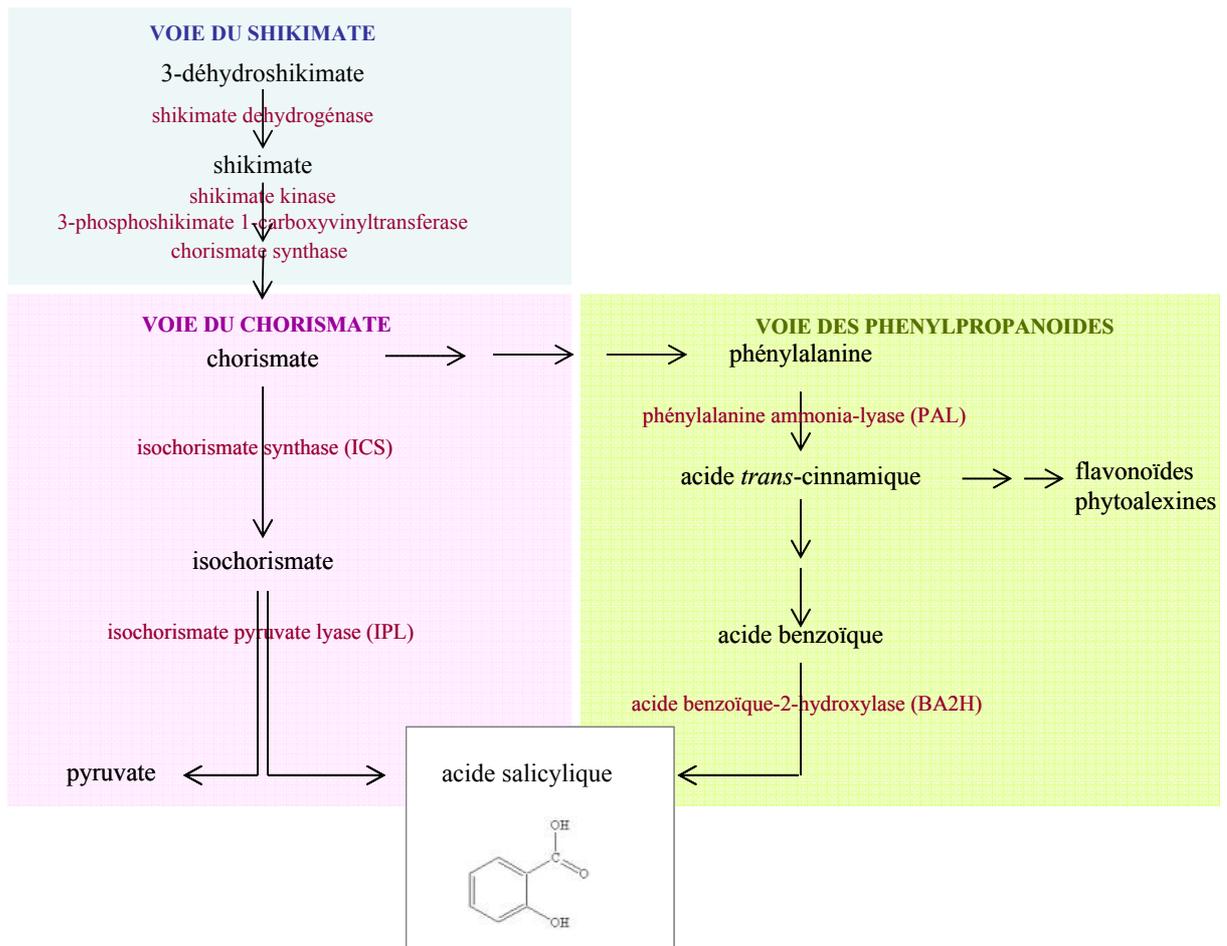


Figure 12 : Voies de biosynthèse de l'acide salicylique chez les plantes supérieures

III.3 Les voies des oxylipines : jasmonates et prostaglandines

III.3.1 Définition

Les oxylipines sont des composés biologiquement actifs libérés durant le métabolisme des acides gras polyinsaturés, par oxydation d'un, deux ou quatre atomes d'oxygène. Elles sont synthétisées *de novo* en réponse à des stress biotiques ou abiotiques, par l'action coordonnée de lipases, lipoxygénases et certains cytochromes P450. **Chez les mammifères, les oxylipines sont majoritairement formées par la voie des acides gras en C20 (éicosanoïdes)**, faisant intervenir l'acide arachidonique (C20:4). Elles jouent un rôle majeur dans les processus inflammatoires, et d'une façon générale dans les réponses aux infections, suite à des allergies, exposition aux médicaments et xénobiotiques. Les prostaglandines, thromboxanes et leucotriènes font partie des oxylipines les plus étudiées chez les mammifères. **Chez les plantes supérieures le métabolisme des oxylipines fait intervenir des acides gras en C18 (octadécanoïdes)** : les acides linoléique (C18:2), linoléique (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 en agissant en tant que molécules signal et/ou composés protecteurs ayant une activité anti-microbienne ou cicatrisante. Parmi les composés les plus étudiés, l'acide jasmonique et son méthyle ester, le méthyle jasmonate, ont focalisé les attentions. La famille des jasmonates, regroupant les précurseurs et dérivés de l'acide jasmonique, en plus d'avoir un rôle majeur dans les réponses de défense chez la plante, interviennent également au cours de son développement, et notamment lors de la formation des organes reproducteurs.

III.3.2 Biosynthèse des oxylipines chez les mammifères

Chez les animaux, l'acide arachidonique (C20:4) est synthétisé à partir des acides linoléique (C18:2) et linoléique (C18:3) issu du régime alimentaire, ou à partir des acides stéarique (C18:0) et oléique (C18:1). **Il est le précurseur de la synthèse des oxylipines, suivant trois voies enzymatiques principales faisant intervenir des cytochromes P450, des lipoxygénases, et des cyclooxygénases.** Les isoprostanes sont, quant à eux, synthétisés de façon spontanée à partir de l'acide arachidonique, et sont des isomères de prostaglandines (Figure 13A).

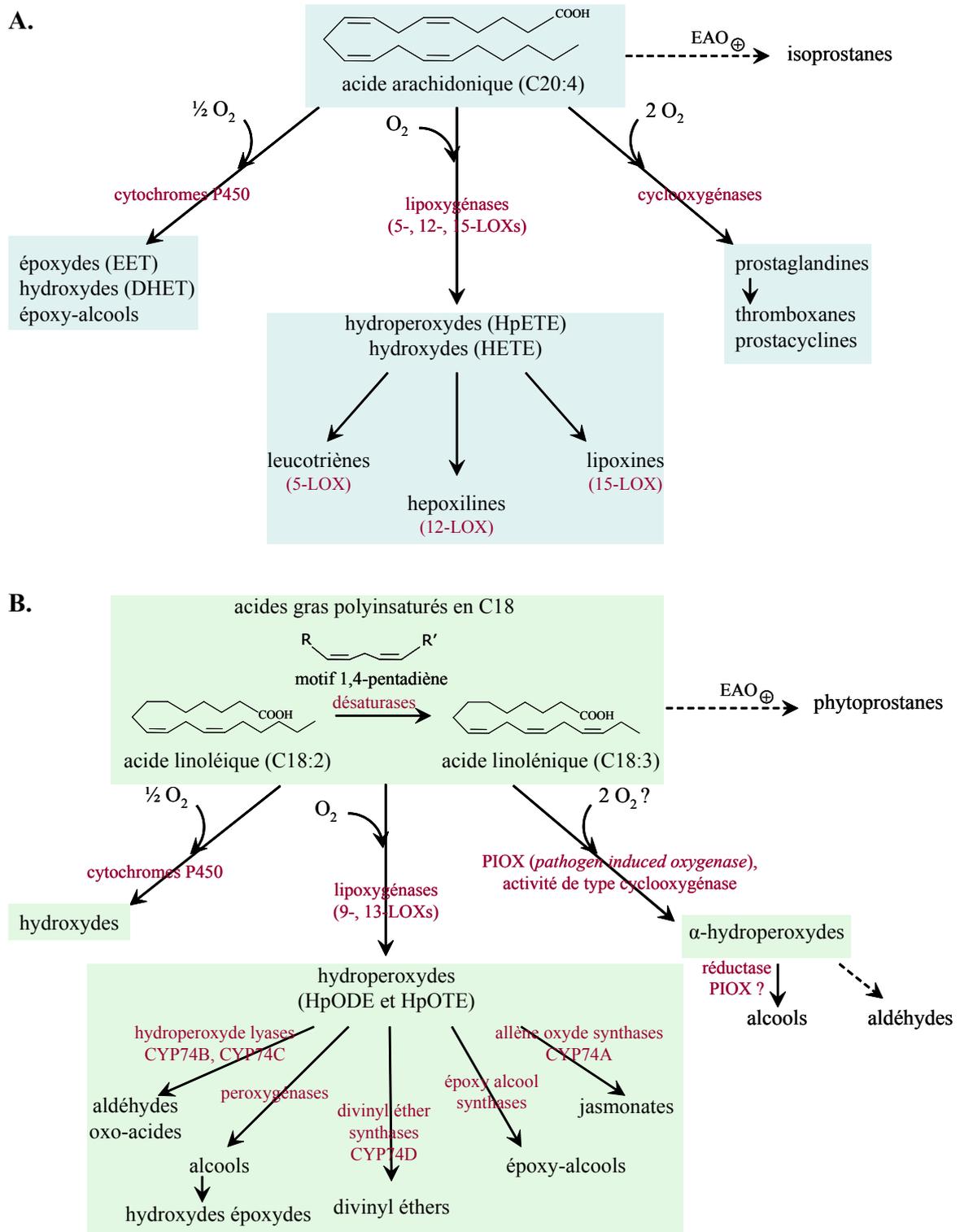


Figure 13 : Biosynthèse des oxylipines chez les animaux et plantes supérieures

Cette biosynthèse met en jeu le métabolisme d'acides gras polyinsaturés, par oxydation d'un (cytochromes P450), deux (lipoxygénases) ou quatre (cyclooxygénases et homologues) atomes d'oxygène (d'après [Blee, 2002](#)).

- A. Chez les animaux, l'acide arachidonique est le substrat préférentiel à la biosynthèse d'oxylipines. L'acide linoléique peut également être substrat de certaines lipoxygénases.
- B. Chez les plantes supérieures, les acides linoléique et linoléinique sont utilisés préférentiellement ; l'acide palmitoléique (C16:3) peut également être métabolisé par l'allène oxyde synthase.

Les cytochromes P450 jouent un rôle mineur dans la formation des oxylipines chez les animaux. Ils conduisent à la formation d'époxydes et d'acides époxy-éicosatriénoïques (EETs) qui sont ensuite hydrolysés en acides dihydro-éicosatriénoïques (DHETs).

La voie des lipoxygénases est à l'origine de la synthèse des acides hydroperoxy-éicosatétraénoïques (HpETEs), des acides hydroxy-éicosatétraénoïques (HETEs) et des leucotriènes. Elles catalysent l'insertion d'une molécule d'oxygène O₂ au niveau de l'acide arachidonique, préférentiellement en positions 5, 12 et 15. Ainsi la fixation d'une molécule d'oxygène sur le carbone 12 de l'acide arachidonique donne l'acide 12-hydroperoxy-5,8,11,14-éicosatétraénoïque (12-HpETE), rapidement réduit en acide 12-hydroxy-éicosatétraénoïque (12-HETE) par une glutathion peroxydase cytosolique (Bacot, 2004). Les hépoixilines sont également issus d'une activité 12-lipoxygénase. Les leucotriènes et les lipoxines dérivent quant à eux respectivement des activités 5-lipoxygénase et 15-lipoxygénase.

La voie des cyclooxygénases conduit à la formation des prostaglandines avec formation d'un cycle pentanique. Les thromboxanes et les prostacyclines sont synthétisés par la suite à partir des prostaglandines. Selon les molécules mises en jeu ces oxylipines peuvent avoir des effets anti-inflammatoires ou pro-inflammatoires chez les animaux.

III.3.3 Biosynthèse des oxylipines chez les plantes supérieures

Les oxylipines chez les plantes supérieures sont synthétisées suivant trois voies enzymatiques majeures, faisant également intervenir d'autres types de cytochromes P450 et de lipoxygénases, ainsi que des oxygénases spécifiques. Une dernière voie de biosynthèse non-enzymatique conduit à la production de phytoprostanes qui évoque les isoprostanes synthétisés de façon analogue chez les mammifères à partir de l'acide arachidonique (Figure 13B).

L'oxydation des acides gras polyinsaturés par un oxygène est due à l'action de **cytochromes P450** qui catalysent, à l'intérieur ou à l'extrémité de la chaîne carbonée, l'hydroxylation d'acides gras saturés ou insaturés de C10 à C18 (Blee, 2002 ; La Camera *et coll.*, 2004).

Les lipoxygénases (LOX) catalysent l'insertion d'une molécule d'oxygène O₂ dans les acides gras contenant un motif 1,4-pentadiène, tels que les acides linoléique et linoléique. La position 9 ou 13 de ces acides gras est oxydée. Les produits obtenus sont à nouveau transformés en une série d'autres oxylipines par diverses enzymes dont des lipoxygénases et une famille particulière de cytochromes P450 (CYP74). Selon l'activité enzymatique de départ on parlera de voies de biosynthèse de la 9-LOX et 13-LOX. La voie de biosynthèse de la 13-lipoxygénase permet notamment la production des acides 13-hydroperoxy-octadecadiénoïque (13-HpODE) et 13-hydroperoxy-octadecatriénoïque (13-HpOTE) à partir respectivement des acides linoléique et linoléique. Contrairement aux autres cytochromes P450, les CYP74 ne nécessitent pas de NADPH réductase et d'oxygène moléculaire pour la catalyse. Parmi ces enzymes, l'allène oxyde synthase (AOS, CYP74A) joue un rôle important dans la biosynthèse de l'acide jasmonique. Les différentes étapes de cette synthèse ont d'abord lieu dans le chloroplaste puis dans les peroxysomes. La voie de biosynthèse de l'acide jasmonique est généralement appréhendée comme une voie signalitique impliquée dans la biosynthèse de nombreux composés secondaires chez la plante. L'acide jasmonique et ses métabolites sont des régulateurs des réponses de défenses et activateurs de l'expression de gènes. Ils sont également impliqués dans des processus du développement (germination, croissance racinaire, fertilité).

L'hydroxylation du carbone α des groupements carboxyliques est catalysée par des oxygénases nommée **PIOX** (*pathogen-induced oxygenase*) qui possèdent une activité similaire aux cyclooxygénases de mammifères. Les α -hydroperoxydes d'acides gras libérés sont rapidement réduits en leurs alcools correspondants. Cette réaction est catalysée par une réductase et entre en compétition avec la décarboxylation spontanée de ces hydroperoxydes en aldéhydes.

IV. Détoxification active de composés xénobiotiques

Nous avons vu au cours de ce chapitre que la plante était capable de mettre en œuvre toute une série de réactions précoces de défense pour lutter contre l'invasion d'un agent infectieux : production de formes actives de l'oxygène par la NADPH oxydase et peroxydases, simultanément limitation des effets toxiques de ces composants chez la cellule hôte et induction de réponses de défense telles que la voie des phénylpropanoïdes (acide salicylique, phytoalexines, protéines-PR) et celle de biosynthèse des oxylipines (acide jasmonique). L'organisme pathogène peut également synthétiser des toxines que la plante va devoir éliminer, au même titre que d'autres produits de nature abiotique présents dans son environnement et potentiellement toxiques (pesticides, métaux lourds, hydrocarbures aromatiques polycycliques).

Lorsque la cellule détecte la présence d'un corps étranger (xénobiotique), biologique ou chimique, elle met en place des processus de détoxification. **La détoxification active va permettre à la fois de convertir les molécules toxiques en métabolites biologiquement moins actifs (biotransformation) pour favoriser leur élimination**, mais également de limiter l'extension des réactions radicalaires générées suite au stress oxydatif. Ce processus de détoxification se décompose en trois phases ([Figure 14](#)).

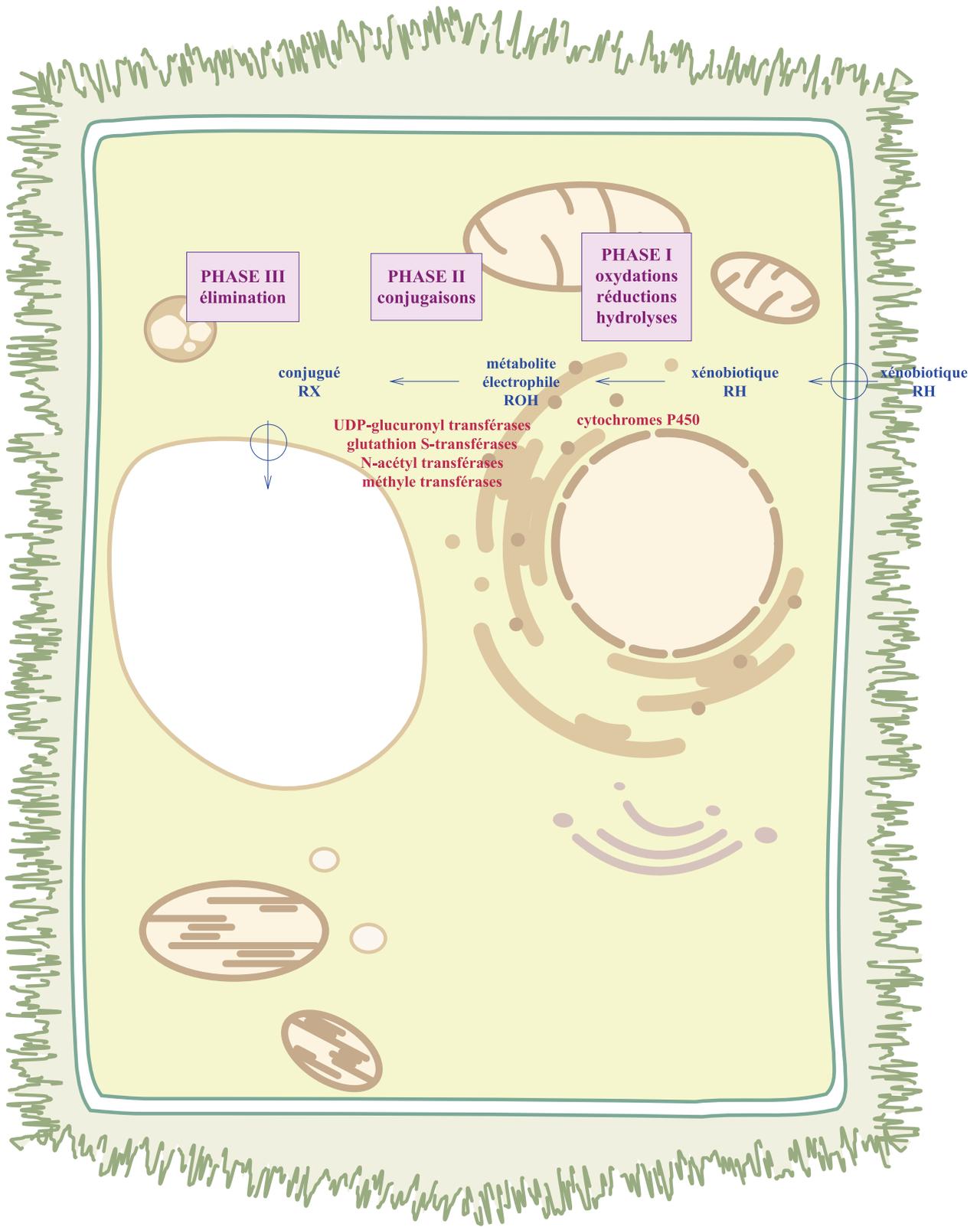


Figure 14 : Biotransformation de composés xénobiotiques au niveau de la cellule végétale

IV.1 Le métabolisme de phase I

IV.1.1 Réactions mises en jeu

Les réactions de phase I permettent l'inactivation des substrats et comprennent majoritairement des réactions d'oxydation, mais également des réactions de réduction, et d'hydrolyse (Tableau 1).

IV.1.1.1 Les réactions d'oxydation

La biotransformation de nombreux produits chimiques implique des processus oxydatifs. **Un très grand nombre de réactions d'oxydation sont catalysées par des cytochromes P450.** D'autres oxydations de toxiques sont catalysées par des oxydoréductases non microsomales localisées dans les mitochondries ou le cytosol (monoamine oxydase, aldéhyde déshydrogénase).

L'oxydation peut correspondre à plusieurs types de réactions (oxydation aliphatique, oxydation aromatique, époxydation, désamination oxydative, S-désalkylation, oxydation d'amines, déshydrogénation d'aldéhydes) et il y a le plus souvent formation de plusieurs métabolites.

IV.1.1.2 Réactions de réduction et d'hydrolyse

Les toxiques peuvent être réduits par des réductases (réduction des dérivés nitrés, réaction réverse de l'alcool déshydrogénase). De nombreux toxiques contiennent par ailleurs des liaisons sensibles à l'hydrolyse : ce sont essentiellement des esters, des amides et des composés phosphorés. Ces hydrolyses sont généralement catalysées par des estérases non-spécifiques et des amidases.

Réactions	Enzymes	Localisation	Substrats
<i>Réactions de phase I</i>			
Oxydations	alcool déshydrogénases	cytosol	alcools
	aldéhydes déshydrogénases	cytosol	aldéhydes
	monoamine oxydases	mitochondries	amines
	flavine monooxygénases	microsomes	amines tertiaires
	cytochromes P450	microsomes	
Réductions	cytochromes P450	microsomes	
	carbonyl réductases		aldéhydes, cétones
	alcool déshydrogénases	cytosol	aldéhydes, cétones
Hydrolyses	estérases	cytosol	esters
		microsomes, mitochondries	
<i>Réactions de phase II</i>			
Conjugaisons	UDP-glucuronyl transférases	microsomes	phénols, thiols, amines, acides carboxyliques
	glutathion S-transférases	cytosol, microsomes	électrophiles
	sulfotransférases	cytosol	phénols, thiols, amines
	méthyle transférases	cytosol, microsomes	phénols, amines
	N-acétyl transférases	cytosol	amines
	aminoacyl transférases	microsomes	acides carboxyliques

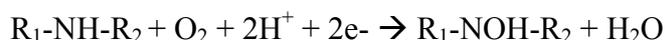
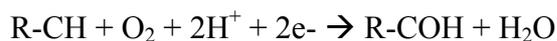
Tableau 1 : Principales réactions de biotransformations de phase I et II

IV.1.2 Les cytochromes P450

IV.1.2.1 Fonction biologique

L'oxydation des substrats est quantitativement la plus importante réaction de phase I et elle est principalement catalysée par la famille des cytochromes P450. Les cytochromes représentent le système enzymatique oxydatif le plus puissant *in vivo*. Les différentes familles de cytochromes P450 peuvent être subdivisées en deux grands groupes, soit celles qui interviennent dans la synthèse des substances endogènes (cas des stéroïdes, leucotriènes ou prostaglandines chez les mammifères), et celles qui interviennent dans le métabolisme des xénobiotiques.

Dans ces réactions d'oxydations un atome d'oxygène moléculaire est réduit en une molécule d'eau et l'autre est incorporé dans le substrat.



IV.1.2.2 Localisation cellulaire et structure du complexe

Les enzymes à cytochrome P450 sont généralement localisées dans le réticulum endoplasmique lisse (animaux et végétaux). Il semble que ces enzymes aient une structure globulaire et qu'elles soient fortement ancrées dans la couche bilipidique du réticulum. Cette configuration leur permet d'avoir accès autant aux substrats lipophiles qu'aux composés hydrophiles. Certains cytochromes P450 sont également localisés dans les membranes internes des mitochondries (mammifères, insectes) ou dans l'enveloppe nucléaire (animaux) et seraient impliqués uniquement dans la synthèse des stéroïdes. Chez les bactéries, on rencontre également des formes solubles de cytochromes P450.

Les cytochromes P450 sont associés à des chaînes de transfert d'électrons, distinctes suivant leurs localisations cellulaires mais qui utilisent toutes les deux le NADPH comme source d'électrons. La NADPH cytochrome P450 réductase est rencontrée dans le réticulum endoplasmique, elle possède deux domaines contenant chacun une

flavine (FAD et FMN). Le cytochrome b5 peut également jouer le rôle de donneur d'électrons. Pour les cytochromes P450 mitochondriaux, la chaîne de transport d'électrons comporte, outre une réductase à flavine, une protéine fer-soufre qui joue le rôle du donneur d'électrons.

IV.1.2.3 Nomenclature

La nomenclature actuelle des cytochromes P450 dépend strictement de la séquence en acides aminés. **Deux séquences possédant plus de 55 % d'identité appartiennent à la même famille, tandis que moins de 40 % d'identité les placent dans des familles différentes.** La famille est représentée par un chiffre, puis la lettre correspond à la sous-famille, et enfin le dernier chiffre indique la protéine spécifique : ainsi la CYP3A4 correspond à l'isoenzyme 4 de la sous-famille A de la famille 3. Ce n'est donc pas une classification fonctionnelle ; cela va de pair avec leur faible spécificité de substrats, même si elles sont en revanche souvent très spécifiques en ce qui concerne la réaction catalysée.

L'ensemble de ces réactions de phase I produit des composés hydrosolubles qui peuvent être directement excrétables. Cependant, certains métabolites issus de ces réactions sont des intermédiaires très réactifs (radicaux libres, peroxydes, carbocations, radicaux hydroxyles) qui peuvent créer des dommages à la cellule. Ils sont donc pris en charge par des enzymes du métabolisme de phase II.

IV.2 Le métabolisme de phase II : conjugaisons

IV.2.1 Réactions et enzymes mises en jeu

Lors de la phase II les molécules toxiques ou les métabolites intermédiaires de la phase I subissent une conjugaison. L'association de ces toxiques ou métabolites avec un transporteur polaire endogène permet la génération de conjugués généralement plus hydrosolubles et donc plus facilement excrétables. Ces réactions sont réalisées sur des molécules possédant des fonctions alcools ou acides (Tableau 1).

On distingue plusieurs types de réactions suivant le type de molécule polaire à laquelle est associé le métabolite à désactiver : glutathion, acétate, cystéine, sulfate, glycine, glucuronates (Tableau 2).

La glucuroconjugaison, catalysée par des UDP-glucuronyltransférases, est la forme de conjugaison la plus courante et la plus importante. L'enzyme, localisée dans le réticulum endoplasmique, utilise l'acide UDP- β -glucuronique comme substrat de conjugaison. Quatre 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 des glutathion S-transférases ; elles 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 de groupements acétyles sur des amines aromatiques primaires, des hydrazines, des hydrazides, des sulfonamides et certaines amines aliphatiques primaires. La réaction est catalysée par des N-acétyltransférases en présence d'acétylCoA. Il peut également y avoir conjugaison avec des acides aminés déjà conjugués et l'acétylCoA, généralement avec des conjugués de la glycine ou de la glutamine.

Les réactions de méthylations sont catalysées par des méthyltransférases, le substrat de conjugaison étant la S-adénosylméthionine. La méthylation n'est pas la voie majoritaire de biotransformation des toxiques, en raison à la fois de la plus grande

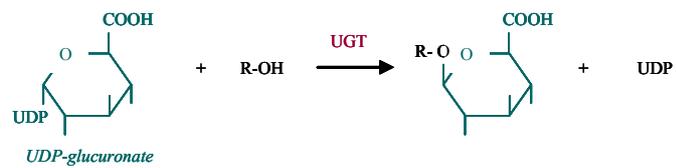
disponibilité en acide UDP- β -glucuronique pour former des glucuronides et également du fait que les produits méthylés ne sont pas nécessairement plus hydrosolubles.

Enfin la **sulfoconjugaison** est catalysée par des sulfotransférases en présence de 3-phosphoadénosine-5'-phosphosulfates (PAPS). Les groupements fonctionnels nécessaires pour la formation des sulfates sont les phénols, les alcools aliphatiques et les amines aromatiques.

principales réactions de conjugaison

exemple de réaction

- **glucurunoconjugaison**
enzyme : UDP-glucuronyltransférase
substrat de conjugaison :
UDP-glucuronate



- **mercaptoconjugaison**
enzyme : glutathion S-transférase
substrat de conjugaison :
glutathion



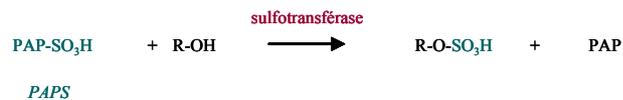
- **acétylation**
enzyme : N-acétyltransférase
substrat de conjugaison :
acétyl-CoA



- **méthylation**
enzymes : O-, N-, S-méthylases
substrat de conjugaison :
S-adénosylméthionine (SAM)



- **sulfoconjugaison**
enzyme : sulfotransférase
substrat de conjugaison :
3-phosphoadénosine-5'-phosphosulfate (PAPS)



- **conjugaison aux acides aminés**
enzyme : amino acid transférase
substrat de conjugaison :
glycine, glutamine

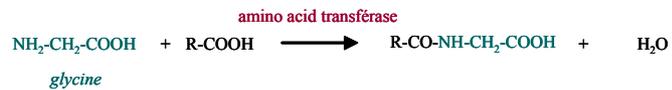


Tableau 2 : Principales réactions de conjugaison du métabolisme de phase II

IV.2.2 Les glutathion S-transférases

IV.2.2.1 Nature et fonctions biologiques

Les glutathion S-transférases constituent un groupe comprenant un très grand nombre d'isoenzymes. Elles peuvent être très abondantes dans les cellules suivant les localisations tissulaires (jusqu'à 20 % des protéines hépatiques du rat).

Ces enzymes possèdent de nombreuses fonctions, la plupart étant en relation directe avec les mécanismes de protection cellulaire. **Un de leur rôle majeur est la détoxification d'un très grand nombre de composés électrophiles** lors du métabolisme de phase II du processus de détoxification cellulaire. Ainsi elles catalysent l'addition du groupement thiol du glutathion (Figure 15) sur les groupements électrophiles hydrophobes à éliminer.

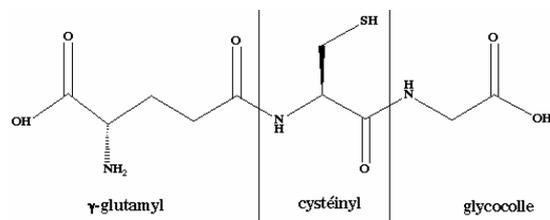


Figure 15 : Structure du glutathion (γ -glutamyl-cysteinyl-glycine)



Les conjugués du glutathion formés sont ensuite métabolisés par coupure du glutamate et du glycolle, libérant ainsi la cystéine liée à la molécule étrangère. Le groupement thiol de cette cystéine sera ensuite acétylé par la N-acétyltransférase pour former un acide mercapturique très soluble, qui sera excrété de la cellule avant d'être éliminé.

Les activités glutathion S-transférases sont impliquées dans la détoxification des radicaux libres, des époxydes, des halogénés, des aromatiques hétérocycliques, des dérivés nitrés, des hydroxylamines, etc.

Il a été démontré que ces enzymes, notamment chez les mammifères, sont impliquées dans le métabolisme de médicaments anticancéreux (cyclophosphamide, cisplatine, thiotépa) et de cancérigènes (aflatoxines, hydrocarbures aromatiques polycycliques, amines aromatiques). **Les GST d'insectes et de plantes sont également impliquées dans la**

détoxication de xénobiotiques et peuvent être responsables, respectivement, **de phénomènes de résistance** aux insecticides (DTT, organophosphorés) ou aux herbicides (triazines, thiocarbamates) et aux polluants organiques. Chez la bactérie, les GST sont à l'origine de résistances aux antibiotiques.

Quelques isoformes de GST possèdent également une activité peroxydase et jouent un rôle dans l'élimination d'hydroperoxydes d'acides gras générés lors d'un stress oxydant. En plus de leur rôle de détoxication **certaines GST interviennent dans le métabolisme de molécules endogènes**. Citons de manière non exhaustive le cas des **GST de la classe sigma** chez les mammifères. Ces enzymes sont décrites dans la littérature comme **possédant une activité prostaglandine synthase, catalysant la réaction d'isomérisation de la prostaglandine H2 (PGH2) en prostaglandine D2 (PGD2)** (Urade *et coll.*, 1987 ; Thomson *et coll.*, 1998). Ces composés ont des rôles majeurs dans le maintien de l'homéostasie chez l'organisme (douleur, fièvre, vasoconstriction et/ou vasodilatation). Les GST de la classe zêta possèdent des activités de type maleyloaceto-acetate, et de ce fait catalysent une des dernières étapes de la synthèse de la phénylalanine et de la tyrosine (Hayes *et coll.*, 2005). Certaines **GST des classes thêta, phi et tau possèdent une activité glutathion peroxydase** : elles utilisent le GSH pour réduire les hydroperoxydes organiques ou d'acides gras en l'alcool correspondant (Dixon *et coll.*, 2002). Certaines GST possèdent également des rôles non-enzymatiques, comme la capacité à se lier à des ligands non substrats, ou à inhiber l'activité de protéines kinases en formant des complexes avec elles.

IV.2.2.2 Classification

Les GST appartiennent à une grande famille d'enzymes exprimées de façon ubiquiste des procaryotes aux eucaryotes. Elles sont regroupées en différentes classes suivant leurs similitudes de séquences. **Les GST appartenant à une même classe partagent plus de 60 % d'identité de séquence alors que moins de 30 % d'identité les placent dans des familles différentes**. Ces enzymes, majoritairement présentes dans le cytosol, mais également dans les microsomes (famille des *membrane-associated proteins in eicosanoid and glutathione metabolism* MAPEG) et les mitochondries (GST kappa), sont actives sous la forme d'homodimères ou d'hétérodimères par association de sous-unités appartenant à une même classe.

La plupart des gènes codant des **GST de mammifères** ont été bien caractérisés ; ils sont classiquement répartis en huit classes (**alpha, mu, pi, thêta, zêta, sigma, oméga et kappa**). L'étude de GST de plantes, de bactéries, de champignons ou d'insectes, ont révélé l'existence de nouvelles classes et permis d'étendre les connaissances sur la diversité structurale et fonctionnelle de ces enzymes. Alors que certaines classes de GST sont communes aux **mammifères, insectes et plantes (thêta, zêta)**, d'autres ne sont retrouvées que chez les **plantes (tau, phi)**, les **bactéries (beta)** ou les **insectes (delta, epsilon)** (Tableau 3).

Classe	Symbole	Représentation majeure
Alpha	α	Mammifères
Mu	μ	Mammifères
Pi	π	Mammifères
Sigma	σ	Mammifères
Omega	ω	Mammifères
Kappa	κ	Mammifères
Rhô	ρ	Poissons
Tau	τ	Plantes terrestres
Phi	φ	Plantes terrestres
Lambda	λ	Plantes terrestres
Zêta	ζ	Mammifères et plantes terrestres
Thêta	θ	Mammifères et plantes terrestres
Delta	δ	Insectes
Epsilon	ε	Insectes
Beta	β	Bactéries
Gamma	γ	Champignons
Nu	ν	Nématodes

Tableau 3 : Les différentes classes de glutathion S-transférases et leur répartition majeure dans les différentes lignées du vivant

IV.2.2.3 Régulation de l'expression des gènes

Les GST, comme la plupart des enzymes de détoxification, ont la particularité d'être inductibles par de nombreux composés possédant des structures très diverses (médicaments, hydrocarbures aromatiques polycycliques, flavonoïdes, polyphénols, isothiocyanates). Chez les animaux ces phénomènes sont essentiellement transcriptionnels. Chez les plantes une induction des GST tau et phi a été décrite lors de stress biotiques ou abiotiques. **Certains gènes sont ainsi induits par l'auxine (Dixon *et coll.*, 2002), les métaux lourds (Moons, 2003), les pesticides (DeRidder *et coll.*, 2002), l'acide salicylique (Sappl *et coll.*, 2004), l'acide jasmonique (Wagner *et coll.*, 2002), l'acide abscissique. Certains gènes de GST seraient spécifiquement induits lors d'un stress oxydatif (Dixon *et coll.*, 2002).**

IV.3 Le métabolisme de phase III : élimination

Les conjugués générés lors du métabolisme de phase II sont généralement plus polaires et plus hydrosolubles que les métabolites de départ, et donc plus facilement excrétables. Les métabolites hydrosolubles issus de la phase I ou II sont ensuite soit stockés dans la vacuole ou éliminés de la cellule chez les plantes supérieures, tandis qu'ils sont excrétés par voie biliaire ou urinaire en fonction de leur taille chez les mammifères. **L'expulsion des produits de détoxification à l'extérieur de la cellule peut se faire par l'intermédiaire de transporteurs membranaires.**

Parmi ces transporteurs, **la famille multigénique des protéines ABC constitue l'une des plus importantes familles de protéines impliquées dans le transport de nombreux substrats à travers les membranes biologiques.** Ses membres peuvent être retrouvés chez les bactéries, les champignons, les plantes et les animaux (Sanchez-Fernandez *et coll.*, 2001 ; Martinoia *et coll.*, 2002). La plupart de ces protéines ABC sont des transporteurs actifs qui utilisent l'hydrolyse de l'ATP comme source d'énergie pour permettre la translocation des solutés à travers les membranes. Certaines protéines ABC sont des systèmes d'import, c'est à dire qu'elles assurent l'accumulation de substrat à l'intérieur de la cellule alors que d'autres servent pour l'export ou l'excrétion (Theodoulou, 2000). Les protéines ABC sont ainsi impliquées dans la résistance aux herbicides, aux pesticides, aux pathogènes et aux métaux lourds mais aussi dans la croissance et le développement de la plante (Martinoia *et coll.*, 2002).

En résumé.

Nous avons brièvement vu au début de ce chapitre que l'interaction hôte/pathogène chez les plantes n'a rien d'anodin et peut revêtir plusieurs formes qui vont déterminer la capacité ou non de la plante à se protéger.

L'exposé des données de la littérature nous montre tout d'abord que le processus de résistance à l'infection est complexe :

- (1) Il débute avec la reconnaissance du pathogène ou d'un de ces composant et la génération d'un burst oxydatif par la NADPH oxydase membranaire. Si la sous-unité catalytique est conservée chez les systèmes végétaux et animaux, les mécanismes de régulation sont différents.
- (2) Des peroxydases participent également à la production du burst oxydatif ou de composés toxiques. Leur nature est variable suivant les organismes mais leurs stratégies ont pu converger : c'est le cas des haloperoxydases animales (MPO) et des algues marines (vHPO).
- (3) L'émission des FAO par la plante est un processus finement régulé. Il permet à la fois de limiter la propagation du pathogène en induisant la mort des cellules des deux acteurs, tout en permettant l'induction de voies de défense dans les cellules saines. La plante possède par ailleurs un arsenal de systèmes anti-oxydants pour limiter les effets néfastes des FAO sur ses propres cellules.
- (4) Les réactions de défense induites par l'infection sont multiples et forment un réseau complexe ; cependant deux voies majeurs peuvent être discernées chez les plantes : la voie des phénylpropanoïdes et la voie des oxylipines. La 1^{ère} conduit à la synthèse de l'acide salicylique impliqué dans l'acquisition d'une résistance systémique acquise chez la plante, ainsi qu'à l'émission de divers composés anti-microbiens. La 2nde conduit à la synthèse de dérivés lipidiques variés dont l'acide jasmonique est le représentant majeur. La structure en cycle cyclopentanone rappelle les prostaglandines de mammifères.

Au-delà des agressions biotiques la plante doit aussi être capable de réagir à la présence de composés toxiques dans son milieu de vie. Un mécanisme ordonné de biotransformation permet d'inactiver ces composés. L'étape majeure de ce processus est la conjugaison du toxique à une molécule endogène qui va faciliter son élimination ultérieure.

A la différence des plantes supérieures, les processus de défense sont encore très mal connus chez les macroalgues. Des données préliminaires sur l'interaction hôte/pathogène de l'algue rouge *Chondrus crispus* avec son algue verte *Acrochaete operculata*, nous a permis d'élaborer les premières pistes sur le mécanisme de résistance à l'infection chez cette algue.

I. Modèle d'étude : *Chondrus crispus*

I.1 Position phylogénétique

Les **algues** sont des eucaryotes photosynthétiques non vascularisés ; contrairement à l'unicité que suppose ce terme, elles **appartiennent en réalité à des lignées phylogénétiques indépendantes**. Aussi une classification des algues 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, aurait donné naissance aux algues rouges (Rhodophyta) et à la lignée verte, comprenant les algues vertes (Chlorophyta) et les plantes terrestres (Streptophyta). Algues rouges et lignée verte sont donc deux groupes issus d'un même parent eucaryotique. Les algues brunes (Phaeophyta) sont elles issues d'une endosymbiose secondaire entre un protiste sans plaste et un ancêtre unicellulaire d'algue rouge ; les diatomées et oomycètes appartiennent également au groupe des hétérokontes (Boyen, 2001 ; Baldauf, 2003) (Figure 16).

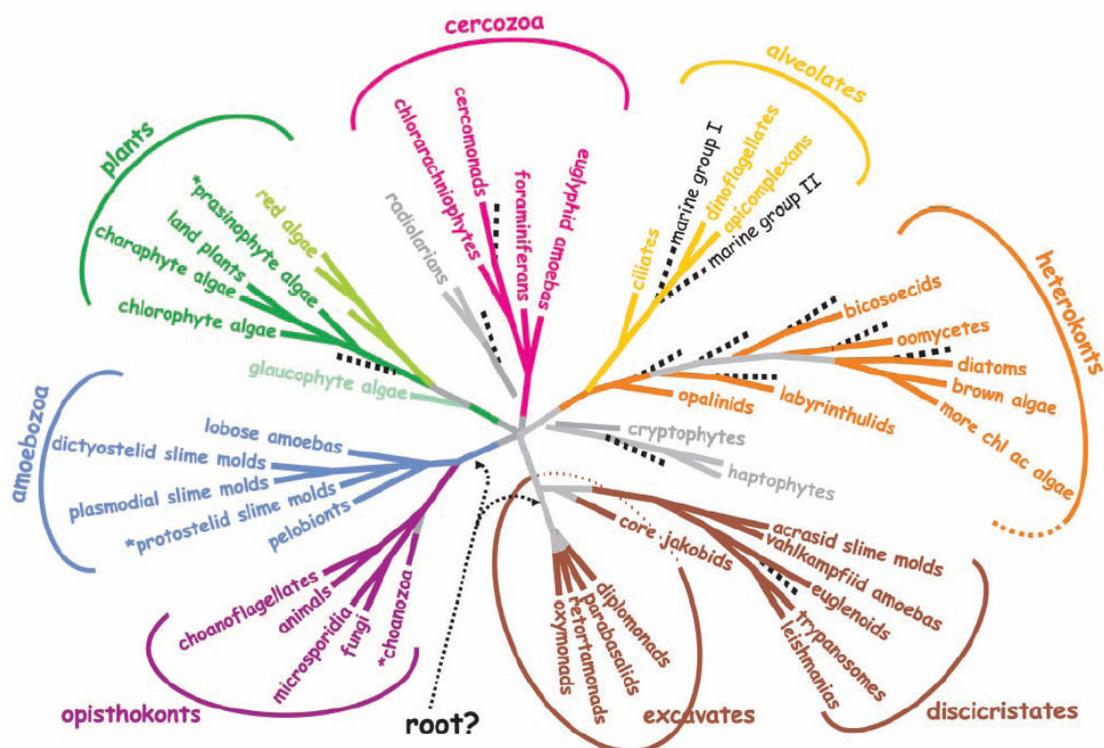


Figure 16 : Arbre phylogénétique consensus des eucaryotes (d'après Baldauf, 2003).

Les algues possèdent, en plus de propriétés propres à l'adaptation au milieu marin, certaines caractéristiques conservées par rapport aux autres eucaryotes, notamment des mécanismes de mise en place de l'immunité naturelle (reconnaissance de pathogènes et signalisation). **La capacité à produire du peroxyde d'hydrogène** suite à l'infection par des pathogènes, ou par élicitation, a été démontrée chez un certain nombre d'algues rouges (Bouarab *et coll.*, 1999 ; Weinberger et Friedlander, 2000 ; Weinberger *et coll.*, 2001) et brunes (Kupper *et coll.*, 2001 ; Kupper *et coll.*, 2002). **La biosynthèse de composés halogénés volatils** catalysée par certaines haloperoxydases a été décrite chez ces deux lignées et certaines structures cristallographiques ont également été obtenues (Messerschmidt et Wever, 1996 ; Weyand *et coll.*, 1999 ; Isupov *et coll.*, 2000 ; Colin *et coll.*, 2003). D'autres activités enzymatiques de défense ou de **biosynthèse de composés secondaires** sont également connues chez ces algues, même si les enzymes incriminées n'ont pas toujours été isolées (shikimate deshydrogénase, phénylalanine ammonia-lyase, lipoxygénase) (Liu et Reith, 1994 ; Nunez *et coll.*, 2002 ; Bouarab *et coll.*, 2004). **En terme d'oxylipines un nombre important de structures est maintenant décrit** chez les algues marines mais leurs rôles biologiques restent en grande partie inconnus. Plusieurs de ces métabolites sont proches voire identiques à ceux caractérisés non seulement chez les plantes supérieures (acide jasmonique) (Krupina et Dathe, 1991 ; Fujii *et coll.*, 1997) mais aussi chez les mammifères (prostaglandines, leucotriènes) (Todd *et coll.*, 1994 ; Sajiki et Kakimi, 1998 ; Gerwick *et coll.*, 1999). Les algues marines auraient ainsi conservé les deux voies de signalisation lipidique.

I.2 Cycle biologique

Chondrus crispus est une algue rouge appartenant à la classe des Florideophyceae et à l'ordre des Gigartinales. Elle occupe les zones intertidales et subtidales de l'océan Atlantique européen et nord américain. Le cycle biologique de l'algue est de type haplo-diplophasique trigénétique avec **succession d'une génération gamétophytique haploïde, d'une génération carposporophytique diploïde qui se développe sur les gamétophytes femelles et d'une phase tétrasporophytique diploïde** (Figure 17). Le cycle est isomorphe, gamétophytes et sporophytes étant identiques sur le plan morphologique. La paroi cellulaire de *C. crispus* est constituée de cellulose et de polysaccharides sulfatés appelés carraghénanes. Le sporophyte contient des carraghénanes de type lambda (3 sulfates par motif disaccharidique), tandis que le gamétophyte femelle contient exclusivement des carraghénanes de type kappa (1 sulfate par motif disaccharidique et 1 pont anhydro) et iota (2 sulfates par motif disaccharidique et 1 pont anhydro) (Bouarab, 2000). Le gamétophyte mâle est peu représenté dans son milieu naturel, et les données de structures pariétales le concernant sont inexistantes (ref, Christophe Destombe, William Helbert, communication personnelle).

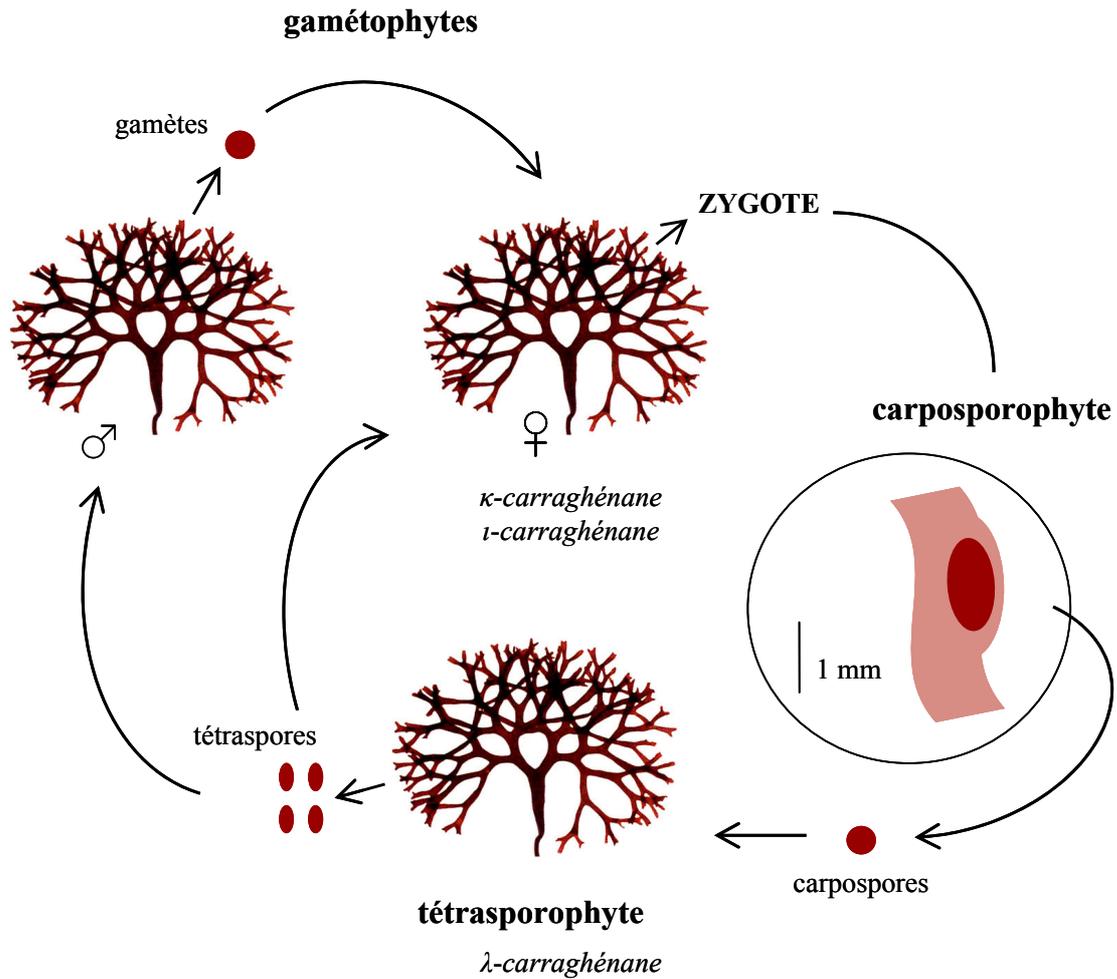


Figure 17 : Cycle biologique de l'algue rouge *Chondrus crispus*

Acrochaete operculata est une algue verte filamenteuse appartenant à l'ordre des Ulvales. La plupart des espèces de cette famille vivent généralement sous forme d'épiphytes ou d'endophytes d'algues rouges ou dans des coquillages. L'algue verte *Acrochaete operculata* partage généralement le même biotope que *C. crispus* et on la rencontre ainsi dans les eaux de l'Atlantique Nord ; il s'agit d'un pathogène endophyte très spécifique qui est **capable d'envahir complètement les sporophytes de l'algue rouge tandis que les gamétophytes femelles sont très peu endommagés.**

I.3 Valorisations

L'industrie des algues représente un marché mondial annuel d'environ 4,5-5,0 milliards d'euros pour environ 7,5-8,0 millions de tonnes d'algues fraîches utilisées chaque année. L'utilisation des algues dans l'alimentation représente le plus large débouché, avec près de 4,2 milliards d'euros. Les substances hydrocolloïdes extraites de la paroi des algues représentent le second débouché majeur. Les alginates sont extraits d'algues brunes, tandis que les agars et les carraghénanes sont extraits d'algues rouges. Les genres *Euchema* et *Kappaphycus* représentent la majorité des algues carraghénophytes exploitées (88,5 %). *C. crispus* représente 2,3 % de ce marché avec 3 900 tonnes sèches. Elle est exploitée pour ces carraghénanes du type kappa, iota et lambda. Le Canada constitue le principal pays exploitant, suivi de la France, de l'Espagne et du Portugal.

II. Stress oxydatif et protection cellulaire chez *C. crispus*

Seuls certains points marquants, permettant de se représenter l'importance de certaines voies métaboliques de défense chez *C. crispus*, seront évoqués. Ils sont issus essentiellement des travaux de thèse de Kamal Bouarab (Bouarab, 2000) et d'Emmanuel Gaquerel (Gaquerel, 2005).

II.1 Burst oxydatif chez *C. crispus*

Le modèle bipartite constitué d'une part par l'algue verte *A. operculata* et d'autre part par l'algue rouge hôte *C. crispus*, représente un modèle singulier d'étude de reconnaissance et de mises en place de cascades de signalisation entre deux organismes. L'interaction biologique entre ces deux acteurs a été particulièrement étudiée ces dernières années au sein de l'équipe « Biochimie de défense des algues » dirigée par Philippe Potin. Il a ainsi été démontré que la composition qualitative en carraghénanes de la paroi de l'hôte joue un rôle majeur dans l'interaction des deux acteurs et dans la potentialisation (sporophyte) ou l'inhibition (gamétophyte) de la virulence du pathogène (Bouarab *et coll.*, 1999 ; Bouarab, 2000) (Figure 18).

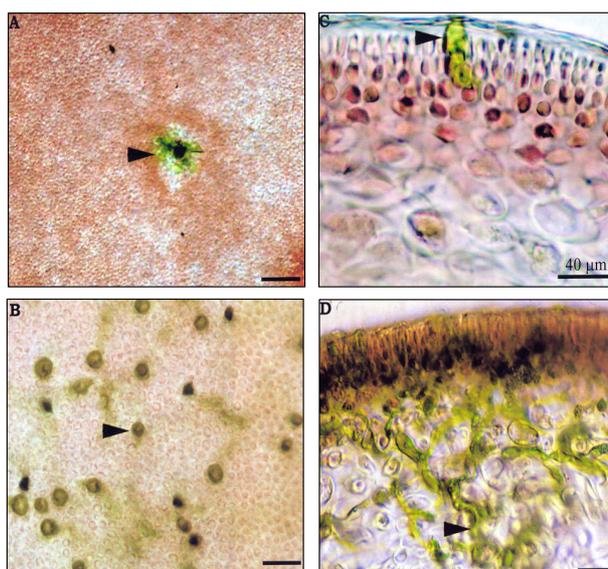


Figure 18 : Planches photographiques de l'interaction *C. crispus*-*A. operculata*

Le gamétophyte est très peu infecté (A, C) tandis que le sporophyte est complètement envahi (B, D).

(A, B) : vues de surface. (C, D) : coupes transversales. D'après Bouarab, 2000.

Par ailleurs **des extraits acellulaires du pathogène sont capables d'induire chez l'algue rouge l'émission d'un burst oxydatif**, similaire à ce qui peut être observé chez des cellules végétales ou animales élicitées (Bouarab *et coll.*, 1999). Ce burst oxydatif est inhibé par le diphénylène iodonium (DPI), un inhibiteur de flavocytochromes tels que la NADPH oxydase, classiquement utilisé chez les mammifères (Figure 19). Par ailleurs, l'azide de sodium (NaN_3) et le cyanure de potassium (KCN), deux inhibiteurs de peroxydases, ne bloquent pas la génération du burst. Ces résultats suggèrent l'**implication d'une enzyme de type NADPH oxydase** dans la production de formes actives de l'oxygène au cours de l'élicitation de l'algue rouge. D'autre part ce burst oxydatif serait indispensable à la mise en place de la résistance contre le pathogène chez les gamétophytes de *C. crispus*. En effet les thalles traités par le DPI se font complètement envahir par le pathogène, montrant ainsi que la production de formes actives de l'oxygène est indispensable à la mise en place de la résistance à l'infection chez les gamétophytes de l'algue rouge.

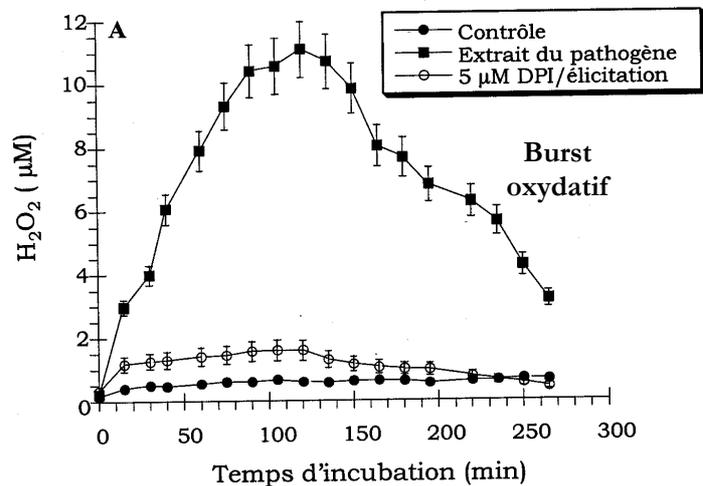


Figure 19 : Emission d'un burst oxydatif par les gamétophytes de *C. crispus* élicités par des extraits acellulaires d'*A. operculata*

Le burst oxydatif est inhibé par le DPI.
D'après Bouarab, 2000.

II.2 Les haloperoxydases

Lorsqu'il est élicité par les extraits acellulaires d'*A. operculata*, le gamétophyte de *C. crispus* montre également une augmentation de l'émission de **composés halogénés volatils**. Cette production serait dépendante du burst oxydatif (Bouarab, 2000). Certains de ces composés, tels que l'iodioéthane $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{I}$, le bromofore CHBr_3 et le chloroforme CHCl_3 , sont toxiques pour les spores du pathogène à des doses similaires à celles émises par le gamétophyte.

Parallèlement à cette émission de composés halogénés volatils, l'élicitation des gamétophytes induit l'**apparition d'une nouvelle activité enzymatique de type bromoperoxydase** (Figure 20).

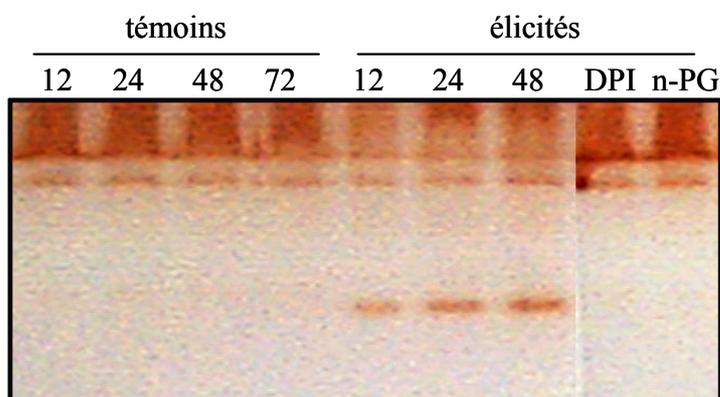


Figure 20 : Induction d'une nouvelle isoforme de bromoperoxydase en réponse à l'élicitation par des extraits acellulaires du pathogène *A. operculata* chez le gamétophyte de *C. crispus*

L'induction de cette nouvelle activité est inhibée par le DPI, un inhibiteur de NADPH oxydases, et le n-propylgalate (n-PG), un inhibiteur de lipoxygénases.

Par la suite, les caractérisations au niveau moléculaire et biochimique des différentes isoformes de bromoperoxydases chez *C. crispus* ont fait l'objet d'une étude préliminaire plus spécifique par Audrey Cosse au cours de son stage de DEA (Cosse, 2003 –rapport de DEA).

II.3 La voie des phénylpropanoïdes

Lorsque les spores de l'algue verte *A. operculata* pénètrent les premières couches de cellules des gamétophytes de l'algue rouge *C. crispus*, **des composés autofluorescents dans l'UV s'accumulent fortement autour des zones de pénétration**. Cet anneau de fluorescence n'est pas observé chez les sporophytes. Chez les plantes supérieures cette accumulation de composés autofluorescents dans l'UV correspond à des composés phénoliques, issus de la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes. Ils sont toxiques et également supposés participer aux processus de densification pariétale par pontages oxydatifs, permettant ainsi de bloquer la propagation du pathogène (Bouarab *et coll.*, 2004).

La mise en place préalable d'un burst oxydatif serait indispensable à la synthèse de ces composés fluorescents. D'autre part l'inhibition de la voie de l'acide shikimique bloquerait non seulement l'accumulation de ces composés mais également la résistance à l'infection. Ces résultats montreraient que la voie de l'acide shikimique serait indispensable à la production de composés secondaires fluorescents indispensables à la mise en place d'une protection efficace contre les agresseurs chez *C. crispus* (Bouarab, 2000).

Par ailleurs **les extraits acellulaires d'*A. operculata* sont capables d'induire une nouvelle activité shikimate déshydrogénase chez les gamétophytes de *C. crispus*, ainsi que de stimuler l'activité phénylalanine ammonia-lyase**, alors qu'une telle élicitation est sans effet sur ces enzymes dans le cas des sporophytes (Figure 21).

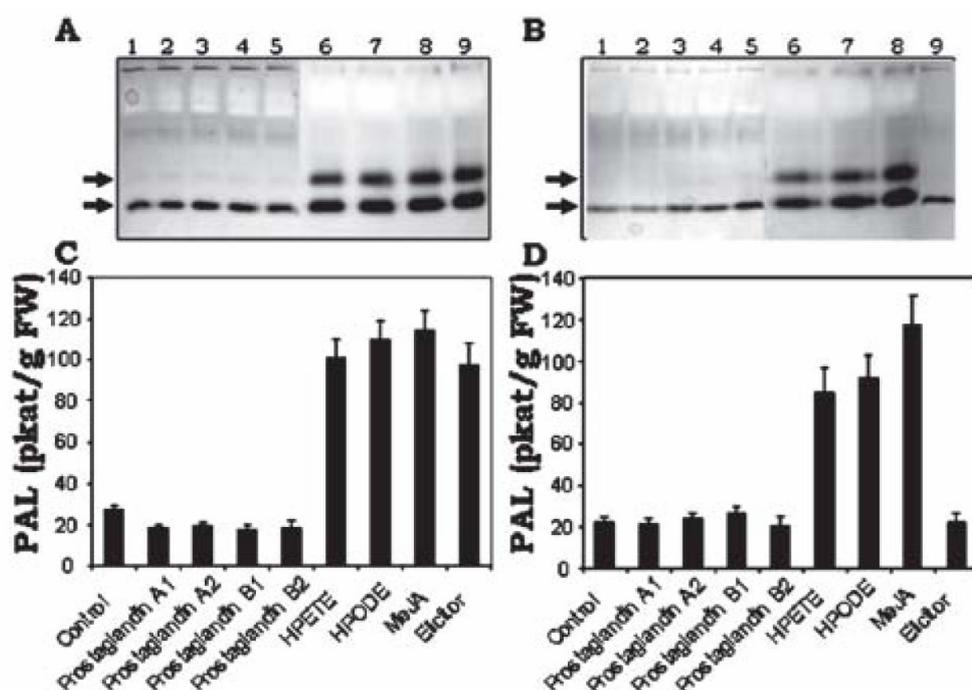


Figure 21 : Activités shikimate déshydrogénase et phénylalanine ammonia-lyase chez *C. crispus*

(A, B) : activités shikimate déshydrogénase. (C, D) : activités phénylalanine ammonia-lyase

(A, C) : gamétophytes. (C, D) : sporophytes

Les extraits acellulaires d'*A. operculata* stimulent une nouvelle activité shikimate déshydrogénase ainsi que l'activité phénylalanine ammonia-lyase chez les gamétophytes de *C. crispus*, alors qu'un tel effet n'est pas observé chez les sporophytes. En revanche les oxylipines 12-HpETE, 13-HpODE et le méthyle jasmonate, induisent ces activités chez les deux phases génétiques (d'après [Bouarab et coll., 2004](#)).

En revanche la mise en place d'une résistance systémique acquise telle qu'elle est observée chez les plantes supérieures n'est pas observée chez *C. crispus* dans le cadre d'une interaction avec son pathogène. La production de peroxyde d'hydrogène et la mise en place de la résistance sont notamment confinées aux lieux d'infection ([Bouarab, 2000](#)). D'une manière générale **l'acquisition d'une systémie n'a jamais été démontrée chez les algues**, et leur environnement marin leur permet sans doute de les en dispenser car il est un véhiculant idéal pour de nombreux composés secondaires libérés par l'algue infectée. Ainsi [Toth et Pavia \(2000\)](#) ont pu montrer pour la première fois que des signaux émis dans l'eau par l'algue brune *Ascophyllum nodosum*, attaquée par des herbivores, induisaient la production de phlorotannins chez ses voisins, les rendant impropres à la consommation.

II.4 Coexistence des deux voies de synthèse d'oxylipines

Les algues marines présentent la particularité de synthétiser des acides gras polyinsaturés en C18 et en C20, tels que les acides arachidonique et linoléique, conduisant respectivement à la synthèse de prostaglandines chez les animaux et de jasmonates chez les plantes supérieures. Lors de la mise en place de son métabolisme de défense contre l'attaque de pathogènes, **l'algue rouge *C. crispus* aurait la capacité d'utiliser à la fois des oxylipines de type animal (éicosanoïdes) et végétal (octadécanoïdes)**. Cette particularité rappelle le cas des mammifères qui, au-delà des dérivés de l'acide arachidonique, pourraient également mobiliser des dérivés de l'acide linoléique pour leurs réponses de défense. Le schéma le plus probable expliquant la présence des deux cascades d'oxydation des AGPI, en C20 et C18, chez ces deux lignées phylogénétiques, seraient que ces deux catégories de dérivés lipidiques préexistaient avant la séparation des lignées eucaryotiques, avec perte des voies de biosynthèse de l'acide arachidonique chez les plantes supérieures (Figure 22) (Bouarab *et coll.*, 2004). Les voies de biosynthèse de ces deux types de dérivés lipidiques chez les algues marines, avec l'identification des enzymes incriminées, restent encore à élucider.

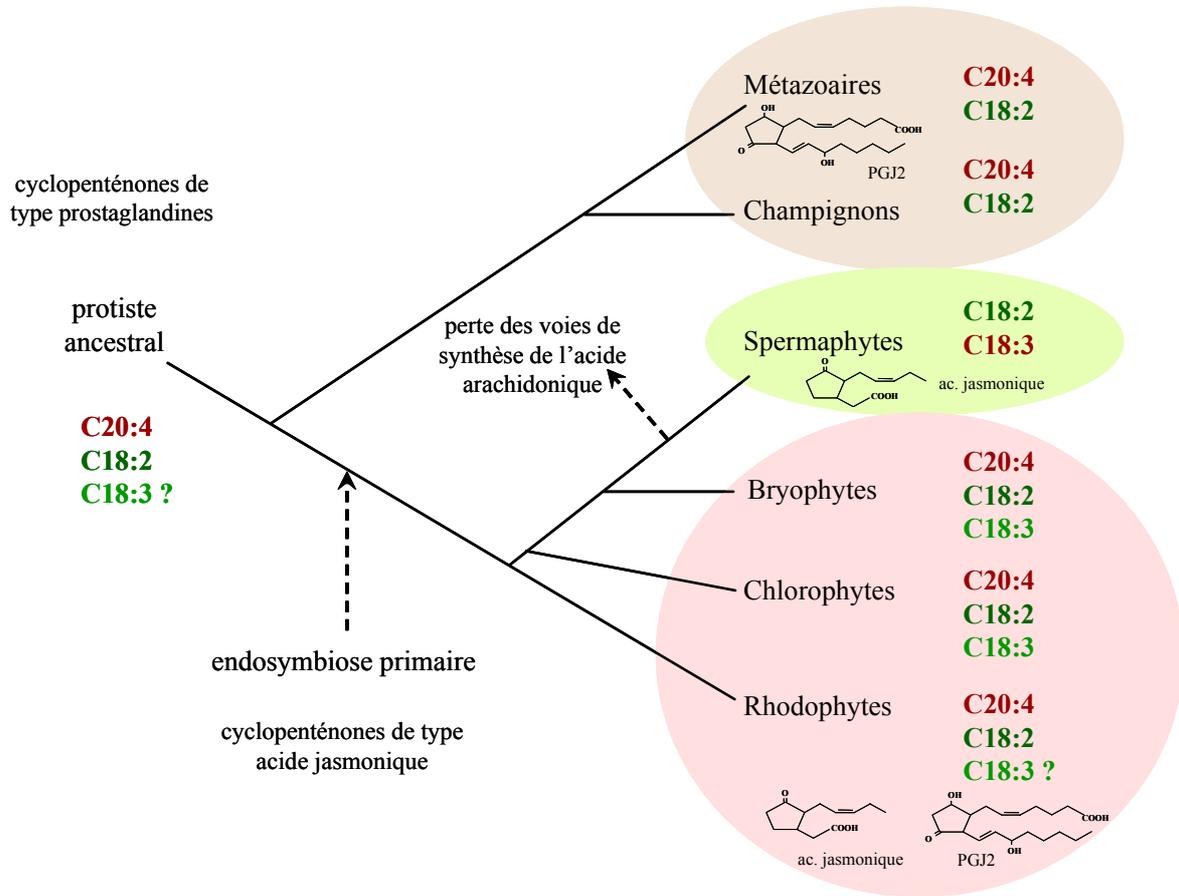


Figure 22 : Représentation spéculative de la distribution des acides gras polyinsaturés et de leurs dérivés cyclopentanones chez les eucaryotes

Les différents groupes animaux, champignons, plantes supérieures, mousses, algues vertes et algues rouges sont représentés. L'endosymbiose entre un hôte eucaryote et une cyanobactérie a donné lieu à la lignée des Rhodophytes, de laquelle la lignée verte (algues vertes et plantes terrestres) a divergée. Compte tenu de la large distribution des voies de biosynthèse des acides gras en C20 et C18, les règles de la parcimonie font supposer que l'ancêtre commun possédait ces deux voies. Les prostaglandines, telles que la prostaglandine J2 (PGJ2), sont retrouvées dans la plupart des lignées eucaryotes avec l'exception des plantes supérieures. La présence de l'acide jasmonique à la fois chez les algues rouges et les plantes supérieures dérive sans doute de l'endosymbiose chloroplastique. Les spermaphytes ne possèdent pas de voies de biosynthèse des oxylipines en C20 (d'après Bouarab *et coll.*, 2004).

L'élicitation des gamétophytes de *C. crispus* par des extraits acellulaires d'*A. operculata* provoque un **changement du profil en acides gras libres de l'algue rouge**. Ainsi en complément de l'acide linoléique C18:2 et l'acide éicosapentaénoïque C20:5 déjà présents dans l'algue témoin, les acides oléique C18:1, linoléique C18:3, stéaridonique C18:4 et arachidonique C20:4 sont nouvellement formés (Gaquerel, 2005).

Par ailleurs les profils métaboliques démontrent l'induction d'une **production d'oxylipines en C18 et C20** suite à l'élicitation, avec une majorité de dérivés issus d'une activité de type 13-lipoxygénase (13-HODE, 13-oxo-ODE, 13-HOTE). L'unique éicosanoïde détecté en proportion importante suite à l'élicitation est le 12-HETE, métabolite typiquement issu du métabolisme de l'acide arachidonique par une 12-lipoxygénase chez les mammifères. Des études *in vitro* du métabolisme oxydatif des acides gras polyinsaturés font supposer la mise en place d'activité de type lipoxygénase pour l'obtention de ces composés (Gaquerel, 2005).

Des études complémentaires *in vitro* sur les fractions acellulaires de *C. crispus* préalablement élicités par les extraits du pathogène, ont montré la biosynthèse de composés présentant de fortes homologues avec le **méthyle jasmonate**, dans le cas d'incubation avec l'acide linoléique d'une part, et avec les **prostaglandines B1 et B2** dans le cas d'incubation avec l'acide arachidonique d'autre part (Bouarab *et coll.*, 2004). Emmanuel Gaquerel a également montré lors de son doctorat que des **prostaglandines de type A2 et E2** étaient détectées dans des extraits de l'algue préalablement élicitée par le méthyle jasmonate (Gaquerel, 2005).

Enfin les oxylipines auraient la capacité de stimuler la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes. Il a ainsi été montré que le SHAM, un inhibiteur de lipoxygénase, inhibait l'accumulation des composés autofluorescents autour des zones d'infection par *A. operculata*, ainsi que la mise en place de la résistance chez les gamétophytes de *C. crispus* (Bouarab, 2000). Par ailleurs, si les oxylipines n'induisent pas la production d'un burst oxydatif chez l'algue rouge, certaines isoformes en C18 (13-HpODE et méthyle jasmonate) et C20 (12-HpETE) stimuleraient l'activité shikimate déshydrogénase et phénylalanine ammonia-lyase à la fois chez les gamétophytes et les sporophytes (Figure 21) (Bouarab *et coll.*, 2004). Enfin le traitement d'une heure des sporophytes par ces oxylipines, les rend plus résistants à l'infection par les spores d'*A. operculata*.

III. Vers une meilleure compréhension des voies de défense chez *C. crispus*

Les données concernant l'activation de voies de défenses données chez les algues, dans le cas d'élicitation ou d'interaction hôte/pathogène, sont très fragmentaires. Les enzymes potentiellement incriminées, ou le rôle physiologique des métabolites isolés, sont rarement caractérisés. La plupart des voies métaboliques de défense reste à définir entièrement. L'algue rouge *C. crispus* est particulièrement intéressante car elle nous fournit, pour un même pathogène, une phase sensible et une phase résistante. Elle fait par ailleurs partie des modèles pour lesquels on dispose le plus d'informations accumulées et détaillées. La variété des résultats obtenus nous permettent d'ores et déjà de repérer certains points clés de la résistance à l'infection chez les gamétophytes. Une partie de ces résultats a été présentée précédemment. L'état de nos connaissances sur ce modèle nous permet d'établir les points suivants :

- (1) La production du burst oxydatif est générée par une activité de type NADPH oxydase et est indispensable à la résistance. Le traitement des gamétophytes par des inhibiteurs de phospholipases inhibe cette production, suggérant l'implication d'acides gras libres ou de leurs métabolites dans l'établissement du burst. Les canaux ioniques seraient également indispensables à son activation. Certaines protéines kinases interviendraient en amont du burst, d'autres en aval ou dans d'autres procédés de défense (Bouarab *et coll.*, 1999).
- (2) Certaines enzymes déjà bien décrites chez les algues marines voient leur activité stimulée chez *C. crispus* au cours de l'infection, c'est le cas des haloperoxydases dont certaines sont induites. La production des composés halogénés volatils est dépendante du burst oxydatif et est toxique pour les spores du pathogène.
- (3) La voie de l'acide shikimique est également indispensable au processus de défense de l'algue. Elle aboutit à la génération de composés fluorescents toxiques autour des zones d'infection. Une nouvelle activité shikimate déshydrogénase est induite au cours de l'élicitation, et l'activité phénylalanine ammonia-lyase est stimulée. Il s'agit de deux enzymes clés de la voie des phénylpropanoïdes chez les plantes supérieures. Les effets sur ces activités sont reproduits lors d'élicitations par des oxylipines, à la fois chez les gamétophytes et les sporophytes.

(4) Les oxylipines dérivent d'acides gras en C18 et C20 chez *C. crispus* et semblent également avoir un rôle important dans la défense. L'élicitation par des extraits du pathogène modifie le profil en acides gras libres de l'hôte et stimule un métabolisme oxydatif des acides gras, essentiellement représenté par une activité de type 13-lipoxygénase. Certaines oxylipines en C18 (13-HpODE, méthyle jasmonate) et C20 (12-HpETE) sont capables de protéger efficacement les sporophytes contre l'infection et induisent des activités des deux voies de défense (voie des phénylpropanoïdes, voie des oxylipines). Les extraits d'algues élicitées, par le méthyle jasmonate ou des fractions acellulaires du pathogène, ont la capacité de synthétiser du méthyle jasmonate et des prostaglandines. Ces deux types de molécules ont des rôles signalitiques dans le maintien de l'homéostasie ou le développement, largement décrits respectivement chez les plantes et les mammifères.

Face à ces informations enzymatiques et métaboliques, l'état des connaissances liées aux bases moléculaires des réponses de défense chez *C. crispus* demeure très partiel. L'identification dans les banques EST (Etiquettes de Séquences Transcrites) de l'algue rouge *Porphyra yezoensis* d'un transcrit ayant un fort taux de similitude avec des NADPH oxydases, nous a tout d'abord fait supposer que l'isolement du gène codant la protéine responsable du burst oxydatif chez *C. crispus* était possible. Par la suite la génération de banques EST au sein de l'équipe sur l'algue rouge *C. crispus*, nous permettait d'envisager l'identification de gènes impliqués dans des voies métaboliques de défense.

Dans ce contexte, la problématique d'étude a été définie autour de l'identification de marqueurs moléculaires du stress oxydatif et de la défense chez *C. crispus*.

(1) Le 1^{er} objectif de ce travail a porté sur l'identification et l'analyse du transcrit codant la NADPH oxydase chez *C. crispus*. Des expériences biochimiques sur l'enzyme native devaient compléter cette étude.

Par ailleurs, au cours du développement de ce 1^{er} axe de recherche il nous a fallu malgré nous admettre que les fractions acellulaires du pathogène n'étaient plus capables d'induire l'émission du burst oxydatif chez les gamétophytes de *C. crispus*, même si certaines voies de défense continuaient à être induites. Une perte de virulence du pathogène est

l'hypothèse la plus facile à évoquer même si l'explication réelle est sans doute bien plus complexe. Nos efforts pour retrouver un extrait éliciteur sont restés vains malgré les nombreuses voies explorées. L'élucidation des causes incriminées dans la perte de ce signal nous est apparue comme une analyse sans doute bien plus coûteuse en temps et en énergie que l'utilisation d'autres métabolites éliciteurs. Contre toute attente, il nous a fallu admettre que les extraits du pathogène ne nous permettaient plus d'étudier plus avant et de façon fiable les voies de défense chez *C. crispus*.

- (2) Au-delà de l'étude sur la NADPH oxydase, les programmes EST sur les thalles et les protoplastes de gamétophytes de *C. crispus* amorcés au sein de l'équipe, étaient une source de gènes potentiellement induits au cours de réponses au stress et à la défense. Je me suis attachée à identifier et isoler parmi ces gènes des candidats à l'élucidation des voies moléculaires de défense chez *C. crispus*.
- (3) Les oxylipines en C18 et C20 jouent visiblement un rôle important dans la défense chez *C. crispus*. L'algue synthétise ces composés au cours de réactions de défenses liées à l'infection et ils semblent avoir un rôle dans la mise en place de la résistance. L'effet de ces oxylipines au niveau moléculaire était à explorer chez l'algue.
- (4) D'un ordre plus général, l'identification de nouveaux composés capables de provoquer l'expression de ces gènes de défense, au-delà de potentiels changements physiologiques, restait à élucider afin de disposer de nouveaux outils nous permettant d'étudier les cascades signalitiques activées chez l'algue.
- (5) Dans la mesure du possible nous devons pouvoir assigner une fonction aux enzymes codées par les gènes étudiés, ou émettre des hypothèses sur leur implication dans les voies de défense chez *C. crispus*.

Chapitre III -Matériel et méthodes

MATERIEL ET METHODES

Chapitre III -Matériel et méthodes

I. Préparation du matériel végétal et traitement

I.1 Matières premières

I.1.1 Matériel végétal

Les gamétophytes de l'algue rouge *Chondrus crispus* issus de cultures unialgales (souche canadienne JC 001 PC-G) sont cultivés au laboratoire (Figure 23) en eau de mer stérilisée enrichie en nutriments (milieu SFC) selon (Correa *et coll.*, 1988). Le milieu de culture est renouvelé chaque semaine. Les cultures sont maintenues à 13°C avec une photopériode de 10 heures de lumière et 14 heures d'obscurité, sous un flux lumineux de $40 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. La majorité des expériences a été menée avec cette souche, en revanche les premières expériences de biologie moléculaire (analyse des profils d'expression de la NADPH oxydase) ont été réalisées avec des gamétophytes de *C. crispus* issus de cultures unialgales de Innovalg (Bouin, France). Certaines expériences nécessitant de grandes quantités de matières premières (Northern blotting, analyses biochimiques de la NADPH oxydase) ont été réalisées à partir de gamétophytes sauvages récoltés sur l'estran de Roscoff et préalablement acclimatés au laboratoire selon les méthodes de culture décrites précédemment.



Figure 23 : Gamétophytes de *C. crispus* cultivés au laboratoire (JC 001 PC-G) et exemple d'un plan d'élucation

L'algue verte *Acrochaete operculata* (souche KH 060487-1-1) est également cultivée en milieu SFC (Figure 24) selon une photopériode de 16 heures de lumière et 8 heures d'obscurité, et sous un flux lumineux de $40 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Les cultures sont maintenues à 15°C et le milieu est renouvelé chaque semaine.

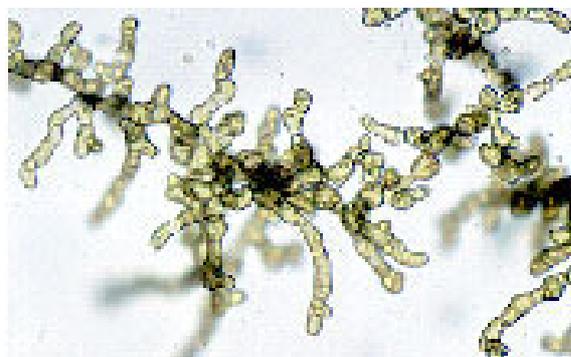


Figure 24 : Planche photographique de l'algue verte *A. operculata*

I.1.2 Réactifs

Les solutions stocks, utilisées pour les traitements de l'algue rouge, de CdCl_2 (Sigma), CuSO_4 (Prolabo), ZnCl_2 (Prolabo), et AlCl_3 (Sigma) à 10 mM, ainsi que les solutions stocks de H_2O_2 (Sigma) à 500 mM, dichlorvos (Sigma), glyphosate (Sigma) et paraquat (Sigma) à 25 mM, et la solution stock de Messenger® (EDEN Bioscience) à 10 g.l^{-1} , ont toutes été préparées dans l'eau de mer. Les solutions à 100 mM d'acide salicylique (Sigma), métolachlor (Sigma), atrazine (Sigma) et 2,4-D (Sigma), ont été préparées dans l'acétone. Une solution à 10 mM de méthyle jasmonate (Sigma) a été préparée dans le DMSO. Toutes les solutions sont ensuite stockées à -80°C . Des solutions à 5 mM des oxylipines 13(S)-HpODE (acide 13S-hydroperoxy-9Z,11E-octadécadiénoïque), 13(S)-HpOTE (acide 13S-hydroperoxy-9Z,11E,15Z-octadécatriénoïque), 12(+/-)-HpETE (acide 12-hydroperoxy-5Z,8Z,10E,14Z-éicosatétraénoïque) et 15(S)-HETE (acide 15S-hydroxy-5Z,8Z,11Z,13E-éicosatétraénoïque) (Cayman Chemicals, SpiBio, France) ont été préparés dans le DMSO extemporanément.

I.2 Elicitation des gamétophytes de *C. crispus*

I.2.1 Expériences d'infection

Pour les expériences d'infection, 200 mg de l'algue verte *A. operculata* sont préalablement incubés en boîte de Pétri dans 100 mL de milieu SFC, pendant 18 heures à 4°C et dans l'obscurité afin de provoquer la sporulation. Lorsque les zoospores sont libérées dans le milieu, l'inoculation est réalisée en introduisant dans chaque boîte de Pétri, 10 fragments de 200 mg chacun, de gamétophytes de *C. crispus*. L'activité des spores, du relargage par le pathogène jusqu'à leur fixation au niveau des thalles de l'hôte, est contrôlée par observation au microscope optique. Des thalles d'algue rouge cultivés en milieu SFC selon des conditions identiques sont utilisés comme témoins. Les échantillons sont récoltés après 0, 6, 12, 24, 48 et 96 heures d'inoculation.

I.2.2 Traitements chimiques

Pour réaliser les traitements chimiques des algues, 100 mg de gamétophytes de *C. crispus* sont d'abord maintenus au moins 18 heures en boîtes de Pétri contenant de l'eau de mer fraîche. Les produits sont ensuite ajoutés à une concentration finale de 10 mM pour H₂O₂, 200 µg.mL⁻¹ pour le Messenger® (pour obtenir une concentration théorique finale en harpine de 6 µg.mL⁻¹), 500 µM pour l'acide salicylique et l'ensemble des pesticides testés, 200 µM pour tous les métaux lourds, 100 µM pour le méthyle jasmonate et 50 µM pour les autres oxylipines testées. Un volume équivalent de solvant est utilisé pour chaque traitement témoin correspondant. Après trois heures d'incubation, les thalles sont récoltés, congelés dans l'azote liquide et stockés à -80°C jusqu'à utilisation.

I.3 Mesure du burst oxydatif

Des fragments de 500 mg de gamétophytes de *C. crispus* sont placés en boîtes de Pétri dans 10 mL d'eau de mer. La cinétique d'émission du peroxyde d'hydrogène par les gamétophytes de *C. crispus* élicités 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 : le luminol (injection de 50 μL à 0,3 mM) et la peroxydase HRP (injection de 100 μL à 20 $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ dans du tampon phosphate pH7,8). La mesure de la luminescence, issue de l'oxydation du luminol par le peroxyde d'hydrogène en présence de peroxydase, est mesurée sur des aliquotes de 300 μL du milieu d'élicitation. Une gamme étalon est réalisée et permet de déduire la quantité de peroxyde d'hydrogène produite au cours de l'élicitation.

II. Analyses de biologie moléculaire

II.1 Extraction des ARN et de l'ADN génomique

II.1.1 Extraction des ARN

Pour l'extraction de l'ARN total, un protocole en tubes eppendorf pour des quantités inférieures ou égales à 100 mg de masse fraîche, a été optimisé. Les tissus de gaméophytes congelés sont broyés en une fine poudre dans l'azote liquide puis repris dans un tampon d'extraction contenant 100 mM Tris-HCl pH 7,5, 2 % CTAB, 1,5 M NaCl, 50 mM EDTA, 50 mM DTT à raison de 9 mL.g⁻¹ de masse fraîche. Les ARN sont extraits par séparation de phase en présence de chloroforme puis la phase aqueuse est collectée avant précipitation au chlorure de lithium. Dans le cas des expériences de RT-PCR quantitative, les échantillons sont traités par la DNase I selon les instructions du fournisseur (Stratagène), 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 3 M.

II.1.2 Extraction de l'ADN génomique

Pour l'extraction de l'ADN génomique les tissus congelés sont broyés en une fine poudre dans l'azote liquide, reprise dans du tampon d'extraction contenant 100 mM Tris-HCl pH 8, 2 % CTAB, 1,5 M NaCl, 50 mM EDTA, 50 mM DTT à raison de 10 mL.g⁻¹ de masse fraîche. L'ADN est ensuite extrait par séparation de phases en présence de chloroforme puis précipité avec 0,6 volume d'isopropanol. Le culot est resuspendu avant purification sur gradient au chlorure de césium.

Les échantillons d'ARN et d'ADN sont ensuite dosés par spectrophotométrie et contrôlé qualitativement par électrophorèse en gel d'agarose.

II.2 Clonage et séquençage des acides nucléiques d'intérêt

II.2.1 Clonage et séquençage de la NADPH oxydase

L'alignement des séquences protéiques de la NADPH oxydase gp91^{phox} humaine avec des homologues rboh de plantes supérieures et d'algues, dont les premières EST de *Porphyra yezoensis*, a permis de désigner des amorces dégénérées : NOX1 (sens), 5'-CA(A/C)TGGCA(C/T)CCNTT(C/T)ACNAT(A/C/T)-3' et NOX2 (antisens), 5'-NGCNGG(A/G)CTNCC(A/G)TANGG-3'. L'utilisation de ces amorces sur de l'ADN génomique de gamétophytes de *C. crispus* a permis l'amplification d'un fragment nucléotidique de 165 pb, cloné dans le vecteur pCR2.1®-TOPO (Invitrogen) puis séquencé. Ce fragment, montrant des taux de similitudes importants avec la gp91^{phox}, a ensuite été radio-marqué avec du [α -32P]-dCTP, en utilisant le kit ReadyPrime™ Random Primed DNA Labelling kit (Amersham-Biosciences). La banque EST de thalles (Collén *et coll.*, 2006) a ensuite été criblée en utilisant cette sonde. Les clones positifs furent séquencés et les inserts respectifs correspondaient au même ADNc, codant un cadre de lecture incomplet.

La séquence de l'ADNc pleine longueur a été obtenue par des expériences de 5'-RACE PCR, en utilisant le kit SMART™ RACE cDNA amplification kit (BD Biosciences) et l'amorce spécifique NOX3 (sens), 5'-CCACCGGAGATGAGAACGACTCGC-3'. Les fragments positifs obtenus furent à nouveau clonés et séquencés. L'assemblage de ces deux séquences a permis de déterminer la séquence nucléotidique complète du transcrit de la NADPH oxydase chez *C. crispus* (*Ccrboh*).

L'insert du clone AV429771 de la banque d'EST de *P. yezoensis* (généreusement fourni par N. Kusuhara du Kazusa DNA Research Institute, Japon) fut également entièrement séquencé. La nouvelle information de séquence a permis de déterminer la séquence nucléotidique complète du transcrit de la NADPH oxydase chez *P. yezoensis* (*Pyrboh*), par assemblage avec les différentes séquences d'EST.

II.2.2 Identification des séquences génomiques des glutathion S-transférases

Afin d'obtenir les séquences génomiques correspondantes des transcrits de glutathion S-transférases *Ccgst1*, *Ccgst2* et *Ccgst7*, des expériences de PCR ont été réalisées sur de l'ADN génomique de *C. crispus*, en utilisant des amorces encadrant chaque partie codante. La séquence génomique de *Ccgst1* a été déterminée en utilisant les amorces Ccgst1-1 (sens) : 5'-CCTCGTATTTCCGTCACTAT-3' et Ccgst1-2 (antisens) : 5'-CGGGCACAGCACGTGTTGTTA-3. La séquence génomique de *Ccgst2* a été déterminée en utilisant les amorces Ccgst2-1 (sens) : 5'-GCTCAGCCACACTCGCACAAT-3' et Ccgst2-2 (antisens) : 5'-ACGCTGACATCGCTACGAAAACA-3'. La séquence génomique de *Ccgst7* a été déterminée en utilisant les amorces Ccgst7-1 (sens) : 5'-CACACAACCTCGCCTTCACAA-3' et Ccgst7-2 (antisens) : 5'-CACTCTCCCACATGGTGCACATT-3'. Les produits de PCR obtenus ont été purifiés après électrophorèse en gel d'agarose en utilisant le kit MiniElute PCR Purification kit (Qiagen) puis séquencés dans les deux directions.

Par ailleurs l'ensemble des clones de la banque EST composant les séquences d'intérêt présentées dans le rapport, ont fait l'objet d'un re-séquençage systématique.

II.3 Southern blotting

L'ADN génomique (5 µg) des gamétophytes de *C. crispus* a été digéré par plusieurs enzymes de restrictions, utilisées seules ou en couple (*EcoRI*, *HindIII* et *XhoI*), puis séparé par électrophorèse sur un gel d'agarose à 0,8 %. L'ADN présent dans le gel est dénaturé puis transféré sur une membrane de nylon Hybond N+ (Amersham Pharmacia Biotech) par la méthode de Southern (Southern, 1975).

Dans le cas de la NADPH oxydase, un fragment de 556 bp correspondant à la partie N-terminale de Ccrboh, incluant la zone codant pour les sites de fixation du FAD et du NADPH-ribose, a été amplifié à partir d'un clone positif de la banque en utilisant les amorces NOX4 (sens, 5'-TCAGTACGCAGAGGTCCAGGT-3') et NOX5 (antisens, 5'-GGCATCGACCATCTCCACTTC-3'). Cette sonde spécifique a ensuite été marquée par la fluorescéine-11-dUTP en utilisant le kit GeneImages™ Random Primed Labelling kit (Amersham-Biosciences). 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 luminescence émise a été réalisée selon les instructions du fournisseur et à l'aide du STORM840 (Molecular Dynamics).

Dans le cas des glutathion S-transférases, une sonde de 692 pb pour *Ccgst1* a été amplifiée en utilisant les amorces Ccgst1-3 (sens, 5'-CCTCGTATTTCCGTCACTAT-3') et Ccgst1-4 (antisens, 5'-CGGGCACAGCACGTGTTGTTA-3'). Une sonde de 354 pb pour *Ccgst2* a été amplifiée en utilisant les amorces Ccgst2-3 (sens, 5'-TGACGTCACCCACGCCATGTA-3') et Ccgst2-4 (antisens, 5'-ACGCTGACATCGCTACGAAAACA-3'). Une sonde de 545 pb pour *Ccgst7* a été amplifiée en utilisant les amorces Ccgst7-3 (sens, 5'-CCTTGCTCTGTCTGACGCACAAA-3') et Ccgst7-4 (antisens, 5'-CACTCTCCCACATGGTGCACATT-3'). L'amplification a porté sur les clones positifs correspondants. Ces sondes spécifiques ont ensuite été marquées à la phosphatase alcaline en utilisant le kit Gene Images AlkPhos Direct Labelling and Detection system (Amersham-Biosciences). Les hybridations ont été réalisées en conditions stringentes, sur

la nuit à 65°C. Le premier lavage a également été réalisé à 65°C. Les deux solutions de lavage sont fournies par le kit ; la détection de la fluorescence émise a été réalisée selon les instructions du fournisseur et à l'aide du STORM840 (Molecular Dynamics).

II.4 Analyses transcriptionnelles

II.4.1 Northern blotting

Les échantillons d'ARN totaux (15 µg) sont déposés pour migration sur un gel dénaturant agarose-formaldéhyde à 1,2 %. Le gel est ensuite transféré sur une membrane de nylon Hybond N+ (Amersham Pharmacia Biotech). Les mêmes fragments nucléotidiques que ceux présentés pour les analyses par Southern blotting furent utilisés pour la synthèse de sondes de *Ccrboh*, *Ccgst1*, *Ccgst2* et *Ccgst7*. Dans le cas des myéloperoxydases, une sonde de 396 pb pour *CcMPO1* a été amplifiée en utilisant les amorces CcMPO1-1 (sens, 5'-CCATCGCCAAGACGCATTTCTAA-3') et CcMPO1-2 (antisens, 5'-TGAGGCGAGCGTTGTTGAGGAT-3'), une sonde de 558 pb pour *CcMPO2* a été amplifiée en utilisant les amorces CcMPO2-1 (sens, 5'-GCCATGGCCCACTCCTCTATTCTA-3') et CcMPO2-2 (antisens, 5'-GAAGCGAAGCTGTCCTCCCGTTAT-3'), une sonde de 458 pb pour *CcMPO3* a été amplifiée en utilisant les amorces CcMPO3-1 (sens, 5'-CGGGCGTTGATATCGAGAGACCTA-3') et CcMPO3-2 (antisens, 5'-CCAGAACATCAGGTCGCGTCGTA-3'). Dans le cas de la peroxiredoxine *CcPrx1*, une sonde de 596 pb a été amplifiée en utilisant les amorces CcPrx1-1 (sens, 5'-TGGTACCGAGGCATACAGCAAGTT-3') et CcPrx1-2 (antisens, 5'-CCTTGTGCTTGGGGAAGTGCTT-3'). Dans le cas des cytochromes P450, une sonde de 502 pb pour *CcCYPt1* a été amplifiée en utilisant les amorces CcCYPt1-1 (sens, 5'-CAGCTTTCTAGTCGCGGGTCAA-3') et CcCYPt1-2 (antisens, 5'-GGTTCCGCACGACAATAACATGTT-3'), une sonde de 579 pb pour *CcCYPp1* a été amplifiée en utilisant les amorces CcCYPp1-1 (sens, 5'-CGTCGAGACCGTCATTGACAAGA-3') et CcCYPp1-2 (antisens, 5'-CACTTCCTCGAGCTCCTGCTGAA-3'). Une sonde spécifique de l'actine de *C. crispus* fut également utilisée à la fois comme témoin de charge et contrôle de l'intégrité des échantillons : une sonde de 275 pb a été amplifiée en utilisant les amorces Act1 (sens, 5'-AATCATCATGTGCGAAGCCC-3') et Act2 (antisens, 5'-AGTAGAAGGCATGGGACC-3').

Ces sondes ont ensuite été radio-marquées par du [α -³²P]-dCTP en utilisant le kit ReadyPrime™ Random Primed DNA Labelling kit (Amersham-Biosciences).

L'hybridation est réalisée sur la nuit à 42°C, puis les membranes sont lavées quatre fois à 42°C avec un premier lavage avec du 2 × SSC, 0,5 % SDS pendant 30 min, puis deux fois avec du 1 × SSC, 0,1 % SDS pendant 20 min, puis un dernier lavage avec du 0,2 × SSC, 0,1 % SDS pendant 15 min.

II.4.2 RT-PCR quantitative

L'ARN total, extrait comme décrit précédemment, est quantifié en moyennant les résultats de trois dosages spectrophotométriques puis est soumis à électrophorèse en gel d'agarose pour vérifier son intégrité et l'absence de contaminants d'ADN génomique. L'ARN total (4,2 µg) est ensuite rétro-transcrit en ADNc en utilisant le kit Superscript II RT kit (Invitrogen) et selon les recommandations du fournisseur. La qualité des ADNc est ensuite contrôlée par électrophorèse en gel d'agarose.

Les expériences de PCR quantitative sont réalisées avec un système de détection GeneAmp 5700 (Applied Biosystems) en utilisant le kit SYBR Green PCR master kit (Applied Biosystems) et selon les recommandations du fournisseur.

La pertinence des amorces, utilisées pour les réactions, a été contrôlée en utilisant le logiciel Primers Express 1.0 (Applied Biosystems). Les amorces spécifiques du gène *Ccrboh* sont les suivantes : NOX6 (sens, 5'-CCCCAAGGCTTTCAGTTACCA-3') et NOX7 (antisens, 5'-GGTGCCACTCACGGTTAATGA-3'), permettant la génération d'un amplicon de 73 pb. Dans le cas des glutathion S-transférases, un amplicon de 70 pb est généré pour *Ccgst1* en utilisant les amorces Ccgst1-5 (sens, 5'-GGACTACCATCCCACCTCGTATT-3') et Ccgst1-6 (antisens, 5'-AGCTTAAGTTCAGAAGACGGCATT-3'), un amplicon de 68 pb est généré pour *Ccgst2* en utilisant les amorces Ccgst2-5 (sens, 5'-GCCGTCGGAGGTAACATGAC -3') et Ccgst2-6 (antisens, 5'-CCGCACCTGATATTAGTGACCAA -3'), un amplicon de 67 pb est généré pour *Ccgst7* en utilisant les amorces Ccgst7-5 (sens, 5'-CCAGTCCTGCTGGCTTATGTAGA-3') et Ccgst7-6 (antisens, 5'-CGTCGCCAAACACCCTCTTA-3'). L'actine est utilisé comme gène de normalisation, les amorces utilisées sont les suivantes : Act3 (sens, 5'-CCGCCGTGGTGTTCAT -3') et Act4 (antisens, 5'-ATCTTCTCCATGTCGTCACAGTT -3'), permettant la génération d'un amplicon de 75 pb. La qualité des amorces est vérifiée au préalable en réalisant une amplification par PCR classique sur les ADNc et l'ADN génomique, afin de vérifier à la

fois leur capacité à amplifier les fragments aux tailles attendues et l'absence d'amplification d'une zone intronique sur l'ADN génomique.

Les 40 cycles de PCR qui suivent la première étape de 10 min de dénaturation à 95°C, se décomposent en une étape de 15 s de dénaturation à 95°C et une étape d'hybridation-élongation de 60 s à 60°C. Afin de générer une courbe de standardisation, nous utilisons l'ADN génomique de *C. crispus* en tant que matrice de référence. Des aliquotes de 5 dilutions en série de l'ADN génomique sont utilisées comme standard à chaque étape de la PCR quantitative. Connaissant la masse du génome des gamétophytes de *C. crispus* (0,16 pg) et en considérant qu'il n'existe qu'une copie de gène par génome, il est possible de déterminer le nombre de copies de gène, en équivalents génome, présent dans chaque dilutions. Ces valeurs sont ensuite utilisées comme référence pour déterminer le nombre de copies présentes dans chaque échantillon d'ADNc testé (Tableau 4) (Charrier *et coll.*, 2002).

Quantité d'ADN par puits	0,16 pg	0,1 ng	0,4 ng	1,6 ng	6,3 ng	25 ng
Nombre de copies simple brin (équivalents génome)	1	610	2441	9766	39063	156250

Tableau 4 : Gamme d'étalonnage réalisée pour les expériences de PCR quantitative

Le système GeneAmp 5700 mesure la fluorescence émise et détermine pour chaque gène étudié et d'après les droites étalon obtenues, le nombre de copies en équivalents génome dans les échantillons testés. Une réaction sans matrice est réalisée pour déterminer le bruit de fond résiduel. L'actine est utilisée en tant que standard interne et gène de normalisation. La spécificité de l'hybridation des amorces est vérifiée en déterminant la courbe de dissociation en fin de PCR, leur efficacité est calculée d'après la pente des droites étalons.

Chaque traitement chimique est répété au moins deux fois de façon indépendante. Pour chaque expérience, les valeurs d'au moins deux mesures sont moyennées pour chaque échantillon. Pour standardiser les données, dans un premier temps le rapport entre le niveau d'expression du gène considéré et celui de l'actine est calculé pour chaque échantillon (rapport r). Dans un deuxième temps le rapport r de l'échantillon est rapporté au rapport r du témoin non traité correspondant (rapport R). Le changement du niveau d'expression des gènes est exprimé en x-fois de variation par rapport au contrôle correspondant pour chaque échantillon.

III. Analyses bioinformatiques des séquences

III.1 Banques de données publiques

Les homologues des séquences obtenues chez *Chondrus crispus* ont été recherchés dans diverses banques de données publiques, et tout d'abord chez les algues avec notamment la macroalgue rouge *Porphyra yezoensis* (banque EST disponible à <http://www.kazusa.or.jp/en/plant/porphyra/EST/>), l'algue rouge unicellulaire *Cyanidioschyzon merolae* (génomme accessible à <http://merolae.biol.s.u-tokyo.ac.jp/>), les diatomées *Phaeodactylum tricornutum* et *Thalassiosira pseudonana* (respectivement banque EST et génome accessibles à <http://avesthagen.sznbowler.com/> et <http://genome.jgi-psf.org/thaps1/thaps1.home.html>), et l'algue verte unicellulaire *Chlamydomonas reinhardtii* (banque EST disponible à <http://www.kazusa.or.jp/en/plant/chlamy/EST/index.html> et génome accessible à <http://genome.jgi-psf.org/Chlre3/Chlre3.home.html>). En interne nous avons également plusieurs banques EST disponibles sur les algues brunes *Laminaria digitata*, *Laminaria japonica* et *Fucus distichus* ; sur les algues rouges *Gracilaria gracilis* et *Gracilaria lemaneiformis*, sur la diatomée *Fragilariopsis cylindrus*. Nous avons également accès au génome de l'algue verte unicellulaire *Ostreococcus tauri*. En dehors des algues, les banques généralistes ont également été interrogées (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, <http://www.rcsb.org/pdb/Welcome.do>).

III.2 Alignements

Pour un nombre de séquences restreint les alignements de séquences protéiques ont été réalisés en utilisant le programme Mafft (Kato et coll., 2002) qui peut être interrogé en ligne à l'adresse <http://bioinformatics.uams.edu/mafft/>. Pour un nombre plus important de séquences (cas des études phylogénétiques des glutathion S-transférases), le logiciel Muscle (Edgar, 2004) a été utilisé. Les différents alignements ainsi générés sont ensuite systématiquement retravaillés à la main.

Les différents alignements présentés dans le manuscrit ont été édités avec le programme ESPrIt 2.2-ENDscript 1.0 qui est disponible en ligne à l'adresse <http://espript.ibcp.fr/ESPrIt/cgi-bin/ESPrIt.cgi> (Gouet et coll., 1999).

III.3 Profils d'hydropathie

Les profils d'hydropathie déterminés pour les différents homologues de la NADPH oxydase ont été réalisés en utilisant l'algorithme Kyte-Doolittle (Kyte et Doolittle, 1982), avec une fenêtre de 19, à l'adresse :

http://occawlonline.pearsoned.com/bookbind/pubbooks/bc_mcampbell_genomics_1/medialib/activities/kd/kyte-doolittle.htm.

III.4 Phylogénie

Les analyses phylogénétiques en Neighbor Joining et parcimonie ont été réalisées à l'aide du logiciel Phylowin (Galtier N *et coll.*, 1996). Les analyses en maximum de vraisemblance ont été réalisées avec le programme Phylm (Guindon *et coll.*, 2005) exécutable en ligne à l'adresse <http://atgc.lirmm.fr/phylm/>. Les arbres ont ensuite été édités dans ATV (Zmasek et Eddy, 2001) et/ou TreeView (Page, 1996).

Concernant la NADPH oxydase et ses homologues, des analyses phylogénétiques portant sur les séquences pleine longueur ou uniquement sur les sites catalytiques de 42 séquences ont été réalisées. Les analyses phylogénétiques par neighbor joining et maximum de parcimonie ont été réalisées en utilisant la matrice PAM et le mode de gestion des gaps *global gap removal* (retrait total des gaps). Dans le cas des séquences pleine longueur avec la méthode du Neighbor Joining, 292 sites ont été identifiés comme informatifs. L'arbre consensus obtenu a été réalisé en utilisant 1 000 valeurs de bootstraps. Dans le cas d'un alignement portant uniquement sur les sites catalytiques (domaines transmembranaires 3 et 5 impliqués dans la fixation de l'hème, sites de fixation du FAD, du NADPH-ribose et du NADPH-adénine) avec la méthode du neighbor joining, 215 sites informatifs ont été répertoriés ; l'arbre consensus obtenu a été réalisé avec 500 valeurs de bootstraps. En parcimonie, à partir des sites catalytiques, 199 sites informatifs ont été répertoriés et l'analyse a portée sur 500 valeurs de bootstraps. L'arbre consensus obtenu avec la méthode du maximum de vraisemblance a été réalisé en utilisant l'alignement des sites catalytiques, avec la matrice JTT et 100 valeurs de bootstraps.

Concernant les glutathion S-transférases, 76 séquences pleine longueur ont été alignées en utilisant le programme Muscle (Edgar, 2004). Des membres représentatifs de

chaque classe connue de GST ont été sélectionnés à partir des banques de données publiques, excepté ceux de la classe microsomale et ceux de la classe kappa. Ces deux classes sont déjà connues pour être extrêmement divergentes : les GST microsomaux sont désormais classées dans une autre super-famille de protéines dénommée MAPEG pour *membrane-associated proteins in eicosanoid and glutathione metabolism*, tandis que les enzymes mitochondriales de la classe kappa représentent un type distinct de GST avec une hélice α supplémentaire à la suite du motif $\beta\alpha\beta$ (Hayes *et coll.*, 2005). De ce fait ces deux classes d'enzymes ont été exclues de l'analyse. En revanche des membres des classes récemment identifiées Gamma (Cha *et coll.*, 2002), Rho (Konishi *et coll.*, 2005) et Nu (Schuller *et coll.*, 2005) ont été pris en compte dans cette étude. L'alignement complet a ensuite été analysé par les méthodes du neighbor joining et du maximum de parcimonie, en utilisant la matrice PAM, et le mode *global gap removal* et 500 valeurs de bootstraps.

Les séquences utilisées pour générer les arbres sont les suivantes (organisme, numéro d'accèsion dans GeneBank) : RnGSTA2 (*Rattus norvegicus*, P04903), MmGSTA3 (*Mus musculus*, NP_034486), HsGSTA1 (*Homo sapiens*, NP_665683), DrGSTA2 (*Danio rerio*, NP_998559), GgGSTA4 (*Gallus gallus*, NP_990149), GgGSTS1 (*Gallus gallus*, CAA07005), MmGSTS1 (*Mus musculus*, NP_062328), RnGSTS1 (*Rattus norvegicus*, NP_113832), CfGSTS1 (*Canis familiaris*, XP_535659), HsGSTS1 (*Homo sapiens*, CAG46480), HcGSTN (*Haemonchus contortus*, AAF81283), AcGSTN (*Ancylostoma caninum*, AAT37718), HpGSTN (*Heligmosomoides Polygyrus*, pdb accession number 1TW9), NdGSTN (*Nematospiroides dubius*, AAF36480), CeGSTG1 (*Cunninghamella elegans*, AAL02368), CeGSTG2 (*Cunninghamella elegans*, AAL02369), MmGSTM4 (*Mus musculus*, AAH30444), MfGSTM2 (*Macaca fascicularis*, AAF08540), MmGSTM3 (*Mus musculus*, AAH44927), BtGSTM1 (*Bos taurus*, AAI02051), HsGSTM5 (*Homo sapiens*, NP_000842), BtGSTP (*Bos Taurus*, AAI02705), HsGSTP1 (*Homo sapiens*, NP_000843), MmGSTP2 (*Mus musculus*, AAH64781), RnGSTP (*Rattus norvegicus*, NP_036709), MmGSTP1 (*Mus musculus*, AAH61109), HiGSTB (*Haemophilus influenzae*, AAC21788), OaGSTB (*Ochrobactrum anthropi*, CAA76728), PmGSTB (*Proteus mirabilis*, P15214), EcGSTB (*Escherichia coli*, AAC74707), AgGSTD2 (*Anopheles gambiae*, CAA96104), AgGSTD1-5 (*Anopheles gambiae*, CAB03592), DmGSTD4423 (*Drosophila melanogaster*, AAF54791), DmGSTD1 (*Drosophila melanogaster*, AAB26519), SsGSTD (*Sarcoptes scabiei*, AAV65948), AgGSTE1 (*Anopheles gambiae*, AAL59658), AaGSTE2 (*Aedes aegypti*, AAV68398), DmGSTE17534 (*Drosophila melanogaster*, AAF57693), DmGSTE17522 (*Drosophila melanogaster*, AAF57702),

PpGSTR (*Pleuronectes platessa*, CAA45293), PmGSTR1 (*Pagrus major*, BAD98443), MsGSTR (*Micropterus salmoides*, AAQ91198), EeGSTT1 (*Euphorbia esula*, AAF64449), OsGSTT1 (*Oryza sativa*, AAK98534), AtGSTT10 (*Arabidopsis thaliana*, CAA10457), HsGSTT2 (*Homo sapiens*, NP_000845), RnGSTT2 (*Rattus norvegicus*, AAH61856), MmGSTT1 (*Mus musculus*, CAA66665), MmGSTT3 (*Mus musculus*, NP_598755), HsGSTT1 (*Homo sapiens*, AAL31549), ZmGSTF3 (*Zea mays*, CAA29929), AtGSTF4 (*Arabidopsis thaliana*, CAB80745), NtGSTF1 (*Nicotiana tabacum*, A41789), NtGSTF2 (*Nicotiana tabacum*, P46440), MmGSTZ1 (*Mus musculus*, AAH31777), GgGSTZ1 (*Gallus gallus*, XP_421288), HsGSTZ1 (*Homo sapiens*, NP_665877), BnGSTZ (*Brassica napus*, AAO60042), OsGSTZ1 (*Oryza sativa*, AAG32474), OsGSTZ2 (*Oryza sativa*, AAK98533), TtGSTL (*Triticum aestivum*, CAA76758), OsGSTL (*Oryza sativa*, XP_493844), AtGSTL (*Arabidopsis thaliana*, CAB86032), PsGSTL (*Pisum sativum*, BAC81649), GmGSTL (*Glycine max*, AAG34872), CeGSTO1 (*Caenorhabditis elegans*, AAA27959), TrGSTO (*Takifugu rubripes*, AAL08414), HsGSTO1 (*Homo sapiens*, CAD97673), MmGSTO1 (*Mus musculus*, NP_034492), PtGSTU (*Pinus tabuliformis*, AAY64044), TaGSTU4 (*Aegilops tauschii*, AAM89393), OsGSTU3 (*Oryza sativa*, AAQ02687), OsGSTU17 (*Oryza sativa*, XP_450940), CmGSTU3 (*Cucurbita maxima*, BAC21263).

III.5 Prédiction de la structure tridimensionnelle de CcGST1

La structure tridimensionnelle de CcGST1 a été prédite en utilisant le programme Swiss-Model (Peitsch, 1996), accessible en ligne à l'adresse : <http://swissmodel.expasy.org/> et en utilisant comme modèle la structure connue de la GST sigma humaine à activité prostaglandine synthase HsGSTS, de numéro pdb 1IYI. L'image tri-dimensionnelle est ensuite éditée dans Swiss-Pdb viewer version 3.7 (Guex et Peitsch, 1997).

IV. Analyses biochimiques

IV.1 Analyse de protéines sauvages

IV.1.1 Extraction des protéines de *C. crispus*

Pour l'extraction des protéines totales de *C. crispus* les tissus congelés sont broyés en une fine poudre dans l'azote liquide reprise dans un tampon d'extraction à raison de 0,5 g d'algue.mL⁻¹, contenant 50 mM Tris-HCl pH9,5, 500 mM KCl, 10 mM β-mercaptoéthanol et les anti-protéases suivantes : 2 mM PMSF, 1 µg.mL⁻¹ aprotinine, 0,5 µg.mL⁻¹ leupeptine. L'extrait est homogénéisé par agitation à 4°C pendant une heure, puis centrifugé 30 min à 10 000 g à 4°C. Le surnageant récupéré constitue l'extrait protéique total.

Pour l'extraction des protéines membranaires de *C. crispus* les tissus congelés sont broyés en une fine poudre dans l'azote liquide reprise dans un tampon d'extraction à raison de 0,5 mL.g⁻¹, contenant 50 mM Tris-HCl pH9,5, 500 mM KCl, 15 mM MgCl₂, 1 mM DTT et un les anti-protéases suivantes : 2 mM PMSF, 1 µg.mL⁻¹ aprotinine, 0,5 µg.mL⁻¹ leupeptine. L'extrait est homogénéisé par agitation à 4°C pendant 30 min, puis filtré sur un filtre stérile d'une porosité de 100 µm avant d'être centrifugé 10 min à 10 000 g à 4°C. Le surnageant récupéré est centrifugé à nouveau 45 min à 45 000 g puis le culot est resuspendu à l'aide d'un pinceau fin dans un tampon contenant 50 mM Tris-HCl pH7,5, 250 mM sucrose, 20 mM KCl, 15 mM MgCl₂, 1 mM DTT et les anti-protéases suivantes : 2 mM PMSF, 1 µg.mL⁻¹ aprotinine, 0,5 µg.mL⁻¹ leupeptine. L'extrait obtenu constitue l'extrait membranaire.

IV.1.2 Dosage de protéines

Le dosage des protéines est réalisé selon la méthode de Bradford ([Bradford, 1976](#)) par mesure de l'absorbance à 595 nm. Le réactif de dosage est une forme anionique du bleu de Coomassie qui se fixe préférentiellement aux protéines par interactions avec leurs groupements cationiques. Une gamme étalon est réalisée au préalable sur de la sérum albumine bovine.

IV.1.3 Electrophorèses PAGE et PAGE-SDS

Les tests d'activité NADPH oxydase sont réalisés après électrophorèse des extraits protéiques en gel d'acrylamide PAGE à 9 %. La détection des activités NADPH oxydase utilise une méthode de réduction du NBT (nitro-blue tétrazolium) selon la méthode publiée par Sagi et Fluhr (2001).

Pour l'analyse d'extraits protéiques totaux et coloration au bleu de Coomassie, la migration est réalisée sur un gel d'acrylamide PAGE-SDS à 9 %. Les échantillons sont préalablement incubés dans un tampon de charge dénaturant 5 min à 100°C.

IV.1.4 Immunodétection de la NADPH oxydase chez *C. crispus*

IV.1.4.1 Obtention des anticorps primaires

Connaissant la séquence protéique putative de Ccrboh, deux peptides spécifiques de cette séquence furent synthétisés pour l'obtention d'anticorps primaires spécifiques (Eurogentec). Le premier anti-peptide est dirigé contre un fragment compris entre les acides aminés 280 et 295 qui correspond au site de fixation du FAD, de séquence H₂N-WHPFTIASAPQDKTMC-COOH. Le second anti-peptide est dirigé contre un fragment compris entre les acides aminés 489 et 504 situé au niveau de la zone d'insertion cytosolique des algues rouges, de séquence H₂N-DIKNSANARRGNRERL-COOH. Ces peptides ont été inoculés à des lapins pour l'obtention d'anticorps spécifiques qui ont ensuite été purifiés (Eurogentec).

IV.1.4.2 Obtention des protoplastes

A l'aide d'une lame de rasoir, les gamétophytes de *C. crispus* sont réduits en multiples fragments de moins d'1 mm puis incubés à 20°C sous légère agitation dans une solution de pré-incubation contenant un chélateur de potassium. Après 20 min, le milieu est éliminé et remplacé par le milieu de digestion contenant de la cellulase et des ι - et κ -

carraghénases. La digestion se fait sur la nuit à 13°C et sous légère agitation. Les protoplastes sont récupérés par filtrations successives sur filtres de nylon, repris avec un volume d'eau de mer contenant 0,35 M de sorbitol, puis centrifugés 10 min à 4°C à 150 g. Le culot de protoplastes est repris dans un tampon d'extraction de protéines totales.

IV.1.4.3 Western-blotting et détection

Les protéines des différents extraits sont séparées sur un gel dénaturant PAGE-SDS comme décrit précédemment. Après la migration le gel est démoulé et immergé dans le tampon de transfert contenant 25 mM Tris-HCl, 0,2 M glycine, 20 % méthanol, avec la membrane Hybond™-ECL (Amersham) pendant 20 min. Le transfert des protéines présentes dans le gel vers la membrane 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 sont dilués dans ce même tampon du 1/100^{ème} au 1/500^{ème} pour les anticorps purifiés, et du 1/2500^{ème} au 1/5000^{ème} pour les anticorps non purifiés, puis incubés avec la membrane sur la nuit à 4°C et sous agitation. Le lendemain, la membrane est rincée brièvement puis lavée 4 fois 15 min avec ce même tampon. Elle est ensuite incubée 1 heure à température ambiante dans l'anticorps secondaire, couplé à la peroxydase HRP, dilué au 1/5000^{ème} 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 H₂O₂ utilisés permettent, en présence de la peroxydase, la production d'une émission lumineuse qui va exciter les films photographiques. Ceux-ci sont ensuite développés de façon classique.

IV.2 Expression hétérologue et caractérisation de protéines recombinantes

IV.2.1 Expression hétérologue

Les séquences nucléotidiques contenant les parties codantes des transcrits *Ccgst2* et *Ccgst7* ont été amplifiées par PCR en utilisant les amorces suivantes (les sites de restriction sont soulignés) :

Ccgst2-7 5'-
GGGGGGGGATCCCCGGAAATCAAGCTCACCTACTTC-3' et Ccgst2-8 5'-
CCCCCGAATTCTTACGAAAACATCTTCACCGGCTTCTT-3' pour CcGST2,
Ccgst7-7 5'-GGGGGGGGATCCGCTTCGTCCACCCTCCTCACC-3' et Ccgst7-8 5'-
CCCCCGAATTCTTACAACCTTCCGTCGCCAAACACCC-3' pour CcGST7.

Ces amorces possèdent la même température d'hybridation (70°C) et incorporent un site de restriction *BamHI/EcoRI* au niveau respectivement des parties 5' et 3' non-codantes. Les conditions d'amplification par PCR se décomposent en une dénaturation initiale de 5 min à 94°C, suivie de 30 cycles de 30 s à 94°C, 30 s à 50°C et 6 min à 72°C, puis d'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, qui est un vecteur pET15 (Novagen) modifié contenant également la séquence codant le tag histidine en N-terminal.

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⁻¹), sous agitation et à 37°C. La culture est ensuite diluée au 1/100^{ème} dans le milieu auto-inductif ZYP (Studier, 2005) contenant de l'ampicilline (100 µg.mL⁻¹), puis remise à incubée à 20°C sous agitation, jusqu'à la phase plateau de la courbe de croissance (densité stable).

IV.2.2 Purification sur colonne de nickel et dialyse

Les bactéries, contenant le plasmide recombinant, sont récoltées après culture, puis centrifugées 10 min à 5 000 g pendant 10 min. 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). Les cellules sont lysées par une presse de French. La fraction insoluble est

culottée par centrifugation à 20 000 g pendant 90 min à 4°C. Les protéines du surnageant sont chargées sur une colonne de sépharose (10 mL) préalablement activée avec 100 mM de NiSO₄ et équilibrée dans du tampon A, selon les instructions du fournisseur, et en utilisant un système ÄKTA-FPLC (Amersham Biosciences). Après un premier lavage au tampon A, l'élution est réalisée à raison de 1 mL.min⁻¹, et selon un gradient linéaire de 60 mM à 300 mM d'imidazole, en utilisant un mélange du tampon A et d'un tampon Tris-HCl pH7,5, 300 mM NaCl, 300 mM imidazole (tampon B). La protéine purifiée et éluee est collectée puis dialysée 18 heures à 4°C contre un tampon C contenant 20 mM Tris-HCl pH7,5, 100 mM NaCl, 1mM EDTA, 1 mM DTT. Du glycérol est ensuite ajouté à la fraction protéique purifiée à raison d'une concentration finale de 20 % (v/v) avant le stockage a -80°C.

A chaque étape de purification le profil en protéines totales est vérifié sur gel dénaturant SDS-PAGE à 12 % coloré au bleu de Coomassie. La concentration finale de la protéine purifiée est déterminée selon la méthode de Bradford (Bradford, 1976).

IV.2.3 Chromatographie d'exclusion de taille

La masse moléculaire apparente de la protéine recombinante purifiée est évaluée par chromatographie d'exclusion de taille en utilisant une colonne Superdex 200 avec le système ÄKTA (Amersham). La colonne est équilibrée avec un tampon 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 100 mM NaCl. Les échantillons sont élués à raison de 0,5 mL.min⁻¹. Les masses moléculaires des standards utilisés pour la calibration sont : l'anhydrase carbonique, 29 kDa, la sérum albumine bovine, 66 kDa, l'alcool déshydrogénase, 150 kDa, la β-amylase, 200 kDa, l'apoferritine, 443 kDa, la thyroglobuline, 669 kDa et le bleu dextran, 2 000 kDa.

IV.2.4 Tests enzymatiques pour les activités transférases et peroxydases

Les dosages enzymatiques des glutathion S-transférases recombinantes sont réalisés en utilisant un lecteur de microplaques Sapphire (Tecan). Les réactions spontanées sont systématiquement mesurées et soustraites des réactions enzymatiques correspondantes. Les activités sont déterminées à 30°C. Le glutathion est dissous dans l'eau distillée, les autres substrats sont dissous dans l'éthanol. La concentration finale en éthanol dans le milieu

réactionnel est de 2 % (v/v). L'enzyme purifiée est diluée à une concentration finale de 8 à 40 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ dans un tampon 20 mM Tris-HCl pH7,5, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, additionné de glycérol à une concentration finale de 20 % (v/v). Les essais sont donc réalisés en présence de 2 % de glycérol (v/v).

Sauf indications contraires, le dosage de l'activité glutathion transférase est classiquement réalisé dans une solution contenant 100 mM de tampon phosphate, 1 mM de glutathion (GSH) et 1 mM du second substrat. Les mesures sont réalisées aux longueurs d'onde et aux pH suivants : 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (Sigma), 340 nm ($\Delta\epsilon = 9\ 600\ \text{M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) et pH6,5 ; 1-bromo-2,4-dinitrobenzene (Sigma), 340 nm ($\Delta\epsilon = 9\ 600\ \text{M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) et pH6,5 ; 1-fluoro-2,4-dinitrobenzene (Sigma), 340 nm ($\Delta\epsilon = 9\ 600\ \text{M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) et pH6,5 ; 1-iodo-2,4-dinitrobenzene (Sigma), 340 nm ($\Delta\epsilon = 9\ 600\ \text{M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) et pH6,5 ; para-nitrobenzoyl chloride (Sigma), 310 nm ($\Delta\epsilon = 1\ 900\ \text{M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) et pH6,5 ; acide éthacrinique à 0,2 mM avec 0,2 mM de GSH, 270 nm ($\Delta\epsilon = 5\ 000\ \text{M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) et pH6,5 ; trans-4-phenyl-3-buten-2-one à 0,2 mM avec 0,2 mM de GSH, 290 nm ($\Delta\epsilon = -24\ 800\ \text{M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) et pH6,5 ; para-nitrophenyl acetate à 0,3 mM avec 0,5 mM de GSH, 400 nm et pH7,0.

L'enzyme (0,2-1 μg) est préalablement incubée 2 min dans le mélange réactionnel (240 μL) et les mesures sont relevées toutes les 20 s pendant 10 min après l'addition du second substrat.

L'activité peroxydase dépendante du glutathion de la protéine recombinante est mesurée avec 1 mM de cumene hydroperoxide, 1 mM de t-butyl hydroperoxide (Sigma), et 0,1 mM de chaque hydroperoxyde d'acides gras polyinsaturés testés : l'acide 13S-hydroperoxy-9Z,11E-octadecadiénoïque, 13(S)-HpODE ; l'acide 13S-hydroperoxy-9Z,11E,15Z-octadecatriénoïque, 13(S)-HpOTE ; l'acide 12-hydroperoxy-5Z,8Z,10E,14Z-éicosatétraénoïc, 12(+/-)-HpETE ; et l'acide 15S-hydroperoxy-5Z,8Z,11Z,13E-éicosatétraénoïque, 15(S)-HpETE (Cayman Chemicals). Le milieu réactionnel contient 0,2 mM de NADPH, 1 mM de GSH et 0,25 unités de glutathion réductase dans 100 mM de tampon phosphate pH7,0. 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'absorption utilisé pour l'oxydation du NADPH à 340 nm est de $6\ 220\ \text{M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$.

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 $\mu\text{mol}.\text{min}^{-1}$ par mg d'enzyme. L'acide étacrinique, le trans-4-phenyl-3-buten-

2-one, le para-nitrophenyl acetate et le cumene hydroperoxide nous ont généreusement été fournis par Fabrice Morel (U620 Inserm, Rennes, France).

IV.2.5 Effets du pH et de la température

Le pH optimal de l'enzyme recombinante 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 pH6,5 classiquement utilisés ont été 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 ; Tris-HCl, pH 8,5 à 9,0 ; glycine-NaOH, pH 9,5 à 10,5.

Pour les tests d'inactivation par la chaleur, l'enzyme a préalablement été incubée 10 min à chaque température testée, à une concentration de $24 \mu\text{g.mL}^{-1}$ dans un tampon 20 mM Tris-HCl pH7,5, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT contenant du glycérol à une concentration finale de 20 % (v/v), puis incubée sur glace. L'activité résiduelle a par la suite été mesurée selon le dosage spectrophotométrique classique au CDNB décrit précédemment.

IV.2.6 Détermination des paramètres cinétiques

Le K_m apparent pour le glutathion a été déterminé en utilisant une concentration en GSH de 0,02 mM à 2 mM en présence d'une concentration fixe de 2 mM de CDNB. Les paramètres cinétiques ont été calculés selon la méthode de Lineweaver et Burk.

IV.3 Etudes cristallographiques de la protéine CcGST2 recombinante

Les micro-cristaux de CcGST2 ont été obtenus par la méthode de diffusion en phase vapeur utilisant la technique des gouttes suspendues. Les gouttes sont constituées de 1 μL de tampon de cristallisation avec 1 à 3 μL d'enzyme CcGST2, concentrée à 1,6 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ dans un tampon 20 mM Tris-HCl pH7,5, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 5 % (v/v) glycérol. L'enzyme est déposée seule ou en présence de 0,3 mM de GSH, ou en présence de GSH et CDNB à 0,3 mM chacun.

Les PEG 8000 et MME 5000 ont été utilisés comme précipitants à raison de 16 % à 34 %, dans un tampon 0,1 M Mes pH6,0, Mes pH6,5 ou Caco pH6,5, et en présence de 0,2 M de sulfate d'ammonium. La présence d'additifs tels que le glycérol et l'isopropanol, à raison de 3 %, a également été testée. Des volumes de 200 à 500 μL de tampon de cristallisation ont été testés.

Les boîtes d'échantillonnage sont équilibrées à une température constante de 20°C ; les premiers cristaux apparaissent après 2 à 3 semaines.

Chapitre IV -Résultats et discussion

RESULTATS ET DISCUSSION

Chapitre IV -Résultats et discussion

I. Identification et caractérisation de gènes homologues à la NADPH oxydase chez les algues

Au cours de son travail de thèse, Kamal Bouarab (Bouarab, 2000) a pu montrer que l'élicitation de l'algue rouge *Chondrus crispus* par des extraits acellulaires de l'algue verte endophyte *Acrochaete operculata*, conduisait à la génération d'un burst oxydatif. Cette production rapide et massive de formes actives de l'oxygène est similaire à ce que l'on peut observer chez les mammifères et les plantes supérieures. Chez les gamétophytes, l'inhibition de ce burst oxydant par le DPI faisait supposer l'implication d'une enzyme de type NADPH oxydase. Par la suite l'analyse d'une banque d'ADNc d'une autre macroalgue rouge, *Porphyra yezoensis* (Nikaido *et coll.*, 2000 ; Asamizu *et coll.*, 2003) a permis l'identification de 11 EST formant un contig unique et codant visiblement pour une NADPH oxydase. **La découverte de ce transcrit dans les banques de données, apportait la preuve que les macroalgues rouges pouvaient également posséder ces enzymes.** La séquence du transcrit était en revanche incomplète. Compte tenu des précédents résultats obtenus sur le burst oxydatif chez *C. crispus*, la présence d'homologues éventuels au transcrit de *P. yezoensis* chez *C. crispus* a été recherchée. Pour cela le clone de *P. yezoensis* présentant les plus fortes similitudes avec la gp91^{phox} a été entièrement séquencé. Des amorces dégénérées ont ensuite été déterminées par analyse d'alignements multiples. L'utilisation de ces amorces a permis l'obtention d'un fragment de 165 pb par amplification sur de l'ADN génomique de *C. crispus*. Ce fragment présentait également des similitudes de séquences avec des NADPH oxydases. Au cours de son stage post-doctoral, Jonas Collén a entrepris l'amplification et le radio-marquage de ce fragment pour cribler une banque d'ADNc de gamétophytes de *C. crispus*. Au final, ce travail de longue haleine a permis l'identification de 4 clones identiques, dont **l'ADNc de 2 513 pb, codant pour une séquence partielle, présentait de fortes homologues avec la gp91^{phox} de neutrophiles.** Mon travail de thèse a donc débuté par l'obtention et le séquençage de l'ADNc pleine longueur de la NADPH oxydase de *C. crispus*, ainsi que par l'étude du gène et de sa séquence protéique putative. Ce premier chapitre de travail de thèse, présenté ci-après, a donné lieu à la publication d'un article (Hervé *et coll.*, 2006).

I.1 Séquençage de l'ADNc pleine longueur *Ccrboh* chez *Chondrus crispus*

Malgré la présence d'un codon initiateur en amont de la séquence de 2 513 pb préalablement isolée, l'analyse des alignements avec d'autres homologues de NADPH oxydases faisait suspecter que le transcrit était incomplet. D'après ces alignements et en assumant que la séquence de *C. crispus* possède une région N-terminale similaire à ces homologues, une quarantaine d'acides aminés manquaient. De plus aucun codon stop n'était présent sur la partie 5' non-codante, ne nous permettant pas d'affirmer que nous possédions la séquence codante complète. **L'ADNc pleine longueur a été obtenu par la méthode de 5'-RACE PCR.** Le clone isolé par cette méthode possède un insert de 1 014 pb, dont la séquence traduite contient un codon initiateur suivi d'un cadre ouvert de lecture de 702 pb. La région N-terminale nouvellement déterminée s'aligne désormais à celles des homologues de NADPH oxydases. Si aucun codon stop n'est détecté au niveau de la partie 5' non-codante, la présence d'une région promotrice est soupçonnée à ce niveau, avec également un motif de 4 nucléotides (ACTC) répété 13 fois. Cette séquence fut assemblée avec la précédente pour former une séquence nucléotidique finale de 2 708 pb. L'ADNc pleine longueur ainsi obtenu contient un cadre ouvert de lecture de 2 478 pb, avec une extrémité 5' de 76 pb, et une extrémité 3' de 154 pb. Ce transcrit code une **protéine putative de 825 acides aminés**, ayant une masse moléculaire théorique de 93 kDa. Par analogie à la nomenclature déjà utilisée pour répertorier les séquences de NADPH oxydases présentes dans les banques de données ou décrites dans la littérature, **ce transcrit fut dénommé *Ccrboh* pour *Chondrus crispus respiratory burst oxidase homologue*** (Figure 25).

1 CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACGCGGGAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACGCGGGGACACTCACTCATCTACTATTCACTCACTCACTCACT

121 CACTCACTCACTCACTCAATCCTCACCCCAACTCACA**ATG**ATTCCAGATCCAAGCCGACGTGCGCCGTCCAGCGCCGCATCGAGGCATACCTCTCCACCCACGCATTCAAAGTCC

1 M I P R S K P D V A R P S A R I E A Y L S T H A F K V

241 TCTTCTTTGCTTCTATAGGCGCGCGTCACCCCTCATGTTCCGCTTGGGGTTCAAGCCGAGTTCACCTTCGAGGACAACTTCGACATGCCCACTTCAACACCCGCTCGTTGGTTCATCG

28 L F F A F Y G A A V T L M F A W G F K A E F T F E D N F D M P H F N T V R W F I

361 GCATTGCCGCTGGCATGGGTACACCCCTAACTCAACACCGCTTTCGTGATCCTCCTCGCCTCGCGCTGCTTTTACC**AGCTT**CGCGACTCACCCCTCAGCTCGTCTCGCGTTCG

68 G I A R G M G Y T L N L N T A F V I L L A S R L L F T K L R D S P L Q L V L P F F

481 ATGCAGCTTTCGGGGCCCTCCACATCGTCGTCGGGTACACCATCTCTTTGCGCTTCTCGTCCATGGTTCCTCCATTTCGTCGGCTCATACCTGGGATGCCTGGACTTGGGGCCCTCT

108 D A A F P A L H I V V G Y T I F F A V L V H G S F H F V W L I T W D A W T W G L

601 GGAGCTTCAACATGAGCGTCATCACTGGCTTCTTGCCTCGCCATCGTCTTCGGTACCATGCTGCTTTCGTCGCGCGTCCGTCGTAAGAACAACCTCCGCTCTCTATCGCGTTCATA

148 W S F N M S V I T G F L L A I V F G T M L V L A R P S V R K N N F R L F Y A V H

721 TCATCGCGCCACTTTTTCTTCGGCTCCTCATCATCCACGGTATGTTCCGGCAGGTTCCGTATACCTACAAGTGGGTATTCCCGCTCATCTCAGCCATCGACAGGTTCTCTCC

188 I I G A T L F F G L L I I H G M F R Q V P Y T Y K W V I P P L I L Y A I D R F L

841 GCCGAGGAAGGTATCCGCTGTCGAACCTCTCTCTCCGCTGAGAACGAGTCTCAAGGACGGTGACATCTCGAAGTCCCGAGTCCCAAGGCTTTCAGTTACCAAGCCGCT**CAGTAGC**

228 R R R K V S A V E L F L S A E N A V L K D G D I L E L R V P K A F S Y Q A G Q Y

961 **CAGAGTCCAGTCCCTTCATTAACCGTGAGTGGCACCCCTTCAACATTGCTTCGGCTCCTCAGGACAAGACTATGTGCTTCTACATCAAGCCCTCGGTGACTGGACCAAGGAGCTCC**

268 A E V Q V P F I N R E W H P F T I A S A P Q D K T M C F Y I K A L G D W T K E L

1081 **CGCGCCCTTCCAAGCGCGTGTGACGGTGGCGTCAACCGATTCCCTCCAAGTCAATATCGCGCCGCTACGGCGCCCGCTCAGCAGTCCGCTTACGAGCGAGTCTCTCATCT**

308 R G A F Q A R V D G A V T D S L Q V N I R G P Y G A P A Q H V G L Y E R V V L I

1201 **CGGTGGTATTGGCTTACTCCATTACCTCTATCTGAAGGACTTGCAACCCGCAAGGTCAGGAGAAGCTACAGCGCCACCGGCTTCGAGCCCTTACCTCCACTCTGCTCAAGC**

348 S G G I G S T P F T S I C K D L H H R K V K E N A T S A T G F E P S T S T L L K

1321 **GCATTGAATCCCGCTCAGTACTGCTATCTCTACTTTGTACGGTGTGGACATTCTAATGCCAAGGACATCAATCAGGAAGAGGAGGAGAGGGTCTACCTCGCAACATGCTCAACT**

388 R I E S R V S T A I S T L Y G V D I S N A K D I N Q E E E E K R V Y L A N M L N

1441 **TGACTGCTCTGGTCCGGTCCAGCTCAGGTGAACCCAGGCTCGAAGTGGAGATGGTGCATGC**TCCAAGCAAGTACGAGTCTTCTCCGACTCTGACCCGACACCTCGATGG

428 L T A P G S G S S S G E T T E L E V E M V D A S K Q A D E S S S D S D R S T S M

1561 AGTCTTACAACGCAAGCAATGCTCCGTAAGCAAGGATGAGGAATACATCTCGATGACATCA**GAAATTC**TGCCAACGACGCGCTGGAACCGGTGAACGCTCTCTCCCACTTGTATG

468 E S Y N V K N M L R K E Q D E E Y I L D D I K N S A N A R R G N R E R L S H L Y

1681 AAGCCGCTCCAAGGTGCTGGAGTCTCCATACCTCCCGCTCAACCTGCTGCTCTCTTTGTGCTCATTGCCCGCATCTTCTTATTGTCATCTCCATCATCAAGGCTGACTACA

508 E G R S K V L E F L H T S R V N L L L L F V L I A R I F F I C I S S I I K A D Y

1801 TCATGATCAACCCGAGCCGACGCTATCGAGTCTGGCTCTGGATTGATTGTCGACACTGACTCAGCATCATCTTCGCCATTGTGCTCCCGCTCACCATTCTCT**CTCGAGC**TGAGCT

548 I M I N A E P H A I E S G L W I V I V D T V L S I I F A I V L P L T I F L E L S

1921 ACATGGGCTCTGTTCTTCGCGACCGTTCGCGCACACTGACTTCTCGTCTCCTCCCGCTCACCATCACTAGTGCCAGCCTTGGCATCAAGGCTCTCGTCCAGCGCGCACTGAGC

588 Y M G S R F F R T V G R T L D F F V F L P L T I T S A S L G I K A L V T E R T D

2041 AACAAATCGTCTCTCTCGACTACATGCTCTCTCGCGACGCTTTTCGTCCTCTGCTGCTTCGATGTACCGCGCCCTTGGCAAGAGGACGCTCTCAGTACGCTCCCTGCCATT

628 E Q I V L F L H Y I V F L P T L F V L L A V R M Y R A L G K R T L L T D A P C H

2161 GCTCGCATCGGATATGCTCCCAACGCTGACTTTGTTGGACTGTCCCGCACGAGAATGACGACGAGTGGCTACGCTCCGAACTCGAACCCTCGCCGACGGTACTGAGCTCAAGCTCC

668 C S H R D I V P N V D F V W T V P H E N D D E W L R S E L E P L A D G T E L K L

2281 ACCGCTACGCTCACTCGCGCTAAGGAAGTCGACATGGAAGCCGGCTCT**GAAATTC**ATCAACAGCTCCAACACTGGTCCGCCGAAATGGGATGAGATCTTTGGCAAGATTGCCCGCAAGCTC

708 H R Y V T R A K E V D M E A G S E F I T S S N T G R P E W D E I F G K I A A E A

2401 CCTCCAACCTGTAGTGGCGTGTCTCTCTGGGACCTCACAAGATGGGCGATTCTGTGCAATCAGCGATGCGCAGGGCTGAGATTAACAGCAACTGAGAGGTGCTACTTGAGGAGTA

748 P S N S V V G V F F C G P H K M G D S V Q S A M R R A E I N S N L R G A Y L R S

2521 CTAAGGAGAAGACCTTGATGAAGACCTCGGCTCGCTCAGCGAGGGCTTATTAAGATGCTGATGGGAACCGGTTGCAAGTGTGCGCTTCGTTCCGGGAGGAAACTTCGGCT**TAAGG**TG

788 T K E K T L M K D L G L P Q R G L I K M L M G T G C S V R F V F R E E N F G

2641 CTACACCACCGAGAAGCCCACTTTAGATTTGGCTAACTCACTCACCTTAGCTTGATAGAGAGTCCCGCAACACAACAACCTTTGACAAGAAAATAAATTTTAGATGAGACATATACC

2761 AACATTGAGATGTAATATTCTGACATTC

Figure 25 : Séquence nucléotidique de *Cerboh* et sa séquence protéique déduite

Le codon start et le codon stop sont indiqués en gras. Les sites de restriction des enzymes *EcoRI* (G/AATTC), *HindIII* (A/AGCTT) et *XhoI* (C/TCGAG) sont soulignés et indiqués en gras. La zone grisée représente la sonde utilisée pour les expériences de Northern blotting et Southern blotting.

I.2 Identification de séquences homologues dans les banques de données d'algues

Le séquençage du clone de la **macroalgue rouge** *P. yezoensis*, et l'assemblage de la séquence obtenue avec les différents EST présents dans la banque, a permis d'identifier un ADNc pleine longueur de 3 294 pb, dénommé suivant le même principe *Pyrboh*. Celui-ci contient un cadre ouvert de lecture de 2 712 pb, avec des extrémités 3' et 5' non-codantes respectivement de 220 et 362 pb. Il code une protéine putative de 903 acides aminés, ayant une masse moléculaire théorique de 98 kDa.

Ccrboh et *Pyrboh* furent ensuite utilisés pour identifier des séquences homologues chez les microalgues, dans les banques de données publiques. Ceci a permis l'identification de 2 homologues dans le génome de l'**algue rouge unicellulaire** *Cyanidioschyzon merolae* (Matsuzaki *et coll.*, 2004), dénommés arbitrairement *Cmrboh1* (locus CMG089C) et *Cmrboh2* (locus CMR353C). Le gène *Cmrboh1* contient 2 595 pb, avec un intron de 141 pb localisé entre les bases 1 975 et 2 115. Le transcrit *Cmrboh1* correspondant contient un cadre ouvert de lecture de 2 454 pb, codant une protéine de 817 acides aminés. La séquence protéique putative de *Cmrboh1* partage 31 % d'identité et 50 % de similitude avec celle de *Cmrboh2*. Cette dernière contient un cadre ouvert de lecture de 2 808 pb, et code une protéine de 935 acides aminés (Figure 26).

En suivant le même protocole, quatre séquences homologues et pleine longueur furent identifiées dans les **génomés ou banques d'EST de deux diatomées**. Dans la banque d'EST de *Phaeodactylum tricornutum* (Maheswari *et coll.*, 2005), deux gènes homologues à des NADPH oxydases furent identifiés et nommés *Ptrboh1* et *Ptrboh2*. Ils codent respectivement des protéines de 592 et 522 acides aminés (cadres ouverts de lecture de 1 779 et 1 569 pb). Dans le génome de *Thalassiosira pseudonana* (Armbrust *et coll.*, 2004) deux autres isoformes furent identifiées et nommées *Tprboh1* (TPFRO96211) et *Tprboh2* (TP93FRO). Elles codent respectivement des protéines de 601 et 622 acides aminés (cadres ouverts de lecture de 1 806 et 1 869 pb). En revanche aucun homologue ne fut identifié dans les banques locales d'EST de la macroalgue brune *Laminaria digitata* (Crepineau *et coll.*, 2000 ; Roeder *et coll.*, 2005), ni parmi les séquences publiques disponibles à Genbank de *Laminaria japonica*.

Chez l'algue verte unicellulaire *Chlamydomonas reinhardtii*, deux séquences présentant des similitudes avec des NADPH oxydases furent identifiées dans la banque génomique (C_30094 et C_30095 sur le site du JGI genome portal) (Asamizu *et coll.*, 1999). Cependant elles sont très divergentes par rapport aux séquences de NADPH oxydases précédemment citées ou déjà connues, y compris les homologues de végétaux supérieurs. L'absence de transcrits correspondants dans la banque d'EST, pourtant largement fournie (169 316 EST), peut nous faire supposer que ces gènes ne sont pas exprimés dans les conditions testées (absence de stress), voire non fonctionnels (pseudogènes).

B

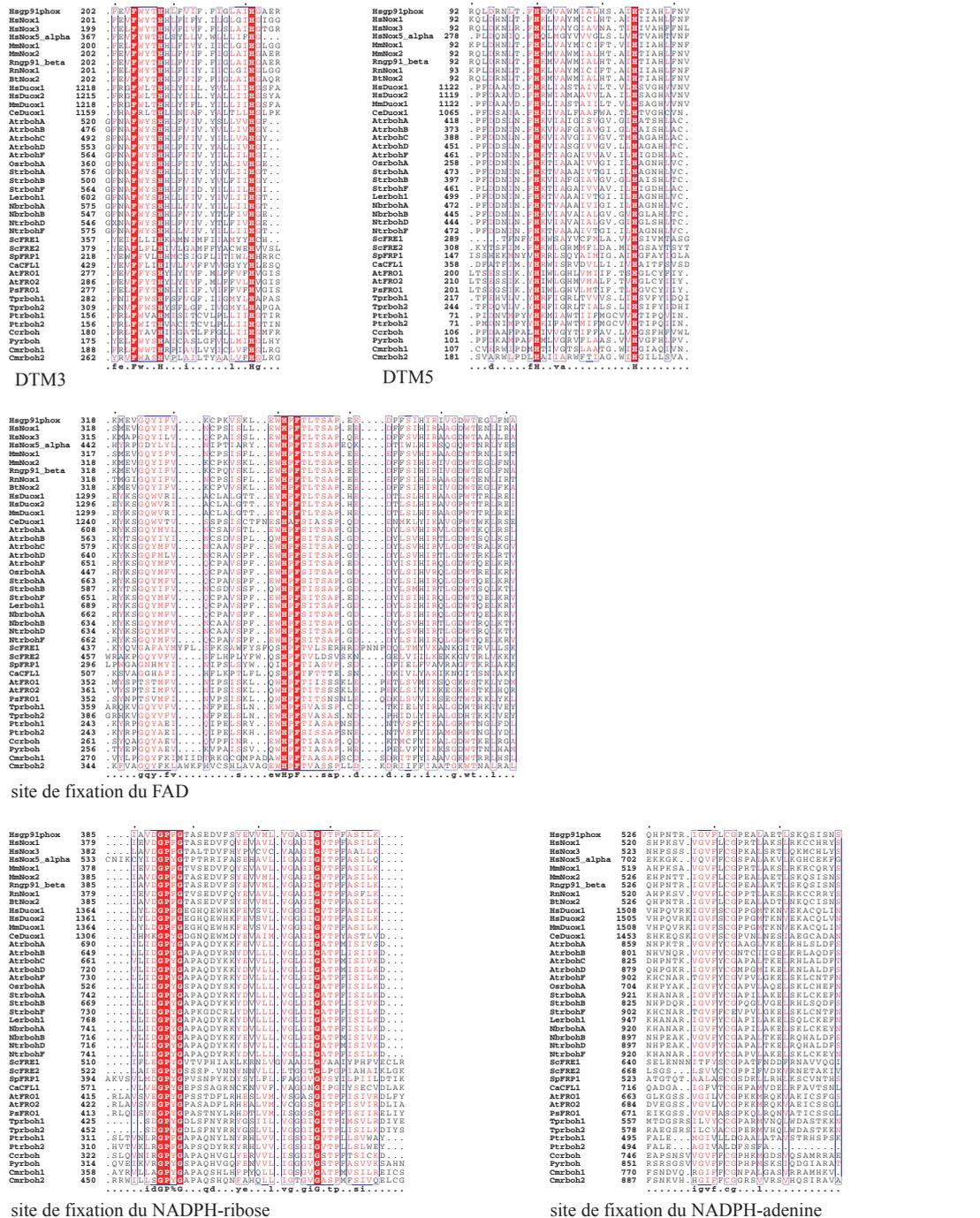


Figure 26 : Comparaison de la séquence protéique de Ccrboh de *C. crispus* avec des homologues de NADPH oxydases.

- A. Alignement de la séquence protéique déduite Ccrboh de *C. crispus* avec ses homologues chez *P. yezoensis* (Pyrboh), *C. merolae* (Cmrboh1 et Cmrboh2) et la gp91^{phox} humaine. Les résidus strictement conservés sont indiqués en blanc sur fond rouge, les résidus bien conservés en rouge et encadrés en bleu. Le site conservé de fixation du FAD est indiqué par des dièses ; les sites conservés de fixation du NADPH sont indiqués par des étoiles. Les résidus histidine impliqués dans la fixation de l'hème sont notés par des H. Les 10 domaines transmembranaires (DTM1 à DTM10) sont figurés pour Ccrboh au-dessus de l'alignement.
- B. Alignement des motifs conservés de la séquence protéique théorique Ccrboh avec ceux de ses homologues chez les familles Nox et Duox, les rboh des plantes supérieures, les ferriques réductases membranaires de levures et de végétaux, ainsi que les homologues chez les algues rouges et brunes. Les résidus strictement conservés sont indiqués en blanc sur fond rouge, les résidus bien conservés en rouge et encadrés en bleu.

I.3 Mise en évidence d'une famille monogénique de NADPH oxydases chez *Chondrus crispus*

Une première analyse par Southern blotting, restreinte à une seule enzyme de restriction, semblait indiquer qu'une seule copie du gène de la NADPH oxydase était présente chez *Chondrus crispus*. Une analyse plus complète a permis de confirmer ce résultat. Un nouveau Southern blotting a été réalisé sur de l'ADN génomique de gamétophytes de *C. crispus*, en conditions stringentes. La sonde de 556 pb utilisée est située entre les positions 953 et 1 509 pb du transcrit. Elle correspond à la partie N-terminale de la protéine théorique, incluant les sites de fixation du FAD et du NADPH-ribose. Cette sonde marquée à la fluorescéine-11-dUTP a ensuite été hybridée à de l'ADN génomique digéré par six enzymes ou couples d'enzymes différents. Dans chaque condition testée, une seule bande majeure est observée (Figure 27). D'après l'analyse de séquence, aucune des trois enzymes utilisées ne possède de site de coupure au coeur de la sonde. Les tailles des bandes obtenues sont également en accord avec la carte de restriction attendue pour le transcrit, avec deux sites de coupure r *EcoRI* aux positions 1 628 et 2 328 pb, un site de coupure *HindIII* à la position 441, et un site de coupure *XhoI* à la position 1 908. **Ces résultats suggèrent la présence d'une seule copie d'un gène homologue à la NADPH oxydase chez les gamétophytes de *C. crispus*.**

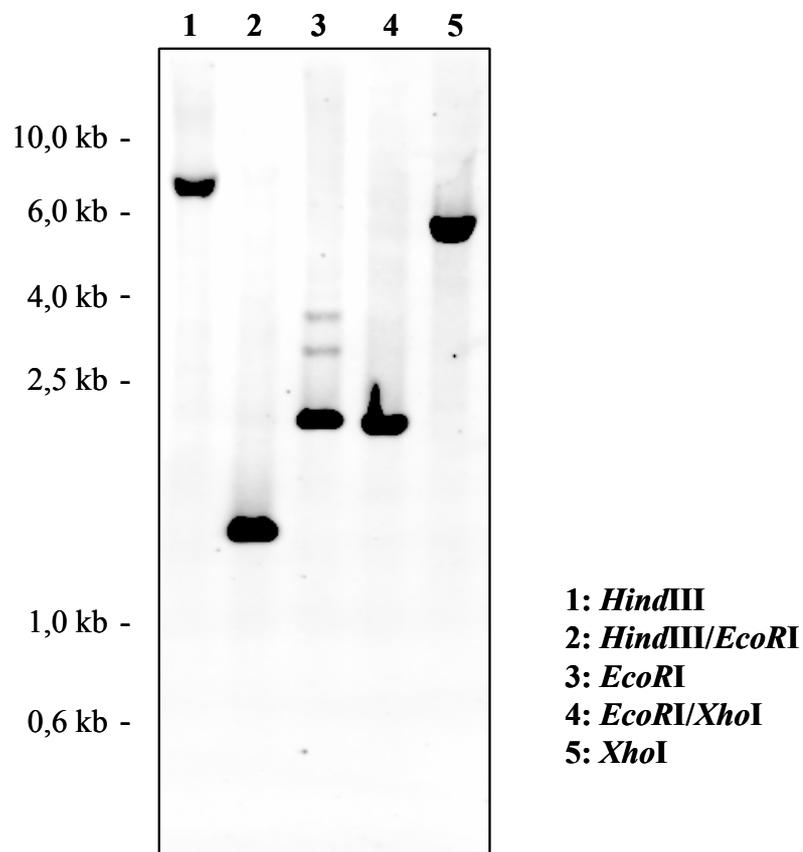


Figure 27 : Analyse par Southern blotting du nombre de copies de gènes de NADPH oxydases chez *C. crispus*

L'ADN génomique a été digéré par les enzymes de restrictions indiquées : *HindIII*, *HindIII/EcoRI*, *EcoRI*, *EcoRI/XhoI*, *XhoI*, puis hybridé par une sonde de 556 pb spécifique de *Ccrboh* et marquée à la fluorescéine. Le résultat de la migration du marqueur de taille est illustré par les valeurs indiquées à gauche de la membrane.

Compte tenu de l'état actuel de nos connaissances, cette monogénie, effective chez *C. crispus*, pourrait également être supposée chez *P. yezoensis*, car pour l'instant un seul transcrit a été identifié dans les banques d'EST (20 779 EST). Seule une analyse plus poussée permettrait de le confirmer. En revanche deux copies de gènes ont d'ores et déjà été identifiées chez l'algue rouge unicellulaire *C. merolae* et les deux diatomées *P. tricornutum* et *T. pseudonana*.

Les NADPH oxydases représentent souvent des familles multigéniques chez divers organismes. Chez les mammifères, des homologues sont désormais bien connus au niveau des cellules non-phagocytaires, au-delà de la gp91^{phox} caractéristique des neutrophiles. Les profils d'expression de ces différents gènes sont souvent spécifiques d'une distribution tissulaire (Banfi *et coll.*, 2001 ; Cheng *et coll.*, 2001). Le taux d'anions superoxyde généré ainsi que les modalités de production, peuvent également être variables d'une isoforme à l'autre (Banfi *et coll.*, 2001). Ces variabilités reflèteraient des spécificités fonctionnelles, même si on dispose aujourd'hui de données concrètes assez restreintes à ce sujet. Chez les plantes supérieures plusieurs gènes de NADPH oxydases peuvent être identifiés dans un même organisme. Ainsi le génome d'*Arabidopsis thaliana* contiendrait au moins 8 gènes homologues à la NADPH oxydase (Torres *et coll.*, 2002), communément dénommés *rboh* pour *respiratory burst oxidase homologue*. Certaines de ces isoformes sont exprimées de façon constitutive dans la plante, tandis que d'autres seraient spécifiquement induites lors de stress biotiques ou abiotiques, suggérant également une diversité fonctionnelle ou l'implication dans des voies de signalisation distinctes. Ainsi *StrbohA* et *NbrbohA*, respectivement chez la pomme de terre et le tabac, sont exprimés de façon constitutive, tandis que *StrbohB* et *NbrbohB* sont induits par des éliciteurs fongiques, l'acide salicylique ou l'acide arachidonique (Yoshioka *et coll.*, 2001 ; Yoshioka *et coll.*, 2003). Chez *A. thaliana*, le gène *AtrbohD* est induit par le peroxyde d'hydrogène et l'harpine (Desikan *et coll.*, 1998).

I.4 Organisations structurales et topologiques des homologues à la NADPH oxydase chez les algues

La comparaison de la séquence protéique de Ccrboh avec la gp91^{phox} humaine et d'autres homologues provenant d'organismes variés, montre que **l'organisation structurale nécessaire à la mise en place de l'activité catalytique, ainsi que l'organisation topologique, sont conservées**. En revanche **les algues rouges possèderaient également des spécificités structurales propres** à cette lignée.

I.4.1 Etude des séquences primaires

Les séquences homologues nouvellement identifiées chez les algues rouges et brunes ont été alignées avec la gp91^{phox} et des isoformes de NADPH oxydases provenant d'organismes variés (Figure 26). Cette comparaison montre que les séquences d'algues rouges contiennent l'ensemble des sites catalytiques nécessaires à l'activité : les deux paires d'histidine impliquées dans la fixation de l'hème, le site de fixation du FAD, et les deux sites de fixation du NADPH. Ces sites sont également présents chez les NADPH oxydases de mammifères, de plantes, ainsi que chez les ferriques réductases membranaires et les diatomées. En revanche **les deux sites de fixation du NADPH sont séparés par une zone d'insertion de près de 300 acides aminés chez les quatre algues rouges**. Ce fragment n'est rencontré dans aucune autre lignée. L'éloignement des deux sites de fixation du NADPH influence probablement le repliement de la protéine au sein de la membrane pour permettre leur rapprochement. Par ailleurs aucun site de fixation du calcium n'a été identifié chez les enzymes d'algues.

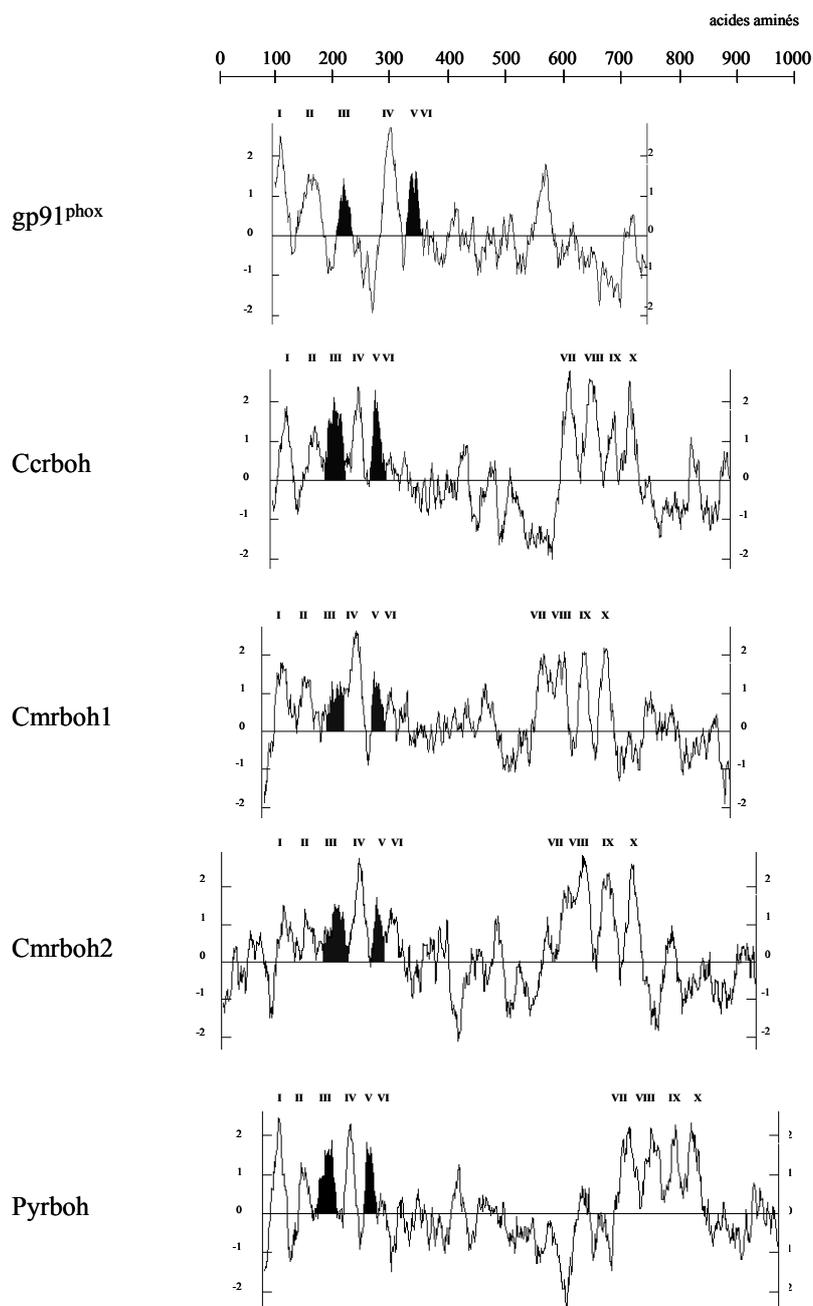


Figure 28 : Profils d'hydrophatie de la gp91^{phox} et de ses homologues chez les algues rouges : Ccrboh, Pyrboh, Cmrboh1 et Cmrboh2.

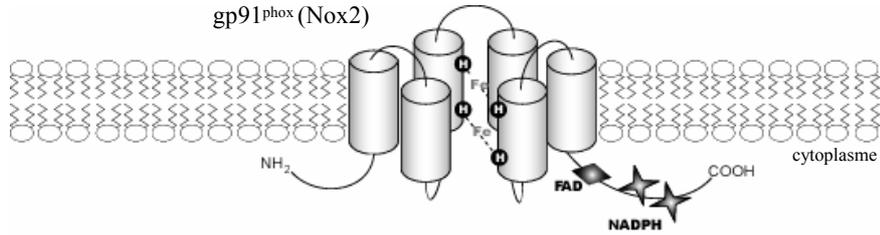
Les profils ont été générés en utilisant l'algorithme Kyte-Doolittle avec un pas de 19. Les chiffres romains au-dessus des profils décomptent les domaines transmembranaires putatifs. Les deux domaines contenant les paires d'histidine potentiellement impliquées dans la fixation de l'hème sont présentés en noir.

Les profils d'hydropathies (Figure 28) montrent que les six domaines transmembranaires habituellement décrits chez la gp91^{phox} ou ses homologues, sont également retrouvés au niveau des séquences d'algues, avec les domaines 3 et 5 contenant les paires d'histidines. La zone d'insertion préalablement décrite chez les algues rouges est également figurée sur ces profils, avec tout d'abord une zone cytosolique, suivie de quatre nouveaux domaines transmembranaires. Malgré le faible niveau de similitude entre les quatre séquences au niveau de ce fragment, cette topologie est strictement conservée. En revanche la partie cytosolique de ce fragment ne semble pas avoir de fonction catalytique propre lorsqu'elle est étudiée de façon isolée. En définitive, **les séquences d'algues rouges possèderaient dix domaines transmembranaires** : les six premiers correspondants à ceux déjà identifiés chez les homologues décrits dans la littérature, **les quatre derniers étant situés dans la zone d'insertion spécifique aux algues rouges.**

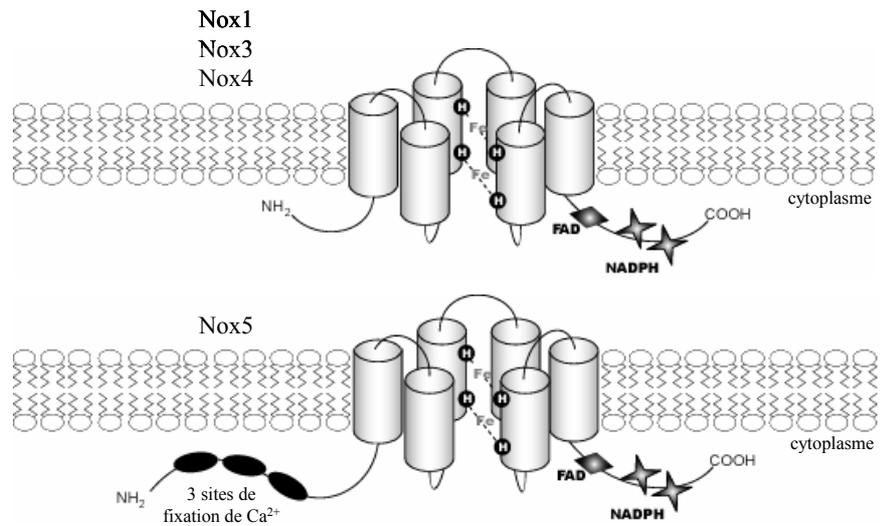
I.4.2 Modèles structuraux

Les six domaines transmembranaires rencontrés chez la gp91^{phox}, tout comme les sites catalytiques impliqués dans l'activité, peuvent être considérés comme une trame commune partagée par l'ensemble des homologues, y compris les ferriques réductases de levures ou de plantes supérieures. Malgré une telle homologie, un système commun de régulation de ces différentes enzymes est peu probable. Pour illustrer l'ensemble de ces caractéristiques, un modèle structural est proposé pour chacune des isoformes (Figure 29). La sous-unité gp91^{phox} du complexe NADPH oxydase rencontré chez les cellules phagocytaires, telles que les neutrophiles, est représentée ; sont également figurées les représentations schématiques des membres de la famille Nox et de la famille Duox, les ferrique réductases membranaires qui partagent des similitudes fortes avec les NADPH oxydases, et enfin le modèle consensus obtenu pour les algues rouges à partir des études de séquences précédemment décrites.

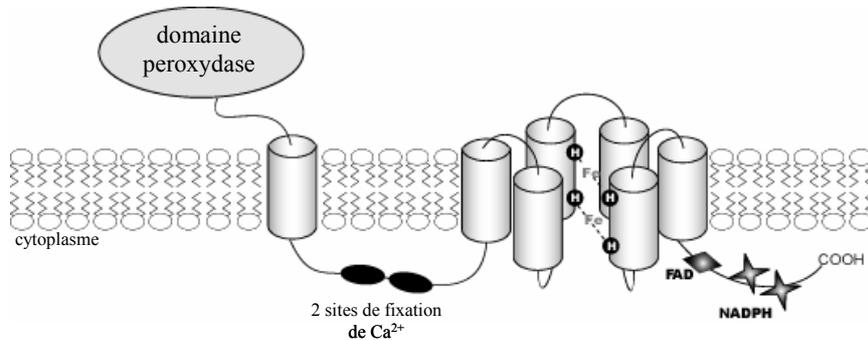
A. gp91^{phox} des cellules phagocytaires



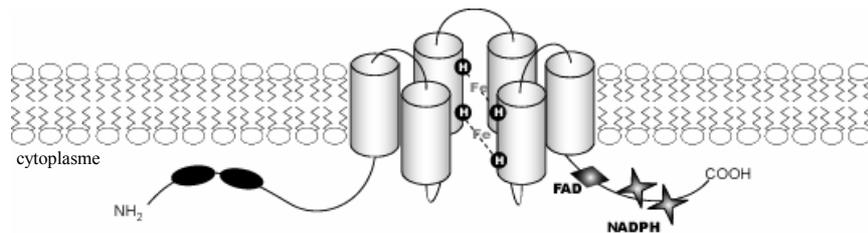
B. Homologues à la gp91^{phox} des cellules non-phagocytaires



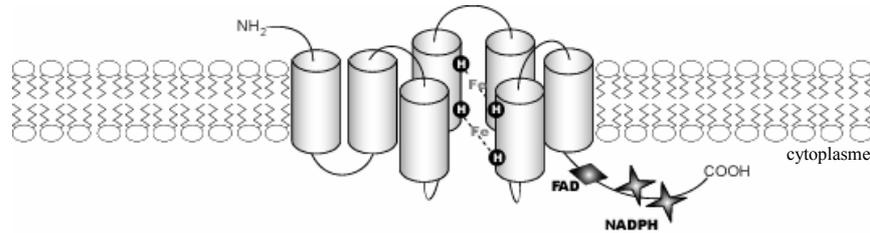
C. Dual oxidase (Duox)



D. Respiratory burst oxidase homologue (rboh) chez les plantes



E. Ferrique réductase membranaire



F. Respiratory burst oxidase homologue (rboh) des algues rouges

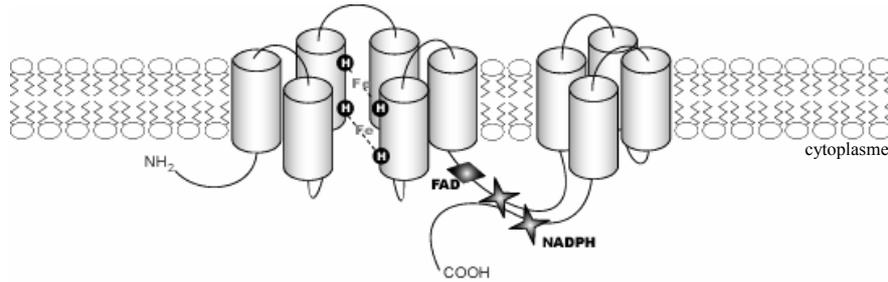


Figure 29 : Schémas structuraux de la sous-unité gp91^{phox} de la NADPH oxydase de neutrophiles et de ces homologues chez divers organismes.

Les domaines transmembranaires sont représentés enchâssés dans la membrane. Les paires d'histidine impliquées dans la fixation des hèmes et les sites de fixation du FAD et du NADPH sont figurés respectivement par un losange et deux étoiles. Les sites de fixation du calcium sont figurés par des ovales noirs.

- A. **La gp91^{phox} des cellules phagocytaires.** La NADPH oxydase chez les cellules phagocytaires est un complexe enzymatique dont l'unité catalytique est la gp91^{phox} (ou Nox2). La sous-unité membranaire p22^{phox} et l'association de facteurs cytosoliques sont nécessaires à l'activation du complexe.
- B. **Homologues à la gp91^{phox} des cellules non-phagocytaires.** Ce sont les membres de la famille Nox : Nox1, 3 et 4, similaires à la gp91^{phox}, et Nox5, séquence la plus divergente et ayant la particularité de posséder 3 sites de fixation du calcium sur son extension N-terminale.
- C. **Dual oxidases chez les mammifères et les nématodes.** Elles possèdent un domaine peroxydase et des sites de fixation du calcium en N-terminal, en plus du domaine homologue à la gp91^{phox}.
- D. **Homologues à la NADPH oxydase des plantes supérieures, ou rboh.** Deux sites de fixation du calcium sont systématiquement présents sur une extension N-terminale.
- E. **Ferriques réductases membranaires, rencontrées chez les levures et plantes supérieures.** La présence d'un domaine transmembranaire supplémentaire en N-terminal par rapport à la gp91^{phox} est probable.
- F. **Homologues à la NADPH oxydase chez les algues rouges : Ccrboh, Pyrboh, Cmrboh1 et Cmrboh2.** Quatre domaines transmembranaires supplémentaires sont présents entre les 2 sites de fixation du NADPH par rapport à la gp91^{phox}.

Chez les algues rouges de fortes homologies ont été identifiées entre les séquences étudiées : Ccrboh chez *C. crispus*, Pyrboh chez *P. yezoensis*, Cmrboh1 et Cmrboh2 chez l'unicellulaire *C. merolae*. **L'analyse de ces séquences et leurs particularités nous permet de proposer un nouveau modèle structural de NADPH oxydase spécifique à cette lignée.** Les six domaines transmembranaires identifiés chez la gp91^{phox} et ses homologues sont conservés, tout comme les sites catalytiques. En revanche la zone d'insertion d'environ 300 acides aminés, présente entre les deux sites de fixation du NADPH, influence vraisemblablement le repliement de la protéine à travers la membrane. La première partie de ce fragment est cytosolique, la seconde portant probablement quatre domaines transmembranaires additionnels.

De telles particularités sont absentes au niveau des séquences homologues de diatomées : Tprboh1 et Tprboh2 chez *T. pseudonana* et Ptrboh1 et Ptrboh2 chez *P. tricornutum*. D'un point de vue structural, elles ressembleraient davantage aux membres de la famille Nox qu'aux isoformes d'algues rouges.

Par ailleurs, aucun homologue à la sous-unité membranaire p22^{phox}, ou aux facteurs cytosoliques de régulation p47^{phox}, p60^{phox} et p67^{phox}, n'a été identifié dans les banques de données chez ces mêmes algues.

Les processus de régulation des homologues de NADPH oxydases chez l'ensemble des organismes vivants sont très probablement différents. Chez les mammifères, seul la mise en place du complexe actif de la NADPH oxydase phagocytaire est particulièrement bien documentée. Chez les membres de la famille Nox, l'intervention d'unités cytosoliques ou membranaires est certainement requise mais peu documentée (Bokoch et Knaus, 2003), excepté pour Nox4 qui semble être active en absence de tels composés (Banfi et coll., 2001). La régulation directe de Nox5 par le calcium a clairement été établie (Banfi et coll., 2001), ainsi que chez les homologues de plantes supérieures (Keller et coll., 1998) qui possèdent également des domaines de fixation du calcium en N-terminal.

L'alcalinisation extracellulaire et l'influx de calcium accompagnent généralement la production de FAO, à la fois chez les mammifères et les plantes supérieures (Simon-Plas et coll., 2002 ; Yoshioka et coll., 2003 ; Zhao et coll., 2005). Chez la tomate, Sagi et Fluhr (2001) ont montré que l'activité NADPH oxydase était stimulée par le calcium d'une manière dose-dépendante. Chez la pomme de terre des chélateurs du calcium bloquent partiellement l'accumulation du transcrit *StrbohB*, tandis que des inhibiteurs de canaux

calciques l'inhibent totalement (Yoshioka *et coll.*, 2001). Chez l'algue brune *Fucus serratus* le calcium semble détenir un rôle important dans la mise en place du burst oxydatif par des rhizoïdes soumis à un stress hyper-osmotique (Coelho *et coll.*, 2002). Chez l'algue rouge *C. crispus* la production de formes actives de l'oxygène est abolie en présence d'inhibiteurs de canaux calciques, tandis qu'elle est stimulée par des ionophores de calcium, suggérant également un **rôle majeur du calcium dans la mise en place du burst oxydatif chez l'algue rouge** (Bouarab, 2000).

Des processus de phosphorylation et de déphosphorylation, au même titre que les influx calciques, semblent être indispensables à la stimulation des activités de type NADPH oxydase chez l'ensemble des organismes vivants. En effet les phosphorylations directes des composés cytosoliques dans l'activation du complexe NADPH oxydase sont avérées chez les cellules phagocytaires (Leusen *et coll.*, 1996 ; Vignais, 2002). Chez les plantes supérieures, plusieurs sites potentiels de phosphorylation par la protéine kinase C ont été identifiés sur la séquence AtrbohD d'*A. thaliana*. Chez ce modèle l'activité NADPH oxydase est par ailleurs stimulée par des activateurs de protéines kinases (Desikan *et coll.*, 1998). Chez la pomme de terre, des inhibiteurs de protéines kinases bloquent l'accumulation du transcrit *StrbohB* (Yoshioka *et coll.*, 2001), et de la même façon l'expression du gène *NbrbohB* chez le tabac est induite par des protéines kinases (Yoshioka *et coll.*, 2003). Chez l'algue rouge *C. crispus* le burst oxydatif est également aboli par la staurosporine, un inhibiteur général de protéines kinases, tandis que des inhibiteurs spécifiques (PD98059, apigénine), sont sans effets sur la production de FAO, tout en inhibant la mise en place de la résistance à l'infection chez les gamétophytes (Bouarab, 2000). Un tel comportement suggère que des **étapes de phosphorylation et déphosphorylation de protéines sont également indispensables à la production du burst oxydatif chez l'algue rouge**, mais également au niveau de la mise en place d'autres processus de défense.

I.5 Analyses phylogénétiques de la NADPH oxydase et de ses homologues

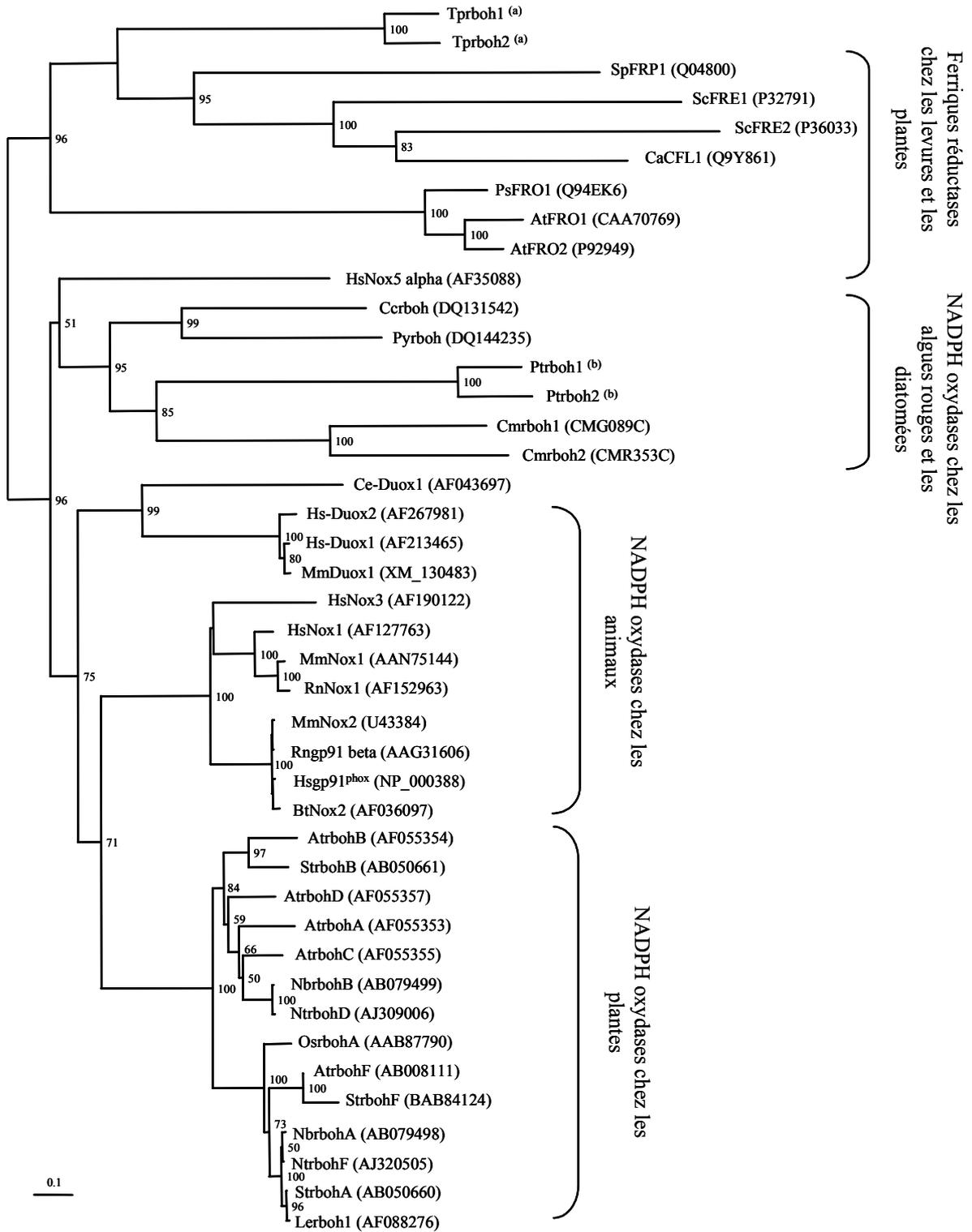
Pour compléter ces analyses structurales, et positionner les séquences nouvellement identifiées chez les algues, j'ai entrepris une analyse phylogénétique exhaustive des NADPH oxydases. Les séquences pleine longueur furent alignées avec des homologues provenant des divers organismes ou familles : gp91^{phox}, représentants des Nox et Duox, rboh de plantes supérieures, ferriques réductases membranaires de levures et de plantes. L'alignement complet de ces 42 protéines a mené à l'identification de 292 sites informatifs pour la construction d'arbres phylogénétiques. L'arbre consensus obtenu avec la méthode du Neighbor Joining permet de distinguer trois grands groupes de séquences (Figure 30).

Le premier groupe contient les séquences de ferriques réductases membranaires de levures et de plantes supérieures. Les séquences Tprboh1 et Tprboh2 de la diatomée *T. pseudonana* semblent appartenir à ce groupe. Cette configuration laisse à penser que les séquences de *T. pseudonana*, préalablement identifiées en tant que NADPH oxydases, seraient vraisemblablement des ferriques réductases.

Figure 30 (ci-contre) : Phylogénie de la NADPH oxydase et de ses homologues, obtenue avec la méthode du Neighbor Joining sur les séquences complètes.

L'analyse phylogénétique a été réalisée sur des membres des familles Nox et Duox, des rboh de plantes supérieures, des ferriques réductases membranaires, ainsi que des homologues d'algues rouges et brunes. Les différentes familles d'enzymes sont indiquées par des accolades. Le numéro d'accèsion est indiqué entre parenthèses pour chaque séquence. L'arbre consensus non raciné a été obtenu avec la méthode du Neighbor Joining et 1000 valeurs de bootstraps sur les séquences complètes (292 sites informatifs). Seules les valeurs de bootstrap supérieures à 50 % sont indiquées. L'échelle donne une mesure relative des longueurs de branches. Les séquences de *T. pseudonana*^(a) sont disponibles sur le site du JGI à l'adresse <http://genome.jgi-psf.org/>. Les séquences de *T. tricorutum*^(b) proviennent de la banque EST dont l'accès nous a généreusement été autorisée par C. Bowler.

Les espèces représentées sont : Tp *Thalassiosira pseudonana*, Sp *Schizosaccharomyces pombe*, Sc *Saccharomyces cerevisiae*, Ca *Candida albicans*, Ps *Pisum sativum*, At *Arabidopsis thaliana*, Hs *Homo sapiens*, Cc *Chondrus crispus*, Py *Porphyra yezoensis*, Pt *Phaeodactylum tricorutum*, Cm *Cyanidioschyzon merolae*, Ce *Caenorhabditis elegans*, Mm *Mus musculus*, Rn *Rattus norvegicus*, Bt *Bos taurus*, St *Solanum tuberosum*, Nb *Nicotiana benthamiana*, Nt *Nicotiana tabacum*, Os *Oryza sativa*, Le *Lycopersicon esculentum*.



Le second groupe comprend la Nox5 et les 4 séquences d'algues rouges, Ccrboh, Pyrboh, Cmrboh1 et Cmrboh2, ainsi que les deux autres séquences de diatomées, Ptrboh1 et Ptrboh2 de *P. tricornutum*. Le regroupement de ces six dernières séquences est soutenu par une forte valeur de bootstrap (95 %), indépendamment des appartenances aux différentes lignées phylogénétiques. Les isoformes Cmrboh1 et Cmrboh2 de l'algue rouge unicellulaire *C. merolae* semblent plus proches des séquences Ptrboh1 et Ptrboh2 de la diatomée *P. tricornutum*, que des deux autres séquences d'algues rouges, et notamment de *P. yezoensis* qui appartient pourtant à la même famille des Bangiophycidae. La topologie de l'arbre suggère que l'ensemble de ces séquences est plus proche de Nox5 ou des Duox que des ferriques réductases ou des NADPH oxydases végétales et animales. Les analyses de parenté déjà réalisées sur Nox5 ont montré la grande divergence de cette isoforme par rapport aux Duox ou aux autres membres de la famille Nox (Cheng *et coll.*, 2001). Ces études suggèrent que cet homologue est sans doute le plus proche représentant de la NADPH oxydase primitive. Il semble y avoir une très grande distance évolutive entre Nox5 d'une part et les membres des familles Nox et Duox d'autre part (Banfi *et coll.*, 2001). Ces observations, combinées à celle de l'arbre obtenu, laissent supposer que les séquences d'algues rouges et de *P. tricornutum* auraient moins divergé au cours de l'évolution par rapport aux autres NADPH oxydases.

Le dernier groupe se décompose également en trois clusters : les Duox forment le premier cluster, avec les isoformes humaines distinctes de celles des nématodes. Le second cluster inclut l'ensemble des représentants de la famille Nox, y compris la gp91^{phox}. Le troisième cluster regroupe les homologues rboh végétaux, avec deux sous-groupes. Le premier sous-groupe contient notamment les séquences NbrbohA, StrbohA, Lerboh1, qui sont exprimées de façon constitutive respectivement chez le tabac, la pomme de terre et la tomate (Desikan *et coll.*, 1998 ; Yoshioka *et coll.*, 2001 ; Yoshioka *et coll.*, 2003). Le second groupe contient des séquences comme NbrbohB, StrbohB et AtrbohD, dont l'expression est induite lors d'élicitation par des extraits de pathogènes respectivement chez le tabac, la pomme de terre et *A. thaliana*.

Pour confirmer cette analyse, la même étude a été réalisée en ciblant uniquement les sites catalytiques, c'est-à-dire les domaines transmembranaires 3 et 5 contenant les paires d'histidines, le site de fixation du FAD et les deux sites de fixation du NADPH. Cette analyse a permis de retenir 215 sites informatifs. L'arbre, obtenu également avec la méthode du Neighbor Joining, conserve la même topologie que le précédent (Figure 31). Le nœud groupant la Nox5 avec les six séquences d'algues est plus robuste, avec une valeur de bootstrap passant à 87 %, contre 51 % dans le cas précédent.

De la même façon, les arbres générés à partir des sites catalytiques avec d'autres méthodes de phylogénie telles que le Maximum de Vraisemblance (Figure 32) et le Maximum de Parcimonie (Figure 33), montrent une topologie comparable. Dans le premier, cas Nox5 et les six séquences d'algues forment toujours un cluster ; en revanche la position du groupe des ferriques réductases est plus ambiguë sur cet arbre. Dans le second cas, la topologie est strictement conservée par rapport aux premiers arbres, obtenus avec la méthode du Neighbor Joining.

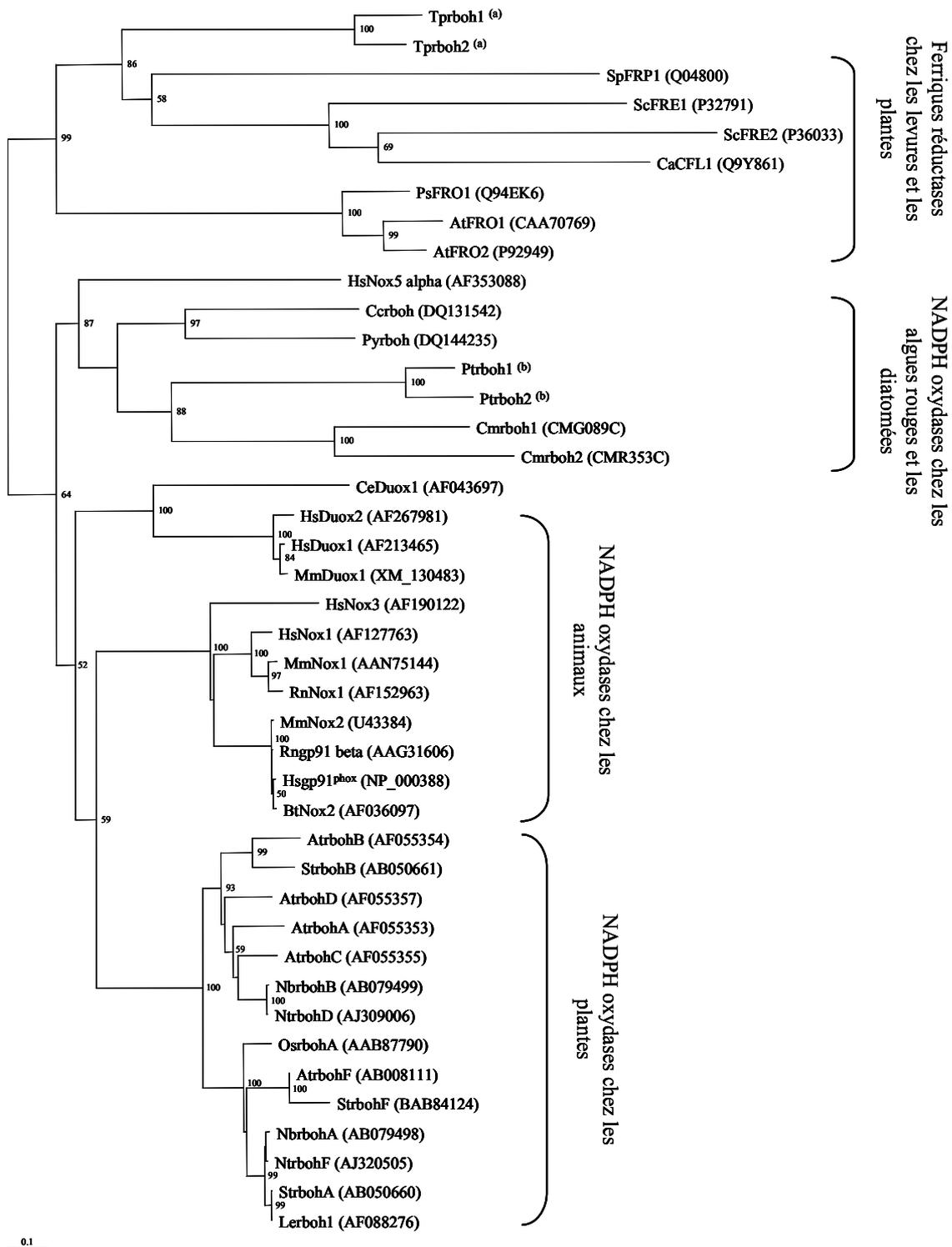


Figure 31 : Phylogénie de la NADPH oxydase et de ses homologues, obtenue avec la méthode du Neighbor Joining sur les sites catalytiques.

Les séquences utilisées sont les mêmes que celles de la Figure 30. Les différentes familles d'enzymes sont indiquées par des accolades. Le numéro d'accèsion est indiqué entre parenthèses pour chaque séquence. L'arbre consensus non raciné a été obtenu cette fois avec la méthode la méthode du Neighbor Joining et 1000 valeurs de bootstraps sur les sites catalytiques uniquement (215 sites informatifs). Seules les valeurs de bootstrap supérieures à 50 % sont indiquées.

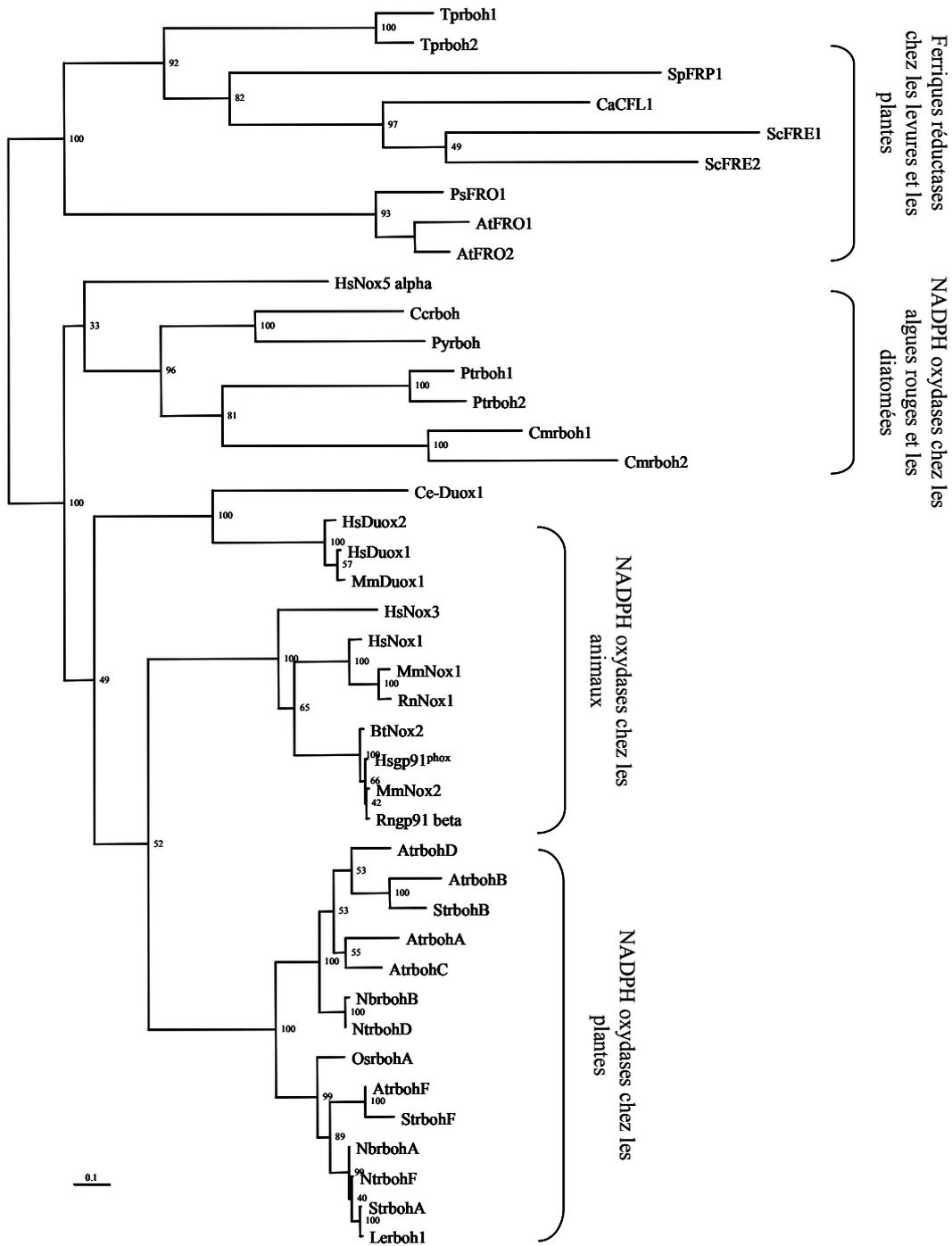


Figure 32 : Phylogénie de la NADPH oxydase et de ses homologues, obtenue avec la méthode du Maximum de Vraisemblance sur les sites catalytiques.

Les séquences utilisées sont les mêmes que celles de la Figure 30. Les différentes familles d'enzymes sont indiquées par des accolades. L'arbre consensus non raciné a été obtenu avec la méthode du Maximum de Vraisemblance et 100 valeurs de bootstraps sur les sites catalytiques uniquement.

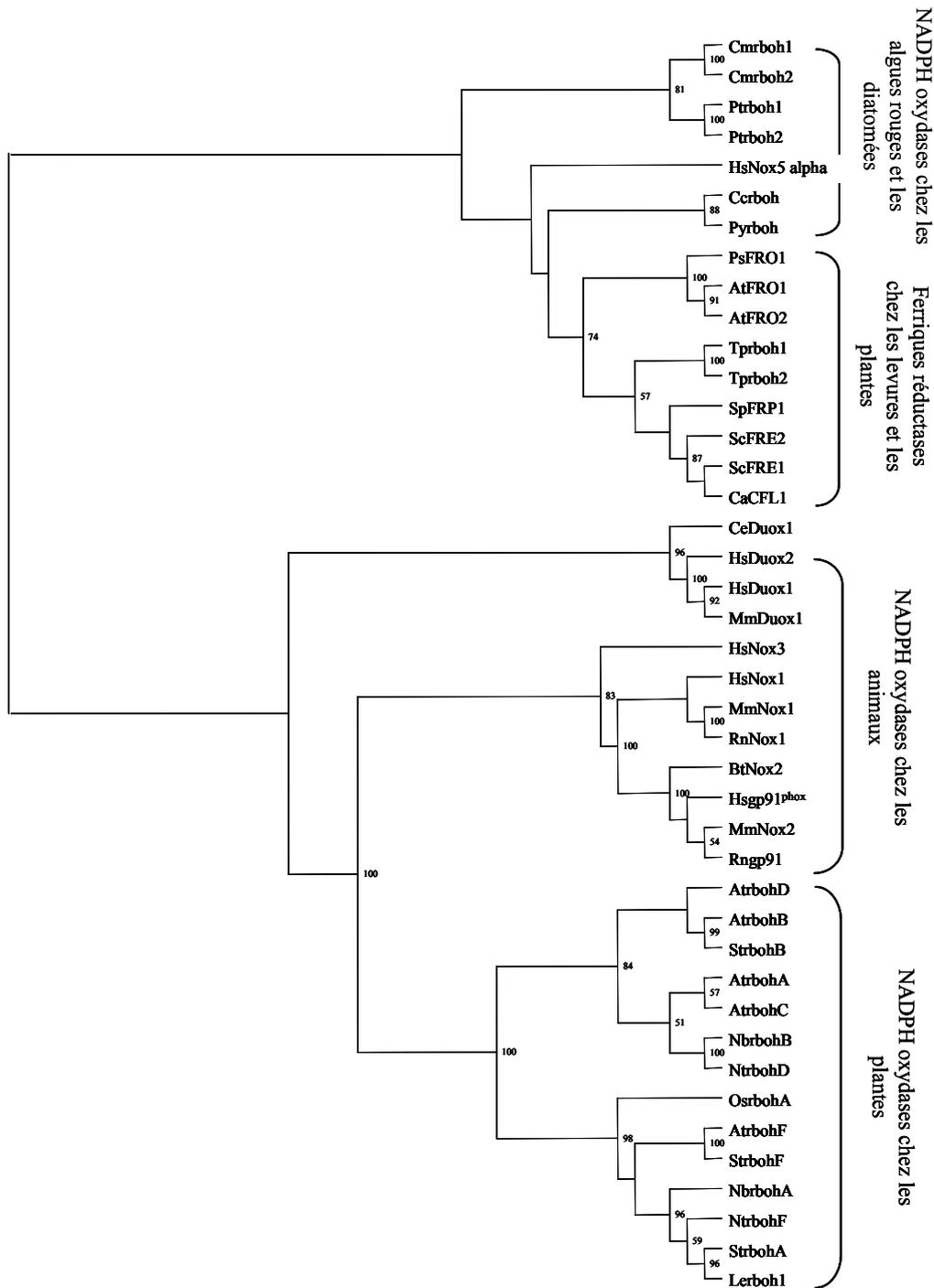


Figure 33 : Phylogénie de la NADPH oxydase et de ses homologues, obtenue avec la méthode du Maximum de Parcimonie sur les sites catalytiques.

Les séquences utilisées sont les mêmes que celles de la Figure 30. Les différentes familles d'enzymes sont indiquées par des accolades. L'arbre consensus non raciné a été obtenu avec la méthode du Maximum de Parcimonie et 500 valeurs de bootstraps sur les sites catalytiques uniquement (199 sites informatifs).

L'ensemble des analyses phylogénétiques réalisées tend à montrer que les séquences de *T. pseudonana* appartiennent au groupe des ferriques réductases, tandis que les séquences d'algues rouges et de *P. tricornutum* se positionnent avec Nox5.

Le génome de la diatomée *T. pseudonana* ne semble pas contenir d'enzymes de type NADPH oxydases, alors que dans les banques EST de la seconde diatomée *P. tricornutum*, deux enzymes homologues aux NADPH oxydases ont été identifiées. Ces dernières séquences semblent plus proches de Nox5 que des ferriques réductases. Toutefois, compte tenu du fait que les analyses ont été réalisées à partir d'une banque EST, nous ne pouvons par exclure que des homologues aux ferriques réductases soient retrouvées chez cette diatomée à l'avenir ; le génome de *P. tricornutum* devrait par ailleurs être prochainement disponible. En revanche cela ne permet pas d'expliquer pourquoi aucune séquence de NADPH oxydases n'a été retrouvée chez la diatomée *T. pseudonana*.

De façon assez surprenante les séquences de l'algue rouge unicellulaire *C. merolae*, semblent plus proches des séquences de NADPH oxydases de la diatomée *P. tricornutum* que des séquences de NADPH oxydases des deux macroalgues rouges. Cela n'est pas représentatif de la monophylie effective des algues rouges. En outre il est intéressant de noter à nouveau que dans le génome entièrement séquencé de *C. merolae*, des homologues de ferriques réductases membranaires n'ont pas été identifiées.

Par ailleurs [Lalucque et Silar \(2003\)](#) ont suggéré que les NADPH oxydases étaient spécifiquement présentes chez les organismes capables de développer une multicellularité et qu'elles étaient donc absentes des organismes unicellulaires. Ils émettaient alors l'hypothèse que ces enzymes, en jouant un rôle dans l'établissement d'un signal redox, auraient permis l'apparition de la multicellularité au cours de l'évolution. Seules cinq lignées eucaryotiques indépendantes ont développé une multicellularité : les animaux, les champignons, les végétaux, les algues rouges et les algues brunes. Nos résultats montrent ici que des homologues aux NADPH oxydases sont également présents chez les eucaryotes unicellulaires tels que les diatomées et l'algue rouge *C. merolae*, remettant en cause l'hypothèse précédemment émise.

I.6 Analyses transcriptionnelles de *Ccrboh*

La présence d'une séquence de NADPH oxydase chez *C. crispus* a d'abord été mise en évidence à partir d'une banque d'ADNc de gamétophytes non stressés. Ce résultat suggérait **l'expression constitutive du gène**, ce qui a ensuite été confirmé par des expériences de RT-PCR et de Northern blotting sur des thalles témoins (Figures 34). En revanche le niveau d'expression restait très faible, le transcrit étant difficilement détectable par Northern blotting. Dans le même ordre d'idée, 1 seul ADNc a été détecté dans les banques de 2 052 EST de thalles et de 2 002 EST de protoplastes de *C. crispus*, illustrant le faible taux d'expression du gène dans ces conditions.

Afin de déterminer l'implication du transcrit *Ccrboh* dans la mise en place de réactions de défense chez l'algue rouge, son profil d'expression a été étudié au cours de stress d'origine biotique et de stress abiotiques.

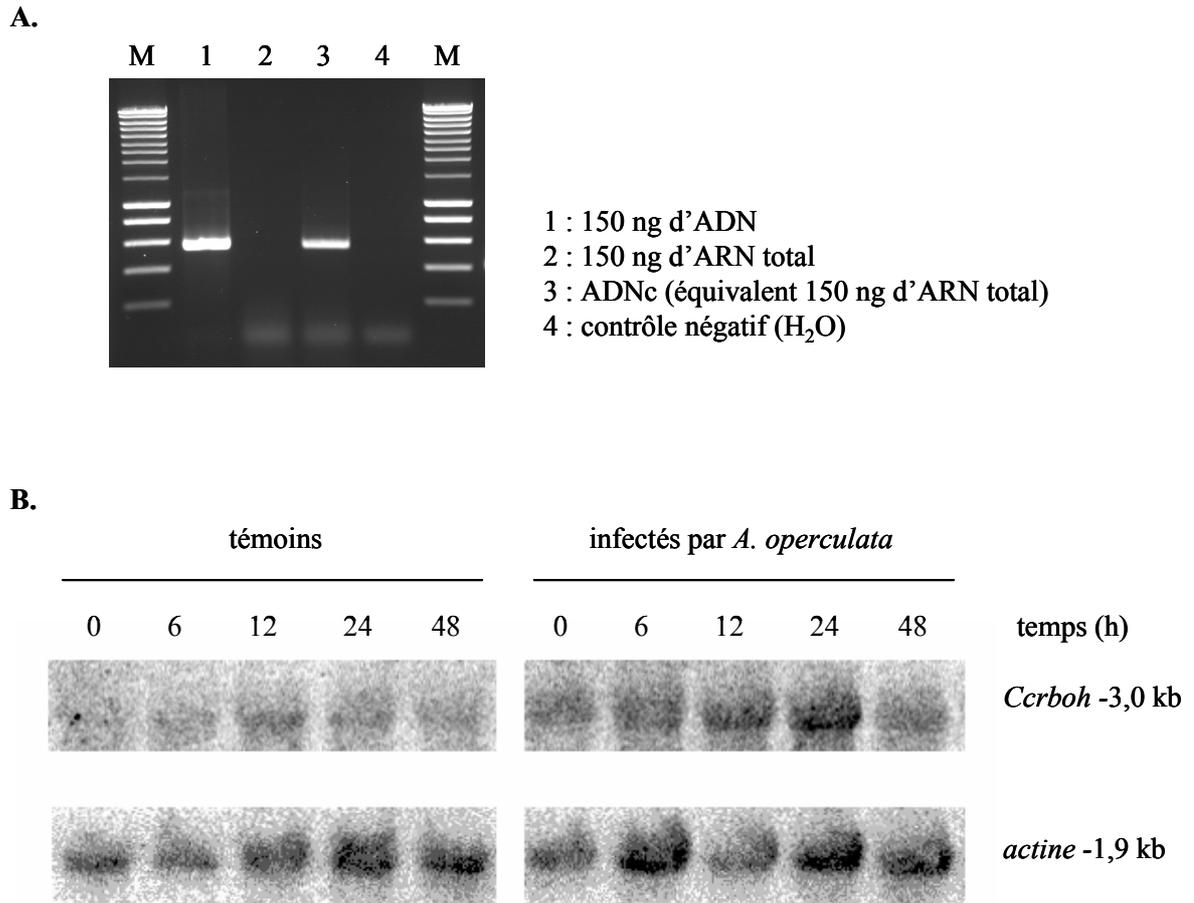


Figure 34 : Analyse de l'expression du gène *Ccrboh* chez les gamétophytes de *C. crispus*.

- A.** *Ccrboh* est exprimé de façon constitutive dans les thalles de *C. crispus*.
Les amorces spécifiques utilisées pour les expériences de PCR permettent l'amplification du même fragment sur le contrôle positif de l'ADN génomique, et sur un échantillon d'ADNc d'algues en conditions physiologiques normales. L'absence de bande dans le cas de l'ARN montre qu'il n'y a pas eu de contamination par de l'ADN génomique dans l'échantillon.
- B.** Analyse par Northern blotting de l'expression de *Ccrboh* lors d'une cinétique d'infection par des gamétophytes de *C. crispus* par l'algue verte endophyte *A. operculata*.
Le gène est exprimé de façon constitutive dans l'algue ; il est difficilement détectable par Northern blotting. Une induction de l'expression est observée à 12 et 24 heures après le début de l'infection.

Kamal Bouarab avait préalablement montré que l'élicitation des thalles par des extraits du pathogène, induisait la génération d'un burst oxydant inhibé par le DPI chez les gamétophytes. L'abolition du burst par le DPI supprimait également la mise en place de la résistance chez les gamétophytes (Bouarab, 2000). Il s'agissait ici de vérifier si l'expression du gène *Ccrboh* pouvait être induite lors d'un phénomène infectieux. La première série d'expériences a porté sur la **mise en présence de gamétophytes de *C. crispus*, avec des spores de son pathogène endophyte *A. operculata***. La cinétique d'infection a duré 96 heures, avec des prélèvements de thalles effectués à 0, 6, 12, 24 et 96 heures. Compte tenu de la difficulté à détecter le transcrit par Northern blotting, la PCR quantitative fut par la suite utilisée pour étudier le niveau d'expression de *Ccrboh* au cours de différents types d'élicitation ou de stress. Cette technique a par ailleurs confirmé le **faible niveau d'expression du gène au niveau constitutif, avec une moyenne de 150 copies de transcrits dans les échantillons témoins**. Ce nombre de copies est exprimé en nombre d'équivalents génomes par nanogramme d'ARN total (la méthode de calcul et d'expression est détaillée dans la partie Matériel et méthodes relative à la PCR quantitative). Durant les six premières heures de l'expérience, des observations microscopiques ont montré que les zoospores d'*A. operculata* étaient très mobiles, nageant librement dans le milieu de culture, et donc potentiellement infectieuses. Le profil d'expression de *Ccrboh* montre sur cette même période une répression du transcrit, suggérant que **tant que le pathogène n'est pas activement fixé au thalle, le gène n'est pas induit (Figure 35)**. Après 12 heures de cinétique, plus de 70 % des zoospores étaient fixées à la surface des gamétophytes. **Après 24 heures** toutes les spores étaient fixées et immobiles, soit au niveau des thalles où elles entamaient leur pénétration, soit sur les boîtes de Pétri. Dans le même temps, **le gène *Ccrboh* est quatre fois plus exprimé par rapport aux témoins, et ce niveau d'expression est maintenu pendant douze heures**. Une telle induction peut révéler une réponse suite à la **perception du pathogène par l'algue rouge**. Après 48 heures d'infection, le transcrit retrouve un niveau basal d'expression.

L'induction de l'expression du gène *Ccrboh* débute lorsque les spores du pathogène germent au niveau du thalle de *C. crispus*, et commencent à pénétrer dans les premières couches cellulaires. Ces observations suggèrent que le pathogène est reconnu par son hôte, ce qui provoque l'accumulation des transcrits. Des produits de dégradation de sa propre paroi, ou bien des composés propres à *A. operculata*, pourraient être la base de cette

reconnaissance par *C. crispus*. Par ailleurs ce profil d'induction est observé au cours des premières heures suivant l'infection, suggérant un rôle du gène *Ccrboh* dans des réponses précoces de défense.

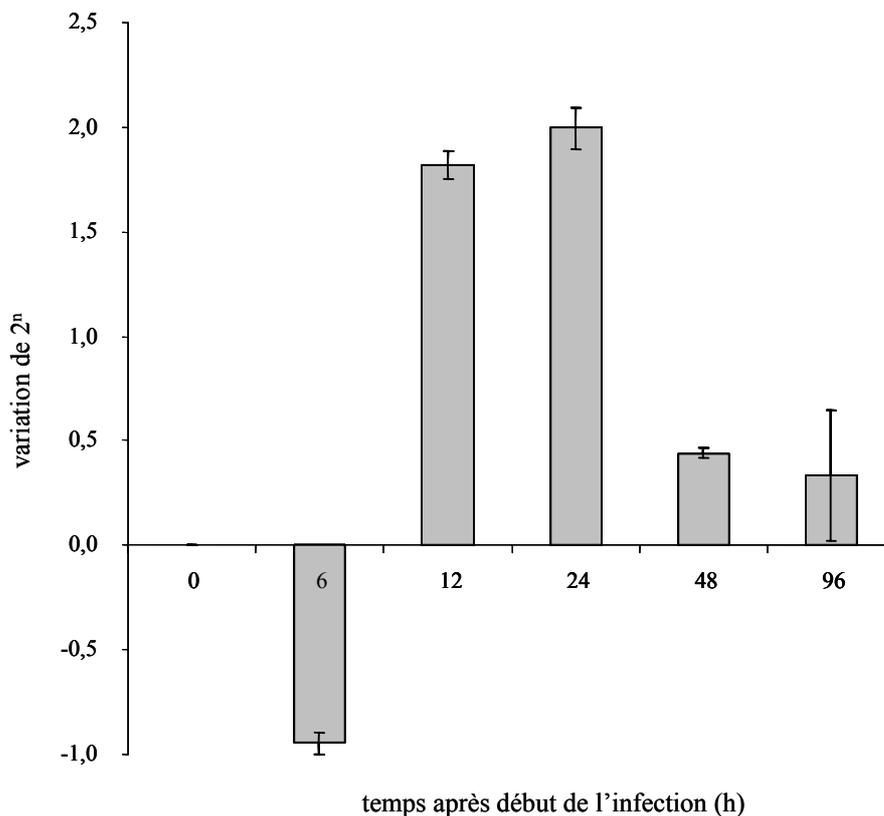


Figure 35 : Analyse par RT-PCR quantitative du niveau d'expression du transcrit *Ccrboh* lors d'une cinétique d'infection des gamétophytes de *C. crispus* par l'algue endophyte *A. operculata*.

L'induction d'expression est confirmée à 12 et 24 heures avec en moyenne 4 fois plus d'expression dans les échantillons infectés par rapport aux témoins.

Une seconde série d'expériences a porté sur l'**analyse du comportement du gène *Ccrboh* suite au traitement des algues par divers produits chimiques**, avec un seul point de cinétique à trois heures afin de cibler des réponses précoces de défense (Figure 36). Dans le cadre d'une analyse sans *a priori*, différentes catégories de produits ont été testées, dont le peroxyde d'hydrogène, l'harpine sous la forme d'émulsion commerciale, l'acide salicylique, puis des métaux lourds, des pesticides et des dérivés oxydés d'acides gras en C18 et en C20.

L'**harpine** est une protéine isolée de bactéries pathogènes de végétaux supérieurs. Après formulation elle est commercialisée pour la protection de culture céréalière sous le nom déposé de Messenger® (EDEN Bioscience). L'harpine est connue pour stimuler la production d'une large gamme de molécules de défense chez la plante et de lui conférer ainsi une résistance non-spécifique contre des agents pathogènes ; elle est donc utilisée dans ce sens pour stimuler la mise en place de réponses de défense chez les plantes traitées. Trois heures de traitement par une concentration équivalente à $6 \mu\text{g.mL}^{-1}$ d'harpine, provoquent une légère induction de l'expression du gène *Ccrboh*. Une induction similaire est observée dans le cas d'un traitement par le **peroxyde d'hydrogène**, tandis que l'**acide salicylique** provoque une légère répression du gène. **Ces trois produits semblent donc n'avoir que peu d'effets sur l'expression du gène *Ccrboh* chez *C. crispus*.** Cela contraste avec ce qui a été observé chez les plantes supérieures où le peroxyde d'hydrogène et l'harpine provoquent à la fois la production de formes actives de l'oxygène et une induction du gène *AtrbohD* chez des suspensions cellulaires d'*A. thaliana* (Desikan *et coll.*, 1998). De même, l'acide salicylique provoque une sur-expression des gènes *NbrbohA* et *NbrbohB* de 9 à 24 heures après injection dans des feuilles de tabac ; le niveau d'accumulation serait par ailleurs suffisant pour induire la génération d'un burst oxydatif chez ces suspensions cellulaires (Yoshioka *et coll.*, 2003).

Les métaux testés sont le cadmium, le cuivre, le zinc et l'aluminium à des concentrations finales de $200 \mu\text{M}$. Ils **ont peu d'effets sur le niveau d'expression du transcrit** ; seuls le cuivre et le zinc semblent provoquer une légère induction. **Les pesticides** testés ont été utilisés à des concentrations finales de $500 \mu\text{M}$. **La plupart ont peu d'effets** (dichlorvos, glyphosate, paraquat, 2,4-D), **excepté le métolachlor et l'atrazine qui induisent** respectivement des taux d'expressions 2,5 et 14 fois plus élevés que dans les thalles témoins.

Les effets les plus marquants sur le niveau d'expression du transcrit *Ccrboh*, ont été obtenus lors des traitements par les dérivés d'acides gras. Kamal Bouarab avait préalablement montré que *C. crispus* était capable d'utiliser à la fois des oxylipines en C18 et en C20 pour mettre en place des mécanismes de défense vis-à-vis du pathogène (Bouarab *et coll.*, 2004). Pour vérifier si de telles molécules pouvaient induire un changement du profil d'expression de *Ccrboh*, les algues ont été incubées en présence de **dérivés d'acides gras en C18** (méthyle jasmonate, 13(S)-HpODE, 13(S)-HpOTE) et en **C20** (12(+/-)-HpETE, 15(S)-HETE). **Toutes ces molécules induisent l'expression du gène mais à des niveaux différents. L'effet le plus important est observé avec le**

méthyle jasmonate où le niveau d'expression du transcrit est 21 fois plus élevé par rapport aux échantillons témoins. Les résultats obtenus sont en accord avec les observations précédentes qui suggéraient que ces oxylipines pouvaient agir en tant qu'intermédiaires dans la mise en place de l'immunité innée chez les gamétophytes de *C. crispus* (Bouarab *et coll.*, 2004).

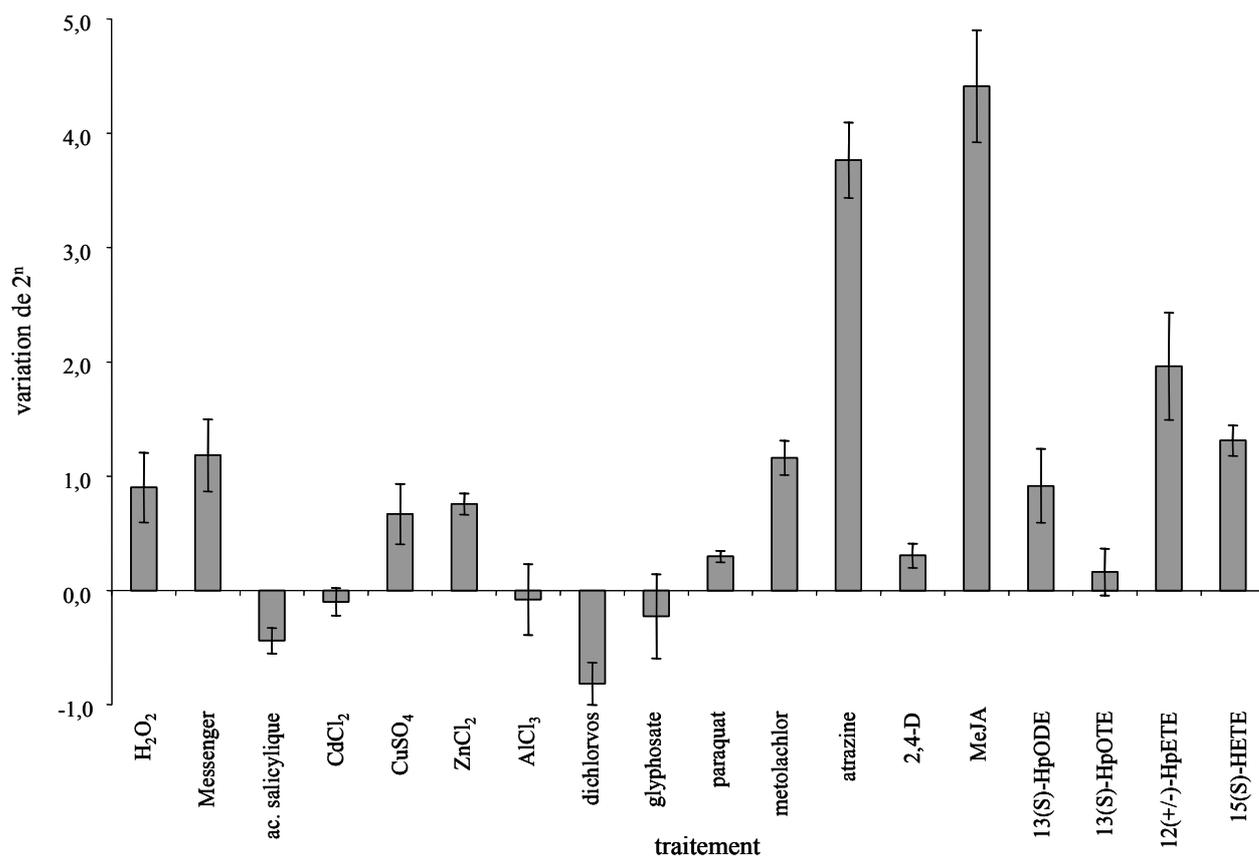


Figure 36 : Analyse par RT-PCR quantitative du niveau d'expression du transcrit *Ccrboh* après 3 heures de divers traitements chimiques.

Des métaux lourds, des pesticides et des dérivés oxydés d'acides gras furent testés.

I.7 Etudes immunologiques et enzymatiques

Pour compléter les données de biologie moléculaire, nous avons également entrepris des études biochimiques et immunologiques de l'enzyme native. La détection de bandes d'activité de type NADPH oxydase et/ou l'utilisation d'anticorps spécifiquement dirigés contre la protéine déduite sur des extraits protéiques de l'algue nous auraient permis d'assigner la présence de la (des) protéine(s) de type NADPH oxydase dans ces extraits. Le microséquençage des bandes d'intérêt issues des études sur gels aurait pu nous permettre d'établir une correspondance entre le gène *Ccrboh* identifié et les protéines isolées dans les extraits, avec éventuellement assignation d'une activité de type NADPH oxydase.

Dans un premier temps j'ai essayé d'identifier la protéine *Ccrboh* dans des extraits bruts ou membranaires, à l'aide d'anticorps spécifiques. Connaissant la séquence déduite de *Ccrboh*, nous avons fait synthétiser des peptides caractéristiques de cette séquence, pour permettre l'obtention d'anticorps spécifiques (le protocole d'obtention est décrit dans la section Matériel et méthodes et a été réalisé par Eurogentec). Le premier anticorps est dirigé contre la zone comprise entre les acides aminés 280 et 295, qui correspond au site de fixation du FAD. Le second anticorps est dirigé contre la partie soluble de la zone d'insertion présente entre les deux sites de fixation du NADPH et entre les acides aminés 489 et 504. Malheureusement **les expériences de western blotting** menées par la suite **ne nous ont pas permis d'identifier l'enzyme *Ccrboh* dans les extraits protéiques de l'algue rouge**. Aucune bande majeure n'est détectée dans les extraits de thalles. Certaines bandes discrètes sont détectées dans quelques extraits mais le fort bruit de fond fait suspecté une détection de bandes aspécifiques. Les extraits membranaires ne permettent pas un enrichissement de ces protéines, les bandes n'étant plus détectées. Pour remédier à ce problème nous avons fait l'hypothèse que l'expression de l'enzyme était induite au cours d'épisodes de stress tels que la génération de protoplastes. Les cellules produisent alors de grandes quantités de FAO, certaines d'entre elles pouvant être relarguées suite à des activités de type NADPH oxydase. J'ai donc par la suite effectué ces mêmes analyses sur des extraits protéiques de protoplastes de gamétophytes. Si aucune bande n'est observée dans le culot de protoplastes, assez curieusement deux bandes de faible taille (35 et 40 kDa) sont détectées dans le milieu de digestion, *a priori* essentiellement constitué de

fragments pariétaux (Figure 37A). La taille des bandes ainsi que leur détection systématique avec les deux anticorps est en désaccord avec les données de séquences dont nous disposons par ailleurs. En effet la séquence code une protéine putative de 93 kDa. La taille réelle peut être plus importante si des modifications post-traductionnelles, telles que des glycosylations, ont lieu. Dans le cas où la protéine aurait été clivée spécifiquement à un endroit au cours de l'extraction, la somme des deux bandes (75 kDa) reste malgré tout inférieure à la taille attendue. Par ailleurs, additionner la taille des deux bandes est un processus logique uniquement si chaque anticorps, dirigé contre deux zones distinctes, ne détecte qu'une seule des deux bandes ; or, pris individuellement, la détection des deux bandes est systématique.

L'absence de détection dans des extraits protéiques totaux ou membranaires, la mise en évidence de deux bandes dans le compartiment apoplastique, à des tailles non-conformes avec celles attendues, nous amène à émettre des réserves sur le fait que ces bandes correspondent à la Ccrboh de *C. crispus*. L'utilisation d'anticorps anti-peptides explique sans doute la difficulté à détecter la protéine cible, dont les fragments sont peut-être masqués par le repliement.

Par la suite **les résultats d'activité sur gel n'ont ni confirmé ceux du western blotting, ni permis de fournir une réponse claire sur la mise en évidence de l'enzyme.** Le protocole de détection de l'activité NADPH oxydase sur gel a été adapté de la méthode décrite par Sagi et Fluhr (2001). Tout comme dans le cas du western blotting, je me suis confrontée à la difficulté d'extraire des protéines membranaires chez un organisme riche en polysaccharides tel que l'algue rouge. Les composés sont certainement mal séparés, les protéines membranaires pénétrant alors difficilement dans les gels natifs d'acrylamide. Si les tests d'activités sur gel natif permettent la détection d'une bande plus au moins nette, ils nous apparaissent peu convaincants (Figure 37B). Le protocole de détection des activités sur gel dénaturant après régénération des protéines ne nous a pas permis de mettre en évidence une activité du même type à partir des mêmes extraits. De plus, la réalisation d'un western blotting à partir des gels d'activités n'a pas donné lieu à la détection de bandes, que ce soit dans le cas des gels natifs ou dénaturants.

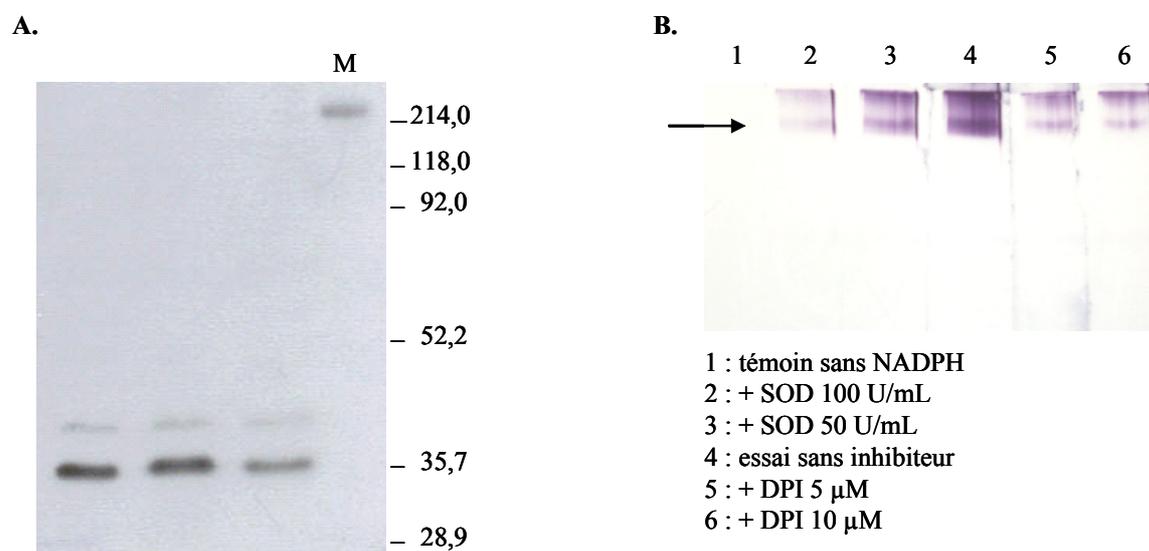


Figure 37 : Etudes immunologiques et biochimiques de l'enzyme native.

- A.** Analyse par Western blotting du milieu de digestion de protoplastes de *C. crispus*. Des anticorps spécifiques de Ccrboh furent utilisés. Le marqueur de taille (M) indique la taille des bandes obtenues.
- B.** Analyse sur gel, d'activités de type NADPH oxydase dans des extraits protéiques de *C. crispus*. Le protocole utilise la précipitation du NBT présentée par Sagi et Fluhr (2001). L'activité est inhibée par la superoxyde dismutase et le DPI.

Au final les études immunologiques et biochimiques ne nous ont pas permis ni de mettre en évidence la présence de l'enzyme Ccrboh dans les extraits, ni celle de protéines ayant une activité de type NADPH oxydase. Actuellement nous ne pouvons pas établir de correspondance entre le transcrit *Ccrboh* de *C. crispus* et sa protéine dans les extraits de l'algue.

I.8 Bilan NADPH oxydase chez *C. crispus*

Au cours de cette étude j'ai pu caractériser au niveau moléculaire l'enzyme suspectée d'être impliquée dans la génération du burst oxydatif chez l'algue rouge *C. crispus*. Ces résultats indiquent l'existence d'un homologue à la NADPH oxydase chez ce modèle, ainsi que chez d'autres algues rouges, unicellulaires ou non, et la diatomée *P. tricornutum*. L'étude phylogénétique de ces séquences semble indiquer l'appartenance à un groupe distinct de celui des ferriques réductases et des homologues animaux ou végétaux des familles Duox ou Nox. Elles apparaissent par ailleurs être proches de la séquence Nox5, malgré des différences structurales. De part ses particularités, Nox5 est supposée être le représentant le plus proche de la séquence primitive. Si la sous-unité catalytique de la NADPH oxydase est conservée chez bien des organismes (mammifères, plantes supérieures, champignons, algues rouges et algues brunes), les processus de régulation de l'activité de l'enzyme sont différents. En revanche, les processus de phosphorylation et déphosphorylation des protéines, ainsi que les flux calciques impliqués dans cette activation, sont rencontrés chez ces organismes.

Les études transcriptionnelles menées sur l'algue rouge *C. crispus*, ont montré que l'expression du gène *Ccrboh* était visiblement impliquée dans des réponses précoces de défense, que se soit lors de l'attaque d'un pathogène ou suite à des traitements chimiques divers. La perception du pathogène *A. operculata* par l'algue rouge provoque une accumulation du transcrit dans les douze heures suivant l'infection. Si globalement les métaux lourds et les pesticides, excepté l'atrazine, ont peu d'effets sur l'expression du gène, les oxylipines en C18 et C20, et plus spécialement le méthyle jasmonate, induisent son expression. Un traitement d'une heure de *C. crispus* par le méthyle jasmonate est par ailleurs connu pour induire une résistance à l'infection par *A. operculata* (Bouarab, 2000). L'induction de l'expression de *Ccrboh* pourrait avoir un rôle à jouer dans la mise en place de cette résistance, avec à la fois production par l'enzyme de FAO toxiques pour le pathogène, et stimulation de réponses de défense par le peroxyde d'hydrogène produit. Des effets protecteurs sont également observés avec l'oxylipine 12-HpETE, qui induit une expression plus modérée du transcrit.

D'une manière générale les évènements mis en place dans la transduction du signal chez les plantes où les animaux, sont connus pour mettre en jeu des dérivés du métabolisme oxydatif d'acides gras. Chez les animaux, les dérivés des acides gras en C20

(éicosanoïdes) régulent des processus de différenciation cellulaire, de réponses immunitaires et d'homéostasie (Funk, 2001). Chez les plantes, les dérivés d'acides gras en C16 et en C18 (octadécanoïdes), tels que le méthyle jasmonate, agissent en tant qu'hormones de défense ou du développement (Weber, 2002 ; Cheong et Choi, 2003). Nos résultats chez l'algue rouge montrent que les deux voies de signalisation des éicosanoïdes et des octadécanoïdes, induisent l'expression du gène *Ccrboh*, en plus de la mise en place de voies de défense et de résistance à l'infection déjà établie par ailleurs (Bouarab, 2000 ; Bouarab *et coll.*, 2004). Ces résultats suggèrent non seulement une perception de ces molécules par l'algue, mais également leur rôle dans la transduction d'un signal, conduisant à l'activation de voies de défense ; ces observations pouvant être attribuées aux oxylipines issues des deux voies de biosynthèse. L'élucidation du rôle de ces composés chez l'algue, des voies métaboliques conduisant à leur biosynthèse et leurs interconnexions, serait une source d'informations vers une meilleure compréhension des mécanismes régulés par les signaux lipidiques chez l'algue et les eucaryotes en général. Elle justifie d'autant plus l'étude de ces modèles plus au moins éloignés phylogénétiquement de l'homme ou des végétaux supérieurs. Chez les plantes, les voies signalitiques impliquant l'acide jasmonique ou ses dérivés, jouent un rôle majeur dans la régulation de la synthèse de métabolites secondaires et l'activation de voies métaboliques du développement et de la défense. Dans ce dernier cas le rôle des jasmonates fait intervenir l'activation de l'expression de gènes de défense ou de gènes impliqués dans leur propre biosynthèse. L'étude au niveau moléculaire de l'effet du méthyle jasmonate chez *C. crispus* pourrait nous apporter des informations sur les voies métaboliques conduisant à la mise en place de la protection chez l'algue.

II. Identification moléculaire d'enzymes du stress oxydatif et de la défense chez *C. crispus*

Au début de mon travail de doctorat nous disposions d'un certain nombre d'informations concernant l'activation des différentes voies de défense chez l'algue rouge *C. crispus* au cours de l'élicitation par des extraits acellulaires de pathogène ou par des dérivés lipidiques. Les études menées par Kamal Bouarab et Emmanuel Gaquerel ont montré le rôle du burst oxydatif dans la mise en place de la résistance, la stimulation des voies de biosynthèse des phénylpropanoïdes et des oxylipines chez l'algue, ainsi que la stimulation d'activités mettant en jeu le métabolisme des acides gras par le méthyle jasmonate. En revanche nous ne disposions d'aucune information moléculaire nous permettant d'étudier plus finement la succession des réactions de défense mise en place dans l'algue et aboutissant à la protection globale et/ou à la synthèse de composés déterminés. **L'identification de marqueurs moléculaires associés aux réponses induites nous était devenue nécessaire afin d'approfondir l'étude de la réponse au stress et à la défense chez *C. crispus*.** Dans ce contexte le gène *Ccrboh* de la NADPH oxydase chez l'algue rouge constituait le premier marqueur moléculaire de réponses précoces à un stimulus extérieur. Le rôle de la protéine codée par ce gène, dans la génération de FAO, n'a pas pu être mise en évidence ; mais la production *in vivo* du peroxyde d'hydrogène à certainement un rôle d'importance dans l'activation de gènes de défense. Le méthyle jasmonate, qui induit la protection chez l'algue, a sans doute un rôle similaire au niveau moléculaire. L'analyse des banques EST mise en place au laboratoire chez *C. crispus* pouvait nous fournir les premières pistes conduisant à l'identification de nouveaux marqueurs reliés à différentes voies de stress ou de défense chez l'algue.

II.1 Présentation du projet EST et analyse

Une première étape à la découverte de gènes jouant un rôle au cours d'un mécanisme physiologique donné est l'étude des changements transcriptionnels survenant au cours de ce processus. L'identification des gènes induits peut fournir les outils moléculaires pour des investigations futures. La réalisation de banques EST fait partie des méthodes performantes pour isoler des gènes induits au cours de divers processus biologiques par rapport à une condition initiale, tels que la réponse au stress ou à la défense. Si ces outils sont également accessibles pour les macroalgues, ils n'ont été utilisés que très récemment chez certains modèles. Au cours de mon doctorat un programme de séquençage de banques EST était mis en place dans l'équipe sur *C. crispus*. Une première banque a été réalisée à partir de thalles de gamétophytes non stressés, afin d'avoir une vue générale des gènes exprimés dans l'algue dans des conditions physiologiques normales. Une seconde banque a été réalisée à partir de protoplastes du même modèle. Les protoplastes sont générés par fragmentation des thalles et digestion enzymatique de la paroi. Ils représentent un stade ultime de blessure, les cellules se retrouvant désolidarisées de leurs tissus, dans un milieu riche en molécules radicalaires : elles font face à des stress multiples de types mécaniques, osmotiques et oxydants. Nous faisons le postulat que pour réagir à ces conditions extrêmes les cellules allaient exprimer de nombreux gènes de défense et des gènes impliqués dans la synthèse pariétale.

La mise en place de cette stratégie EST, en utilisant des conditions ciblées, nous permettait d'obtenir sans *a priori* des banques d'ADNc enrichies en gènes sur-exprimés au cours de la production de protoplastes. Cette approche était une étape préliminaire indispensable vers une meilleure compréhension des mécanismes mis en place par l'algue rouge pour répondre au stress. Le projet a permis de séquencer 2 052 EST de thalles et 2 002 EST de protoplastes (Collén *et coll.*, 2006). Les redondances obtenues pour les banques de thalles (43 %) et de protoplastes (58 %) indiquent une représentativité correcte des gènes exprimés dans ces conditions.

De nombreux gènes de stress sont présents dans la banque de protoplastes (18 %) par rapport à la banque de thalles (3,5 %). Une grande majorité d'entre eux est constituée de chaperonnes et de protéines Heat Shock. Des gènes connus pour être impliqués dans les mécanismes de défense et de réponse au stress ont également été identifiés, tels que les peroxydases (bromoperoxydases, myéloperoxydases) et la NADPH oxydase. Une autre

catégorie importante comprend des enzymes impliquées dans le métabolisme antioxydatif ou de détoxification de xénobiotiques (catalases, ascorbate peroxydases, oxydoréductases, glutathion S-transférases). L'obtention de ces banques EST nous fournit un outil essentiel pour l'identification des gènes impliqués dans les réponses au stress et à la défense chez *C. crispus*. Afin de poursuivre le travail d'analyse de ces réponses au niveau moléculaire, je me suis plus particulièrement intéressée aux EST présentant des homologues de séquences avec des enzymes du stress oxydatif et de la détoxification. Un certain nombre de cibles a retenu mon attention, à la fois de part leur fonction putative, et de part leur forte représentativité dans les banques (Tableau 5). Le re-séquençage systématique des clones a permis l'obtention de plusieurs séquences pleine-longueur. Chaque gène a été comparé et caractérisé de façon plus précise par rapport aux séquences déjà présentes dans les banques de données publiques et en fonction des éléments de la littérature. Ce travail d'analyse a par la suite abouti à une étude transcriptionnelle plus spécifique de ces gènes au cours de divers traitements, et plus particulièrement suite à une élicitation par le méthyle jasmonate, déjà connu pour induire des réactions de défense et l'expression du gène *Ccrboh* chez l'algue.

Protéine putative	Nom de la séquence	Nombre d'EST	Banque d'origine
NADPH oxydase	Ccrboh	1	Protoplastes
Bromoperoxydase	CcBPO1	15	Protoplastes
	CcBPO2	4	Protoplastes
Myéloperoxydase	CcMPO1	12	Thalles
	CcMPO2	10	Protoplastes
	CcMPO3	5	Protoplastes
Peroxiredoxine	CcPrx1	5	Thalles/protoplastes
	CcPrx2	1	Thalles
Cytochromes P450	CcCYPt1	1	Thalles
	CcCYPt2	1	Thalles
	CcCYPp1	1	Protoplastes
Glutathion S-transférase	CcGST1	41	Protoplastes
	CcGST2	12	Protoplastes
	CcGST7	2	Protoplastes

Tableau 5 : Exemples de transcrits isolés des banques EST, codant des enzymes du stress oxydatif, de la défense et de la détoxification

II.2 Enzymes du stress oxydatif : NADPH oxydase et haloperoxydases

II.2.1 La NADPH oxydase

Le cas de la NADPH oxydase a déjà été traité dans le chapitre précédent. La séquence du gène *Ccrboh* préalablement identifiée est également représentée par un transcrit dans la banque EST de protoplastes.

II.2.2 Les bromoperoxydases à vanadium

Les haloperoxydases sont communément rencontrées chez les algues marines. Elles catalysent l'absorption des halogénures puis leur relargage sous formes de composés halogénés lors d'épisodes de stress. Ces enzymes ont fait l'objet d'études plus spécifiques au sein du laboratoire. **Les deux clusters *CcBPO1* et *CcBPO2* identifiés dans les banques de *C. crispus* présentent de fortes homologues avec des bromoperoxydases et partagent entre eux 85 % d'identité (Cosse, 2003 –rapport de DEA).** Le re-séquençage de ces séquences faisait supposer l'existence d'autres gènes potentiels, certains EST présentant des variations de séquences par rapport aux clusters. Des expériences de 5'-RACE PCR ont permis l'obtention de l'ADNc pleine longueur de *CcBPO1*.

La séquence nucléotidique de *CcBPO1* compte 2 193 pb et code une protéine pleine longueur de 631 acides aminés. La séquence nucléotidique de *CcBPO2* compte 1 433 pb et code une protéine incomplète de 411 acides aminés. Ces deux séquences présentent de fortes homologues avec des bromoperoxydases à vanadium d'autres algues rouges (algues calcaires telles que les corallines) et d'algues brunes (genres *Fucus*, *Ascophyllum* et *Laminaria*). La forte similitude des séquences de bromoperoxydases de *C. crispus* avec celles d'algues rouges calcaires est présentée sous forme d'alignement à la [Figure 38](#). En outre *CcBPO1* et *CcBPO2* partagent un taux de similarité extrême avec 97 % d'identité et 99 % de similitude sur les séquences alignables.

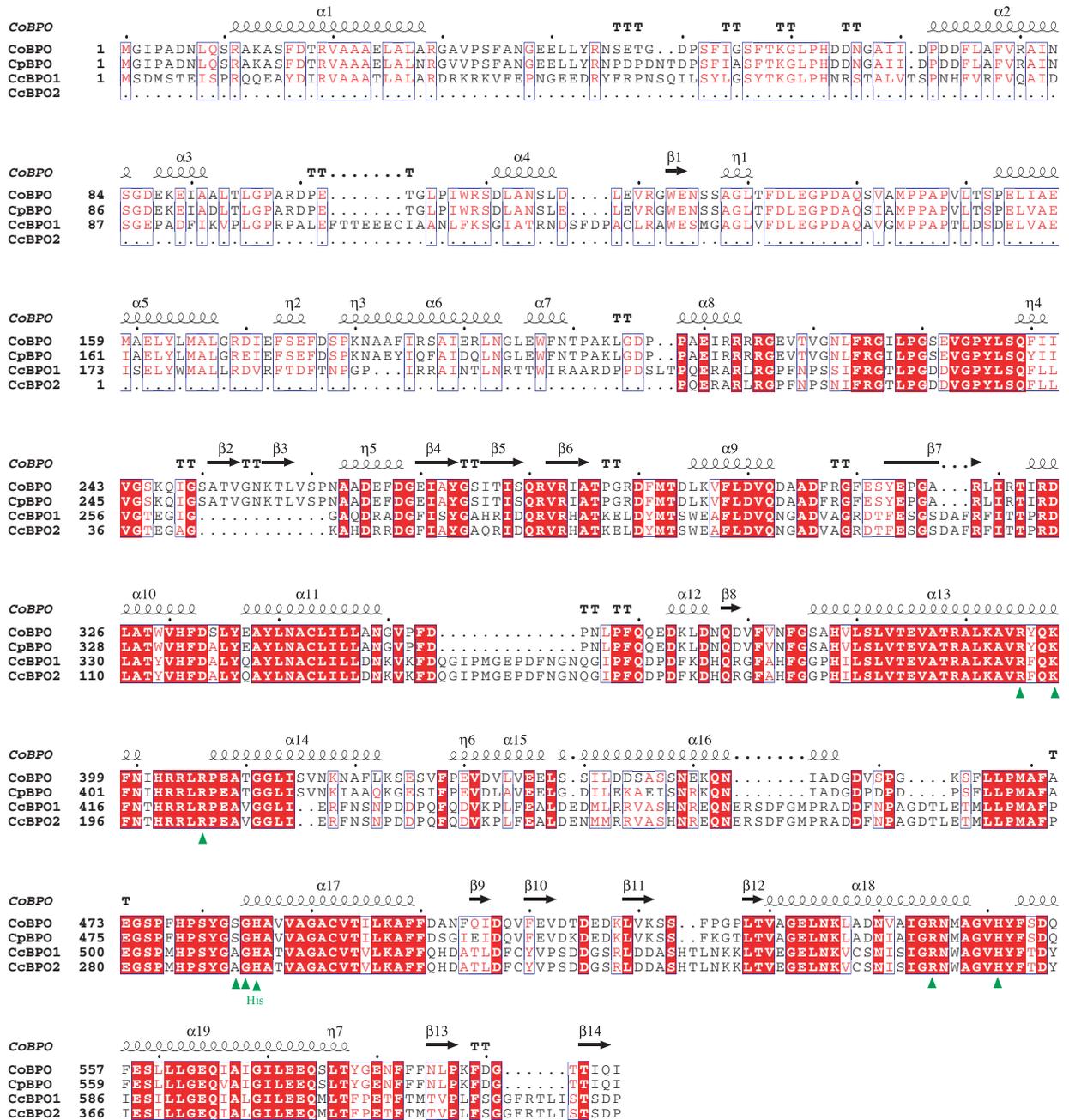


Figure 38 : Alignement des bromoperoxydases CcBPO1 et CcBPO2 de *C. crispus* avec des homologues d'algues rouges calcaires

Alignement des séquences protéiques déduites des bromoperoxydases dépendantes du vanadium CcBPO1 et CcBPO2 de *C. crispus* avec ses homologues chez les algues rouges calcaires *Corallina officinalis* (CoBPO) et *Corallina pilulifera* (CpBPO). La séquence CcBPO2 est incomplète. Les résidus strictement conservés sont indiqués en blanc sur fond rouge, les résidus similaires en rouge et encadrés en bleu. La structure secondaire de CoBPO est représentée au-dessus de l'alignement. Les hélices alpha et les feuilletts beta sont figurés respectivement par des hélices et des flèches, les coudes beta par des TT. Les résidus impliqués dans la fixation du vanadate sont signalés par des triangles verts, tout comme l'histidine catalytique. L'alignement a été réalisé en utilisant les séquences suivantes (organisme, numéro d'accèsion NCBI/pdb) : CoBPO (*Corallina officinalis*, 9256871/1QHB) et CpBPO (*Corallina pilulifera*, 37928255).

Les résidus impliqués dans la fixation du vanadate par des liaisons hydrogène sont conservés chez les séquences de *C. crispus* : Arg412, Lys415, Arg423, Gly511, Arg574 pour CcBPO1 et Arg192, Lys195, Arg204, Gly291, Arg354 pour CcBPO2. En revanche la sérine identifiée chez les séquences de corallines, est remplacée par une alanine chez les séquences de *C. crispus* : respectivement Ala510 et Ala290 pour CcBPO1 et CcBPO2. Elle engendre une modification de la conformation spatiale de la poche abritant le site actif, et pourrait de ce fait influencer la **spécificité de substrat**. En effet une telle différence est également rencontrée chez une iodoperoxydase de *Laminaria digitata*, où l’alanine est impliquée dans la spécificité pour l’iode (Colin *et coll.*, 2005). Le résidu histidine lié de façon covalente au vanadate est conservé chez les séquences de *C. crispus* (His580 et His360 respectivement chez CcBPO1 et CcBPO2), tout comme l’histidine catalytique (His512 et His292 respectivement chez CcBPO1 et CcBPO2).

II.2.3 Les myéloperoxydases

Les myéloperoxydases, tout comme les peroxydases d’éosinophiles, ovoperoxydases, ou autres peroxydases de type animal, sont rencontrées chez les mammifères, les insectes, les nématodes et certaines bactéries. Elles sont impliquées dans la formation de formes actives halogénées de l’oxygène en utilisant les ions superoxyde libérés par la NADPH oxydase pour produire de l’hypochlorite HOCl, cinquante fois plus toxique que le peroxyde d’hydrogène. **Les 3 clusters identifiés dans les banques d’EST de *C. crispus* présentent de très fortes similitudes avec les peroxydases animales et possèdent notamment les sites strictement conservés chez ces enzymes.** Les gènes de myéloperoxydases chez *C. crispus* font partie des gènes les plus moyennement à fortement exprimés dans les banques d’EST.

Le 1^{er} cluster (*CcMPO1*) est constitué de 12 EST provenant de la banque de thalles de gamétophytes, contrairement aux deux autres clusters construits à partir d’EST de la banque de protoplastes. La séquence de 910 pb est incomplète. La 1^{ère} méthionine est rencontrée au 25^{ème} codon, et il n’y a pas de codon stop. La séquence protéique putative est incomplète en C-terminal et serait complète en N-terminal avec 278 acides aminés. Elle possède entre 25 et 30 % d’identité avec des séquences de myéloperoxydases de mammifères et des peroxydases de la bactérie marine *Rhodospirellula baltica*.

Le second cluster (*CcMPO2*) est constitué de 10 EST provenant de la banque de protoplastes. La séquence de 1 675 pb est incomplète. La 1^{ère} méthionine est rencontrée au 11^{ème} codon, et il n'y a pas de codon stop. La séquence protéique putative est pratiquement complète en C-terminal et complète en N-terminal avec 548 acides aminés. Elle possède entre 30 et 40 % d'identité avec les myéloperoxydases de mammifères et des peroxydases de la bactérie marine *Rhodopirellula baltica*. Considérant les parties alignables, CcMPO2 partage 47 % d'identité et 60 % de similitude avec CcMPO1.

Le dernier cluster (*CcMPO3*) est constitué de 5 EST provenant de la banque de protoplastes. La séquence de 1 316 pb est incomplète. La 1^{ère} méthionine est rencontrée au 63^{ème} codon, et il y a 6 codons stop sur la partie 5'. Il y aurait des incertitudes de séquençage sur les 1ères bases de la séquence, compte tenu que le 1^{er} codon est un stop alors que la séquence protéique putative est largement incomplète en N-terminal. En revanche elle serait complète en C-terminal, avec 392 acides aminés. Elle possède entre 30 et 35 % d'identité avec les peroxydases d'éosinophiles, les myéloperoxydases de mammifères et des peroxydases de la bactérie marine *Rhodopirellula baltica*. Considérant les parties alignables, CcMPO2 partage 48 % d'identité et 65 % de similitude avec CcMPO1, contre 49 % et 68 % respectivement avec CcMPO2.

Trois singletons présentant des variations de séquences ont également été identifiés dans la banque de protoplastes. Les séquences sont beaucoup plus courtes car largement incomplètes, avec 870, 474 et 877 pb, avec des cadres ouverts de lecture de 289, 147 et 247 acides aminés respectivement. Ces séquences présentent entre 25 et 40 % d'identité avec des myéloperoxydases présentes dans les banques de données publiques, et entre 25 et 65 % d'identité avec les 3 clusters déjà identifiés chez *C. crispus*.

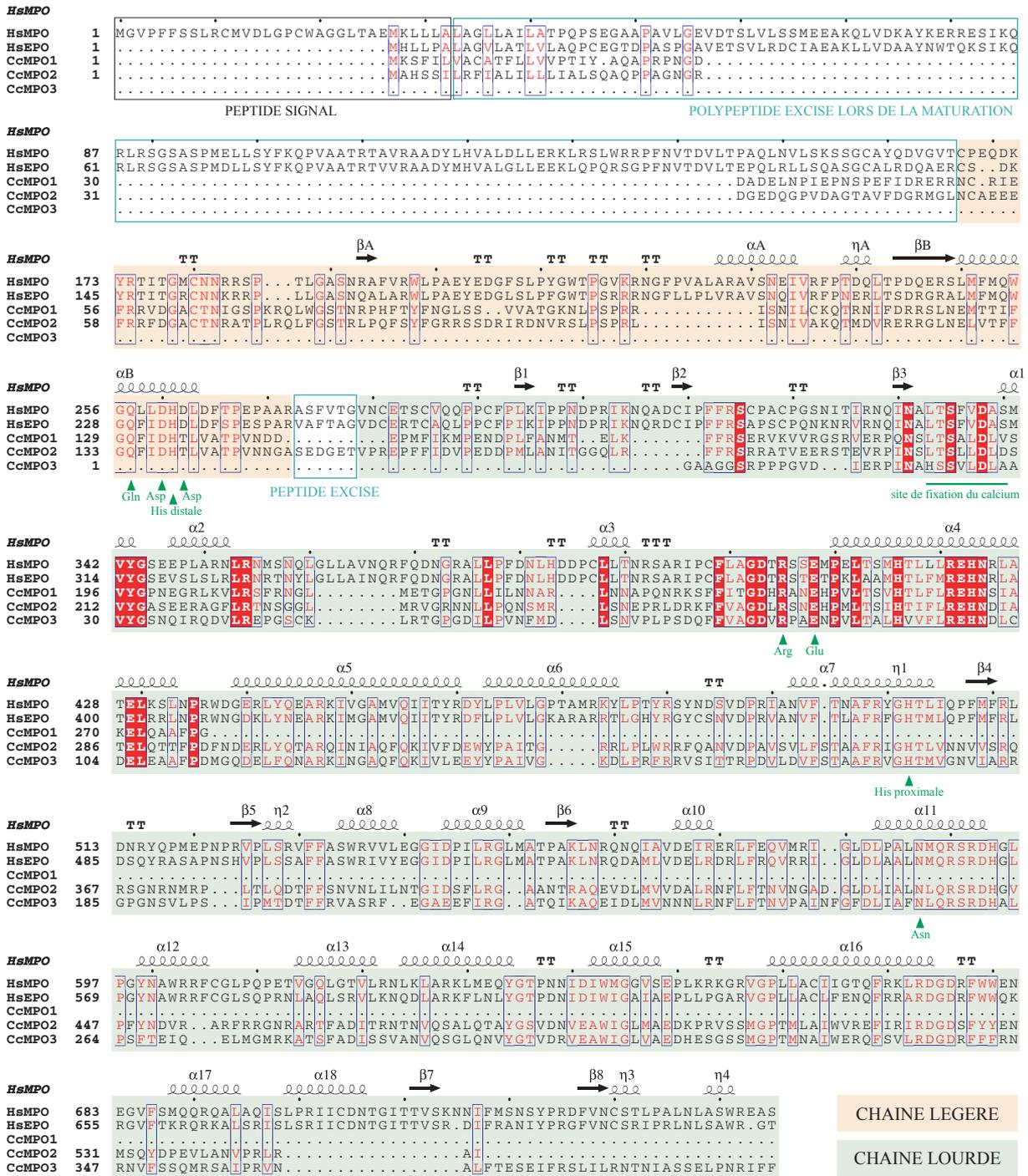


Figure 39 : Alignement des myeloperoxydases CcMPO1, CcMPO2 et CcMPO3 de *C. crispus* avec une myeloperoxydase humaine et une peroxydase d'éosinophile humaine

Alignement des séquences protéiques déduites, partielles et non maturées, des myeloperoxydases CcMPO1, CcMPO2 et CcMPO3 de *C. crispus* avec une myeloperoxydase humaine (HsMPO) et une peroxydase d'éosinophile humaine (HsEPO). Les résidus strictement conservés sont indiqués en blanc sur fond rouge, les résidus similaires en rouge et encadrés en bleu. La structure secondaire de HsMPO est représentée au-dessus de l'alignement. Les hélices alpha et les feuillets beta sont figurés respectivement par des hélices et des flèches, les coudes beta par des TT. Les fragments polypeptidiques excisés lors de la maturation sont encadrés. La chaîne légère et la chaîne lourde sont représentées respectivement sur fond orange et bleu. Les résidus catalytiques importants sont signalés par des triangles verts. L'alignement a été réalisé en utilisant les séquences suivantes (organisme, numéro d'accèsion NCBI/pdb) : HsMPO (*Homo sapiens*, 18158819/1DNU) et HsEPO (*Homo sapiens*, 4503595).

L'alignement présenté en [Figure 39](#) permet d'apprécier les similitudes des séquences les plus complètes identifiées chez *C. crispus* avec celles d'une myéloperoxydase et d'une peroxydase éosinophile humaines, ainsi qu'avec celle d'une peroxydase de *Rhodospirellula baltica*. Ces enzymes sont des homodimères où chaque monomère est lui-même constitué d'une chaîne lourde et d'une chaîne légère. La structure secondaire du monomère est majoritairement composée d'hélices α . Le cœur central contenant les hèmes est constitué de 5 hélices α , quatre provenant de la chaîne lourde et la dernière de la chaîne légère ([Furtmuller et coll., 2006](#)). Les deux chaînes sont codées par un même polypeptide précurseur qui est ensuite excisé. Le monomère de la myéloperoxydase mature est obtenu après le clivage du peptide signal et excision du polypeptide précédant la chaîne légère en N-terminal, ainsi que d'un court fragment peptidique situé entre les deux chaînes ([Figure 39](#)). Les séquences du monomère avant maturation seraient plus courtes chez l'algue rouge (environ 590 acides aminés contre 745 pour HsMPO), en raison de la présence d'un domaine N-terminal restreint : le polypeptide excisé lors de la maturation est ainsi beaucoup plus court que celui rencontré chez la myéloperoxydase humaine (en moyenne 45 acides aminés contre 125). En revanche les deux chaînes légères et lourdes seraient de tailles équivalentes.

Les résidus histidine impliqués dans la fixation covalente de l'hème sont conservés chez les séquences de *C. crispus* : l'histidine distale située sur la chaîne légère (His134 et His138 respectivement pour CcMPO1 et CcMPO2), ainsi que l'histidine proximale située sur la chaîne lourde (His356 et His174 respectivement pour CcMPO2 et CcMPO3). L'asparagine située en C-terminal de la chaîne lourde (Asn437 et Asn254 pour respectivement CcMPO2 et CcMPO3) est reliée à l'histidine proximale par une liaison hydrogène et interviendrait dans la stabilisation du dimère. La glutamine située à proximité de l'histidine distale est typiquement rencontrée chez les peroxydases de type animale et absente de la cavité distale des peroxydases des plantes supérieures ([Furtmuller et coll., 2006](#)), or un tel résidu est également présent chez les séquences de *C. crispus* CcMPO1 (Gln130) et CcMPO2 (Gln134). L'arginine située sur la chaîne lourde est également importante pour l'établissement de cette cavité et est absolument conservée chez les 3 séquences de l'algue rouge (Arg247, Arg263 et Arg81 respectivement pour CcMPO1, CcMPO2 et CcMPO3), de même pour le résidu glutamate situé en aval (Glu250, Glu266 et Glu384 respectivement pour CcMPO1, CcMPO2 et CcMPO3). En revanche au niveau du site de fixation du calcium seuls 4 résidus sont conservés chez CcMPO1 (Leu187, Thr188,

Ser189, Asp192) et CcMPO2 (Leu203, Thr204, Ser205, Asp208) contre les huit habituellement rencontrés (Leu, Thr, Ser, Phe, Val, Asp, Ala, Ser). La conservation pour ce site est encore plus faible pour CcMPO3 avec deux résidus conservés (Ser23, Asp26), mais l'information de séquence étant incomplète en N-terminal, l'alignement pourrait être amené à changer avec la séquence pleine longueur. Au niveau de la chaîne légère le résidu aspartate situé en amont de l'histidine distale est conservé chez CcMPO1 (Asp133) et CcMPO2 (Asp137). Il jouerait également un rôle de ligand du calcium tout en facilitant les interactions entre les deux chaînes du monomère. Le résidu aspartate suivant est quant à lui remplacé par un résidu thréonine chez CcMPO1 (Thr135) et CcMPO3 (Thr139).

L'identification de myéloperoxydases chez *C. crispus* constitue la première mise en évidence de ces enzymes chez les végétaux. Elles pourraient avoir une activité de défense par production de composés toxiques. Outre leur rôle d'oxydation des halogénures et de génération de formes actives de l'oxygène, les myéloperoxydases ont également un rôle dans la peroxydation des lipides chez les mammifères, essentiellement à partir d'acides gras en C18 et C20 (acides linoléique et arachidonique). Elles pourraient être impliquées dans de telles fonctions chez l'algue rouge *C. crispus*, compte tenu que de tels précurseurs y sont naturellement présents.

II.3 Enzymes à activités anti-oxydantes : cas de la peroxiredoxine

La glutathion peroxydase assure la réduction du peroxyde d'hydrogène et des hydroperoxydes d'acides gras en utilisant le glutathion comme cofacteur. Chez les mammifères son rôle est très important dans la plupart des tissus où elle réalise l'élimination de la quasi-totalité du peroxyde d'hydrogène. Les peroxiredoxines ont une activité de type glutathion peroxydase mais avec la particularité de ne pas utiliser de sélénium au niveau de leur site actif. Elles appartiennent à une super-famille d'enzymes contenant toutes un motif de type thiorédoxine et interagissent avec des substrats contenant des groupements thiols ou disulfides. Ces enzymes peuvent être divisées en plusieurs classes telles que : les peroxiredoxines Prx, les glutathion peroxydases GPx, les glutathion S-transférases GST, les thiorédoxines Trx, les glutaredoxines Grx.

Deux séquences de peroxiredoxines ont été identifiées dans les banques de *C. crispus*. Elles se caractérisent toutes deux par des **forts taux d'identité avec des séquences de mammifères** (de 45 à 50 %). La 1^{ère} séquence (*CcPrx1*) est celle d'un cluster constitué de 5 EST, provenant indifféremment de la banque de thalles ou de celle de protoplastes. La séquence d'ADNc de 928 pb serait complète et code une protéine de 249 acides aminés, avec un poids moléculaire théorique de 27,6 kDa. La 2^{ème} séquence (*CcPrx2*) est celle d'un singleton provenant de la banque de thalle. La séquence d'ADNc de 841 pb serait complète et code une protéine de 246 acides aminés. *CcPrx2* partage 38 % d'identité et 54 % de similitude avec *CcPrx1*.

Les peroxiredoxines sont des enzymes fortement conservées à la fois chez les eucaryotes et les procaryotes. Elles sont généralement présentes dans l'organisme sous forme d'homodimères ou d'hétérodimères. Le monomère est constitué d'un premier domaine en N-terminal contenant le motif thiorédoxine ($\beta 3\alpha 2\beta 4\alpha 4\beta 6\beta 7$), le second domaine en C-terminal est majoritairement constitué d'hélices α (Figure 40). La dimérisation est majoritairement stabilisée par des interactions entre des résidus du 1^{er} domaine avec ceux du 2nd domaine de l'autre monomère. Les résidus du 1^{er} domaine impliqués dans cette interaction sont strictement conservés chez *C. crispus* : Phe64, Thr65, Pro66, Val67, Thr69, Thr70, Glu71 chez *CcPrx1* et Phe41, Thr42, Pro43, Val44, Thr46, Thr47, Glu48 chez *CcPrx2*. En revanche la conservation est moindre pour les résidus du 2nd domaine impliqués dans ces interactions, avec uniquement conservation stricte des résidus proline et tyrosine chez les deux séquences : Ala197, Phe213, Pro216, Tyr241, Met242 chez *CcPrx1* contre Val180, Val189, Pro192, Tyr218, Leu219 chez *CcPrx2*. En plus de ces liaisons hydrogène, deux résidus impliqués dans des interactions hydrophobes sont conservés à la fin du 1^{er} domaine : Leu165 et Tyr169 pour *CcPrx1* et Leu146 et Tyr150 pour *CcPrx2*. Le résidu catalytique majeur, la cystéine située au niveau du 1^{er} domaine, est conservé chez les séquences de l'algue rouge *CcPrx1* (Cys68) et *CcPrx2* (Cys45). Ce résidu est remplacé par une sélénocystéine chez les glutathion peroxydases à sélénium. Les résidus histidine et arginine du 1^{er} domaine ont également un rôle primordial dans l'activité en interagissant avec ce résidu : His60 et Arg152 chez *CcPrx1* et His37 et Arg133 chez *CcPrx2* (Choi *et coll.*, 1998).

Certaines peroxiredoxines (2-Cys-Prx) possèdent une seconde cystéine dans leur région C-terminale. Ce résidu interagit au cours de la réaction de réduction du H₂O₂ avec la cystéine catalytique, pour former un pont disulfide intermoléculaire (Choi *et coll.*, 1998). Ce résidu est remplacé respectivement par une alanine et une valine chez CcPrx1 (Ala197) et CcPrx2 (Val180). Les isoformes identifiées font partie du groupe 1-Cys-peroxiredoxines. Des homologues aux 2-Cys-Prx chloroplastiques de plantes supérieures ont également été identifiées chez l'algue rouge *Porphyra purpurea* et la cyanobactérie *Synechocystis*. Les forts taux de similitudes entre ces isoformes font suggérer l'introduction de peroxiredoxines plastidiales chez les plantes suite au processus d'endosymbiose primaire qui a permis le développement des chloroplastes (Dietz *et coll.*, 2002).

D'autres peroxiredoxines sont bifonctionnelles, possédant une activité de type phospholipase A2 en plus de leur activité de glutathion peroxydase (Chen *et coll.*, 2000). Le résidu sérine, remplacé par une lysine chez CcPrx1 (Lys 52) mais conservé chez CcPrx2 (Ser30) constituerait le résidu catalytique impliqué dans l'activité hydrolase de type phospholipase A2 Ca-indépendante. Outre leur rôle dans des processus anti-oxydatifs de protection de la cellule, certaines isoformes de peroxiredoxines pourraient avoir un rôle dans la libération d'acides gras membranaires.

II.4 Enzymes de détoxification active : cytochromes P450 et glutathion S-transférases

II.4.1 Les cytochromes P450

L'oxydation des substrats est quantitativement la réaction de phase I la plus importante et elle est essentiellement catalysée par la famille des cytochromes P450. Chez l'homme les différentes familles du cytochrome P450 peuvent être subdivisées en deux grands groupes : celles qui interviennent dans la synthèse des substances endogènes telles que les stéroïdes, les leucotriènes ou les prostaglandines, et celles qui interviennent dans le métabolisme des xénobiotiques.

Trois séquences homologues à des cytochromes P450 ont été identifiées chez *C. crispus*, mais elles sont largement incomplètes. Deux singletons ont été isolés à partir de la banque de thalles (*CcCYPt1* et *CcCYPt2*) et un singleton à partir de la banque de protoplastes (*CcCYPp1*). La séquence codée par l'ADNc de 697 pb de *CcCYPt1* est complète en C-terminal avec 199 acides aminés, les deux autres séquences sont incomplètes aux deux extrémités avec des ADNc de 1 595 pb et 372 pb codant 284 et 124 acides aminés pour respectivement *CcCYPp1* et *CcCYPt2*.

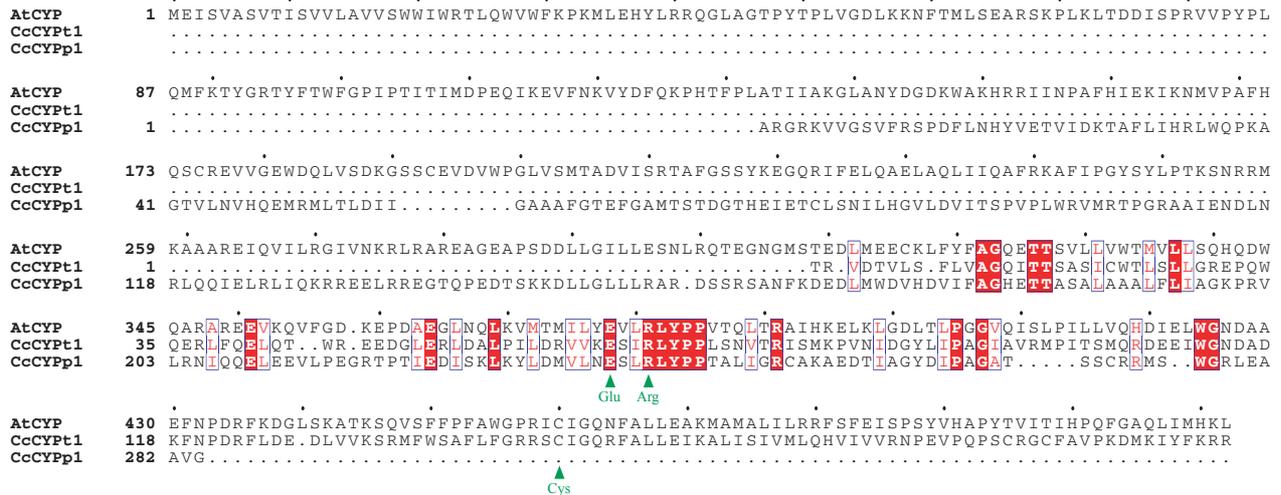
Les séquences sont trop courtes pour l'obtention de taux de similitudes entre les séquences. Les recherches d'homologues dans les banques de données montrent que *CcCYPt1* et *CcCYPp1* sont plus proches de cytochromes P450 de plantes supérieures, mais ces analyses ne permettent pas de déterminer l'appartenance à une famille donnée. En revanche *CcCYPt2* présente un fort taux de similitude avec des cytochromes P450 de la famille 51, qui ont la particularité d'être impliqué dans des voies endogènes de biosynthèse des stéroïdes.

Les stéroïdes 14 α -déméthylases (CYP51) constituent l'unique famille de cytochromes P450 représentée parmi tous les règnes de l'arbre du vivant, des eucaryotes aux procaryotes. Elles sont considérées comme les membres les plus anciens de cette large famille. Elles ont par ailleurs une spécificité de substrat bien définie, qui illustre sans doute le maintien au cours de l'évolution de voies de biosynthèses endogènes essentielles. Seuls quatre substrats sont connus actuellement sur l'ensemble des CYP51 étudiées jusqu'à présent ; ce sont tous des stéroïdes et on peut fortement supposer que l'enzyme homologue

CcCYPt2 chez *C. crispus* soit également impliquée dans le métabolisme endogène de telles molécules (Bellamine *et coll.*, 2001 ; Lepesheva et Waterman, 2004).

Les trois résidus Glu, Arg et Cys conservés chez toutes les isoformes de cytochromes P450 sont indiqués sur les alignements de la Figure 41. Ils sont conservés chez les séquences de l'algue rouge pour lesquelles on dispose de l'information de séquence : CcCYPt1 (Glu66, Arg69, Cys147) et CcCYPp1 (Glu237, Arg240). Pour CcCYPt2 les résidus Tyr46 et Asp60 sont également conservés, intervenant respectivement dans le maintien du site actif dans sa conformation fonctionnelle et dans l'interaction avec le stérol. Les résidus Phe53, Gln54 également conservés joueraient un rôle structural indispensable au maintien de l'activité (Lepesheva et Waterman, 2004).

A



B

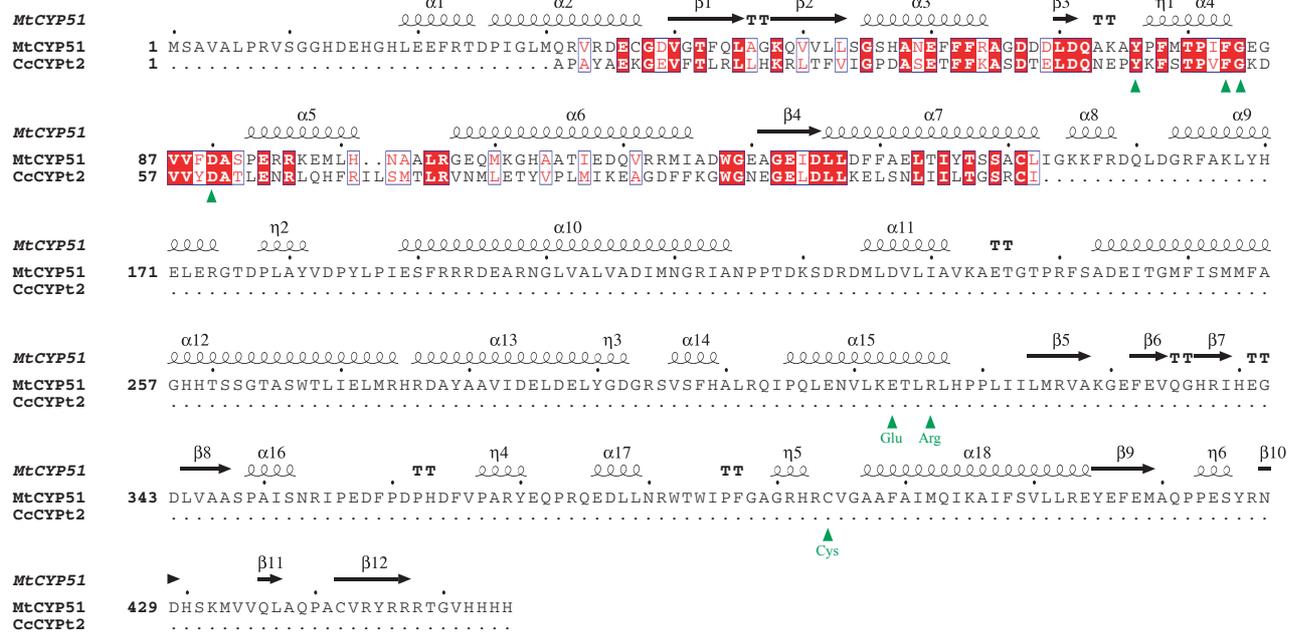


Figure 41 : Alignement des cytochromes P450 CcCYPt1, CcCYPp1 et CcCYPt2 de *C. crispus* avec des homologues correspondants chez *A. thaliana* et *Mycobacterium tuberculosis*

Les résidus strictement conservés sont indiqués en blanc sur fond rouge, les résidus similaires en rouge et encadrés en bleu. Les résidus glutamate, arginine et cystéine conservés chez toutes les cytochromes P450 sont signalés par des triangles verts et identifiés.

- A. Alignement des séquences protéiques déduites partielles des cytochromes P450 CcCYPt1 et CcCYPp1 de *C. crispus* avec un homologue rencontré chez *A. thaliana* (AtCYP450).
- B. Alignement de la séquence protéique déduites partielle du cytochrome P450 CcCYPt2 de *C. crispus* avec son homologue, de la famille 51 des stérols 14 α -déméthylases, rencontré chez *M. tuberculosis* (MtCYP51). Les résidus indispensables au maintien de l'activité sont signalés par des triangles verts. La structure secondaire de MtCYP51 est représentée au-dessus de l'alignement.

Les alignements ont été réalisés en utilisant les séquences suivantes (organisme, numéro d'accension NCBI/pdb) : AtCYP450 (*Arabidopsis thaliana*, 9294391) et MtCYP51 (*Mycobacterium tuberculosis*, 13400015/1E9X).

II.4.2 Les glutathion S-transférases

Les glutathion S-transférases constituent une famille formée d'un très grand nombre d'isoenzymes. Elles possèdent de nombreuses fonctions, la plupart étant en relation directe avec les mécanismes de protection cellulaire. Un de leur rôle majeur est la détoxification de composés électrophiles lors du métabolisme de Phase II du processus de détoxification cellulaire.

Trois clusters de glutathion S-transférase ont été identifiés dans la banque de protoplastes, ils font partie des **gènes les plus fortement à moyennement exprimés dans le protoplaste**. Ils sont représentés par 41, 12 et 2 EST pour respectivement *CcGST1*, *CcGST2* et *CcGST7*. Les trois séquences sont pleine longueur.

La séquence nucléotidique de *CcGST1* compte 854 pb et code une protéine de 210 acides aminés. La séquence nucléotidique de *CcGST2* compte 958 pb et code une protéine de 209 acides aminés. *CcGST2* partage 52 % d'identité avec *CcGST1*; elles appartiendraient donc à la même famille de glutathion S-transférases. *CcGST1* et *CcGST2* présentent les **meilleurs taux de similitude avec des glutathion S-transférases de la classe sigma**, avec des taux d'identité allant jusqu'à 32 %. Ce taux est en revanche trop faible pour assigner à ces séquences l'appartenance à une classe.

La séquence nucléotidique de *CcGST7* compte 1 036 pb et code une protéine de 230 acides aminés. Cette séquence est différente des deux autres, et ne partage que 17 et 20 % d'identité avec respectivement *CcGST1* et *CcGST2*, faisant supposer l'appartenance à une famille distincte de glutathion S-transférases. Les meilleurs taux d'identité partagés avec les séquences présentes dans les banques de données publiques ne dépassent pas 27 %, et ce avec des glutathion S-transférases des classes beta, epsilon, delta et zêta.

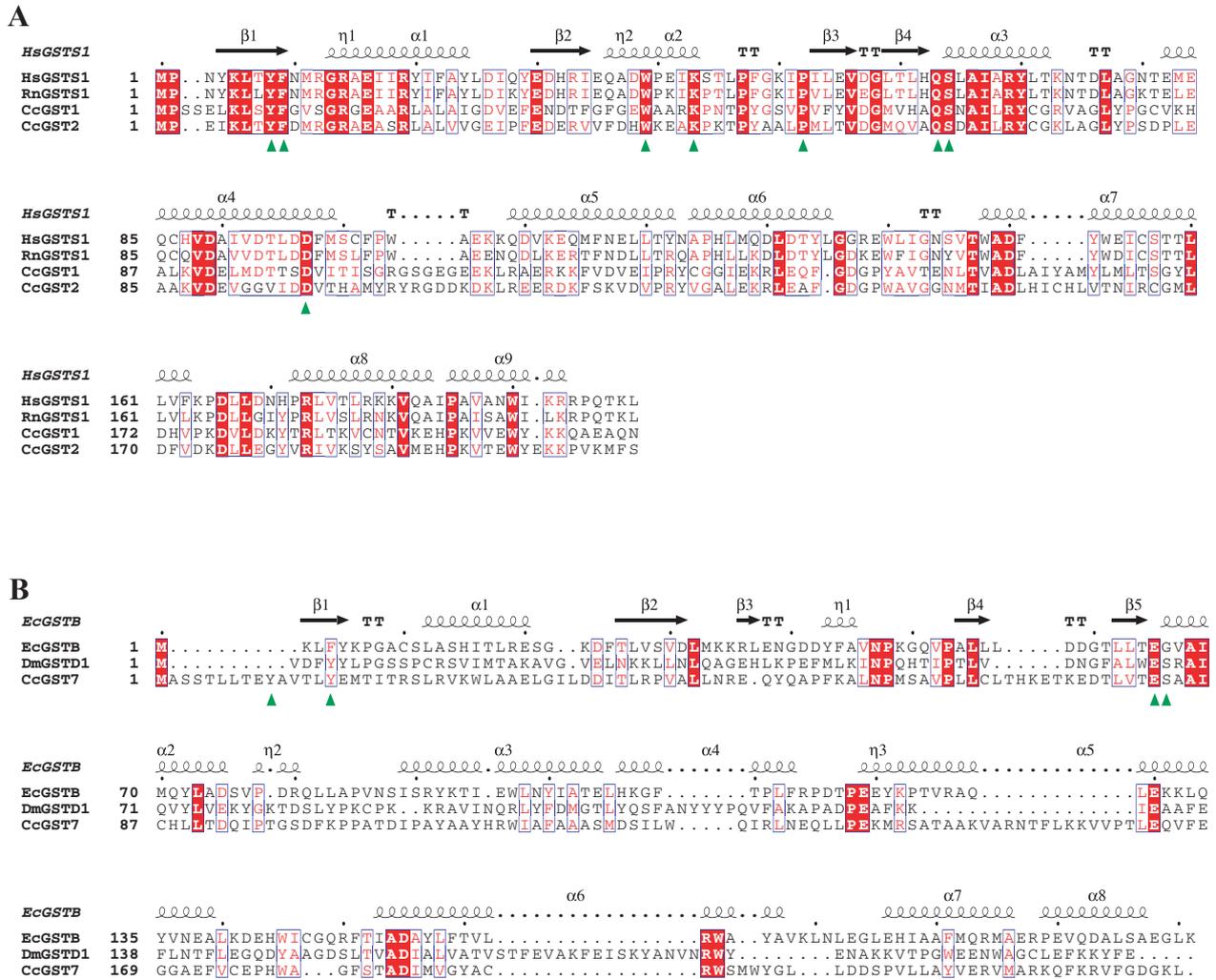


Figure 42 : Alignement des glutathion S-transférases CcGST1, CcGST2 et CcGST7 de *C. crispus* avec des homologues des classes correspondantes

Les résidus strictement conservés sont indiqués en blanc sur fond rouge, les résidus similaires en rouge et encadrés en bleu. Les résidus importants pour la fixation et la catalyse du glutathion et du second substrat sont signalés par un triangle vert.

- A. Alignement des séquences déduites des glutathion S-transférases CcGST1 et CcGST2 de *C. crispus* avec des homologues de la classe sigma présentant une activité prostaglandine synthase rencontré chez l'homme (HsGSTS1) et le rat (RnGSTS1). La structure secondaire de HsGSTS1 est représentée au-dessus de l'alignement.
- B. Alignement de la séquence protéique déduite de glutathion S-transférase CcGST7 de *C. crispus* avec deux homologues, l'un provenant de la classe beta spécifique des bactéries (EcGSTB), l'autre provenant de la classe delta spécifique des insectes (DmGSTD1). La structure secondaire de EcGSTB est représentée au-dessus de l'alignement.

Les alignements ont été réalisés en utilisant les séquences suivantes (organisme, numéro d'accension NCBI/pdb) : HsGSTS1 (*Homo sapiens*, AAH20734/1IYI), RnGSTS1 (*Rattus norvegicus*, NP8113832), EsGSTB (*Escherichia coli*, AAC74707/1N2A) et DmGSTD1 (*Drosophila melanogaster*, AAB26519).

La Figure 42 présente les séquences de *C. crispus* alignées avec les homologues des classes les plus proches. La région la plus conservée parmi les glutathion S-transférases cytosoliques est le domaine N-terminal responsable de la fixation du glutathion. Il représente un tiers de la protéine et possède le motif thiorédoxine $\beta\alpha\beta\alpha\beta\alpha$.

CcGST1 et CcGST2 sont comparées avec des membres de la classe sigma. Neuf des onze résidus potentiellement impliqués dans la fixation du glutathion sont conservés chez CcGST1 (Tyr10, Phe11, Arg16, Trp41, Lys45, Pro54, Gln65, Ser66, Asp99) et CcGST2 (Tyr8, Phe9, Arg14, Trp39, Lys43, Pro53, Gln63, Ser64, Asp97). Le résidu lysine est remplacé par une sérine chez CcGST1 (Ser52) et une alanine chez CcGST2 (Ala50) ; le résidu isoleucine est remplacé par une valine chez CcGST1 (Val53) et une alanine chez CcGST2 (Ala51). Le résidu tyrosine essentiel pour la catalyse chez les enzymes des classes alpha, mu, pi et sigma est conservé chez CcGST1 (Tyr10) et CcGST2 (Tyr8). Chez les enzymes des classes thêta, tau, phi et zêta, ce résidu est remplacé par une sérine jouant le même rôle catalytique (Armstrong, 1997 ; Dixon *et coll.*, 2002 ; Soranzo *et coll.*, 2004). L'interaction avec le glutathion implique d'autres résidus catalytiques majeurs tels que la glutamine ou le glutamate, suivie par une sérine ou une thréonine, juste avant l'hélice α_3 . Les enzymes de la classe sigma mettent en jeu un résidu glutamine suivi d'une sérine, conservés chez CcGST1 (Gln65, Ser67) et CcGST2 (Gln63, Ser65). La proline conservée juste avant le feuillet β_3 , et également présente chez CcGST1 (Pro54) et CcGST2 (Pro52) est supposée avoir un rôle crucial dans la reconnaissance et la fixation du glutathion, tout comme la conservation de la structure $\beta\beta\alpha$ au niveau du domaine N-terminal (Zeng *et coll.*, 2005).

Chez l'enzyme RnGSTS1 de la classe sigma, 15 résidus sont identifiés comme étant potentiellement impliqués dans la fixation de prostaglandines (Met11, Arg12, Gly13, Arg14, Glu16, Ile17, Asp96, Met99, Ser100, Trp104, Tyr152, Ile155, Cys156, Thr159, Leu199) (Kanaoka *et coll.*, 1997 ; Thomson *et coll.*, 1998). Quatre de ces résidus sont conservés chez CcGST1 (Gly15, Arg16, Glu18, Tyr163) et 7 chez CcGST2 (Met11, Arg12, Gly13, Arg14, Glu16, Asp96, Ile164). Seuls trois changements conservatifs sont répertoriés chez CcGST1 (Ile101, Arg106, Leu166 au lieu des résidus Met, Trp et Ile respectivement), et un seul chez CcGST2 (Arg104 contre Trp). Les domaines C-terminal de CcGST1 et CcGST2 partagent ainsi une identité de séquence substantielle avec les enzymes membres de la classe sigma présentant une activité de type prostaglandine-

synthase. Les divergences peuvent indiquer les spécificités de substrats des glutathion S-transférases de *C. crispus*.

CcGST7 est comparée avec des séquences des classes beta et delta, avec lesquelles elle partage 25 et 27 % d'identité (Figure 42B). Ces taux d'identité sont trop faibles pour permettre une étude approfondie de l'alignement. Cependant des suppositions peuvent être émises sur certains résidus. Chez les eucaryotes un résidu tyrosine situé en amont du domaine N-terminal est impliqué dans la fixation du glutathion ; il pourrait s'agir de Tyr10 ou Tyr15 chez CcGST7. Chez les bactéries, ce rôle est attribué à une cystéine. De la même façon un résidu glutamate (Glu82) ainsi que le résidu sérine suivant (Ser83) pourraient avoir un rôle catalytique important. Ils sont conservés chez le représentant DmGSTD1 de la classe delta, mais la sérine est remplacée par une glycine chez le représentant EcGSTB de la classe beta.

II.5 Profils d'expression des gènes identifiés

II.5.1 Le MeJA : une substance vitale chez les plantes supérieures

L'acide jasmonique, le méthyle jasmonate, ainsi que leurs métabolites dérivés ou précurseurs, sont communément dénommés **jasmonates**. Les jasmonates font partie d'une famille de cyclopenténones ou cyclopentanones biologiquement actifs, de structure similaire et provenant du métabolisme des acides gras en C16 et C18 (Farmer *et coll.*, 1998). En terme de biogenèse et de structure, ces molécules sont proches des prostaglandines, au caractère anti-inflammatoire, rencontrées chez les mammifères. Ce sont des **substances vitales chez les plantes supérieures** ; elles interviennent en tant que régulateurs de divers processus du développement et de réponses de défense. En jouant un rôle majeur dans la fertilité, ces composés sont nécessaires à l'accomplissement du cycle biologique chez les plantes. Ils influent également sur le processus de germination des graines, sur la croissance racinaire et la maturation des fruits (Cheong et Choi, 2003). Ils permettent également l'acquisition d'une résistance à l'herbivorie ou toute autre agression extérieure, biotique ou abiotique. Certains gènes impliqués dans la synthèse de ces molécules sont induits dans le cas d'attaque par des pathogènes. L'acide jasmonique est alors accumulé à la fois dans les feuilles infectées et non-infectées, faisant de la voie de synthèse des jasmonates une voie parallèle à celle de l'acide salicylique. Cette dernière est déjà définie comme conduisant à l'établissement de la résistance systémique acquise chez les plantes supérieures (Farmer *et coll.*, 1998). La synthèse du méthyle jasmonate induit à son tour l'expression de certains gènes de défense : à la fois ceux codant des enzymes impliquées dans son propre métabolisme, comme ceux codant des enzymes du métabolisme secondaire, la formation de la paroi cellulaire, et autres protéines de défense.

II.5.2 Le MeJA élicite des voies de défense chez *C. crispus*

Les connaissances sur les voies de production d'oxylipines chez les algues sont encore diffuses. Il est généralement admis qu'il y a une coexistence des acides gras en C18 et en C20 chez de nombreuses algues marines, faisant supposer la possibilité de synthèse chez ces organismes des oxylipines communément rencontrées chez les plantes supérieures et les animaux. Au cours de son doctorat, Kamal Bouarab a largement étudié les interactions entre l'algue rouge *C. crispus* et son algue verte pathogène *A. operculata* (Bouarab, 2000). Il a ainsi pu montrer que le traitement des sporophytes par le méthyle jasmonate, ou les oxylipines 12-HpETE et 13-HpODE, augmentait leur résistance à l'infection d'une manière dose-dépendante (Bouarab *et coll.*, 2004). D'autre part le traitement des algues pas des inhibiteurs des voies d'oxydation des acides gras, tels que le n-propylgallate et le SHAM, réduit la résistance des gamétophytes à l'infection par leur pathogène *A. operculata*. Il a également été montré que ces trois dérivés lipidiques induisaient des activités enzymatiques clés du métabolisme de défense chez les plantes supérieures : la shikimate déshydrogénase et la phénylalanine amnioa-lyase, toutes deux impliquées dans la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes.

Le méthyle jasmonate est également connu chez les gamétophytes de *C. crispus* pour induire une cascade oxydative des acides gras. Les extraits protéiques d'algues préalablement élicitées par le méthyle jasmonate, montrent une capacité à synthétiser des oxylipines en présence d'acides gras en C18 et C20. Récemment, Emmanuel Gaquerel a pu montrer lors de son travail de thèse que du méthyle jasmonate était néo-synthétisé dans des extraits de gamétophytes de *C. crispus* à partir d'acide linoléique (Bouarab *et coll.*, 2004 ; Gaquerel, 2005). L'ensemble des résultats antérieurs sur l'étude des effets du **méthyle jasmonate** montrant que ce composé induisait des réponses de défense chez l'algue rouge *C. crispus*, fait supposé qu'il constitue **un métabolite actif sans doute essentiel chez l'algue** (Bouarab *et coll.*, 2004). D'autre part Emmanuel Gaquerel a également montré la capacité de *C. crispus* à synthétiser des prostaglandines de type E2 et A2 après traitement par le méthyle jasmonate.

II.5.3 Effets du MeJA sur l'induction de gènes chez *C. crispus*

Compte tenu de la capacité du méthyle jasmonate à stimuler la mise en place de réactions de défense chez les gamétophytes de *C. crispus*, ainsi que l'observation de sa néosynthèse *in vitro*, nous avons voulu connaître l'effet d'un tel traitement sur l'induction des gènes présentés précédemment. Nous avons donc réalisé une cinétique de traitement des algues par 100 μ M de méthyle jasmonate pendant 48 heures, avec des prélèvements après 0, 1, 6, 12, 24 et 48 heures. Nous avons également testé l'effet de l'oxylipine dérivée de l'acide linoléique (C18:2), le 13-oxo-ODE, dont la synthèse *in vivo* est également attribuée à une activité de type 13-lipoxygénase.

L'analyse par Northern blotting à porté sur les différents gènes candidats présentés précédemment (à l'exclusion des bromoperoxydases) et dont les enzymes sont potentiellement impliquées dans des voies de métabolisme des acides gras ou de leurs dérivés. Ainsi l'effet de ces traitements a été étudié sur 7 gènes : la myéloperoxydase *CcMPO3*, la peroxiredoxine *CcPrx1*, les cytochromes P450 *CcCYP1* et *CcCYP1*, les glutathion S-transférases *CcGST1*, *CcGST2* et *CcGST7*. L'actine a été utilisée en tant que gène contrôle de l'expression. La [Figure 43](#) présente les résultats obtenus pour l'ensemble des 7 gènes. L'observation des profils d'expression des témoins non traités montre que les algues étaient sans doute stressées au moment du traitement (temps 0 heure), puis à partir de 24 heures, ceci du fait que les algues n'ont sans doute pas été pré-incubées assez longtemps dans leur milieu de culture avant traitement d'une part, puis du fait qu'elles aient dû faire face à une diminution du volume d'eau de mer par évaporation à la fin de la cinétique d'autre part. L'observation des différents profils entre eux permet néanmoins de tirer quelques conclusions.

Sur les 3 clusters codant des myéloperoxydases chez *C. crispus*, seule l'expression de *CcMPO3* a pu être étudiée. Le gène *CcMPO1* n'a pas été détecté dans aucune des conditions testées, malgré un témoin positif correct. La sonde spécifique du gène *CcMPO2* ne s'est quant à elle pas hybridée ni sur les filtres, ni sur le témoin. La sonde spécifique de *CcMPO3* a permis d'identifier un **transcrit d'environ 2 300 pb**, confirmant que la séquence de 1 316 pb que nous possédons est largement incomplète. **L'expression de *CcMPO3* est visiblement induite après 1 à 12 heures de traitement par le méthyle jasmonate, et après 6 à 48 heures de traitement par le 13-oxo-ODE.**

Le gène de la peroxiredoxine *CcPrx1* est assez fortement exprimé de façon constitutive, et semble être légèrement induit dans le cas d'un traitement par le méthyle jasmonate alors que le 13-oxo-ODE semble sans effet. L'analyse par Northern blotting a permis l'identification d'un **transcrit d'environ 1 000 pb**, ce qui est en accord avec la séquence pleine-longueur de 928 pb que nous avons déjà identifiée.

Les résultats obtenus pour les deux gènes de cytochromes P450, *CcCYPt1* et *CcCYPp1* sont plus difficiles à interpréter, l'induction des deux gènes étant difficile à corrélérer au stress provoqué par les traitements chimiques. En effet les deux gènes sont déjà fortement exprimés dans les témoins en début de cinétique (0 heures), ainsi qu'en fin de cinétique (24 et 48 heures). Ces fortes expressions sont retrouvées dans les algues traitées, excepté à 48 heures pour *CcCYPp1* dans le cas du méthyle jasmonate. La forte expression à 6 heures pour *CcCYPt1* dans les algues témoins n'est en revanche pas retrouvée dans les traitements par les oxylipines. La forte expression du gène *CcCYPt1* à 1 et 12 heures de traitement par le méthyle jasmonate pourrait en revanche être assimilée à une réponse au traitement. **Lorsqu'il est induit le gène *CcCYPt1* est toujours plus fortement exprimé que le gène *CcCYPp1*.** Les séquences nucléiques dont nous disposons par ailleurs sont largement incomplètes par rapport aux **transcrits de 1 700 et 2 600 pb** observés au niveau des Northern blottings pour respectivement *CcCYPt1* et *CcCYPp1*. L'expression du troisième gène de cytochrome P450 *CcCYPt2*, caractéristique de la famille des stérois 14 α -déméthylases, n'a malheureusement pas pu être étudiée au cours de ces analyses, compte tenu de problèmes technique liés à la banque d'EST.

L'expression des 3 clusters de glutathion S-transférases a également été étudiée par Northern blotting. Les transcrits de *CcGST1* et *CcGST2* ont une taille d'environ 900 pb, ce qui est en accord avec la taille des séquences de 854 et 958 pb dont nous disposons par ailleurs. D'autre part les sondes utilisées ne permettent pas d'hybridation croisée des 2 transcrits. Le transcrit *CcGST7* a une taille plus importante d'environ 1 100 pb, ce qui est en accord avec la séquence isolée de 1 036 pb. Les deux premiers gènes *CcGST1* et *CcGST2* sont déjà assez fortement exprimés de façon constitutive dans l'algue (témoins à 1, 6 et 12 heures). *CcGST7* est quant à lui plus faiblement exprimé. En revanche **les trois gènes sont fortement induits par un traitement au méthyle jasmonate**, et plus faiblement dans le cas du 13-oxo-ODE. L'effet du méthyle jasmonate est particulièrement important dans le cas de *CcGST2* après 6 et 12 heures.

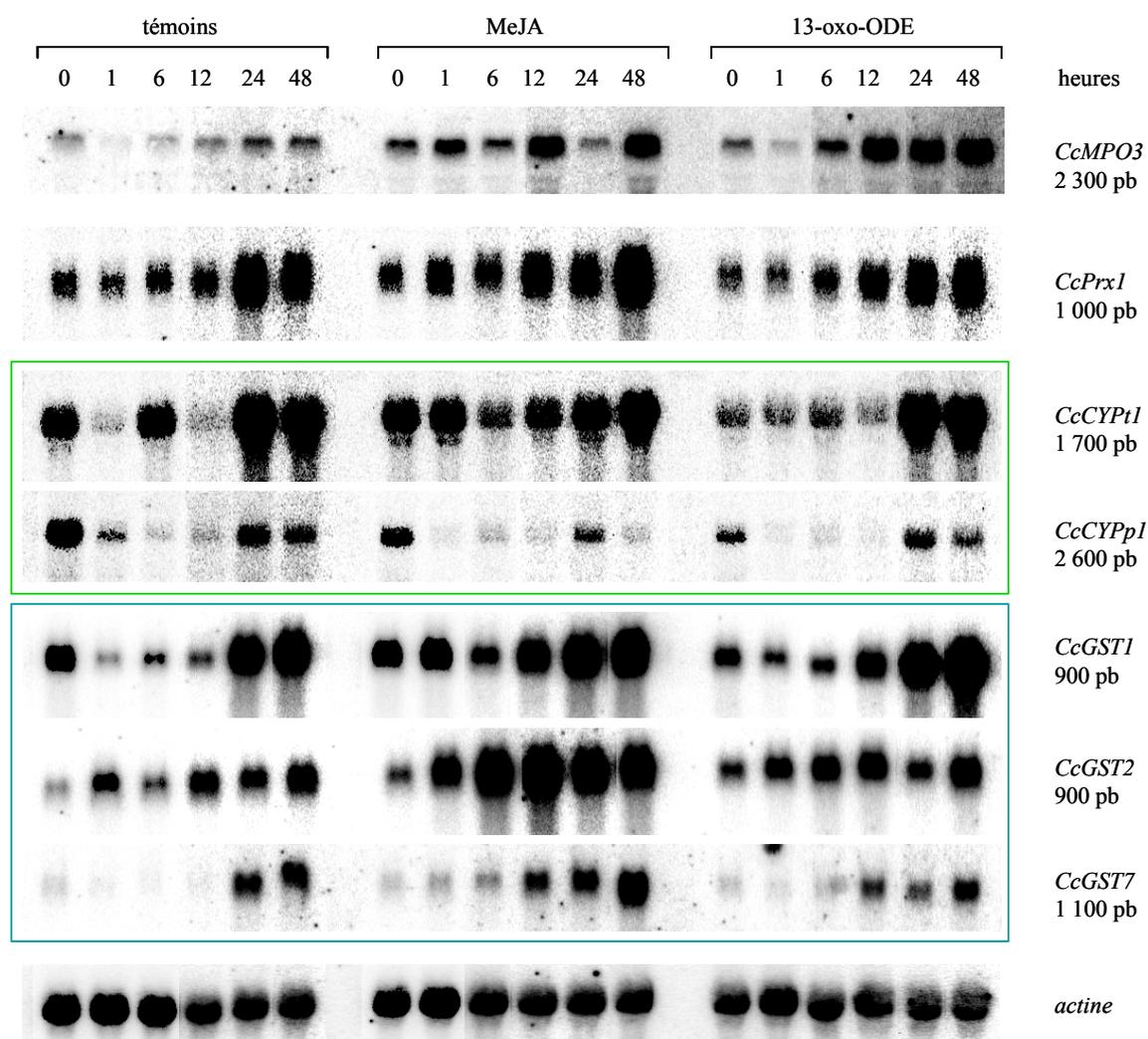


Figure 43 : Profils d'expression de 7 gènes de défense chez *C. crispus*, après traitement par deux oxylipines en C18

Les gamétophytes de *C. crispus* ont été incubés avec du méthyle jasmonate et du 13-oxo-ODE et prélevés après différentes périodes de traitement. Les gamétophytes laissés dans l'eau de mer constituent les témoins d'expression au cours de la cinétique. Des sondes spécifiques ont été utilisées pour la myéloperoxydase *CcMPO3*, la peroxyredoxine *CcPrx1*, les deux cytochromes P450 *CcCYP1* et *CcCYPp1*, ainsi que pour les trois glutathion S-transférases *CcGST1*, *CcGST2* et *CcGST7*. L'actine a été utilisée comme gène constitutif.

II.6 Bilan de l'identification moléculaire de gènes de défense chez *C. crispus*

L'analyse des banques EST de *C. crispus* a permis de mettre en évidence un certain nombre de gènes sur-exprimés chez le protoplaste, et potentiellement impliqués dans des réponses liées au stress et à la défense chez l'algue rouge. La [Figure 44](#) replace dans son contexte cellulaire l'ensemble des gènes étudiés au cours de ce manuscrit : enzymes du stress oxydatif et impliquées dans la production de composés toxiques (NADPH oxydase Ccrboh ; bromoperoxydases CcBPO1, CcBPO2 ; myéloperoxydases CcMPO1, CcMPO2, CcMPO3), enzymes à activité antioxydantes (peroxiredoxines CcPrx1, CcPrx2), enzymes impliquées dans la biotransformation de composés toxiques et dans des métabolismes endogènes potentiels (cytochromes P450 CcCYPt1, CcCYPt2, CcCYPp1 ; glutathion S-transférases CcGST1, CcGST2, CcGST7).

Parmi ces gènes plusieurs d'entre eux codent des enzymes liées à la production de FAO ou de molécules toxiques pour un pathogène potentiel. La NADPH oxydase (Ccrboh) a ainsi été retrouvée dans les banques, mais très faiblement exprimée puisque représentée par un unique transcrite. Deux gènes de bromoperoxydases dépendantes du vanadate (CcBPO1, CcBPO2) et typiques des organismes marins ont également été isolés. De façon plus remarquable, plusieurs transcrits de myéloperoxydases ont été retrouvés chez l'algue, dont trois d'entre eux (CcMPO1, CcMPO2, CcMPO3) sont fortement représentés dans les deux banques d'EST. Ces enzymes sont habituellement rencontrées chez les neutrophiles de mammifères et elles pourraient également être impliquées dans la production de composés halogénés toxiques, au même titre que les haloperoxydases dépendantes du vanadate (vHPO). Les transcrits des MPO sont par ailleurs mieux représentés dans les banques par rapport aux vHPO, il n'est donc pas exclu qu'elles jouent un rôle prépondérant dans cette production.

L'expression d'un gène de peroxiredoxine (CcPrx1), enzyme à activité antioxydante, a été étudiée au cours d'un traitement par le méthyle jasmonate. Si son expression semble légèrement plus importante au cours de l'élicitation, elle est déjà conséquente dans l'algue témoin, et l'induction du gène est sans doute davantage le produit d'une réaction à un stress oxydatif global plutôt qu'au traitement lui-même.

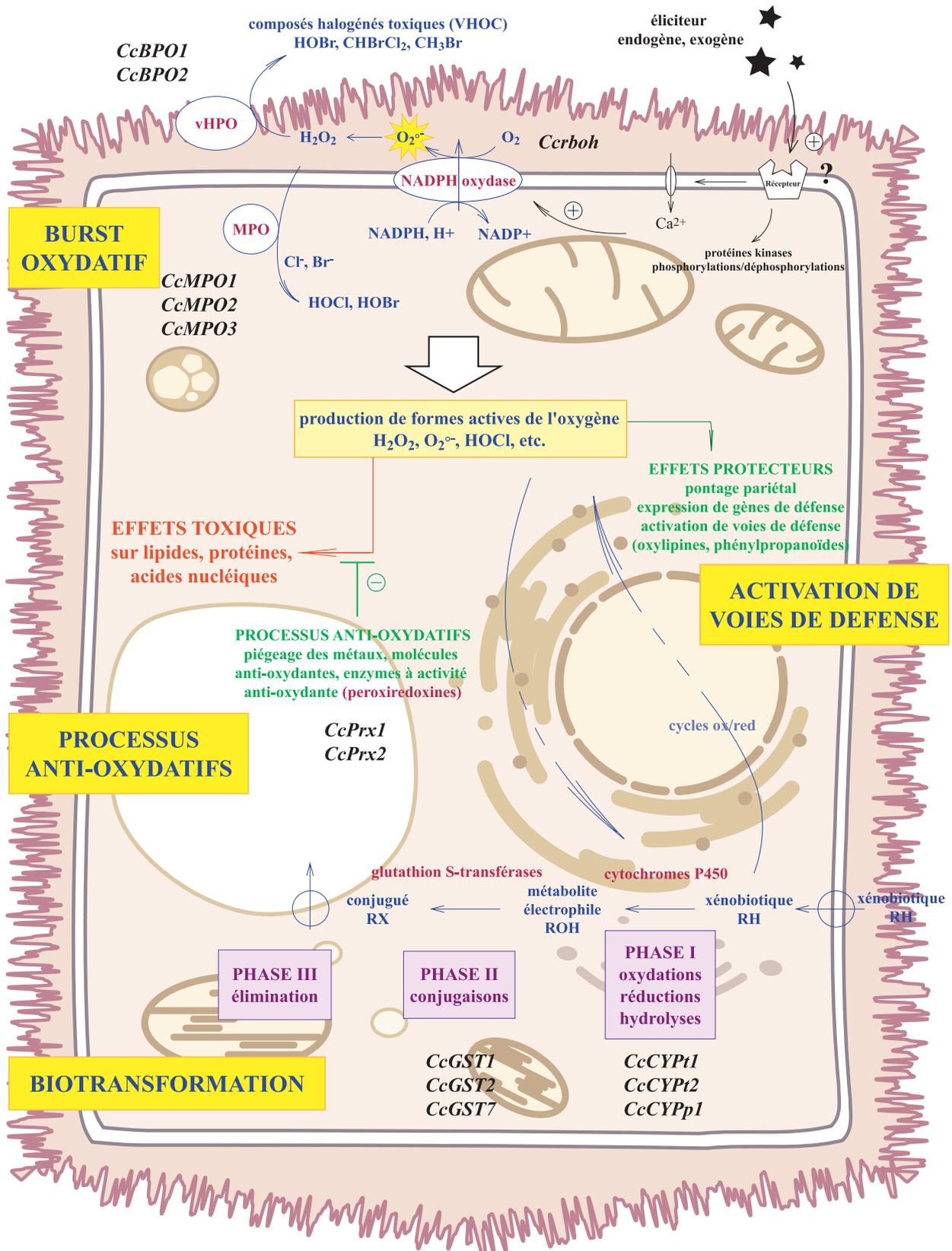


Figure 44 : Schéma cellulaire hypothétique des enzymes et événements impliqués dans la génération du stress oxydatif et la réponse au stress et à la défense chez l'algue rouge *C. crispus*

Plusieurs gènes potentiellement impliqués dans la détoxification de produits xénobiotiques et/ou dans un métabolisme endogène de dérivés lipidiques ont également été isolés. L'expression de deux cytochromes P450 a été étudiée au cours du traitement par le méthyle jasmonate. Si la première isoforme présente dans la banque EST de thalles (CcCYPt1) est globalement plus fortement exprimée que celle retrouvée dans la banque EST de protoplastes (CcCYPp1), l'analyse par Northern blotting ne permet pas de faire ressortir un profil particulier de ces deux gènes suite au traitement. En revanche les trois transcrits de glutathion S-transférases (CcGST1, CcGST2, CcGST7), qui font partie des gènes les plus moyennement à fortement exprimés chez le protoplaste, voient leur expression augmentée au cours du traitement par le méthyle jasmonate. Ces enzymes qui sont classiquement impliquées dans la détoxification de composés xénobiotiques électrophiles, peuvent posséder dans certains cas des rôles dans le métabolisme endogène de dérivés d'acides gras (activité peroxydase, activité d'isomérisation de prostaglandines). Les deux premiers clusters sont déjà assez fortement exprimés dans l'algue à l'état constitutif (respectivement CcGST2 puis CcGST1) mais le traitement par le méthyle jasmonate a un effet très marqué sur leur expression. L'activation de ces gènes par le méthyle jasmonate pourrait avoir un effet protecteur soit directement en induisant l'expression de ces enzymes, soit par la génération de molécules actives par les enzymes nouvellement traduites.

Les glutathion S-transférases semblent être une cible de choix pour appréhender au niveau moléculaire les réponses au stress et à la défense chez *C. crispus*. En effet elles font partie des enzymes dont les gènes sont les plus moyennement à fortement exprimés chez le protoplaste, qui doit faire face à une situation extrême de stress. Ils sont également fortement induits au cours d'un traitement par le méthyle jasmonate, connu pour stimuler des réactions de défense chez l'algue et la mise en place chez le sporophyte d'une résistance à l'infection par le pathogène *A. operculata*. D'autres oxylipines en C18 (13-HpODE) et C20 (12-HpETE) sont capables d'induire cette protection (Bouarab, 2000). Le méthyle jasmonate stimule également chez l'algue la synthèse d'oxylipines variées, majoritairement en C18 via une voie de type 13-lipoxygénase. Par ailleurs il a été montré *in vitro* que *C. crispus* était capable de synthétiser du méthyle jasmonate, démontrant que cette molécule a certainement un rôle endogène dans des processus métaboliques qui restent à déterminer (Gaquerel, 2005). **Les glutathion S-transférases pourraient avoir**

un rôle dans le catabolisme ou la biosynthèse des oxylipines chez *C. crispus*, avec un rôle plus général dans les réponses de défense et de protection.

Outre leur rôle potentiel dans la défense chez *C. crispus*, les séquences de GST isolées présentent des traits remarquables qui ne permettent pas de les affilier de façon certaine à une seule des nombreuses classes déjà identifiées. **Elles pourraient être les premiers représentants isolés de nouvelles classes de GST qui restent à caractériser.** Parmi les trois gènes identifiés, deux d'entre eux partagent des similitudes plus fortes avec des GST de la classe sigma rencontrée chez les mammifères. Les membres de cette classe possèdent une activité prostaglandine synthase caractéristique. Certaines isoformes sont ainsi capables de catalyser la réaction d'isomérisation de la prostaglandine H₂ en prostaglandine D₂ (Shimizu *et coll.*, 1979 ; Thomson *et coll.*, 1998 ; Jowsey *et coll.*, 2001). Un rôle des glutathion S-transférases dans le métabolisme de ces molécules n'est pas exclu chez *C. crispus*, d'autant plus que divers types de prostaglandines ont été isolés chez cet organisme. Des prostaglandines B₁ et B₂ sont synthétisées par l'algue élicitée par des extraits du pathogène *A. operculata* (Bouarab *et coll.*, 2004). **Des prostaglandines de type A₂ et E₂ sont synthétisées par l'algue au cours d'un traitement par le méthyle jasmonate. Les GST dont la transcription est induite par ce traitement pourraient avoir un rôle à jouer dans la synthèse de ces métabolites**, d'autant plus que des inhibiteurs des voies classiques des prostaglandines par les cyclooxygénases chez les mammifères ne bloquent pas la synthèse de ces composés chez l'algue (Emmanuel Gaquerel, communication personnelle). Un tel résultat, même s'il reste à confirmer, suggère l'implication d'enzymes en marge des voies habituellement rencontrées dans la biosynthèse des prostaglandines chez *C. crispus*. Le rôle des GST dans le métabolisme des prostaglandines chez l'algue rouge est à explorer.

Au-delà d'un rôle potentiel dans le métabolisme endogène d'acides gras, il est très probable que les GST de *C. crispus*, tout comme l'ensemble des enzymes de cette famille, soient également impliquées dans la détoxification de produits xénobiotiques. **Elles constituent pour cela des marqueurs moléculaires potentiels de choix dans la réponse à des stress abiotiques.** Le comportement de ces gènes au cours de tels stress devra être étudié.

Je me suis plus particulièrement attachée dans la suite de mon travail à l'analyse des gènes de GST chez *C. crispus*, de leur comportement au cours de divers stress abiotiques incluant des traitements par des dérivés lipidiques, des métaux lourds et des pesticides, ainsi qu'à la caractérisation de leurs enzymes associées, et plus particulièrement CcGST2. Il s'agissait d'une part d'avoir une meilleure connaissance de ces enzymes au niveau du génome, d'analyser leurs positions phylogénétiques au sein de la famille des GST afin d'étayer notre hypothèse d'appartenance à de nouvelles classes d'isoformes. D'autre part il s'agissait également d'appréhender le rôle global de ces enzymes dans la défense chez l'algue, en élucidant, à partir du comportement des gènes et des caractéristiques propres à l'enzyme, à la fois leur rôle dans le métabolisme endogène de composés actifs, ainsi que dans celui de la détoxification de composés xénobiotiques potentiellement toxiques.

III. Les glutathion S-transférases chez *C. crispus*

III.1 Identification et étude des gènes de glutathion S-transférases chez *C. crispus*

III.1.1 Analyse des séquences génomiques

Les ADNc des trois clusters de glutathion S-transférases *CcGST1* et *CcGST2* et *CcGST7* et leurs séquences protéiques putatives, ont déjà été décrits dans la section précédente. Afin de mieux examiner l'homologie des deux transcrits *CcGST1* et *CcGST2*, et de comparer l'organisation des trois gènes par rapport à ceux des différentes classes de glutathion S-transférases, j'ai entrepris de caractériser leur structure intron/exon. Les séquences des trois gènes, obtenues par amplification sur de l'ADN génomique à l'aide d'amorces spécifiques, ont été comparées aux séquences transcrites.

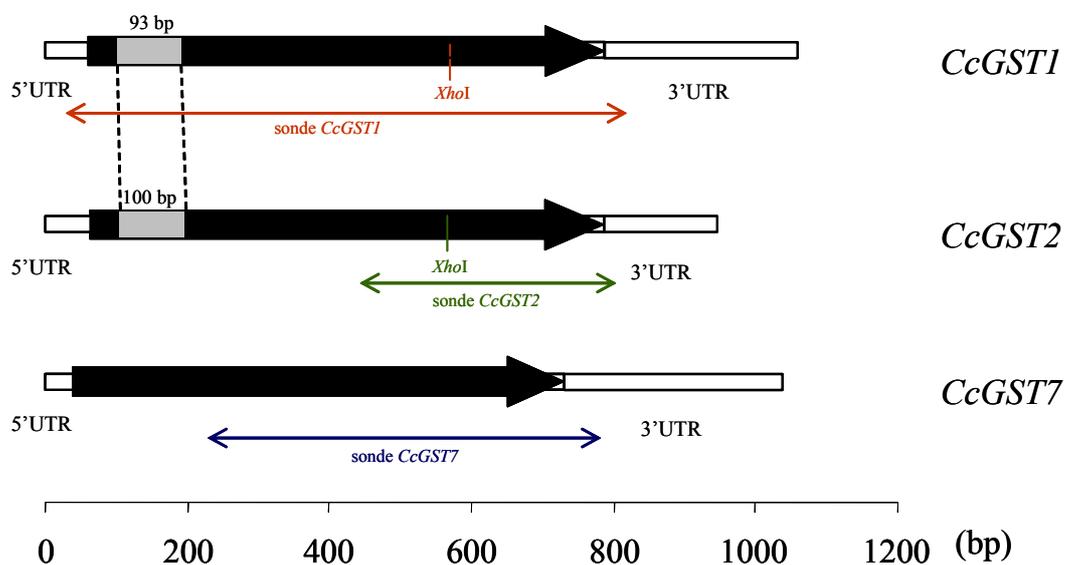


Figure 45 : Structure en intron/exon des gènes de glutathion S-transférases chez *C. crispus*

Les séquences génomiques de *CcGST1*, *CcGST2* et *CcGST7* sont présentées. Les blocs noirs et gris représentent respectivement les exons et les introns. Une échelle de taille est figurée.

Un site de coupure de l'enzyme *XhoI* est identifié chez *CcGST1* et *CcGST2*. Les enzymes *HindIII* et *EcoRI* ne possèdent pas de sites de coupure sur aucune des trois séquences. Les sondes utilisées pour les analyses de Northern et Southern blotting sont indiquées.

Les gènes *CcGST1* et *CcGST2* contiennent tous deux un intron unique d'environ 100 pb, situé en amont de la partie codante. Le gène *CcGST7* serait sans intron. La [Figure 45](#) résume les résultats obtenus.

La séquence nucléotidique du transcrit ***CcGST1*** est composée d'un cadre ouvert de lecture de 630 pb, d'une partie 5' non traduite de 65 pb et d'une partie 3' non traduite de 159 pb. Ce transcrit **code une protéine de 210 acides aminés**, au poids moléculaire théorique de 23,27 kDa. Le point isoélectrique de CcGST1 est estimé à 6,47. La séquence génomique de *CcGST1* est de 946 pb et contient un intron de 93 pb qui sépare le gène en deux exons de respectivement 108 et 746 pb.

La séquence nucléotidique du transcrit ***CcGST2*** est composée d'un cadre ouvert de lecture de 627 pb, d'une partie 5' non traduite de 59 pb et d'une partie 3' non traduite de 272 pb. Ce transcrit **code une protéine de 209 acides aminés**, au poids moléculaire théorique de 23,68 kDa. Le point isoélectrique de CcGST2 est assez similaire de celui de CcGST1 et est estimé à 6,10. La séquence génomique de *CcGST2* est de 1 058 pb et conserve la même structure intron/exon que *CcGST1* ; elle contient un intron de 100 pb qui sépare le gène en deux exons de respectivement 96 et 862 pb. La séquence nucléotidique codante de *CcGST2* partage 59 % d'identité avec la séquence équivalente de *CcGST1*, avec également un fort taux d'identité au niveau de la séquence intronique (59 %).

La dernière séquence de glutathion S-transférase ***CcGST7*** possède des caractéristiques propres manifestes par rapport aux deux séquences *CcGST1* et *CcGST2*. La séquence nucléotidique du transcrit *CcGST7* est composée d'un cadre ouvert de lecture de 690 pb, d'une partie 5' non traduite de 39 pb et partie 3' non traduite de 307 pb. Ce transcrit **code une protéine de 230 acides aminés**, au poids moléculaire théorique de 25,79 kDa. La composition en acides aminés de CcGST7 aboutit à un point isoélectrique calculé différent de ceux de CcGST1 et CcGST2, à 7,20. La séquence génomique du gène *CcGST7* est de 1 036 pb et **ne contient pas d'intron**.

Pour déterminer le nombre de copies de chaque gène de glutathion S-transférase étudié, une analyse par Southern blotting a été réalisée ([Figure 46](#)). Les expériences d'hybridation ont été menées pour chaque gène sous des conditions de forte stringence. Les profils obtenus nous font suggérer la présence d'une seule copie des gènes CcGST1 et CcGST2 dans le génome de *C. crispus*. L'hypothèse d'une seule copie de gène dans le cas

de CcGST7 est très probable mais la présence de bandes additionnelles de faible intensité nous amène à émettre des réserves.

La séquence nucléotidique de CcGST1 ne possède pas de sites de coupures pour les enzymes *HindIII* et *EcoRI*. Aucune bande n'est observée dans le cas d'une digestion avec *HindIII*. Aucun site de coupure n'est sans doute présent dans l'environnement immédiat du gène et la sonde à peut-être du mal à détecter un fragment très long qui pénètre peu dans le gel et qui est donc mal séparé d'autres fragments. Une bande unique d'environ 5 kb est observée dans le cas d'une digestion avec *HindIII* et *EcoRI*. La génération de ces fragments serait due à la présence de deux sites de coupures *EcoRI* de part et d'autre du gène *CcGST1* et séparés par environ 5 kb. La séquence nucléotidique de *CcGST1* possède un site de coupure *XhoI* à la position 570, qui sépare la sonde en 2 fragments de 537 et 155 pb. La digestion par *EcoRI* et *XhoI* permet la génération de deux bandes d'environ 2,5 et 2 kb. Cette observation est conforme avec la présence d'un site de coupure par *EcoRI* de part et d'autre du gène *CcGST1*. La digestion par l'enzyme *XhoI* seule permet la génération d'un premier fragment d'environ 2,5 kb et d'un second fragment d'intensité plus faible d'environ 4 kb. Des sites de coupure *XhoI* seraient également présents de part et d'autres du gène *CcGST1* et séparés par environ 6,5 kb.

L'obtention d'une bande unique dans le cas de digestion à une enzyme sans site de coupure au niveau de la sonde, d'une ou deux bandes dans le cas de digestion à deux enzymes respectivement avec ou sans site de coupure au niveau de la sonde, et de deux bandes dans le cas d'une digestion à une enzyme avec un site de coupure au niveau de la sonde, est conforme avec la **présence d'une seule copie de gène *CcGST1* chez *C. crispus***.

Une démarche similaire pour l'analyse du Southern blotting de *CcGST2* nous permet d'arriver à la **même conclusion pour ce gène**. La séquence nucléotidique de *CcGST2* ne possède pas de sites de coupure pour les enzymes *HindIII* et *EcoRI*. Deux bandes de faible intensité et de très grande taille sont observées dans le cas de la digestion par *HindIII*. Cette coupure pourrait être expliquée par une mauvaise digestion et un fractionnement efficace uniquement sur une partie des fragments. Une bande unique d'environ 5 kb est observée dans le cas d'une digestion par *HindIII* et *EcoRI*. La génération de ces fragments est due à la présence de sites de coupure *EcoRI* de part et d'autre du gène *CcGST2* et séparés par environ 5 kb. La séquence nucléotidique de *CcGST1* possède un site de coupure *XhoI* à la position 565, qui sépare la sonde en deux fragments de 118 et 236

pb. La digestion par *EcoRI* et *XhoI* permet la génération d'une première bande à 2,5 kb et d'une seconde bande d'intensité plus faible à 0,6 kb. Cette observation est conforme avec la présence d'un site de coupure *EcoRI* de part et d'autre du gène *CcGST2*. La digestion par l'enzyme *XhoI* seule permet la génération d'un premier fragment d'environ 7 kb et d'un second fragment d'intensité plus faible d'environ 2,5 kb. Des sites de coupure par *XhoI* seraient également présents de part et d'autres du gène *CcGST2* et séparés par environ 9,5 kb.

L'obtention d'une bande unique dans le cas de digestion à une enzyme sans site de coupure au niveau de la sonde, d'une ou deux bandes dans le cas de digestion à deux enzymes respectivement avec ou sans site de coupure au niveau de la sonde, et de deux bandes dans le cas d'une digestion à une enzyme avec un site de coupure au niveau de la sonde, est conforme avec la **présence d'une seule copie de gène *CcGST2* chez *C. crispus*.**

La séquence nucléotidique de *CcGST7* ne présente aucun site de coupure pour les trois enzymes testées. Dans tous les cas présentés (digestion simple/digestion double) une bande unique de forte intensité est observée, faisant supposer l'existence d'**une seule copie du gène *CcGST7*** dans le génome de *C. crispus*. Pourtant des bandes d'intensité plus faible sont observées dans le cas des digestions par *HindIII/EcoRI*, *EcoRI* et *EcoRI/XhoI*. La présence de ces bandes additionnelles d'intensité plus faible peut faire penser à la présence de gènes apparentés à *CcGST7* dans le génome de l'algue rouge.

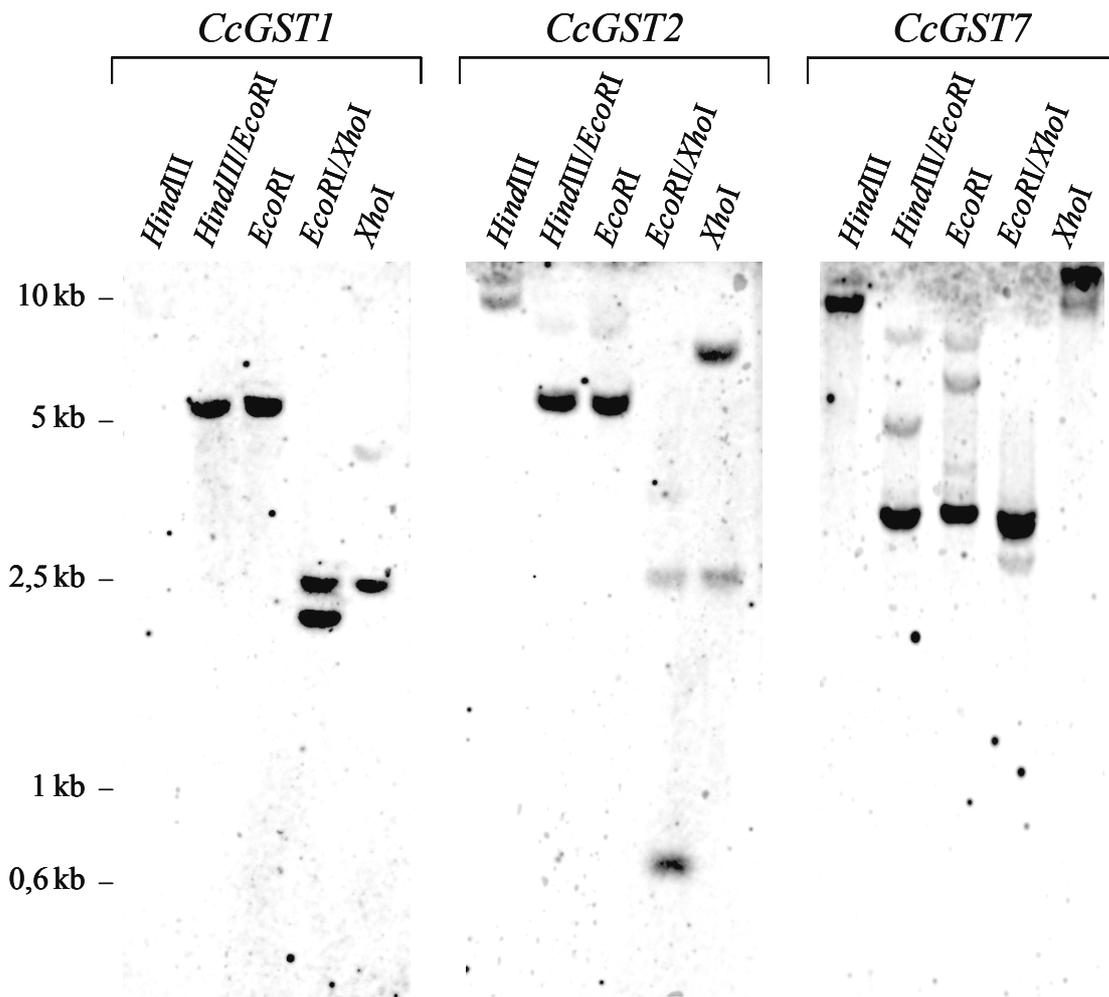


Figure 46 : Analyse par Southern blotting du nombre de copies de gènes de glutathion S-transférases chez *C. crispus*

L'ADN génomique a été digéré par les enzymes de restrictions indiquées : *HindIII*, *HindIII/EcoRI*, *EcoRI*, *EcoRI/XhoI*, *XhoI*, puis hybridé par des sondes spécifiques, marquées à la fluorescéine, de chaque gène de glutathion S-transférase : *CcGST1* (692 pb), *CcGST2* (354 pb) et *CcGST7* (545 pb). Le résultat de la migration du marqueur de taille est illustré par les valeurs indiquées à gauche des trois membranes.

III.1.2 Analyses phylogénétiques des GST d'algues

Afin de déterminer si les séquences identifiées chez *C. crispus* appartiennent ou non à des classes déjà existantes de glutathion S-transférases, j'ai réalisé une analyse phylogénétique avec la méthode du Neighbor Joining. Pour cela j'ai aligné les trois séquences protéiques déduites CcGST1, CcGST2 et CcGST7 avec différents membres de chaque classe de glutathion S-transférases, excepté les groupes divergents des glutathion S-

transférases microsomaux et de la classe kappa des enzymes mitochondriales. En effet les glutathion S-transférases microsomaux sont maintenant incluses dans une autre superfamille dénommée MAPEG pour *membrane-associated proteins in eicosanoid and glutathione metabolism*. La classe kappa quant à elle regroupe des enzymes mitochondriales qui possèdent toutes une hélice α additionnelle après le motif $\beta\alpha\beta$.

L'arbre consensus obtenu avec la méthode du Neighbor Joining sur les séquences pleine longueur, montre que deux groupes majeurs de glutathion S-transférases peuvent être établis (Figure 47), conformément à ce qui est déjà connu dans la littérature (Snyder et Maddison, 1997 ; Marco *et coll.*, 2004).

Un premier groupe de glutathion S-transférases contiendrait les enzymes des classes alpha, pi, mu, gamma, nu et sigma. Les classes alpha, pi, mu et sigma sont majoritairement rencontrées chez les mammifères, avec quelques représentants occasionnels chez les insectes, les héminthes et les céphalopodes, respectivement pour les classes pi, mu et sigma (Hayes et McLellan, 1999). Chez les vertébrés la classe sigma a la particularité de comprendre des enzymes ayant une double activité : certaines isoformes, en plus d'être impliquées dans des processus de détoxification, possèdent également une activité de type prostaglandine synthase (Shimizu *et coll.*, 1979 ; Thomson *et coll.*, 1998 ; Jowsey *et coll.*, 2001). Les classes récemment élucidées gamma et nu, comprennent des protéines rencontrées chez les champignons et les nématodes (Cha *et coll.*, 2002 ; Schuller *et coll.*, 2005). Le lien de parenté entre les classes nu et sigma est confirmé au niveau de l'arbre par une forte valeur de bootstrap (85 %).

Le deuxième groupe majoritaire regroupe les classes beta, oméga, thêta, zêta, phi, tau, lambda, delta, epsilon et rhô. Ce second groupe contient des protéines 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 oméga sont majoritairement rencontrés chez les mammifères, mais également chez les héminthes (Girardini *et coll.*, 2002). Les glutathion S-transférases des classes thêta et zêta sont rencontrées chez les animaux et les plantes supérieures, tandis que les classes phi, tau et lambda sont spécifiques des plantes supérieures (Sheehan *et coll.*, 2001 ; Dixon *et coll.*, 2002). Les classes delta et epsilon sont spécifiques des insectes (Ranson *et coll.*, 2001 ; Sawicki *et coll.*, 2003) et la classe rhô récemment décrite est visiblement spécifique des poissons (Konishi *et coll.*, 2005).

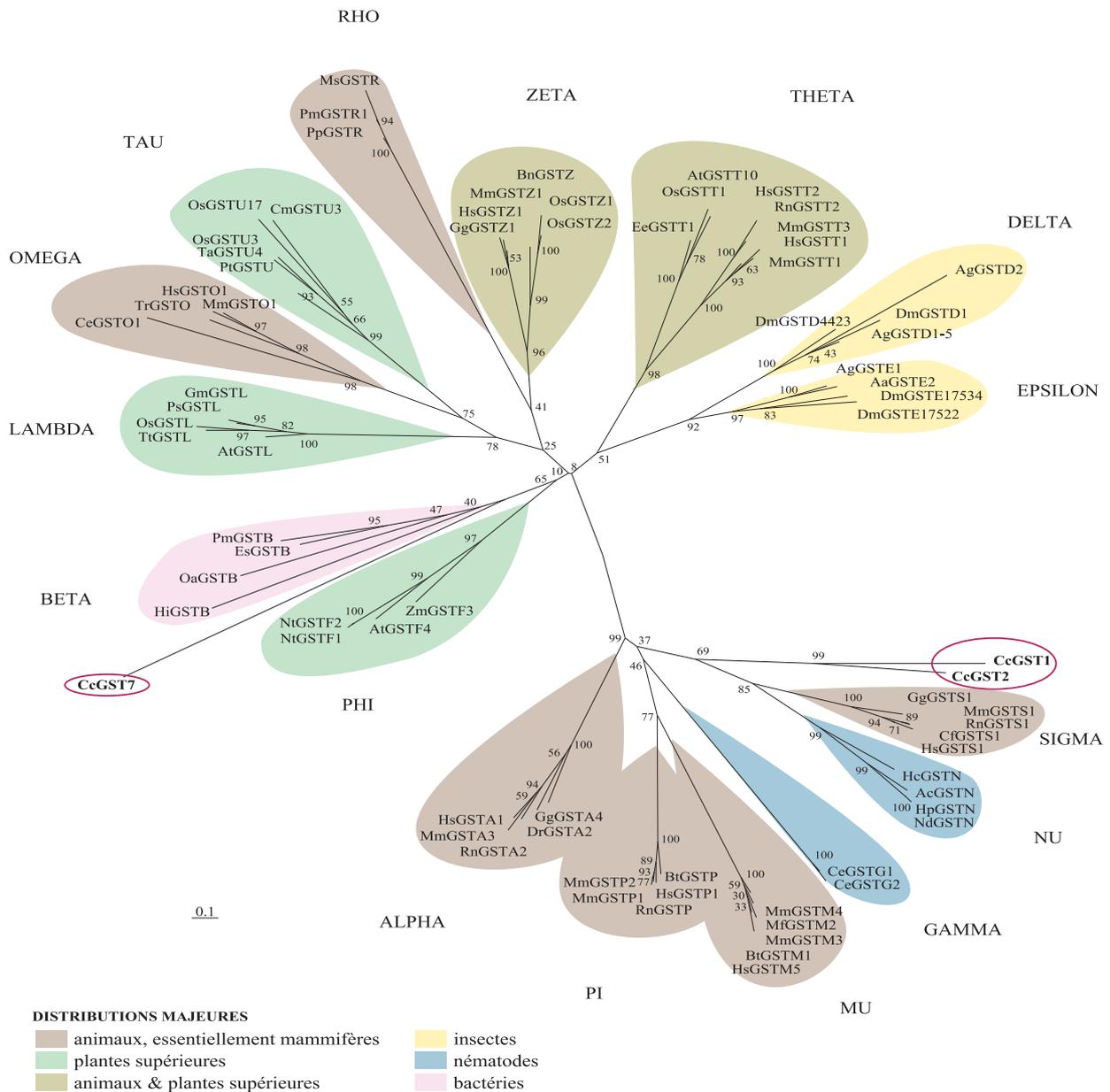


Figure 47 : Phylogénie des glutathion S-transférases obtenue avec la méthode du Neighbor Joining, incluant les séquences de *C. crispus*

L'arbre consensus non raciné a été obtenu par analyse d'un alignement de séquences protéiques pleine longueur, avec la méthode du Neighbor Joining et 500 valeurs de bootstraps. Les glutathion S-transférases utilisées proviennent de différentes classes et différents embranchements, dont celui des algues rouges avec les 3 membres CcGST1, CcGST2 et CcGST7 identifiés chez *C. crispus*. L'appartenance des enzymes aux différentes classes de glutathion S-transférases est figurée sur l'arbre. Les séquences utilisées pour générer l'arbre sont répertoriées dans la partie Matériel et méthodes.

Les résultats de cette analyse phylogénétique montrent très clairement que les protéines CcGST1 et CcGST2 de *C. crispus*, n'appartiennent à aucune des classes de glutathion S-transférases présentées. L'arbre confirme par ailleurs les déductions faites à partir des taux d'identité, c'est-à-dire le fait que ces deux séquences partagent un ancêtre commun avec des glutathion S-transférases de la classe sigma et nu. Les branches inférieures reliant le groupe des classes nu et sigma avec celui de CcGST1 et CcGST2 sont supportées au nœud correspondant par une valeur de bootstrap significative (69 %). Néanmoins certaines branches inférieures de l'arbre font quant à elles intervenir des valeurs plus faibles de bootstraps, rendant difficile l'établissement de liens de parenté précis entre les différentes classes. La particularité de CcGST7 par rapport aux deux autres séquences de *C. crispus* est à nouveau illustrée par sa position particulière dans l'arbre, au niveau de la classe beta. La longueur de cette branche démontre la divergence de cette protéine par rapport aux autres glutathion S-transférases. Cette position au niveau de l'arbre ne peut toutefois pas être considérée comme fiable car aucune valeur de bootstrap n'est attribuée pour ce nœud, suggérant qu'il est donc peu robuste.

Pour confirmer la topologie de l'arbre obtenu avec la méthode du Neighbor Joining, la même analyse a été réalisée avec la méthode du Maximum de Parcimonie (Figure 48). L'arbre consensus obtenu confirme la distribution des enzymes dans leurs classes respectives avec des nœuds supportés par de fortes valeurs de bootstraps, ainsi que le clivage en deux grands groupes tels qu'ils ont été présentés précédemment. Il confirme également l'assignation des séquences CcGST1 et CcGST2 dans une nouvelle classe de glutathion S-transférases. En revanche elle n'est plus perçue comme un embranchement frère des classes nu et sigma, mais comme une classe antérieure aux glutathion S-transférases des classes gamma, puis nu et sigma. Cependant aucune valeur de bootstrap n'est attribuée pour ce nœud, suggérant qu'il est très faiblement supporté. De même que pour la méthode du Neighbor Joining, certains nœuds de branches inférieures sont supportés par de faibles valeurs de bootstraps, rendant difficile l'affiliation précise des différentes classes entre elles. La méthode du Maximum de Parcimonie montre cette fois clairement que CcGST7 n'appartient à aucune des classes de glutathion S-transférases présentées, et la positionne en tant qu'un nouveau groupe constitué de cette unique séquence. Cet arbre supporte par ailleurs l'hypothèse que CcGST7 est plus proche d'une part de la classe lambda, et d'autre part des classes rho, delta et theta.

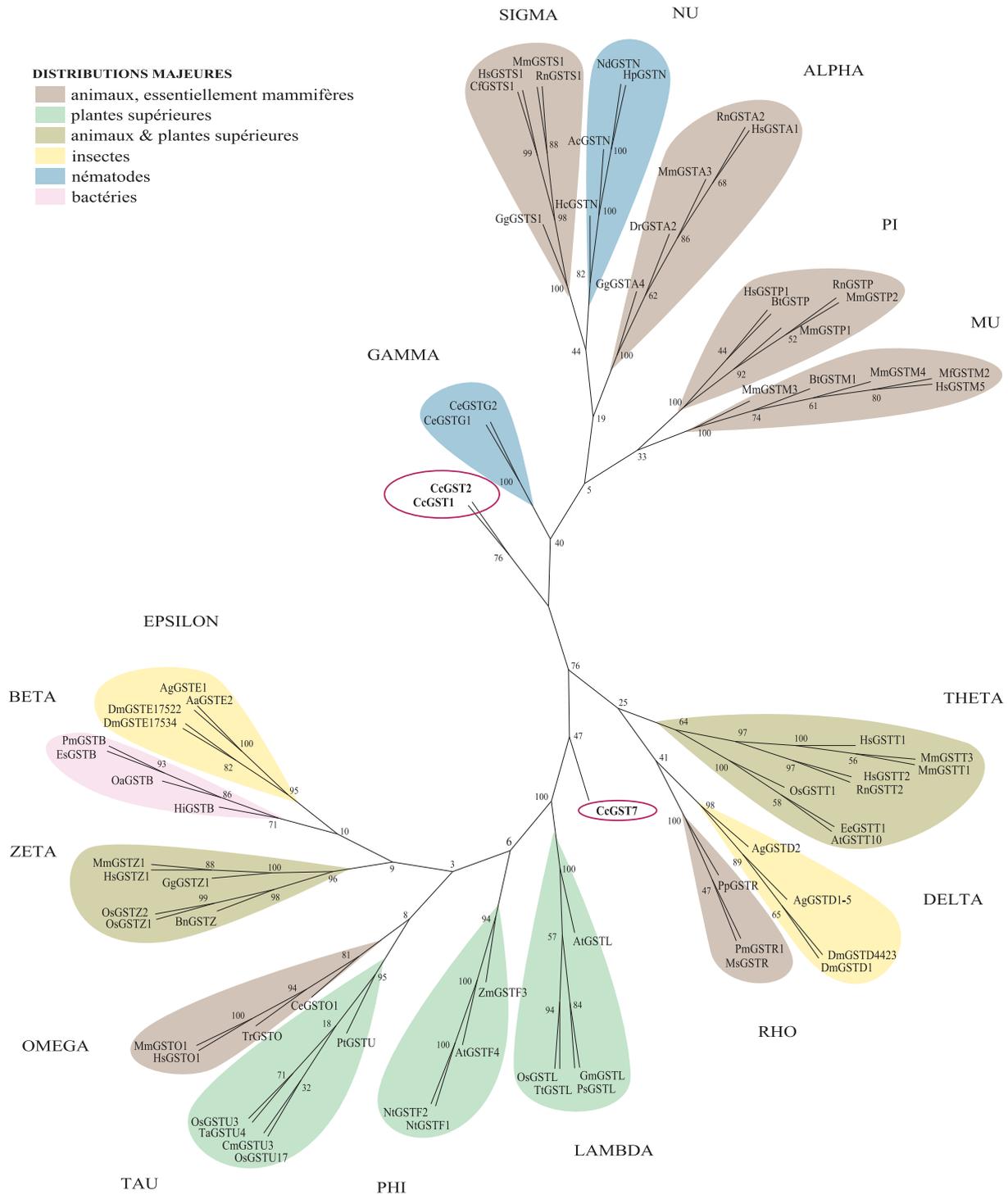


Figure 48 : Phylogénie des glutathion S-transférases obtenue avec la méthode du Maximum de Parcimonie, incluant les séquences de *C. crispus*

L'arbre consensus non raciné a été obtenu par analyse d'un alignement de séquences protéiques pleine longueur, avec la méthode du Maximum de Parcimonie et 500 valeurs de bootstraps. Les glutathion S-transférases utilisées proviennent de différentes classes et différents embranchements, dont celui des algues rouges avec les 3 membres CcGST1, CcGST2 et CcGST7 identifiés chez *C. crispus*. L'appartenance des enzymes aux différentes classes de glutathion S-transférases est figurée sur l'arbre. Les séquences utilisées pour générer l'arbre sont répertoriées dans la partie Matériel et méthodes.

Pour compléter ces analyses, des séquences de glutathion S-transférases identifiées au laboratoire et provenant des macroalgues brunes *Laminaria digitata* et *Ectocarpus siliculosus* ont également été prises en compte. Les quatre séquences isolées chez *L. digitata* sont pleine longueur et proviennent d'une banque EST de protoplastes et comprennent respectivement 21 EST (*LdGST8*), 10 EST (*LdGST19*), 8 EST (*LdGST54*) et 4 EST (*LdGST78*); elles font également partie des gènes les plus moyennement à fortement exprimés chez le protoplaste (Roeder *et coll.*, 2005). Au moins onze séquences différentes de GST ont été identifiées dans les banques d'EST d'*E. siliculosus*, six d'entre elles étant constituées respectivement de 3 EST (*EsGSTc657*), 3 EST (*EsGSTc824*), 2 EST (*EsGSTc1930*), 2 EST (*EsGSTc1895*), 2 EST (*EsGSTc1801*), 2 EST (*EsGSTc1074*) les 5 dernières étant représentées par des singletons (Defranco, non publié). Seules les quatre séquences *EsGSTc657*, *EsGSTc824*, *EsGSTc1895* et *EsGSTs2106* sont pleines longueurs et ont été utilisées pour les analyses phylogénétiques.

D'après les comparaisons de séquences protéiques l'existence d'au moins trois nouvelles classes de GST est supposée. Les séquences *LdGST8*, *LdGST78*, *LdGST54* et *EsGSTc657* formeraient une première classe et partagent entre elles de 47 à 67 % d'identité. Les séquences *LdGST19*, *EsGSTc1895* et *EsGSTs2106* formeraient une seconde classe et partagent entre elles de 46 à 67 % d'identité. Les séquences de l'algue rouge *CcGST1* et *CcGST2* forment une troisième classe et partagent entre elles 52 % d'identité. L'affiliation de la séquence *EsGSTc824* à cette dernière classe est incertaine car si elle partage 39 % d'identité avec *CcGST2*, elle ne partage que 31 % d'identité avec *CcGST1*. Les taux d'identité entre chacune de ces classes sont environ de 30 % et les résultats de blasts indiquent toujours des similitudes plus élevées avec des GST de la classe sigma (en moyenne 30 % d'identité) même si des similitudes sont également observées avec des GST de bactéries et d'insectes.

Une première étude phylogénétique en utilisant la méthode du Neighbor Joining a été réalisée en incluant ces huit nouvelles séquences dans l'analyse (Figure 49). L'arbre consensus obtenu par rapport à la précédente analyse en Neighbor Joining, confirme la distribution des enzymes dans leurs classes respectives ainsi que le clivage des deux grands groupes déjà identifiés. Si la structure du premier groupe, contenant les classes alpha, pi, mu, gamma, nu et sigma, est strictement conservée, celle du second groupe est modifiée pour certaines classes. Cependant la position de certaines classes entre elles est confirmée : les deux classes delta et epsilon partagent un ancêtre commun avec la classe thêta, de même pour les classes tau, oméga, lambda et zêta ; les positions des classes rhô et phi au sein de ce groupe sont par contre plus ambiguës et faiblement supportées (26 %). Étonnamment les dix séquences d'algues rouges et brunes utilisées dans l'analyse se positionnent toutes ensemble, en dehors des classes déjà identifiées de GST, et partagent un ancêtre commun avec les classes nu et sigma. Cependant ce regroupement ne semble pas refléter la présence d'une classe unique car des divergences semblent exister au sein de ce groupe « GST d'algues » avec l'apparition d'au moins trois classes, telles qu'elles avaient déjà été précédemment suspectées avec les analyses de séquences. On aurait ainsi à faire à **trois, voire quatre, nouvelles classes de glutathion S-transférases, non encore décrites jusqu'à présent.**

Une seconde analyse phylogénétique par la méthode du Maximum de Parcimonie a également été réalisée et confirme la présence d'un groupe de « GST d'algues » (Figure 50). En revanche, outre le clivage entre les deux groupes habituels, la topologie change par rapport à l'arbre consensus précédent réalisé avec la même méthode. Sur ce point, ce nouvel arbre révèle une structure en accord avec ceux obtenus avec la méthode du Neighbor Joining. Ainsi la présence d'un ancêtre commun entre les classes delta, epsilon et thêta semble confirmée, ainsi que pour les classes tau, lambda, zêta et oméga. La classe gamma retrouve sa position de lignée sœur aux classes mu et pi. Le groupe « GST d'algues » se retrouve à nouveau dans le premier groupe de GST, et semble plus proche des classes gamma, mu et pi, que des classes sigma, nu et alpha. De même, il n'est pas non plus évident que ce groupe d'enzymes forme une classe unique. Un regroupement similaire des différentes séquences d'algues est observé par rapport à celui déjà obtenu avec la méthode du Neighbor Joining. A nouveau cette analyse tend à montrer l'identification de trois, voire quatre nouvelles classes de GST à partir des macroalgues.

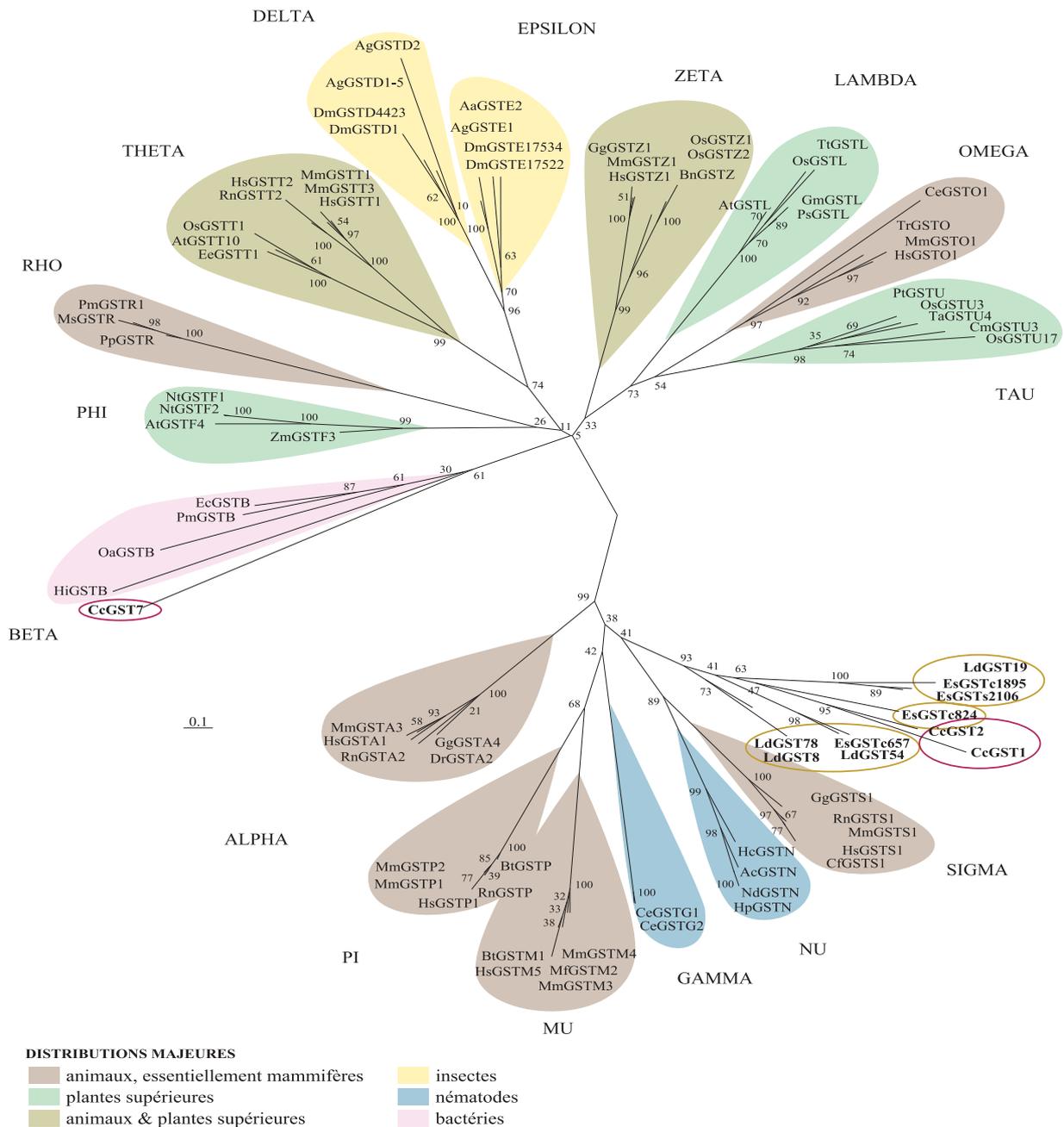


Figure 49 : Phylogénie des glutathion S-transférases obtenue avec la méthode du Neighbor Joining, incluant des séquences d'algues rouges et brunes

L'arbre consensus non raciné a été obtenu par analyse d'un alignement de séquences protéiques pleine longueur, avec la méthode du Neighbor Joining et 500 valeurs de bootstraps. Les glutathion S-transférases utilisées proviennent de différentes classes et différents embranchements, dont celui des algues rouges avec les 3 membres CcGST1, CcGST2 et CcGST7 identifiés chez *C. crispus*, 4 membres provenant de l'algue brune *Laminaria digitata* et 4 membres provenant de l'algue brune *Ectocarpus siliculosus*. L'appartenance des enzymes aux différentes classes de glutathion S-transférases est figurée sur l'arbre. Les séquences utilisées pour générer l'arbre sont répertoriées dans la partie Matériel et méthodes.

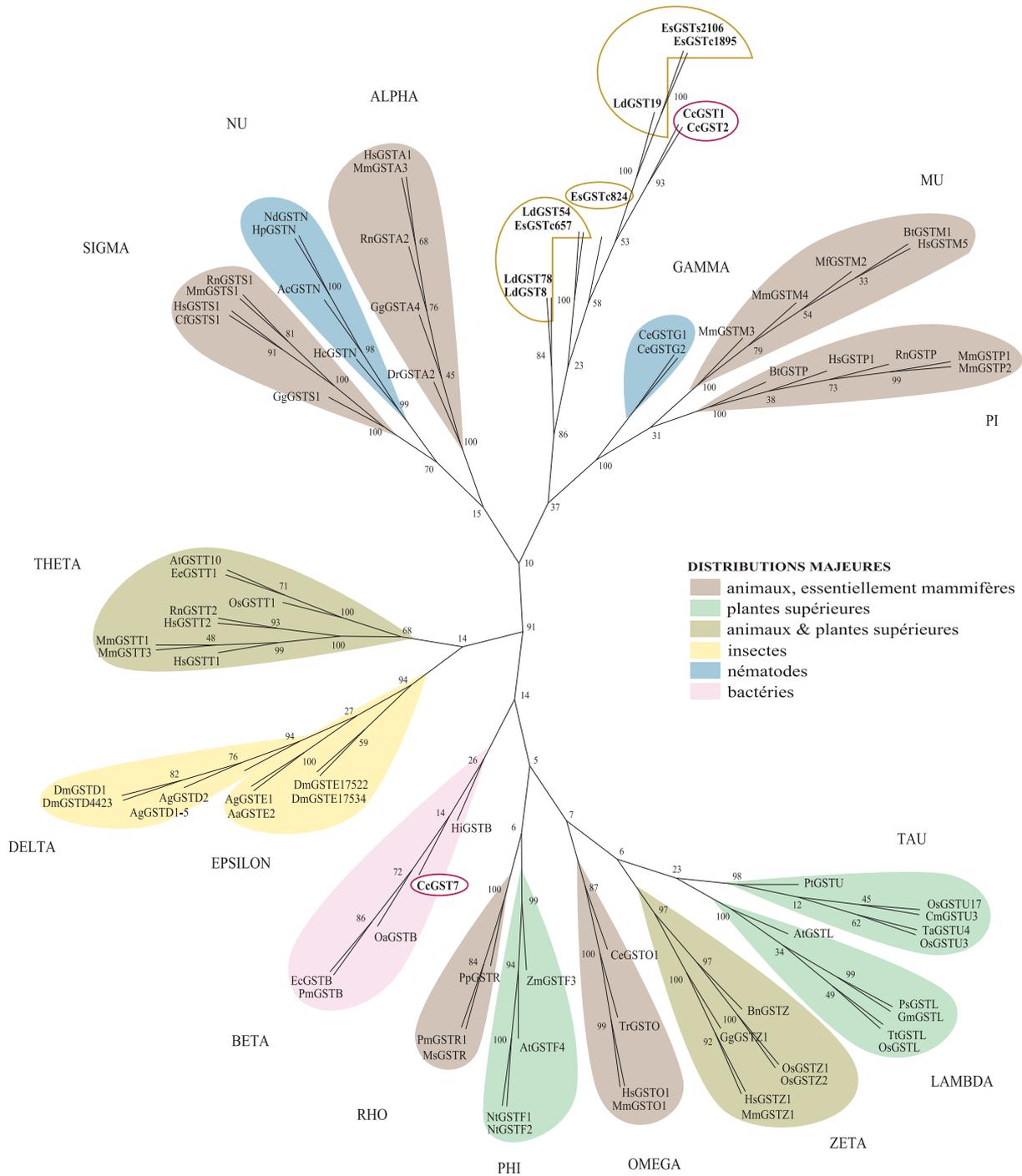


Figure 50 : Phylogénie des glutathion S-transférases obtenue avec la méthode du Maximum de Parcimonie, incluant des séquences d'algues rouges et brunes

L'arbre consensus non raciné a été obtenu par analyse d'un alignement de séquences protéiques pleine longueur, avec la méthode du Maximum de Parcimonie et 500 valeurs de bootstraps. Les glutathion S-transférases utilisées proviennent de différentes classes et différents embranchements, dont celui des algues rouges avec les 3 membres CcGST1, CcGST2 et CcGST7 identifiés chez *C. crispus*, 4 membres provenant de l'algue brune *Laminaria digitata* et 4 membres provenant de l'algue brune *Ectocarpus siliculosus*. L'appartenance des enzymes aux différentes classes de glutathion S-transférases est figurée sur l'arbre. Les séquences utilisées pour générer l'arbre sont répertoriées dans la partie Matériel et méthodes.

L'ensemble des analyses phylogénétiques réalisées illustre le caractère particulier des GST de macroalgues nouvellement identifiées. Elles n'appartiennent à aucune classe connue et seraient plus proches des classes GST de type mammifère, avec visiblement un ancêtre commun partagé avec les classes nu et sigma. Les onze séquences d'algues rouges et brunes forment un groupe unique entre ces différentes classes mais son hétérogénéité interne pourrait refléter l'identification de trois voire quatre nouvelles classes de GST encore non caractérisées. Si toutes ces enzymes ont un rôle dans la détoxification de produits xénobiotiques, certaines classes ont parfois des spécificités fonctionnelles. Il serait intéressant de déterminer si les GST de macroalgues possèdent des propriétés propres, et notamment si des différences fonctionnelles existent entre les différentes classes suspectées de GST de macroalgues.

III.1.3 Analyses transcriptionnelles des GST de *C. crispus*

Le stress oxydatif, les pesticides et les métaux lourds sont connus pour provoquer l'induction des gènes de glutathion S-transférases chez les plantes supérieures (DeRidder *et coll.*, 2002 ; Dixon *et coll.*, 2002 ; Moons, 2003). Chez l'algue rouge *C. crispus*, les analyses par Northern blotting ont montré qu'un traitement par le méthyle jasmonate induisait l'expression des 3 gènes, avec un effet marqué pour *CcGST2* après 12 heures. Par ailleurs les dérivés oxydés d'acides gras en C18 et C20 sont visiblement utilisés en tant qu'hormones de défense chez les gamétophytes de *C. crispus* (Bouarab *et coll.*, 2004 ; Gaquerel *et coll.*, soumis). Afin d'examiner plus en détail les profils d'expression des différents gènes de glutathion S-transférases chez *C. crispus*, j'ai réalisé des expériences de RT-PCR quantitative sur des algues traitées pendant 3 heures avec différents produits chimiques, dont 6 pesticides, 4 métaux lourds et 5 oxylipines. Les amorces utilisées ont été déterminées pour amplifier de façon sélective chacun des trois gènes. Tout comme l'analyse par Northern blotting, l'actine a été utilisée comme contrôle interne pour les expériences de RT-PCR quantitative.

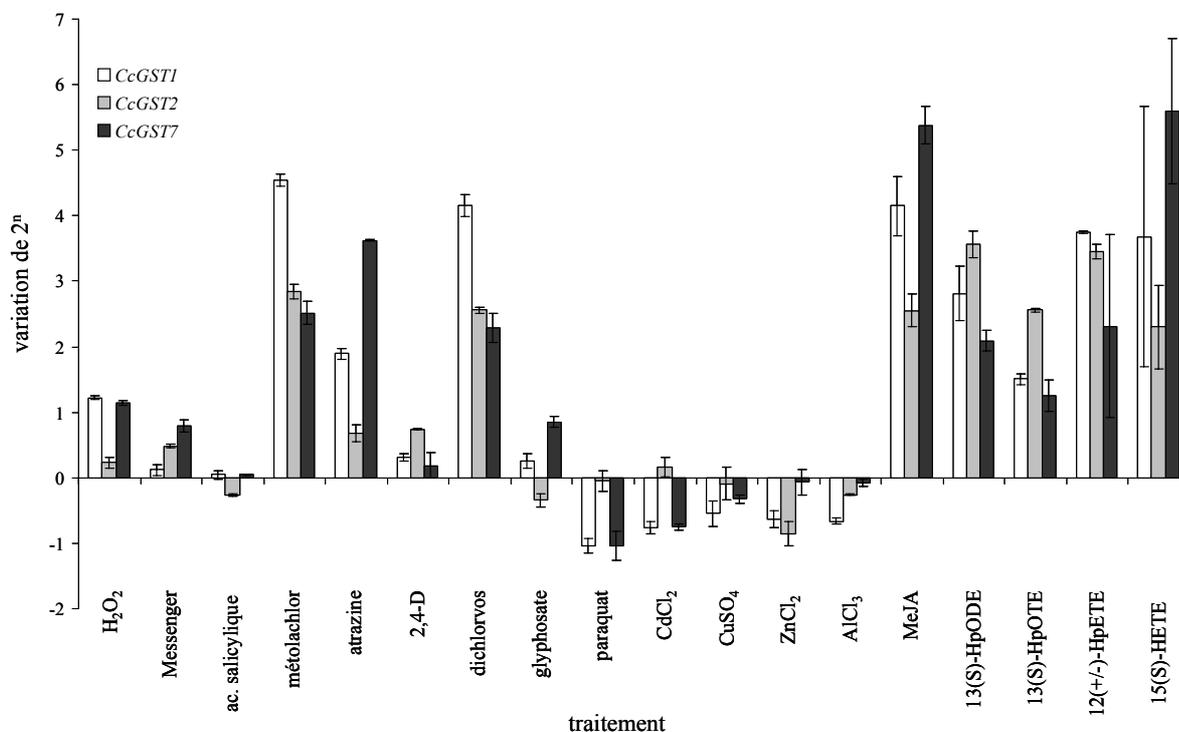


Figure 51 : Analyse par RT-PCR quantitative du niveau d’expression des transcrits de glutathion S-transférases après 3 heures de divers traitements chimiques

Les gamétophytes de *C. crispus* furent incubés pendant 3 heures avec les différents produits indiqués, dont 4 métaux lourds, 6 pesticides et 5 oxylipines. Le profil d’expression des différents transcrits sont normalisés par rapport à l’actine avant d’être rapporté à la valeur du témoin correspondant. Les résultats sont présentés en 2ⁿ d’induction ou de répression par rapport à la valeur des témoins.

En absence de traitement (conditions contrôles), environ 150 copies de *CcGST7* sont détectées dans les gamétophytes, exprimées en nombre d'équivalents génomes par nanogramme d'ARN total. Ce résultat confirme la faible expression du gène dans l'algue au niveau constitutif. Dans les mêmes conditions, *CcGST1* et *CcGST2* sont plus fortement exprimés avec 5 000 et 30 000 copies respectivement, confirmant également les résultats obtenus par Northern blotting.

Comme le montre la [Figure 51](#), les trois gènes de glutathion S-transférases de *C. crispus* possèdent des profils d'expression très similaires.

Le traitement par le Messenger, à une concentration équivalente de 6 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ d'harpine, a un effet inducteur modeste sur les 3 gènes, du même ordre que celui du peroxyde d'hydrogène (10 mM) : entre 1 à 2 fois plus d'expression par rapport au témoin. L'acide salicylique (500 μM) qui contrôle la résistance systémique acquise chez les plantes supérieures n'a quant à lui aucun effet après 3 heures de traitement.

Un traitement par le 2,4-D (500 μM) et par le glyphosate (500 μM), provoque une faible augmentation de l'expression des gènes (moins de deux fois plus) et même une légère inhibition de *CcGST2* dans le cas du glyphosate. Le paraquat (500 μM) n'a pas d'effet sur *CcGST2* mais réprime modestement *CcGST1* et *CcGST7* (deux fois moins exprimés que dans les témoins). **Les incubations de *C. crispus* avec le métolachlor (500 μM), l'atrazine (500 μM) et le dichlorvos (500 μM), induisent quant à elles très fortement l'expression des 3 gènes.** Les effets majeurs sont observés pour *CcGST1* avec une expression 23 fois plus importante dans le cas du métolachlor et 18 fois plus importante dans le cas du dichlorvos. L'atrazine n'a qu'un faible effet sur *CcGST2*, avec une expression 2 fois plus forte par rapport aux témoins.

Les métaux lourds ont de modestes effets, mais répriment globalement l'expression des 3 gènes. Contrairement aux inductions observées chez les plantes supérieures, le traitement des algues par le cadmium (200 μM), le cuivre (200 μM), le zinc (200 μM) et l'aluminium (200 μM), provoque une expression des 3 gènes jusqu'à 2 fois moins importantes pour les algues traitées par rapport aux témoins, dans le cas des répressions les plus fortes.

Les expériences de RT-PCR quantitative chez *C. crispus* ont non seulement confirmé l'induction des gènes de glutathion S-transférases par un traitement de 3 heures au méthyle jasmonate, mais ont également montrées que **toutes les oxylipines testées induisaient fortement l'expression de ces gènes.** Lors du traitement par le méthyle jasmonate (100

μM), les transcrits *CcGST1*, *CcGST2* et *CcGST7* ont montré des augmentations respectives de l'expression de 20, 6 et 43 fois. Le même ordre de grandeur pour les inductions est observé dans le cas des traitements avec les autres oxylipines (50 μM). Les effets les plus remarquables sont ceux obtenus pour le 13(S)-HpODE sur *CcGST2* (12 fois plus exprimé) dans le cas des dérivés en C18, et pour le 15(S)-HETE sur *CcGST7* (80 fois plus exprimé) pour les dérivés en C20.

Les résultats obtenus sur l'expression des gènes de GST chez *C. crispus* tendent à montrer que les trois enzymes jouent des rôles dans des processus métaboliques très similaires, puisque les trois transcrits ont globalement les mêmes profils d'expression. Ils ne sont que très peu affectés par des traitements aux métaux lourds, voire légèrement inhibés, ce qui fait supposer un rôle peu probable de ces enzymes dans la réponse aux stress de type métallique. En revanche les gènes sont induits par certains produits pesticides, alors que d'autres n'ont pas d'effet. Ces enzymes pourraient être impliquées chez l'algue rouge dans la détoxification de produits tels que le métolachlor, l'atrazine ou le dichlorvos.

L'induction systématique relativement importante, des trois gènes de GST par des dérivés lipidiques, est remarquable. Ces résultats renforcent notre hypothèse de départ du rôle probable de ces enzymes dans le catabolisme ou la biosynthèse d'oxylipines en C18 ou en C20 chez *C. crispus*. De telles hypothèses restent à confirmer au niveau des enzymes *CcGST1*, *CcGST2* et *CcGST7* correspondantes. **D'une manière générale les GST chez *C. crispus* pourraient jouer un rôle dans des réponses de défense et plus particulièrement par la détoxification de produits étrangers toxiques et la génération de métabolites lipidiques endogènes actifs.**

III.2 Etude d'une glutathion S-transférase recombinante de *C. crispus*

III.2.1 Expression hétérologue de CcGST2 et purification

Afin de caractériser les GST de *C. crispus* et dans un premier temps d'étudier leurs comportements vis-à-vis d'hydroperoxydes d'acides gras en C18 et C20, la séquence nucléotidique de CcGST2 a été clonée dans le vecteur d'expression pFO4, puis exprimée dans la souche BL21 d'*Escherichia coli*. La réalisation des constructions a été prise en charge par Gurvan Michel au sein de l'équipe « Glycobiologie des protéines », dans le cadre d'une procédure systématique d'expression hétérologue de protéines d'algues ou de bactéries. La procédure d'obtention des plasmides recombinants et de transformation est décrite dans le chapitre Matériel et méthodes. J'ai par la suite entrepris la culture en gros volumes de la souche recombinante, exprimant le gène *CcGST2* de *C. crispus*. Après obtention et préparation des lysats bactériens, la protéine CcGST2 produite est purifiée par affinité sur une colonne de nickel, en utilisant le Tag histidine greffée à la protéine. L'expression en milieu auto-inductif, et les étapes de purifications qui ont suivi, ont permis **l'obtention d'un grand rendement en protéines recombinantes** (15 mg pour 200 mL de milieu de culture), **pratiquement pures**, comme le montre le gel dénaturant (Figure 52). **La protéine purifiée apparaît sous forme d'une simple bande dans le gel, avec une masse moléculaire d'environ 26 kDa.** La protéine CcGST2 recombinante est plus grande que la protéine théorique de 2 kDa ; une partie de cette différence peut s'expliquer par le Tag additionnel placé en N-terminal et constitué de 6 histidines. La chromatographie par exclusion de taille de CcGST2 montre la présence d'un pic à environ 52 kDa, indiquant la **formation d'un homodimère** (Figure 53).

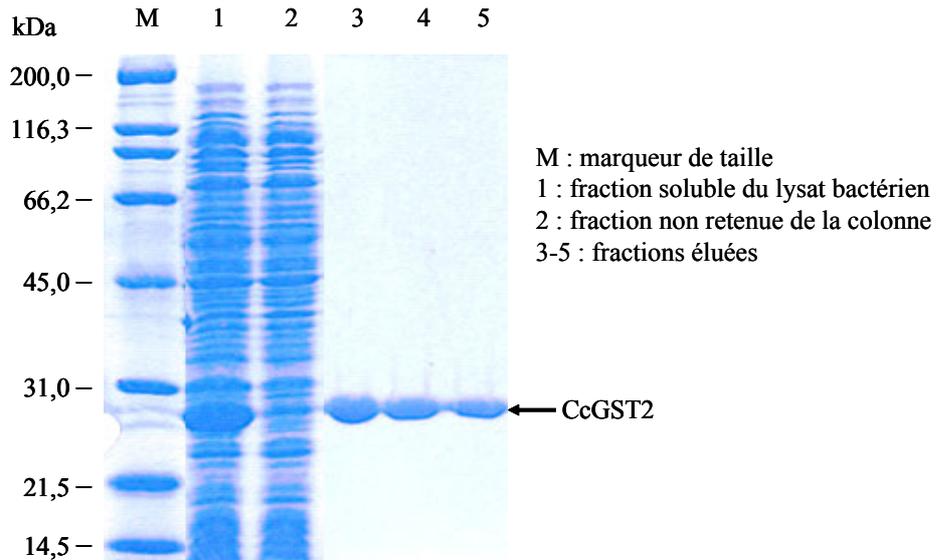


Figure 52 : Analyse sur gel dénaturant de l'expression hétérologue de CcGST2

L'expression hétérologue de CcGST2 dans *E. coli* a été examinée sur gel PAGE-SDS. La protéine recombinante a ensuite été purifiée par chromatographie d'affinité en utilisant une colonne de nickel.

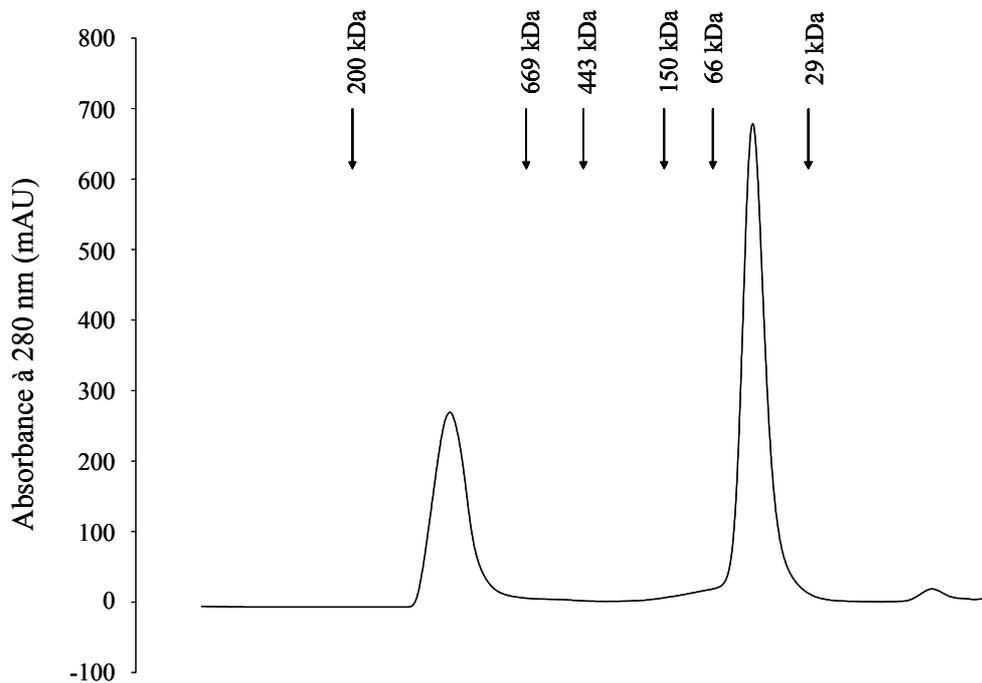


Figure 53 : Profil d'éluion de la CcGST2 recombinante par chromatographie d'exclusion de taille

Un pic majeur est observé à 52 kDa, indiquant une structure en homodimère de l'enzyme. Cent soixante-dix µg d'enzyme ont été injectés. Des agrégats sont également présents, apparus certainement suite aux étapes de concentration de l'échantillon en vue des expériences de cristallographie.

Une approche similaire a été réalisée pour le gène *CcGST7* de *C. crispus*. Le rendement d'expression est beaucoup plus faible : moins de 1 mg de protéine pour 200 mL de milieu de culture (700 µg). En revanche **CcGST7 est également pratiquement pure en sortie de colonne, avec une simple bande observée à 31 kDa (Figure 54)**. La protéine CcGST7 recombinante a une masse moléculaire plus importante de 5 kDa par rapport à la protéine théorique. La chromatographie par exclusion de taille de CcGST7 montre cette fois que la protéine est soit présente sous forme d'agrégats très lourds, soit dégradée (Figure 55). Un tel comportement peut illustrer un mauvais repliement de l'enzyme lors de l'expression, et de ce fait expliquer également le faible rendement obtenu. Ce défaut de repliement aura par ailleurs des conséquences sur l'activité catalytique de l'enzyme.

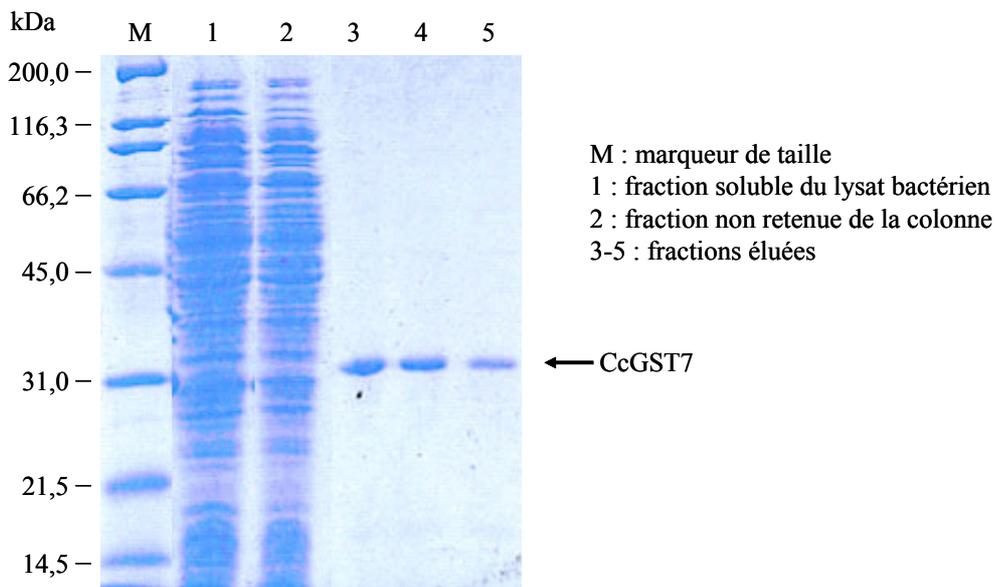


Figure 54 : Analyse sur gel dénaturant de l'expression hétérologue de CcGST7

L'expression hétérologue de CcGST7 dans *E. coli* a été examinée sur gel PAGE-SDS. La protéine recombinante a ensuite été purifiée par chromatographie d'affinité en utilisant une colonne de nickel.

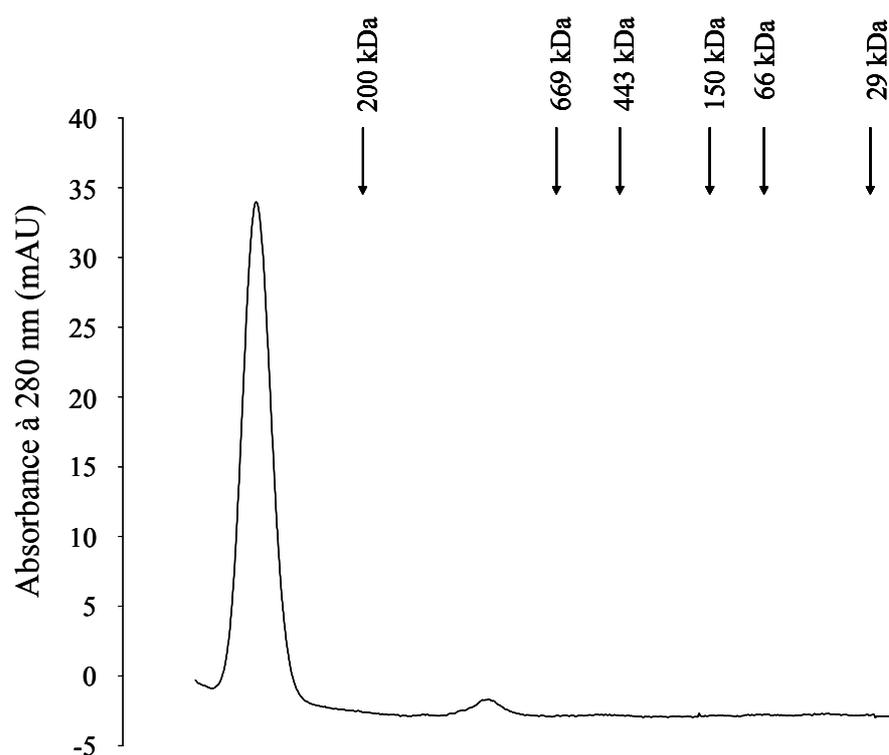


Figure 55 : Profil d'élution de la CcGST7 recombinante par chromatographie d'exclusion de taille

Seuls de lourds agrégats et un peu de contamination ou de dégradation sont présents. Ni le dimère ni le monomère ne sont détectés. Douze μg d'enzymes ont été injectés.

III.2.2 Spécificité de substrat

La spécificité catalytique de CcGST2 a été étudiée en utilisant une gamme de substrats communément utilisés pour tester les activités de type glutathion S-transférases. Parmi eux le mécanisme catalytique de la conjugaison du CDNB (ou 1-chloro-2,4-dinitrobenzène) au glutathion a fait l'objet de nombreuses études ; il s'agit du test le plus largement utilisé pour tester une activité glutathion S-transférase. **La protéine recombinante CcGST2 présente une activité spécifique de $1,05 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ contre le CDNB (Tableau 6)**, et également de bonnes activités transférases contre d'autres substrats halogénés tels que le 1-iodo-2,4-dinitrobenzène ($3,84 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$) et le 1-fluoro-2,4-dinitrobenzène ($20,34 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$). Aucune activité transférase n'est détectée ni avec les substrats carbonés α,β -insaturés testés, ni avec le substrat *para*-nitrophényl acétate.

Par ailleurs **la protéine CcGST2 présente une activité glutathion peroxydase** et est capable de réduire de façon assez importante l'hydroperoxyde de cumène ($5,50 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$). Des activités plus modestes sont observées dans le cas des hydroperoxydes d'acides gras tels que le 13-HpODE ($0,71 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$) et 13-HpOTE ($1,36 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$). Les activités d'hydroxylation des hydroperoxydes d'acides gras en C20 n'ont techniquement pas pu être déterminées. Il est intéressant de noter que CcGST2 possède un profil d'activité assez similaire à celui de la glutathion S-transférase HsGSTS1 de la classe sigma décrite par *Jowsey et coll. (2001)*, qui possède une activité prostaglandine synthase ([Tableau 6](#)).

Dans le cas de CcGST7 l'absence d'activité avec tous les substrats testés confirme notre précédente hypothèse d'un mauvais repliement de l'enzyme ou d'un problème de dimérisation, rendant impossible la catalyse des différentes réactions.

Substrat	Activité spécifique ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ de protéine)	
	CcGST2	HsGSTS
Activité transférase		
Aryl halides		
1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB)	1,05 \pm 0,07	5,06 \pm 0,01
1-bromo-2,4-dinitrobenzene	1,56 \pm 0,08	8,60 \pm 0,02
1-fluoro-2,4-dinitrobenzene	20,34 \pm 0,59	44,26 \pm 1,56
1-iodo-2,4-dinitrobenzene	3,84 \pm 0,12	10,70 \pm 0,16
<i>para</i> -nitrobenzoyl chloride	non détecté	-
α , β -unsaturated carbonyls		
Acide éthacrinique	non détecté	-
<i>trans</i> -4-phenyl-3-buten-2-one	non détecté	-
Divers		
<i>para</i> -nitrophenyl acetate	non détecté	-
Activité peroxydase		
Hydroperoxydes organiques		
Cumene hydroperoxide	5,50 \pm 0,21	0,052 \pm 0,007
<i>t</i> -butyl hydroperoxide	0,70 \pm 0,13	non détecté
13-HpODE	0,71 \pm 1,36	-
13-HpOTE	1,36 \pm 0,69	-

Tableau 6 : Activités spécifiques de CcGST2 de *C. crispus* et de la glutathion S-transférase de la classe sigma HsGSTS envers différents substrats

Les activités glutathion S-transférases et glutathion peroxydases furent testées pour la CcGST2 de *C. crispus*. Dans ce cas les résultats correspondent à la moyenne et l'écart-type de quatre répliquats. Les données concernant l'isoforme humaine HsGSTS ont été déterminées à 25°C et publiées par [Jowsey et coll. \(2001\)](#).

III.2.3 Effet de la température et du pH sur l'activité enzymatique de CcGST2

L'activité enzymatique reste stable sur une gamme de pH plus au moins large, allant de pH7 (80 % de l'activité) à pH9 (83 % de l'activité), suggérant que le changement de pH n'a qu'un effet modeste sur l'activité de l'enzyme CcGST2 en utilisant le CDNB comme substrat (Figure 56). L'enzyme semble préférer des pH légèrement alcalins. **Le pH optimal apparent est évalué à pH 8,0.**

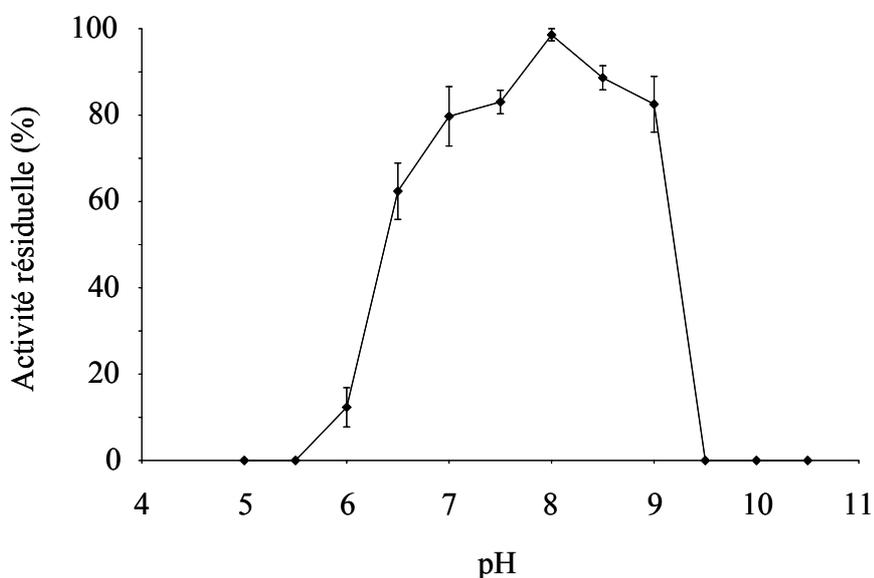


Figure 56 : Détermination du pH optimal de la CcGST2 recombinante

L'activité résiduelle de l'enzyme est mesurée selon un test classique au CDNB, dans différents tampons aux pH indiqués.

La thermostabilité de l'enzyme a été étudiée en incubant CcGST2 à différentes températures pendant 10 min, puis en mesurant l'activité résiduelle en utilisant le CDNB comme substrat (Figure 57). L'enzyme est relativement stable jusqu'à 35°C, mais est rapidement inactivée de façon irréversible au-delà de cette température.

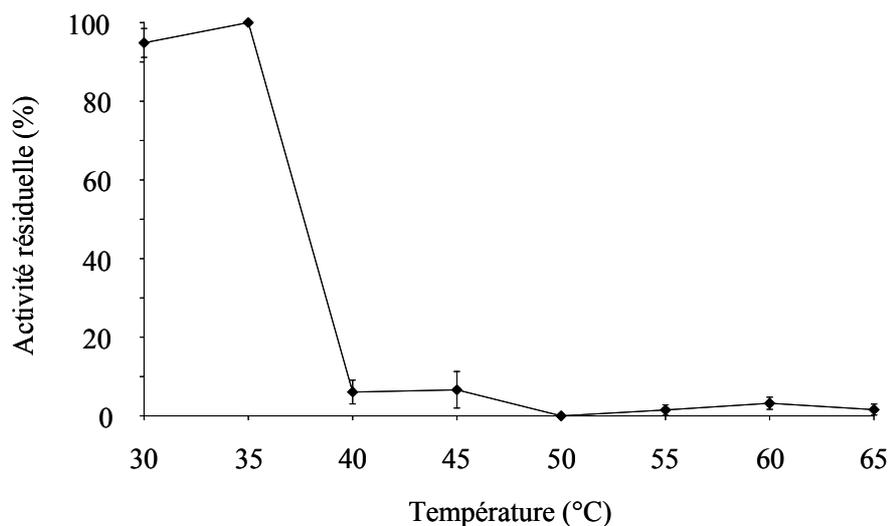


Figure 57 : Thermostabilité de la CcGST2 recombinante

L'activité résiduelle de l'enzyme a été mesurée après une incubation de 10 min aux différentes températures indiquées.

III.2.4 Etudes cinétiques

Les mesures des activités de type glutathion peroxydase et les paramètres cinétiques du glutathion de la CcGST2 ont été réalisés par Pierre-Olivier Defranco (doctorant).

Les valeurs du K_m et de V_{max} pour CcGST2 dans le cas du glutathion sont respectivement de $361 \mu M$ et $1,55 \mu mol \cdot min^{-1} \cdot mg^{-1}$ (Figure 58). L'ordre de grandeur du K_m obtenu illustre une affinité modérée de CcGST2 vis-à-vis du glutathion.

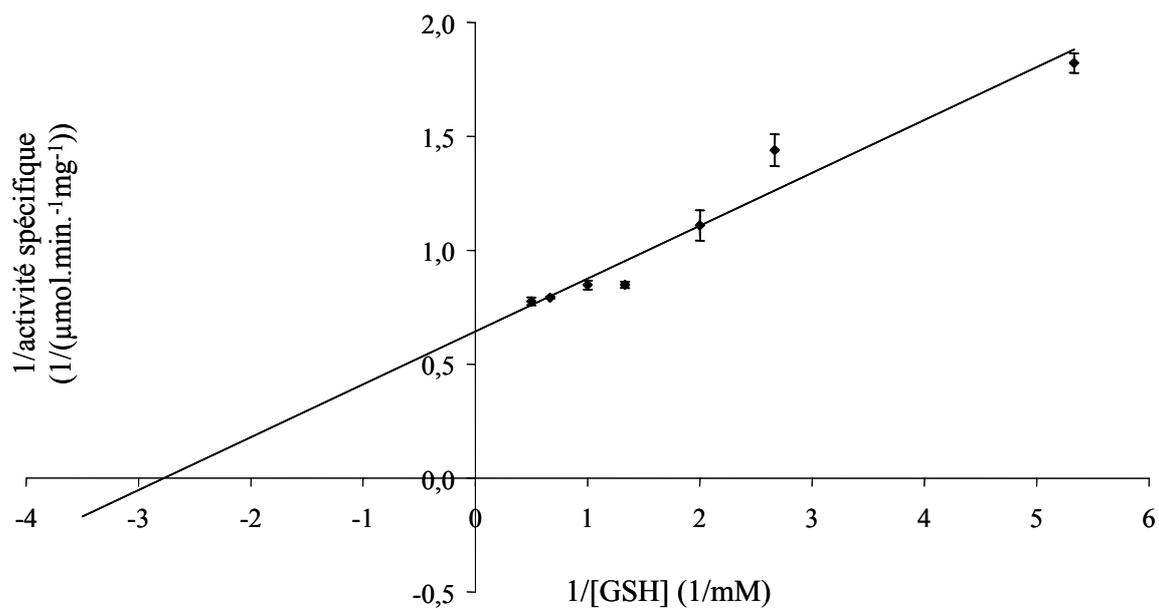


Figure 58 : Détermination des paramètres cinétiques de CcGST2 pour le glutathion par analyse de Lineweaver-Burk

III.3 Etudes cristallographiques de CcGST2

III.3.1 Prédiction de la structure tridimensionnelle de CcGST1

Afin d'avoir une idée *a priori* de la structure tridimensionnelle des glutathion S-transférases chez *C. crispus*, des prédictions ont été réalisées pour CcGST1 à l'aide de Swiss-Model et en utilisant comme modèle la structure connue de la GST sigma humaine à activité prostaglandine synthase HsGSTS. Une telle prédiction doit être analysée avec prudence car le taux d'identité est faible (25 %) et peut conduire à des mauvaises interprétations. De telles prédictions n'ont d'ailleurs pas pu être obtenues pour CcGST7 et CcGST2.

Les images tridimensionnelles ont été éditées dans Swiss-Pdb viewer par Gurvan Michel (Figure 59).

L'analyse des repliements protéiques met en avant les différences déjà observées au niveau des séquences primaires et notamment la zone d'insertion présente entre les hélices $\alpha 4$ et $\alpha 5$, figurée par un brin beta. Cette zone surplombe le site de fixation du glutathion et pourrait avoir une influence sur la nature du second substrat accepté par l'enzyme. Cette représentation permet de visualiser la présence du motif thioredoxine $\beta 1 \alpha 1 \beta 2 \alpha 2 \beta 3 \beta 4 \alpha 3$ au niveau de la région N-terminale ; la région C-terminale étant quant à elle constituée exclusivement d'hélices α .

La représentation des surfaces moléculaires montre clairement que si la GST sigma humaine est massivement acide, CcGST1 a un état de charges plutôt neutre. Notamment le dessus de la boucle fixant le glutathion est plus basique chez l'algue rouge ; une telle propriété peut avoir une influence sur le type de substrat pris en charge. Par ailleurs sur ces représentations, le groupement thiol du glutathion est dirigé vers l'intérieur du site actif et est donc masqué par les chaînes latérales de l'enzyme. Dans le cas de CcGST1 le glutathion est quasiment recouvert par ces avancées et la gorge pourrait avoir une topologie plus resserrée que celle de HsGSTS. Une telle structure pourrait indiquer que les seconds substrats pris en charge pour une activité transférase sont sans doute différents de ceux acceptés par HsGSTS, voire probablement d'encombrements moindres.

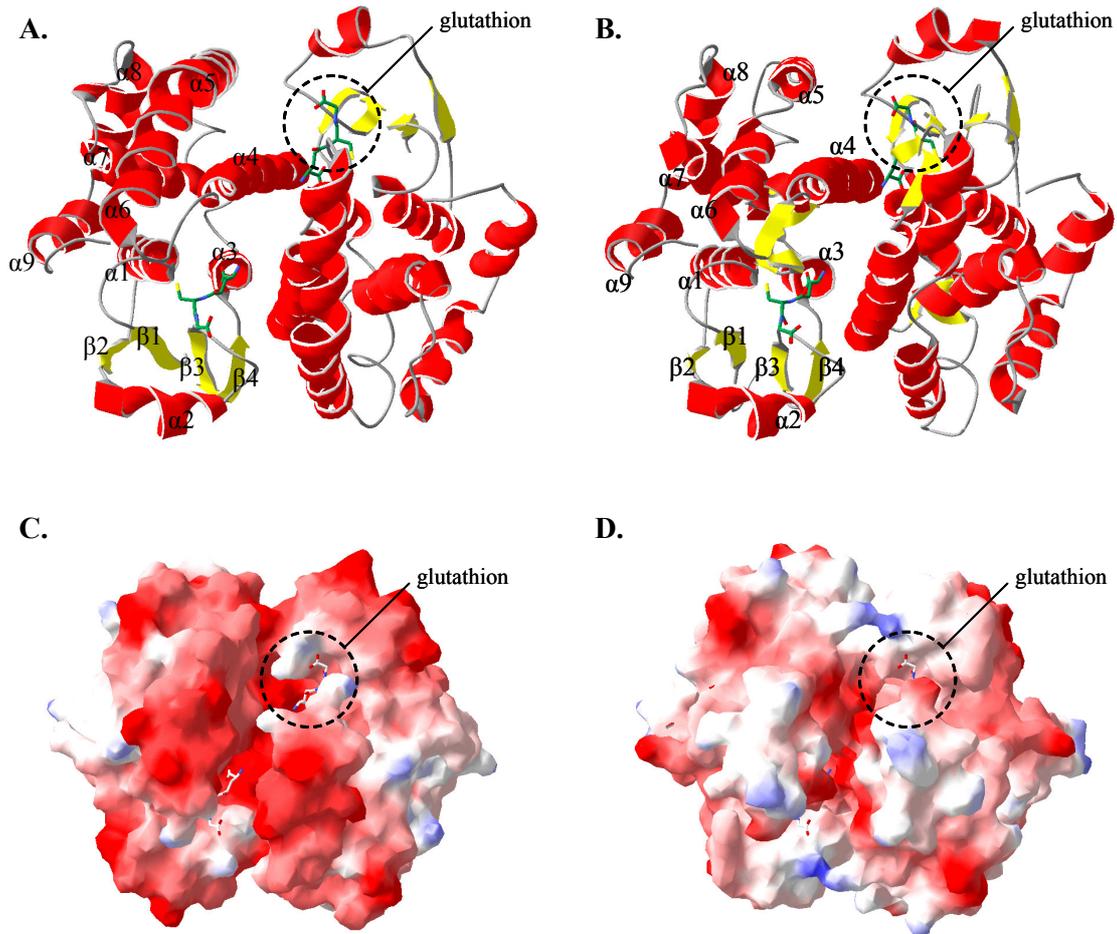


Figure 59 : Représentation de la structure établie de HsGSTS et de la structure prédite de CcGST1

La structure dimérique prédite de CcGST1 est comparée à la structure dimérique établie de HsGSTs (pdb : 1IYI)

(A, C) : HsGSTS. (B, D) : CcGST1

(A, B) : représentations en rubans. Les hélices alpha sont représentées en rouge et les brins beta en jaune. La molécule de glutathion est figurée dans le site actif.

(C, D) : représentations des surfaces électrostatiques. Les zones rouges indiquent des charges acides, les zones bleues les charges basiques.

Les zones d'insertions présentes entre les hélices $\alpha 4$ et $\alpha 5$ d'une part et au niveau de l'hélice $\alpha 7$ d'autre part, sont conservées dans le cas de CcGST2. Une structure tridimensionnelle identique à celle de CcGST1 pourrait être supposée dans ce dernier cas. Cependant les taux d'identité avec la GST sigma utilisée comme modèle sont relativement faibles (30 %) et les prédictions de structures tri-dimensionnelles ainsi réalisées doivent être interprétées avec prudence. Elles ne peuvent en aucun cas se substituer à la résolution de la structure réelle.

III.3.2 Cristallisation de la protéine recombinante CcGST2

Des essais préliminaires de cristallisation, réalisés avec l'aide de Mirjam Czjzek, ont permis l'obtention de micro-cristaux de la protéine recombinante CcGST2. Les cristaux apparaissent sous la forme de bâtonnets (Figure 60).



Figure 60 : Micro-cristaux de la protéine CcGST2 recombinante

Les cristaux ont une longueur moyenne de 30 à 40 μm sur 6 à 10 μm de hauteur et de largeur.

Les meilleurs résultats ont été obtenus en présence de PEG MME 5000 dans un tampon 0,1 M MES pH6,5, contenant 0,2 M de sulfate d'ammonium et 3 % de glycérol, avec un rapport de volume de gouttes de 3 μL d'enzyme sans substrat et 1 μL de tampon, équilibré en présence de 500 μL de tampon de cristallisation.

Les analyses réalisées au cours de cette étude ont montré une meilleure cristallisation de l'enzyme à pH6,5 et en présence de 0,2 M de sulfate d'ammonium. Cependant les cristaux ne dépassent pas une taille limite de 40 μm . Un tel constat peut sans doute s'expliquer par l'hétérogénéité de l'échantillon CcGST2 utilisé ; en effet des contaminants ont visiblement été entraînés au cours de la concentration de la protéine (Mirjam Czjzek, communication personnelle) et perturbent certainement la cristallisation. Une concentration plus drastique de la protéine ($\sim 10 \text{ mg.L}^{-1}$), à partir d'échantillons nouvellement sur-exprimés et purifiés, devrait permettre d'obtenir assez facilement des cristaux d'une taille satisfaisante. Par ailleurs nous disposons désormais de suffisamment d'information sur les conditions de cristallisation de la protéine CcGST2 pour améliorer le protocole d'obtention.

III.4 Bilan de l'étude des GST chez *C. crispus*

L'étude moléculaire des gènes de GST chez *C. crispus* a abouti à l'expression en système hétérologue d'au moins un de ces représentants et à la caractérisation enzymatique de la protéine recombinante.

L'organisation de la structure en intron/exon des trois gènes de GST chez *C. crispus* soutient l'idée d'un lien de parenté de CcGST1 et CcGST2, ainsi que la divergence de CcGST7. L'étude des séquences protéiques déduites ne permet pas d'affilier ces séquences à aucune des classes de GST connues. Un constat similaire peut également être attribué aux GST nouvellement identifiées des algues brunes *Laminaria digitata* et *Ectocarpus siliculosus*. Les analyses phylogénétiques confirment la particularité de ces enzymes puisqu'elles semblent former un groupe à part entière parmi toutes les classes de GST déjà caractérisées. Celui-ci posséderait un ancêtre commun avec les GST des classes nu et sigma, cette dernière classe contenant des membres possédant également une activité de type prostaglandine synthase. Ce groupe reste hétérogène avec visiblement plusieurs nouvelles classes de GST ainsi identifiées. Seule CcGST7 diverge par rapport à toutes ces séquences d'algues et est difficilement positionnable dans l'arbre des GST.

Malgré le caractère particulier de CcGST7, le profil d'expression du gène est très similaire à ceux de CcGST1 et CcGST2. Ces trois transcrits adoptent un profil remarquable suite à divers traitements de l'algue. Contre toute attente ils semblent légèrement réprimés par les métaux, et seuls quelques pesticides particuliers tels que le métolachlor et le dichlorvos, stimulent leur expression, tandis que le glyphosate est sans effet. Le trait le plus marquant est la forte activation unanime de l'expression suite à des traitements par des oxylipines en C18 (méthyle jasmonate, 13-HpODE, 13-HpOTE) et C20 (12-HpETE, 15-HETE). Un tel comportement suggère l'implication des enzymes correspondantes dans des voies métaboliques mettant en jeu des substrats dérivés d'acides gras. Elles pourraient ainsi détenir un rôle dans la synthèse de métabolites endogènes lipidiques actifs chez l'algue. Connaissant l'importance des deux voies de biosynthèse des oxylipines dans la mise en place de réponses de défense chez *C. crispus* (aboutissant notamment à la synthèse de cyclopenté(a)nonés rappelant ceux synthétisés chez les plantes supérieures ou les

animaux), il devient particulièrement intéressant de déterminer si ces enzymes ont un rôle potentiel dans ces métabolismes.

Le gène *CcGST2* a pu être sur-exprimé en système hétérologue et a permis l'obtention d'une protéine soluble active. L'activité transférase de cette enzyme a été déterminée sur des substrats génériques, mais nous avons également montré qu'elle est capable d'hydroxyler des hydroperoxydes d'acides gras en C18, substrats qui induisent par ailleurs l'expression de son gène. Son rôle *in vivo* dans le métabolisme des dérivés lipidiques reste à déterminer. Elle pourrait par ailleurs également posséder d'autres types d'activités, telle qu'on le rencontre chez les GST sigma, qui catalysent l'isomérisation de la prostaglandine H2 chez les animaux. L'obtention de cristaux de taille suffisante de la protéine CcGST2 et la résolution de sa structure, pourraient nous apporter des informations sur les caractéristiques de la gorge et la nature des substrats potentiels pouvant s'y positionner. Ces résultats seraient autant d'indices pouvant nous orienter sur l'identification du rôle de ces enzymes chez l'algue.

Chapitre V -Conclusions et perspectives

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Chapitre V -Conclusions et perspectives

L'étude de ce travail de thèse sur l'élucidation des voies de défense mises en place chez *C. crispus*, initialement prévue au niveau moléculaire, a permis de mettre en avant quatre résultats principaux.

- (1) La NADPH oxydase potentiellement impliquée dans la génération du burst oxydatif chez *C. crispus* a été caractérisée au niveau moléculaire et constitue le premier marqueur de défense chez l'algue.
- (2) L'analyse des banques EST a permis de dessiner une carte sans *a priori* des gènes d'importance dans le métabolisme du protoplaste. Plusieurs gènes dont les enzymes ont un rôle à jouer dans la défense ont été appréhendés : production de composés toxiques pour un pathogène potentiel, activité anti-oxydante, détoxification de produits étrangers toxiques et métabolisme potentiel de composés endogènes actifs.
- (3) De nouvelles classes de GST ont été mises en évidence à partir des macroalgues, soulignant l'intérêt d'étudier des modèles dits exotiques.
- (4) Ces classes d'enzymes restent à caractériser et sur ce point des premiers éléments de réponse ont été apportés sur les GST de l'algue rouge *C. crispus*, pour lesquelles je propose, et ce par analogie à la nomenclature en vigueur, d'attribuer la dénomination de **GST de la classe iota (CcGST1, CcGST2)**.

Les réflexions suscitées à la suite de ce travail sont multiples et offrent plusieurs perspectives d'étude. Au-delà des considérations propres au modèle d'étude, elles nous amènent notamment à nous interroger sur la convergence des systèmes de transduction des signaux mis en place chez les organismes eucaryotes et sur l'idée plus générale d'une immunité innée non inféodée uniquement aux systèmes animaux.

1) Elucider le rôle des GST chez *C. crispus*

Les analyses moléculaires des GST chez *C. crispus* nous apportent des indices sur leurs rôles dans la détoxification de composés étrangers et dans un métabolisme potentiel de dérivés lipidiques endogènes.

Au-delà du cadre de l'étude, l'obtention de la protéine CcGST2 recombinante représente un premier succès pour le laboratoire car elle constitue la première protéine d'algue sur-exprimée de façon soluble et active dans notre unité. Tous nos essais antérieurs d'expression de protéines recombinantes de macroalgues étaient jusqu'alors restés vains ;

ce résultat démontre non seulement les possibilités techniques d'une telle réalisation mais ouvre également des perspectives futures au laboratoire pour l'expression de protéines d'algues en système hétérologue. Les premières études enzymatiques menées sur la protéine CcGST2 recombinante ont montré que l'enzyme était capable d'hydroxyler des hydroperoxydes d'acides gras en C18. Le groupement -OH de la fonction carboxylique est vraisemblablement la cible de l'enzyme, mais la nature des produits libérés suite au réarrangement moléculaire de ces molécules est inconnue. Le type de résidus impliqués dans le site catalytique de l'enzyme et la conformation de la gorge, déterminent la façon dont se positionne le substrat et la nature des produits formés. Les produits libérés au cours de la réaction catalysée par CcGST2 devront être analysés par LC/MS et GC/MS afin d'identifier leur nature exacte. Des études similaires devront être réalisées à partir des hydroperoxydes d'acides gras en C20 comme substrats, afin de déterminer si CcGST2 a la capacité de les hydroxyler ou non, ainsi que la nature des produits libérés s'ils existent. Une telle analyse pourrait nous apporter des éléments de réponse sur la façon dont sont synthétisés ces produits *in vivo* dans l'algue.

D'autre part il devient essentiel de confirmer que la synthèse des prostaglandines, chez des gamétophytes de *C. crispus* incubés avec méthyle jasmonate, n'est pas abolie par des inhibiteurs de cyclooxygénases (COX) et d'allène oxyde synthase (AOS). Des tests préliminaires suggéraient que l'aspirine (inhibiteur des COX et AOS) et l'indométacine (inhibiteur des AOS) n'inhibent pas la synthèse de prostaglandines chez *C. crispus* ; si un tel résultat est confirmé il permettra d'établir que des cyclopenté(a)nonés chez *C. crispus* sont synthétisés par d'autres voies que celles rencontrées chez les mammifères et les plantes supérieures. Afin d'étayer ces analyses, des inhibiteurs de GST de mammifères pourront être testés sur la protéine recombinante CcGST2. L'identification *in vitro* d'inhibiteurs de cette enzyme pourrait alors nous permettre d'établir *in vivo* si la synthèse méthyle jasmonate-dépendante des prostaglandines chez *C. crispus* est inhibée ou non par les inhibiteurs de CcGST2. Ces résultats nous permettraient d'appréhender le rôle de cette enzyme dans la synthèse des cyclopenté(a)nonés chez *C. crispus*. Ces tests sont relativement simples à mettre en place et vont être réalisés prochainement.

Enfin, et d'une manière assez exploratoire, la possibilité que l'enzyme recombinante détienne une activité prostaglandine synthase devra être démontrée. Les expériences préliminaires que j'ai réalisées sur ce point avec Emmanuel Gaquerel ont

montré qu'elles n'avaient rien de trivial. Les méthodes de dosage sont en soi relativement simples et font appel à des techniques que nous avons à notre disposition (UMR7139, EA948, Faculté de Médecine de Brest) ; néanmoins des mises au point sont nécessaires avant la réalisation des réactions. Elles utilisent généralement des méthodes de CCM ou de séparation des produits de la réaction sur colonne HPLC avec détection des produits libérés avant leur identification par LC/MS et GC/MS. La détection peut se réaliser dans l'UV et en utilisant des étalons internes dans le cas de substrats non marqués, mais elle fait appel le plus fréquemment à des substrats radiomarqués au ^{14}C . Certains kits de dosage d'activités prostaglandines synthases sont également disponibles dans le commerce, mais ciblent d'une manière générale des activités déjà bien caractérisées.

Dans notre cas, une telle démarche est assez ambitieuse car nous ne connaissons ni les substrats pris en charge par l'enzyme, ni les produits libérés. C'est pourquoi l'utilisation d'acides gras radiomarqués (acide arachidonique, acide linoléique, acide linolénique), en présence d'une cyclooxygénase ou d'une lipoxygénase pour permettre la génération d'un mélange de dérivés lipidiques marqués, constitueraient notre support de départ. Le différentiel entre la réaction avec et sans CcGST2 serait alors analysé. Ce protocole est à préférer à celui d'une détection réalisée dans l'UV avec des substrats non marqués, malgré les contraintes de travail qu'imposent le ^{14}C . En effet la méthode à froid impose de nombreuses mises au point préalables, nécessitant notamment l'analyse de standards pouvant être potentiellement produits au cours de la réaction. La méthode doit permettre à la fois une bonne séparation de tous ces produits, y compris les produits issus d'une dégradation spontanée (choix de la colonne et de la phase mobile), et une bonne détection de chacun d'entre eux (choix des longueurs d'onde). Une telle réaction implique notamment l'utilisation de la prostaglandine H₂, qui est extrêmement instable et nécessite préférentiellement de travailler à des basses températures (0 à 4°C). Toutes ces mises au point et l'utilisation de standards parfois coûteux, pour la mise en évidence d'une activité prostaglandine synthase qui n'est encore qu'hypothétique, me font préférer l'utilisation du protocole au ^{14}C précédemment décrit. Une réflexion de fond sur la démarche à adopter s'impose d'elle-même et justifie la chronologie à suivre concernant les différents tests à réaliser.

Au-delà des tests enzymatiques *in vivo* et *in vitro*, l'analyse de la protéine recombinante par une méthode bien plus robuste pourrait également nous apporter des indices. En effet j'ai également eut la chance au cours des derniers mois de mon doctorat,

de tirer parti du développement d'une équipe de cristallographie des protéines dans le laboratoire. Des expériences préliminaires ont permis l'obtention de microcristaux de CcGST2. Les conditions de cristallisation sont à améliorer pour obtenir des cristaux d'une taille suffisante, mais des étapes supplémentaires de purification et de concentration de l'enzyme pourraient sans conteste suffire à les obtenir. Et quand bien même, nous avons désormais suffisamment d'informations sur les conditions de cristallisation pour également améliorer le protocole (composition des tampons, ensemencement). La résolution de la structure de CcGST2 nous apportera des informations sur la topologie du site actif. Des expériences de positionnement du substrat (*molecular docking*) pourraient nous indiquer quel type de molécule peut être pris en charge ou non par l'enzyme. Les modélisations avec les oxylipines en C18 (13-HpODE, 13-HpOTE) et en C20 (12-HpETE, 15-HpETE) sont à envisager. Une modélisation avec la prostaglandine H2 pourrait nous indiquer si le substrat a la capacité de s'engager et de se fixer dans la gorge, et nous fournir ainsi des informations justifiant ou non le dosage d'une réaction de type prostaglandine synthase. L'enzyme seule peut être cristallisée, mais la résolution du complexe ternaire peut également être envisagé. Dans un premier temps le complexe enzyme/GSH/CDNB peut être résolu, mais un complexe incriminant une oxylipine en C18 est également réalisable (ajout des substrats avant ou après cristallisation).

Toutes les perspectives présentées jusqu'alors concernent essentiellement CcGST2. Les séquences CcGST1 et CcGST7 devront également être sur-exprimées en système hétérologue. L'expression de CcGST7 est visiblement plus difficile que CcGST2 et d'autres constructions devront être testées. Les séquences des plasmides recombinants devront être reséquencées afin de vérifier le maintien de leurs intégrités ; le cas contraire pouvant conduire à des défauts d'expression. Dans le cas de CcGST7, la modification du tampon de dialyse pourrait peut-être améliorer la stabilité du monomère et permettre la dimérisation. L'obtention et la caractérisation enzymatique d'une protéine CcGST7 recombinante seraient particulièrement intéressantes. En effet les trois gènes isolés CcGST1, CcGST2 et CcGST7 ont tous un profil d'expression très similaire. Serait-il possible que l'enzyme CcGST7, si éloignée phylogénétiquement de ses congénères, possède malgré tout la même activité ? Inversement elle pourrait également être impliquée dans des voies différentes de biosynthèse d'oxylipines chez *C. crispus*.

D'autres gènes de GST ont été identifiés chez les algues brunes *L. digitata* et *E. siliculosus*. Tout comme les gènes de l'algue rouge *C. crispus*, ils ne semblent appartenir à aucune des classes de GST déjà décrites. Malgré des taux d'identité entre ces séquences parfois inférieurs à 30 %, elles semblent former un large groupe contenant également les séquences de *C. crispus*. De façon assez surprenante, des études préliminaires ont montré que les profils d'expressions de deux de ces gènes (*LdGST8*, *LdGST78*) étaient sans doute très différents des profils des gènes de *C. crispus*. En effet leur expression est fortement induite par les oligogulonates (respectivement 16 et 8 fois) et le cuivre (respectivement 5 et 22 fois), alors qu'elle est inhibée lors d'un traitement par le méthyle jasmonate (respectivement 8 et 4 fois) et le 15-HETE (respectivement 3 et 4 fois) (Defranco, 2005 – rapport de Master). Ainsi l'expression des gènes de GST de l'algue rouge *C. crispus* serait légèrement réprimée par les métaux et fortement induite par les oxylipines, tandis que l'effet inverse est observé sur deux des gènes de l'algue brune *L. digitata*. Les deux protéines *LdGST8* et *LdGST78* partagent 58 % d'identité entre elles et appartiennent vraisemblablement à la même classe d'isoformes. Elles partagent moins de 30 % d'identité avec les séquences *CcGST1* et *CcGST2* de *C. crispus*, qui malgré leur proximité dans les arbres phylogénétiques présentés, formeraient une autre classe d'isoformes. Il serait intéressant d'étudier le comportement transcriptionnel des autres gènes d'algues brunes identifiés, suite à des traitements par les pesticides, les métaux et les oxylipines, afin de vérifier si nous pouvons assigner à chaque classe un profil de transcription spécifique. Par ailleurs, compte tenu des analyses de profils, ces enzymes jouent très certainement un rôle différent chez l'algue brune *L. digitata*, et en particulier elles pourraient être impliquées dans des processus de détoxification des métaux lourds. Afin d'étudier plus précisément les GST de *L. digitata*, le gène *LdGST54* a doré et déjà été sur-exprimé en système hétérologue et des tests d'activité sur l'enzyme recombinante ont été réalisés (Defranco, non publié).

2) Les oxylipines et autres métabolites d'intérêt chez *C. crispus*

D'une manière générale toutes les études menées jusqu'alors chez *C. crispus* tendent à montrer le rôle majeur que jouent les deux voies métaboliques des oxylipines

chez ce modèle : l'algue est capable de les synthétiser, elles sont perçues par l'algue et induisent la mise en place d'une résistance à l'infection, elles sont sans doute essentielles à la transduction d'un signal aboutissant à l'activation de voies de défense. Des gènes codant des enzymes potentiellement impliquées à différents niveaux de ces voies métaboliques ont été identifiés et devront être étudiés plus précisément. Notamment les cytochromes P450 sont d'un intérêt tout particulier à cet égard. Les trois séquences isolées devront être reséquencées entièrement ; des expériences de 5'-RACE PCR pourront permettre l'obtention des séquences complètes et ainsi nous donner des indications sur l'affiliation à une famille pour les séquences *CcCYPp1* et *CcCYPt1*. La séquence *CcCYPt2* est particulièrement intéressante car elle appartiendrait à la famille 51, impliquée dans la synthèse des stérols. Un métabolisme de ce type reste à caractériser *in vivo*.

Concernant les autres gènes identifiés, la peroxiredoxine serait impliquée dans l'hydroxylation d'hydroperoxydes d'acides gras libérés au cours d'un stress oxydatif. De la même manière que pour *CcGST2*, le gène *CcPrx1* a été sur-exprimé en système hétérologue et les premiers résultats d'activité montrent que l'enzyme est également capable d'hydroxyler les oxylipines 13-HpODE et 13-HpOTE (Cécile Hervé, Pierre-Olivier Defranco, communication personnelle).

L'étude du comportement de chacun de ces marqueurs moléculaires au cours de traitements lipidiques pourrait nous donner des indices sur le rôle qu'ils ont à tenir dans les voies de biosynthèse des oxylipines chez l'algue. Des études biochimiques menées par Emmanuel Gaquerel ont également permis d'identifier une enzyme d'un intérêt tout particulier : il a ainsi isolé et caractérisé une (ω -7) hydroxylase, très certainement impliquée dans la biosynthèse du 11-HODE chez l'algue (Gaquerel, 2005 ; Gaquerel *et coll.*, soumis). Les substrats de l'enzyme ont été identifiés (acides gras de longueur de chaîne variable, possédant au moins un motif 1,4-pentadiène centré autour du carbone ω -7), et la forte régio-sélectivité de l'oxydation constitue une définition inédite au regard de la littérature. La caractérisation de cette enzyme, inductible par le méthyle jasmonate, pourrait apporter un éclairage nouveau d'ordre évolutif sur le métabolisme des oxylipines.

Les oxylipines de *C. crispus* pourraient détenir des intérêts phytosanitaire et pharmaceutique, justifiant à nouveau l'élucidation de leurs voies de biosynthèse chez l'algue et l'isolement d'enzymes impliquées dans leur métabolisme. L'intérêt phytosanitaire résiderait dans le renforcement de la protection des grandes cultures contre les pathogènes, déjà obtenu avec des oligosaccharides d'algues marines, par application

d'extraits lipidiques bioactifs stimulant les défenses (brevet N°02 099 11). L'autre intérêt résiderait dans la propriété des produits issus d'algues élicitées à provoquer des effets physiologiques chez les mammifères. Leurs capacités à provoquer la différenciation du fibroblaste en adipocyte ont été étudiées sur des lignées murines et humaines (brevet N°02 099 12). Le rôle biologique majeur des oxylipines chez les plantes, et *a fortiori* chez les algues, est sans doute comparable au rôle des éicosanoïdes en tant que médiateurs lipidiques chez les animaux (Howe et Schillmiller, 2002).

Chez les plantes ces composés biologiques actifs sont synthétisés *de novo* dans l'organisme, en réponse à un dommage mécanique, l'attaque d'un pathogène, ou à la suite d'une modification environnementale ou du développement. La majorité des efforts a porté jusqu'à présent sur l'étude de la famille des jasmonates. Les voies de biosynthèse d'autres types d'oxylipines (aldéhydes, cétoles, époxydes, divinyl-éthers, hydroxydes) ainsi que leurs rôles dans la plante, restent à élucider. D'autre part l'identification de nouveaux dérivés lipidiques à cycle pentènone constitue une priorité car ils ont très certainement des fonctions signalitiques multiples, tels que les jasmonates chez les plantes supérieures et les prostaglandines chez les animaux (Farmer *et coll.*, 2003). L'étude des oxylipines étendue à d'autres types d'organismes tels que les macroalgues est également essentielle pour l'acquisition d'une vue générale sur le métabolisme des oxylipines et leur fonction dans l'arbre du vivant.

Au-delà des dérivés lipidiques, il est connu que les plantes sont capables de synthétiser une extraordinaire variété de composés dont nombre d'entre eux sont impliqués dans des réponses de défense. La stimulation du métabolisme secondaire des plantes à partir de suspensions cellulaires est parfois la seule façon d'obtenir une quantité satisfaisante de ces produits à haute valeur ajoutée, trouvant des débouchés dans les domaines pharmaceutiques, alimentaires et industriels (Zhao *et coll.*, 2005). Le nombre de produits naturels retrouvés dans les plantes est estimé entre plusieurs centaines ou plusieurs milliers, mais seule une fraction a été entièrement caractérisée (La Camera *et coll.*, 2004). Malgré l'importance de ces composés dans le métabolisme végétal et leur impact sur la santé humaine, notre connaissance sur leurs voies de biosynthèse et leurs rôles, reste fragmentaire. Ce potentiel de composés d'intérêts est également présent chez les macroalgues ou pourtant ce métabolisme reste encore largement inexploré.

Parmi les molécules d'importance contenues dans les plantes, certaines d'entre elles sont issues de la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes. Elles ont des propriétés anti-

microbiennes, anti-oxydantes, vasodilatatrices, anti-inflammatoires ou encore un rôle dans la prévention de développements cancéreux (La Camera et coll., 2004). Si certaines activités enzymatiques typiques de cette voie métabolique ont été mises en évidence chez *C. crispus*, les produits libérés restent inconnus.

Certains métabolites d'intérêts sont, comme évoqué précédemment, utilisés en tant qu'éliciteurs naturels des voies de défense chez les plantes pour la protection des cultures. C'est le cas également de la laminarine, le glucane de réserve des algues brunes, de structure similaire à celle d'éliciteurs glucaniques fongiques, et capable de stimuler les défenses des plantes, les protégeant ainsi des infections. Cette nouvelle voie de protection est intéressante car elle exploite la possibilité d'utiliser des substances élicitrices d'origines naturelles, qui sont généralement des composés relativement simples, non coûteux et non toxiques. Elle offre la possibilité de lutter contre des maladies bactériennes ou virales contre lesquelles nous disposons de peu de moyens de protection, tout en combinant un large spectre d'action, un effet systémique ainsi qu'une action de type multi-sites, non-spécifique et donc durable (Lateur, 2002). De plus ces éliciteurs ne devraient pas être sujets à générer des résistances chez les pathogènes, contrairement aux produits fongicides systémiques. De part leur nature, ces produits devraient pouvoir être agrémentés plus rapidement que les produits pesticides classiques. En outre leurs utilisations offrent la possibilité de limiter l'emploi de traitements pesticides traditionnels, en faveur de produits non toxiques et au coût amoindri. Leur agrémentation devrait pouvoir en être facilitée. Enfin un aspect essentiel qui devrait intensifier leur utilisation est leur meilleure acceptation par les agriculteurs et l'opinion publique par rapport aux produits pesticides classiques, ces derniers étant souvent accusés d'être rapidement contrés par les pathogènes, tout en conservant une forte rémanence dans leur environnement (Gozzo, 2003).

3) Outils génomiques, protéomiques, métabolomiques

Les banques EST ont été un précieux outil pour identifier des gènes d'intérêt chez *C. crispus*. Certains d'entre eux ont été présentés au cours de ce manuscrit. Les gènes de glutathion S-transférases font partie des gènes les plus moyennement à fortement exprimés dans le protoplaste : les séquences *CcGST1* et *CcGST2* sont constituées d'un nombre

importants d'EST (respectivement 41 et 12 EST), la séquence *CcGST7* est divergente par rapport aux deux premières et constituée d'un nombre plus restreint d'EST (2 EST). Deux autres séquences codent potentiellement des glutathion S-transférases dans la banque EST de protoplastes, et appartiendraient toutes deux à la famille désormais nommée MAPEG (*membrane-associated proteins in eicosanoid ans glutathione metabolism*). Ces enzymes microsomales sont généralement impliquées dans le métabolisme des éicosanoïdes, avec des rôles dans la synthèse du leucotriène C4 (*leukotriene C4 synthase*, LTC₄S), dans l'activation des activités 5-lipoxygénases (*5-lipoxygenase activating protein*, FLAP), dans la synthèse de la prostaglandine E2 (*prostaglandin E2 synthase 1*, PGES1) et également dans la réduction du 5-HpETE (Hayes *et coll.*, 2005). Les deux séquences identifiées chez *C. crispus* sont incomplètes en N-terminal avec 490 et 677 pb pour respectivement des cadres ouverts de lecture de 140 et 137 acides aminés. Compte tenu de l'importance du métabolisme lipidique chez *C. crispus*, il est très probable que ces enzymes jouent un rôle dans la biosynthèse d'éicosanoïdes dans l'algue. L'obtention des séquences complètes serait une information intéressante, pouvant nous apporter des indices sur leur fonction. En effet la division de cette famille suivant les similitudes de séquences en quatre sous-groupes, reflète des spécificités fonctionnelles.

Avec le développement de la génomique fonctionnelle, de la protéomique et de la métabolomique, des outils nouveaux et performants peuvent être appliqués à l'étude du métabolisme secondaire chez les plantes, et améliorer notre compréhension globale des processus impliqués (Zhao *et coll.*, 2005). De tels outils, actuellement maîtrisés chez les plantes supérieures, sont en voie de développement chez les macroalgues.

L'analyse de profils transcriptionnels au cours de différents traitements peut nous apporter des informations sur la régulation différentielle de gènes impliqués dans le métabolisme secondaire. Les banques d'EST et les puces à ADN sont des outils performants pour une telle approche. En dehors des EST de *C. crispus*, citons également le cas de l'algue brune *Ectocarpus siliculosus* pour laquelle nous disposons pour le moment d'environ 26 000 EST au laboratoire, et dont le génome est également en cours de séquençage au Génoscope. L'analyse de ces banques a montré la présence d'un gène d'AOS chez l'algue brune, enzyme participant à la synthèse du méthyle jasmonate chez les plantes (Cock, non publié). Un tel gène n'a jusqu'à présent pas été mis en évidence chez *C. crispus* et les enzymes conduisant à la biosynthèse de cyclopenté(a)nonés dont le méthyle jasmonate restent inconnues.

Des puces à ADN à partir de gamétophytes de *C. crispus*, ont également été réalisées au laboratoire par Jonas Collén (*Collén et coll., en préparation*). Sur les puces ainsi produites, 1 920 ADNc issus des banques d'EST ont été déposés ; ils représentent 1 205 gènes uniques. Les premières analyses ont montré que 6 % des gènes étudiés voyaient leurs profils d'expression modifiés au cours d'un traitement par le méthyle jasmonate. Parmi les gènes induits, les glutathion S-transférases sont retrouvées, mais également les protéines Heat Shock, des métallohydrolases et phycocyanin lyases. Certains gènes sont également réprimés comme ceux codant des glucose kinases et des phosphoglucose isomérases. De nombreux gènes de fonction inconnue sont également induits ou réprimés. Une analyse plus approfondie de ces résultats pourrait nous permettre de réaliser des groupes de gènes ayant des profils d'expression identiques. A défaut de pouvoir assigner une fonction à tous ces gènes, une telle démarche pourrait nous permettre d'avoir une vue *a priori* sur leur régulation au cours du traitement, et de les comparer à des profils similaires de gènes dont la fonction est déjà assignée. Le développement de ces outils, combiné à des analyses de bioinformatique, nous offre désormais des points de départ précieux pour étudier de façon ciblée la localisation, la régulation et la fonction de métabolites spécifiques (*Howe et Schillmiller, 2002*).

Le séquençage de génomes entiers nous permet d'avoir également accès aux séquences d'enzymes difficiles à isoler par des analyses biochimiques, présentes en faible abondance dans l'organisme, instables, ou liées aux membranes. La recherche de gènes candidats est alors facilitée à bien des égards. Le génome d'*E. siliculosus* est en cours de séquençage, et nous espérons dans l'avenir pouvoir avoir également accès au génome d'une macroalgue rouge telle que *C. crispus*. Si un tel projet est réalisé, il nous permettra d'avoir accès aux gènes des enzymes dont les activités sont détectées chez ce modèle et pour lesquelles nous n'avons encore isolé aucun candidat, et notamment les enzymes potentiellement impliquées dans la voie de type 13-lipoxygénase, d'importance chez l'algue.

4) Eliciteurs et reconnaissance

L'algue rouge *C. crispus* est un modèle particulièrement intéressant en soi car les deux phases du cycle de vie ont des comportements très différents suite à des élicitations où à l'attaque du pathogène *A. operculata*, aboutissant à l'activation de réactions de défense et à la résistance, ou à l'infection, selon la phase considérée. Des différences pariétales et dans le métabolisme de défense sont connues entre le sporophyte et les gamétophytes femelles. Les mécanismes de reconnaissance et de transduction des signaux sont sans doute très différents, malgré une composition génétique très similaire. Comprendre comment ces différences peuvent être régulées au niveau des génomes et/ou au-delà reste énigmatique. De même les données concernant les gamétophytes mâles sont inexistantes ; leur faible représentativité dans leur milieu naturel est reliée à ce constat.

Plusieurs éliciteurs d'origines biotique ou abiotique ont été identifiés chez les gamétophytes de *C. crispus*. Le cas d'*A. operculata* et les raisons de la perte du signal inducteur du burst oxydatif chez l'hôte restent obscures. Si bien des pistes ont été explorées pour essayer de l'expliquer, elles sont restées vaines. Malgré tout je reste persuadée que cette explication existe, même si elle nécessite un investissement certain en temps et en énergie pour être mise à jour. Elle passe sans doute par une meilleure connaissance du cycle de vie, recréé au laboratoire, d'*A. operculata*. La molécule élicitrice reconnue par les gamétophytes de *C. crispus* n'est peut-être présente qu'au moment de la sporulation. De même les variabilités saisonnières ont un impact sur les populations de l'algue rouge qui peuvent peut être expliquer une variabilité dans cette réponse au cours des premiers tests réalisés.

L'utilisation d'éliciteurs de type abiotiques nous a permis de nous affranchir des variabilités de réponse, tout en nous permettant d'induire et donc d'étudier un nombre plus limité de réponses. Une fois de telles molécules clairement établies, leur utilisation est tout aussi pertinente et efficace pour analyser les voies métaboliques stimulées. Il est désormais reconnu que les éliciteurs biotiques, tels que l'agression par un herbivore ou un pathogène, et les éliciteurs abiotiques tels que les métaux lourds et les composés inorganiques, au même titre que les stress salins et osmotiques, induisent souvent la synthèse et l'accumulation des mêmes métabolites secondaires de défense (Zhao *et coll.*, 2005). Si

nous avons ces dernières années concentré nos efforts sur l'étude de l'effet du méthyle jasmonate ou des oxylipines sur le métabolisme de défense de *C. crispus*, des études biochimiques sont à réaliser pour compléter les données moléculaires des éliciteurs nouvellement identifiés. Aucun de ces nouveaux composés, induisant fortement l'expression des gènes *Ccrboh* ou *CcGST*, n'induit un burst oxydatif chez *C. crispus* (Audrey Cosse, communication personnelle), mais leurs effets sur les activités haloperoxydases, shikimate déshydrogénase, phénylalanine ammonia-lyase ou sur le métabolisme oxydatif des acides gras restent inconnus. Les cas de l'atrazine, du métolachlor et du dichlorvos sont à considérer en premier lieu car ils induisent déjà fortement les gènes de glutathion S-transférases. Disposer d'une batterie de molécules induisant des réponses de défense différentes dans l'algue pourrait constituer un outil utile pour une meilleure analyse de ces réponses.

Trois intérêts majeurs résident dans l'utilisation de tels éliciteurs : ils nous permettent d'étudier les défenses mises en place dans l'algue suite à un stress abiotique défini (nous assurant par la même la reproductibilité des résultats), ces études peuvent aboutir à l'identification de métabolites d'intérêt nouvellement synthétisés, et dans certains cas à la mise en évidence d'enzymes impliquées dans des métabolismes endogènes et d'activités inédites.

5) Transduction du signal

La première idée forte qui ressort de ces analyses est l'extrême complexité des systèmes de défense chez les plantes, et *a fortiori* chez les macroalgues. Il est difficile d'envisager étudier les processus de défense chez un organisme de façon linéaire, en analysant séparément chaque voie impliquée. En effet les interactions sont multiples entre ces voies et cette complexité rend la défense possible. De fait, elle rend également d'autant plus ardue son analyse dans sa globalité.

Une deuxième idée frappante est celle de la grande similitude des systèmes de transduction des signaux chez les animaux, les plantes supérieures et visiblement chez les macroalgues. En effet les séquences d'évènements suivant la perception d'un éliciteur ou d'un pathogène sont extrêmement similaires chez les plantes supérieures et les animaux, et

dans certains cas ces observations ont également été faites chez les algues : phosphorylation et déphosphorylation de protéines, influx calciques, dépolarisation membranaire, reflux de chlore Cl^- et potassium K^+ , flux de protons H^+ , alcalinisation extracellulaire et acidification cytoplasmique, production de FAO, expression précoce de gènes de défense, production et accumulation de métabolites secondaires. Malgré l'éloignement phylogénétique de tous ces organismes, force est de constater qu'ils possèdent malgré tout de nombreux points communs. Les enzymes impliquées peuvent être très différentes, ou homologues mais mettre en oeuvre des systèmes de régulation différents. On peut s'interroger sur la convergence des systèmes de transduction des signaux vers un résultat commun.

Néanmoins les macroalgues possèdent une différence de taille par rapport aux plantes supérieures et aux animaux : l'absence de tout système conducteur (respectivement phloème, xylème et vaisseaux) permettant de véhiculer des signaux rapidement vers des zones éloignées de leur lieu de production. Il n'est pas dit que l'absence de ces structures chez les algues les prive d'une telle capacité. En effet il est tout à fait possible qu'elles aient su au cours de l'évolution tirer parti de leur milieu environnant, le milieu marin constituant l'un des meilleur véhiculant de métabolites hydrophiles. Des études ont abordées ce point et ont confirmé le relargage par des algues attaquées, de composés stimulants la mise en place de réactions de défense chez les algues voisines (Toth et Pavia, 2000). Il s'agit peut-être là d'un système tout aussi efficace dans la protection et à moindre coût énergétique pour l'organisme, le transport des métabolites étant assuré par l'élément extérieur.

6) Immunité innée

Tout comme les animaux, les plantes supérieures ont acquis la capacité de se défendre contre des pathogènes infectieux. Les similitudes vont sans doute au-delà des réponses impliquées, vers l'existence chez les plantes d'une immunité innée, qui possède des différences évidentes mais des similitudes toutes aussi frappantes avec les mécanismes de l'immunité innée bien décrits chez les animaux.

Comme dans le cas de l'activation de l'immunité innée chez les animaux, la mise en place de la résistance systémique acquise chez les plantes supérieures, aboutit à la

protection de la plante entière. En revanche les réponses sont généralement plus faibles en dehors des zones d'infection ; on assiste par exemple à la production de ce que l'on nomme des « micro-bursts », qui sont des bursts oxydatifs d'intensité moindre que ceux observés au niveau du lieu d'infection. Seul un nombre limité de réponses de défense est donc activé en dehors de ce lieu, et elles sont de plus faible intensité par rapport aux réponses locales. Cela permet en réalité à la plante de se maintenir en « état de veille » dans le cas d'attaques ultérieures, tout en minimisant son coût énergétique.

En revanche le processus de résistance chez la plante met en jeu des réponses de défense très spécifiques à cette lignée. Chez les mammifères l'immunité repose notamment sur des cellules spécialisées dans la destruction des pathogènes (cellules phagocytaires) et sur des molécules capables de reconnaître spécifiquement des molécules de surface du pathogène (anticorps). Les plantes quant à elles vont produire une grande diversité de métabolites qui vont permettre la protection, soit directement grâce à leurs propriétés antimicrobiennes, soit de part leur capacité à stimuler des processus de défense (acide salicylique, éthylène, acide jasmonique). Ces activations et production de métabolites vont permettre de protéger la plante contre des attaques ultérieures, qui peut s'inscrire dans la durée (quelques semaines à quelques mois) tout en n'étant pas définitive. Par ailleurs lorsque la plante met en place un processus de résistance, elle se protège ainsi contre un large spectre de micro-organismes, et pas uniquement contre le micro-organisme spécifiquement incriminé.

Tout comme chez les animaux, une réaction extrême de défense chez les plantes supérieures va être l'induction de la mort cellulaire au cours de réactions hypersensibles, pouvant aboutir à des nécroses ; un phénomène qui rappelle l'apoptose chez les cellules de mammifères. Une telle réponse chez ces organismes a pour but de priver les agents pathogènes de tout accès aux nutriments, de limiter leur propagation en les cloisonnant dans des cellules destinées à mourir, tout en émettant des signaux induisant des réponses de défense dans les cellules environnantes. Il est intéressant de constater que chez ces différentes lignées multicellulaires, les êtres vivants sacrifient en dernier recours une partie de leurs cellules au cours d'un processus infectieux, au profit de la survie de l'organisme entier.

Si les plantes ne disposent pas de gènes ayant une structure en mosaïque aboutissant à la production d'anticorps chez les animaux, dans le cas de résistances spécifiques, l'information de reconnaissance du pathogène est malgré tout contenue dans le génome. La plante possède en effet, dans le cas de réactions incompatibles suivant le

modèle gène-à-gène, un gène codant un récepteur *R* spécifique du produit d'avirulence *avr* de l'agent infectieux. Ainsi ce dernier contient lui-même l'information qui va conduire à sa propre perte. Si des interactions directes entre les protéines *R* et *avr* ont été démontrées chez certains modèles, la situation semble être plus complexe dans de nombreuses interactions plante/pathogène. Les protéines *avr* agiraient alors comme des facteurs de virulence, stimulant par leur action la protéine *R* en tant que complexe de perception, ayant une fonction signalitique dans la plante (Nurnberger *et coll.*, 2004). Les phénomènes de l'immunité ont largement été étudiés chez les mammifères et les insectes. Si les mécanismes signalitiques initiés au cours des interactions plante/pathogène commencent tout juste à être identifiés, des avancées significatives ont été faites ces dernières années sur les principes moléculaires de la résistance des plantes aux maladies, et semblent très proches de ceux déjà identifiés chez les animaux. Ainsi les motifs structuraux prédominants de type LRR (*Leucine Rich Repeats*) des protéines *R* chez les plantes rappellent de façon assez intrigante, l'architecture des récepteurs TLR (*Toll-like receptor*) interagissant avec des molécules PAMP (*pathogen-associated molecular patterns*) dérivés de pathogènes chez les mammifères, et qui ont la capacité d'activer la reconnaissance et de stimuler l'immunité (Cohn *et coll.*, 2001 ; Nurnberger *et coll.*, 2004). Les similitudes frappantes entre les différentes lignées suggèrent que l'immunité innée est sans doute issue d'un système ancien de défense qui a perduré au cours de l'évolution et dont certains traits caractéristiques de reconnaissance ont été conservés chez ces différents organismes.

Certains traits caractéristiques de l'immunité sont conservés chez les algues marines. Le fait que des mécanismes basiques de reconnaissance de pathogènes et de signalisation, soient communs aux algues marines, aux plantes terrestres et aux animaux, suggère que l'apparition de ces fonctions cellulaires essentielles a eut lieu dans le milieu marin. En revanche certaines propriétés sont également spécifiques des lignées incriminées ou issues d'adaptations environnementales. L'étude à différents niveaux biologiques (moléculaire, cellulaire et entre individus) des réponses mises en place par les algues marines, pour lutter contre des infections ou des attaques, est certainement nécessaire à la détermination des règles spécifiques gouvernant les interactions biotiques des végétaux dans l'environnement marin, et au-delà permettra sans doute d'apporter des réponses à des questions d'ordre plus général sur la façon dont l'immunité a évolué chez les eucaryotes (Potin *et coll.*, 2002).

Bibliographie

Bibliographie

Bibliographie

Bibliographie

Bibliographie

BIBLIOGRAPHIE

- Amicucci E, Gaschler K, Ward JM** (1999) NADPH oxidase genes from tomato (*Lycopersicon esculentum*) and curly-leaf pondweed (*Potamogeton crispus*). *Plant Biology* **1**: 524-528
- Apel K, Hirt H** (2004) Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu Rev Plant Biol* **55**: 373-399
- Armbrust EV, Berges JA, Bowler C, Green BR, Martinez D, Putnam NH, Zhou S, Allen AE, Apt KE, Bechner M, Brzezinski MA, Chaal BK, Chiovitti A, Davis AK, Demarest MS, Detter JC, Glavina T, Goodstein D, Hadi MZ, Hellsten U, Hildebrand M, Jenkins BD, Jurka J, Kapitonov VV, Kroger N, Lau WW, Lane TW, Larimer FW, Lippmeier JC, Lucas S, Medina M, Montsant A, Obornik M, Parker MS, Palenik B, Pazour GJ, Richardson PM, Rynearson TA, Saito MA, Schwartz DC, Thamatrakoln K, Valentin K, Vardi A, Wilkerson FP, Rokhsar DS** (2004) The genome of the diatom *Thalassiosira pseudonana*: ecology, evolution, and metabolism. *Science* **306**: 79-86
- Armstrong RN** (1997) Structure, catalytic mechanism, and evolution of the glutathione transferases. *Chem Res Toxicol* **10**: 2-18
- Arnhold J** (2004) Properties, functions, and secretion of human myeloperoxidase. *Biochemistry (Mosc)* **69**: 4-9
- Asamizu E, Nakajima M, Kitade Y, Saga N, Nakamura Y, Tabata S** (2003) Comparison of RNA Expression Profiles between the Two Generations of *Porphyra yezoensis* (Rhodophyta), Based on Expressed Sequence Tag Frequency Analysis. *J Phycol* **39**: 923-930
- Asamizu E, Nakamura Y, Sato S, Fukuzawa H, Tabata S** (1999) A large scale structural analysis of cDNAs in a unicellular green alga, *Chlamydomonas reinhardtii*. I. Generation of 3433 non-redundant expressed sequence tags. *DNA Res* **6**: 369-373
- Bacot S** (2004) Caractérisation d'un nouvel aldéhyde d'origine plaquettaire (4-hydroxydodecadiénal) et formation d'adduits de Michael avec les phospholipides à éthanolamine. Doctorat Biochimie. Ecole Doctorale Interdisciplinaire Sciences-Santé, Lyon
- Baker CJ, Orlandi EW** (1995) Active Oxygen in Plant Pathogenesis. *Annu Rev Phytopathol* **33**: 299-321
- Baldauf SL** (2003) The Deep Roots of Eukaryotes. *Science* **300**: 1703-1706
- Banfi B, Molnar G, Maturana A, Steger K, Hegedus B, Demaurex N, Krause KH** (2001) A Ca²⁺-activated NADPH oxidase in testis, spleen, and lymph nodes. *J Biol Chem* **276**: 37594-37601

- Bellamine A, Mangla AT, Dennis AL, Nes WD, Waterman MR** (2001) Structural requirements for substrate recognition of *Mycobacterium tuberculosis* 14 α -demethylase: implications for sterol biosynthesis. *J. Lipid Res.* **42**: 128-136
- Blee E** (2002) Impact of phyto-oxylipins in plant defense. *Trends Plant Sci* **7**: 315-322
- Blokhina O, Virolainen E, Fagerstedt KV** (2003) Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Ann Bot (Lond)* **91 Spec No**: 179-194
- Bokoch GM, Knaus UG** (2003) NADPH oxidases: not just for leukocytes anymore! *Trends Biochem Sci* **28**: 502-508
- Bouarab K** (2000) Bases biochimiques et cellulaires des interactions plante-pathogène dans le système *Chondrus crispus* *Acrochaete operculata*. Doctorat Océanologie Biologique et Environnement Marin. Université Paris VI, Paris VI
- Bouarab K, Adas F, Gaquerel E, Kloareg B, Salaun JP, 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
- Boyen C** (2001) Origin and evolution of plastids and mitochondria: the phylogenetic diversity of algae. *Cah. Biol. Mar.* **42**: 11-24
- Bradford M** (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **7**: 248-254
- Brigelius-Flohe R, Aumann KD, Blocker H, Gross G, Kiess M, Kloppel KD, Maiorino M, Roveri A, Schuckelt R, Usani F, et al.** (1994) Phospholipid-hydroperoxide glutathione peroxidase. Genomic DNA, cDNA, and deduced amino acid sequence. *J Biol Chem* **269**: 7342-7348
- 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*. *Biochem J* **368**: 589-595
- Charrier B, Champion A, Henry Y, Kreis M** (2002) Expression profiling of the whole *Arabidopsis* shaggy-like kinase multigene family by real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Plant Physiol* **130**: 577-590
- Chen JW, Dodia C, Feinstein SI, Jain MK, Fisher AB** (2000) 1-Cys peroxiredoxin, a bifunctional enzyme with glutathione peroxidase and phospholipase A₂ activities. *J Biol Chem* **275**: 28421-28427
- Cheng G, Cao Z, Xu X, van Meir EG, Lambeth JD** (2001) Homologs of gp91 $phox$: cloning and tissue expression of Nox3, Nox4, and Nox5. *Gene* **269**: 131-140

- Cheong JJ, Choi YD** (2003) Methyl jasmonate as a vital substance in plants. *Trends Genet* **19**: 409-413
- Choi HJ, Kang SW, Yang CH, Rhee SG, Ryu SE** (1998) Crystal structure of a novel human peroxidase enzyme at 2.0 Å resolution. *Nat Struct Biol* **5**: 400-406
- Coelho SM, Taylor AR, Ryan KP, Sousa-Pinto I, Brown MT, Brownlee C** (2002) Spatiotemporal patterning of reactive oxygen production and Ca²⁺ wave propagation in fucus rhizoid cells. *Plant Cell* **14**: 2369-2381
- Cohen CK, Garvin DF, Kochian LV** (2004) Kinetic properties of a micronutrient transporter from *Pisum sativum* indicate a primary function in Fe uptake from the soil. *Planta* **218**: 784-792
- Cohn J, Sessa G, Martin GB** (2001) Innate immunity in plants. *Curr Opin Immunol* **13**: 55-62
- Colin C** (2004) Caractérisation biochimique et moléculaire des haloperoxydases dépendantes du vanadate chez l'algue brune *Laminaria digitata*. Doctorat Océanologie Biologique. Université Paris VI, Paris VI
- Colin C, Leblanc C, Michel G, Wagner E, Leize-Wagner E, Van Dorselaer A, Potin P** (2005) Vanadium-dependent iodoperoxydases in *Laminaria digitata*, a novel biochemical function diverging from brown algal bromoperoxydases. *J Biol Inorg Chem* **10**: 156-166
- Colin C, Leblanc C, Wagner E, Delage L, Leize-Wagner E, Van Dorselaer A, Kloareg B, Potin P** (2003) The brown algal kelp *Laminaria digitata* features distinct bromoperoxydase and iodoperoxydase activities. *J Biol Chem* **278**: 23545-23552
- Collén J, Hervé C, Guisle-Marsollier I, Leger J, Boyen C** Expression profiling of *Chondrus crispus* (Rhodophyceae) after exposure to methyl jasmonate. *in preparation*
- 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*: *in Press*
- Conesa A, Punt PJ, van den Hondel CA** (2002) Fungal peroxidases: molecular aspects and applications. *J Biotechnol* **93**: 143-158
- Correa JA, Nielsen R, Grund DW** (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
- Cosse A** (2003) Clonage et caractérisation biochimique d'halopéroxydases chez l'algue rouge *Chondrus crispus*. DEA Interactions Plantes-Microorganismes. Institut National Agronomique Paris-Grignon, Paris

- Crepineau F, Roscoe T, Kaas R, Kloareg B, Boyen C** (2000) Characterisation of complementary DNAs from the expressed sequence tag analysis of life cycle stages of *Laminaria digitata* (Phaeophyceae). *Plant Mol Biol* **43**: 503-513
- Cross AR** (2000) p40^{phox} Participates in the activation of NADPH oxidase by increasing the affinity of p47^{phox} for flavocytochrome b₅₅₈. *Biochem J* **349**: 113-117
- Defranco P** (2005) Etude des glutathion S-transférases chez l'algue brune *Laminaria digitata*. Master Sciences du végétal. Université Paris-Sud, Paris
- DeRidder BP, Dixon DP, Beussman DJ, Edwards R, Goldsbrough PB** (2002) Induction of glutathione S-transferases in Arabidopsis by herbicide safeners. *Plant Physiol* **130**: 1497-1505
- Desikan R, Burnett EC, Hancock JT, Neill S** (1998) Harpin and hydrogen peroxide induce the expression of a homologue of gp91^{phox} in *Arabidopsis thaliana* suspension cultures. *J Exp Bot* **49**: 1767-1771
- Desikan R, Hancock JT, Coffey MJ, Neill SJ** (1996) Generation of active oxygen in elicited cells of *Arabidopsis thaliana* is mediated by a NADPH oxidase-like enzyme. *FEBS Lett* **382**: 213-217
- Dietz KJ, Horling F, König J, Baier M** (2002) The function of the chloroplast 2-cysteine peroxiredoxin in peroxide detoxification and its regulation. *J Exp Bot* **53**: 1321-1329
- Dixon DP, Laphorn A, Edwards R** (2002) Plant glutathione transferases. *Genome Biol* **3**: REVIEWS3004
- Doke N** (1983) Generation of superoxide anion by potato tuber protoplasts during the hypersensitive response to hyphal wall components of *Phytophthora infestans* and specific inhibition of the reaction by suppressors of hypersensitivity. *Physiological Plant Pathology* **23**: 359-367
- Doke N, Miura Y, Sanchez LM, Park HJ, Noritake T, Yoshioka H, Kawakita K** (1996) The oxidative burst protects plants against pathogen attack: mechanism and role as an emergency signal for plant bio-defence - a review. *Gene* **179**: 45-51
- Durrant WE, Dong X** (2004) Systemic acquired resistance. *Annu Rev Phytopathol* **42**: 185-209
- Edens WA, Sharling L, Cheng G, Shapira R, Kinkade JM, Lee T, Edens HA, Tang X, Sullards C, Flaherty DB, Benian GM, Lambeth JD** (2001) Tyrosine cross-linking of extracellular matrix is catalyzed by Duox, a multidomain oxidase/peroxidase with homology to the phagocyte oxidase subunit gp91^{phox}. *J Cell Biol* **154**: 879-891
- Edgar RC** (2004) MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucl. Acids Res.* **32**: 1792-1797

- Farmer EE, Almeras E, Krishnamurthy V** (2003) Jasmonates and related oxylipins in plant responses to pathogenesis and herbivory. *Curr Opin Plant Biol* **6**: 372-378
- Farmer EE, Weber H, Vollenweider S** (1998) Fatty acid signaling in Arabidopsis. *Planta* **206**: 167-174
- Fiedler TJ, Davey CA, Fenna RE** (2000) X-ray crystal structure and characterization of halide-binding sites of human myeloperoxidase at 1.8 Å resolution. *J Biol Chem* **275**: 11964-11971
- Finegold AA, Shatwell KP, Segal AW, Klausner RD, Dancis A** (1996) Intramembrane bis-heme motif for transmembrane electron transport conserved in a yeast iron reductase and the human NADPH oxidase. *J Biol Chem* **271**: 31021-31024
- Fujii S, Yamamoto R, Miyamoto R, Ueda J** (1997) Occurrence of jasmonic acid in *Dunaliella* (Dunielales, Chlorophyta). *Phycol Res* **45**: 223-226
- Funk CD** (2001) Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. *Science* **294**: 1871-1875
- Furtmuller PG, Zederbauer M, Jantschko W, Helm J, Bogner M, Jakopitsch C, Obinger C** (2006) Active site structure and catalytic mechanisms of human peroxidases. *Arch Biochem Biophys* **445**: 199-213
- Galtier N, Gouy M, C. G** (1996) SEAVIEW and PHYLO_WIN: two graphic tools for sequence alignment and molecular phylogeny. *Comput Appl Biosci* **12**: 543-548
- Gaquerel E, Hervé C, Boyen C, Potin P, Salaun JP** Evidence for oxylipin synthesis and induction of a new polyunsaturated fatty acid hydroxylase activity in *Chondrus crispus* during the early response to methyljasmonate. *submitted*
- Gaquerel E** (2005) Bases biochimiques de l'immunité innée de l'algue rouge *Chondrus crispus* : caractérisation et rôle des oxylipines dans les mécanismes précoces de défense. Doctorat de Biologie et Santé. Université de Bretagne Occidentale, Brest
- Gerwick WH, Roberts MA, Vulpanovici A, Ballantine DL** (1999) Biogenesis and biological function of marine algal oxylipins. *Adv Exp Med Biol* **447**: 211-218
- 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. *Eur J Biochem* **269**: 5512-5521
- Gouet P, Courcelle E, Stuart DI, Metoz F** (1999) ESPript: analysis of multiple sequence alignments in PostScript. *Bioinformatics* **15**: 305-308
- Gozzo F** (2003) Systemic acquired resistance in crop protection: from nature to a chemical approach. *J Agric Food Chem* **51**: 4487-4503

- Groom QJ, Torres MA, Fordham-Skelton AP, Hammond-Kosack KE, Robinson NJ, Jones JD** (1996) *rbohA*, a rice homologue of the mammalian *gp91phox* respiratory burst oxidase gene. *Plant J* **10**: 515-522
- Grotz N, Guerinot ML** (2002) Limiting nutrients: an old problem with new solutions? *Curr Opin Plant Biol* **5**: 158-163
- Grun S, Lindermayr C, Sell S, Durner J** (2006) Nitric oxide and gene regulation in plants. *J Exp Bot* **57**: 507-516
- Guex N, Peitsch M** (1997) SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis* **18**: 2714-2723
- Guindon S, Lethiec F, Duroux P, Gascuel O** (2005) PHYML Online--a web server for fast maximum likelihood-based phylogenetic inference. *Nucl. Acids Res.* **33**: W557-559
- Hayes JD, Flanagan JU, Jowsey IR** (2005) Glutathione transferases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **45**: 51-88
- Hayes JD, McLellan LI** (1999) Glutathione and glutathione-dependent enzymes represent a co-ordinately regulated defence against oxidative stress. *Free Radic Res* **31**: 273-300
- Heil M, Bostock RM** (2002) Induced systemic resistance (ISR) against pathogens in the context of induced plant defences. *Ann Bot (Lond)* **89**: 503-512
- Hervé C, Tonon T, Collén J, Corre E, Boyen C** (2006) NADPH oxidases in Eukaryotes: red algae provide new hints! *Current Genetics: in Press*
- Howe GA, Schillmiller AL** (2002) Oxylin metabolism in response to stress. *Curr Opin Plant Biol* **5**: 230-236
- Isupov MN, Dalby AR, Brindley AA, Izumi Y, Tanabe T, Murshudov GN, Littlechild JA** (2000) Crystal structure of dodecameric vanadium-dependent bromoperoxidase from the red algae *Corallina officinalis*. *Journal of Molecular Biology* **299**: 1035-1049
- Jowsey IR, Thomson AM, Flanagan JU, Murdock PR, Moore GB, 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 D2 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
- Katoh K, Misawa K, Kuma K, Miyata T** (2002) MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Res* **30**: 3059-3066

- Keller T, Damude HG, Werner D, Doerner P, Dixon RA, Lamb C** (1998) A plant homolog of the neutrophil NADPH oxidase gp91^{phox} subunit gene encodes a plasma membrane protein with Ca²⁺ binding motifs. *Plant Cell* **10**: 255-266
- Klarzynski O, Fritig B** (2001) Stimulation des défenses naturelles des plantes. *C R Acad Sci III* **324**: 953-963
- Knoops B, Clippe A, Bogard C, Aarsalane K, Wattiez R, Hermans C, Duconseille E, Falmagne P, Bernard A** (1999) Cloning and characterization of AOEB166, a novel mammalian antioxidant enzyme of the peroxiredoxin family. *J Biol Chem* **274**: 30451-30458
- 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
- Krupina M, Dathe W** (1991) Occurrence of jasmonic acid in the red alga *Gelidium latifolium*. *Z Naturforsch [C]* **46**: 1127-1129
- Kupper 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
- Kupper 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. *J Chem Ecol* **28**: 2057-2081
- Kyte J, Doolittle RF** (1982) A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J Mol Biol* **157**: 105-132
- La Camera S, Gouzerh G, Dhondt S, Hoffmann L, Fritig B, Legrand M, Heitz T** (2004) Metabolic reprogramming in plant innate immunity: the contributions of phenylpropanoid and oxylipin pathways. *Immunol Rev* **198**: 267-284
- Lalucque H, Silar P** (2003) NADPH oxidase: an enzyme for multicellularity? *Trends Microbiol* **11**: 9-12
- Lamb C, Dixon RA** (1997) The Oxidative Burst in Plant Disease Resistance. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **48**: 251-275
- Lateur M** (2002) Perspectives de lutte contre les maladies des arbres fruitiers à pépins au moyen de substances naturelles inductrices d'une résistance systémique. *Biotechnol Agron Soc Environ* **6**: 67-77
- Lepesheva GI, Waterman MR** (2004) CYP51--the omnipotent P450. *Mol Cell Endocrinol* **215**: 165-170
- Leusen JH, Verhoeven AJ, Roos D** (1996) Interactions between the components of the human NADPH oxidase: a review about the intrigues in the *phox* family. *Front Biosci* **1**: d72-90

- Liu QY, Reith ME** (1994) Isolation of a gametophyte-specific cDNA encoding a lipoxygenase from the red alga *Porphyra purpurea*. *Mol Mar Biol Biotechnol* **3**: 206-209
- Mahadev K, Motoshima H, Wu X, Ruddy JM, Arnold RS, Cheng G, Lambeth JD, Goldstein BJ** (2004) The NAD(P)H oxidase homolog Nox4 modulates insulin-stimulated generation of H₂O₂ and plays an integral role in insulin signal transduction. *Mol Cell Biol* **24**: 1844-1854
- Maheswari U, Montsant A, Goll J, Krishnasamy S, Rajyashri KR, Patell VM, Bowler C** (2005) The Diatom EST Database. *Nucleic Acids Res* **33**: D344-347
- Marco A, Cuesta A, Pedrola L, Palau F, 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
- 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
- Matsuzaki M, Misumi O, Shin IT, Maruyama S, Takahara M, Miyagishima SY, Mori T, Nishida K, Yagisawa F, Yoshida Y, Nishimura Y, Nakao S, Kobayashi T, Momoyama Y, Higashiyama T, Minoda A, Sano M, Nomoto H, Oishi K, Hayashi H, Ohta F, Nishizaka S, Haga S, Miura S, Morishita T, Kabeya Y, Terasawa K, Suzuki Y, Ishii Y, Asakawa S, Takano H, Ohta N, Kuroiwa H, Tanaka K, Shimizu N, Sugano S, Sato N, Nozaki H, Ogasawara N, Kohara Y, Kuroiwa T** (2004) Genome sequence of the ultrasmall unicellular red alga *Cyanidioschyzon merolae* 10D. *Nature* **428**: 653-657
- Mehdy MC** (1994) Active Oxygen Species in Plant Defense against Pathogens. *Plant Physiol* **105**: 467-472
- Messerschmidt A, Wever R** (1996) X-ray structure of a vanadium-containing enzyme: chloroperoxidase from the fungus *Curvularia inaequalis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 392-396
- Moons A** (2003) *Osgstu3* and *osgtu4*, encoding tau class glutathione S-transferases, are heavy metal- and hypoxic stress-induced and differentially salt stress-responsive in rice roots. *FEBS Letters* **553**: 427-432
- Neill SJ, Desikan R, Clarke A, Hurst RD, Hancock JT** (2002) Hydrogen peroxide and nitric oxide as signalling molecules in plants. *J. Exp. Bot.* **53**: 1237-1247
- Nikaido I, Asamizu E, Nakajima M, Nakamura Y, Saga N, Tabata S** (2000) Generation of 10,154 expressed sequence tags from a leafy gametophyte of a marine red alga, *Porphyra yezoensis*. *DNA Res* **7**: 223-227

- Nunez A, Savary BJ, Foglia TA, Piazza GJ** (2002) Purification of lipoxygenase from *Chlorella*: production of 9- and 13-hydroperoxide derivatives of linoleic acid. *Lipids* **37**: 1027-1032
- Nurnberger T, Brunner F, Kemmerling B, Piater L** (2004) Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences. *Immunol Rev* **198**: 249-266
- O'Brien PJ** (2000) Peroxidases. *Chem Biol Interact* **129**: 113-139
- Page R** (1996) TreeView: an application to display phylogenetic trees on personal computers. *Comput Appl Biosci* **12**: 357-358
- Peitsch M** (1996) ProMod and Swiss-Model: Internet-based tools for automated comparative protein modelling. *Biochem Soc Trans* **24**: 274-279
- Potin P, Bouarab K, Salaun JP, Pohnert G, Kloareg B** (2002) Biotic interactions of marine algae. *Curr Opin Plant Biol* **5**: 308-317
- Ranson H, Rossiter L, Ortelli F, Jensen B, Wang X, Roth CW, Collins FH, 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
- Robinson NJ, Procter CM, Connolly EL, Guerinot ML** (1999) A ferric-chelate reductase for iron uptake from soils. *Nature* **397**: 694-697
- Roeder V, Collén J, Rousvoal S, Corre E, Leblanc C, Boyen C** (2005) Identification of stress genes transcripts in *Laminaria digitata* (Phaeophyceae) protoplast cultures by expressed sequence tag analysis. *J Phycol* **41**: 1227-1235
- Sagi M, Fluhr R** (2001) Superoxide production by plant homologues of the gp91^{phox} NADPH oxidase. Modulation of activity by calcium and by tobacco mosaic virus infection. *Plant Physiol* **126**: 1281-1290
- Sajiki J, 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
- Sanchez-Fernandez R, Davies TG, Coleman JO, Rea PA** (2001) The *Arabidopsis thaliana* ABC protein superfamily, a complete inventory. *J Biol Chem* **276**: 30231-30244
- Sappl PG, Onate-Sanchez L, Singh KB, Millar AH** (2004) Proteomic analysis of glutathione S-transferases of *Arabidopsis thaliana* reveals differential salicylic acid-induced expression of the plant-specific phi and tau classes. *Plant Mol Biol* **54**: 205-219
- 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. *Biochem J* **370**: 661-669
- Schmidt W** (2003) Iron solutions: acquisition strategies and signaling pathways in plants. *Trends Plant Sci* **8**: 188-193
- Schroder I, Johnson E, de Vries S** (2003) Microbial ferric iron reductases. *FEMS Microbiol Rev* **27**: 427-447
- Schuller D, Liu Q, Kriksunov I, 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* **61**: 1024-1031
- Shah J** (2003) The salicylic acid loop in plant defense. *Curr Opin Plant Biol* **6**: 365-371
- 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. *Biochem J* **360**: 1-16
- Shimizu T, Yamamoto S, Hayaishi O** (1979) Purification and properties of prostaglandin D synthetase from rat brain. *J Biol Chem* **254**: 5222-5228
- Shinyashiki M, Pan CJ, Lopez BE, Fukuto JM** (2004) Inhibition of the yeast metal reductase heme protein FRE1 by nitric oxide (NO): a model for inhibition of NADPH oxidase by NO. *Free Radic Biol Med* **37**: 713-723
- Simon-Plas F, Elmayan T, Blein J-P** (2002) The plasma membrane oxidase NtrbohD is responsible for AOS production in elicited tobacco cells. *Plant J* **31**: 137-147
- Snyder MJ, Maddison DR** (1997) Molecular phylogeny of glutathione-S-transferases. *DNA Cell Biol* **16**: 1373-1384
- Soranzo N, Sari Gorla M, Mizzi L, Toma G, Frova C** (2004) Organisation and structural evolution of the rice glutathione S-transferase gene family. *Molecular Genetics and Genomics* **271**: 511-521
- Southern EM** (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* **98**: 503-517
- Studier FW** (2005) Protein production by auto-induction in high density shaking cultures. *Protein Expr Purif* **41**: 207-234
- Theodoulou FL** (2000) Plant ABC transporters. *Biochim Biophys Acta* **1465**: 79-103
- 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. *Biochem J* **333 (Pt 2)**: 317-325

- Todd JS, Proteau PJ, Gerwick WH** (1994) The absolute configuration of ecklonialactones A, B, and E, novel oxylipins from brown algae of the genera *Ecklonia* and *Egregia*. *J Nat Prod* **57**: 171-174
- Torres MA, Dangel JL, Jones JD** (2002) *Arabidopsis* gp91^{phox} homologues *AtrbohD* and *AtrbohF* are required for accumulation of reactive oxygen intermediates in the plant defense response. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**: 517-522
- Torres MA, Onouchi H, Hamada S, Machida C, Hammond-Kosack KE, Jones JD** (1998) Six *Arabidopsis thaliana* homologues of the human respiratory burst oxidase (gp91^{phox}). *Plant J* **14**: 365-370
- Toth GB, Pavia H** (2000) Water-borne cues induce chemical defense in a marine alga (*Ascophyllum nodosum*). *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 14418-14420
- Urade Y, Fujimoto N, Ujihara M, Hayaishi O** (1987) Biochemical and immunological characterization of rat spleen prostaglandin D synthetase. *J Biol Chem* **262**: 3820-3825
- Vignais PV** (2002) The superoxide-generating NADPH oxidase: structural aspects and activation mechanism. *Cell Mol Life Sci* **59**: 1428-1459
- 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
- Waters BM, Blevins DG, Eide DJ** (2002) Characterization of FRO1, a pea ferric-chelate reductase involved in root iron acquisition. *Plant Physiol* **129**: 85-94
- Weber H** (2002) Fatty acid-derived signals in plants. *Trends Plant Sci* **7**: 217-224
- Weinberger F, Friedlander M** (2000) Response of *Gracilaria conferta* (Rhodophyta) to oligoagars results in defense against agar-degrading epiphytes. *J Phycol* **36**: 1079-1086
- Weinberger F, Richard C, Kloareg B, Kashman Y, Hoppe HG, Friedlander M** (2001) Structure-activity relationships of oligoagar elicitors toward *Gracilaria conferta* (Rhodophyta). *J Phycol* **37**: 418-426
- Weyand M, Hecht H, Kiess M, Liaud M, Vilter H, Schomburg D** (1999) X-ray structure determination of a vanadium-dependent haloperoxidase from *Ascophyllum nodosum* at 2.0 Å resolution. *J Mol Biol* **293**: 595-611
- Wojtaszek P** (1997) Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection. *Biochem J* **322** (Pt 3): 681-692
- Yang HL, Zeng QY, Li EQ, Zhu SG, Zhou XW** (2004) Molecular cloning, expression and characterization of glutathione S-transferase from *Mytilus edulis*. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* **139**: 175-182

- Yang S, Madyastha P, Bingel S, Ries W, Key L** (2001) A new superoxide-generating oxidase in murine osteoclasts. *J Biol Chem* **276**: 5452-5458
- Yoshioka H, Numata N, Nakajima K, Katou S, Kawakita K, Rowland O, Jones JD, Doke N** (2003) *Nicotiana benthamiana* gp91^{phox} homologs *NbrbohA* and *NbrbohB* participate in H₂O₂ accumulation and resistance to *Phytophthora infestans*. *Plant Cell* **15**: 706-718
- Yoshioka H, Sugie K, Park HJ, Maeda H, Tsuda N, Kawakita K, Doke N** (2001) Induction of plant gp91 *phox* homolog by fungal cell wall, arachidonic acid, and salicylic acid in potato. *Mol Plant Microbe Interact* **14**: 725-736
- Zamocky M** (2004) Phylogenetic relationships in class I of the superfamily of bacterial, fungal, and plant peroxidases. *Eur J Biochem* **271**: 3297-3309
- Zeng QY, Lu H, Wang XR** (2005) Molecular characterization of a glutathione transferase from *Pinus tabulaeformis* (Pinaceae). *Biochimie* **87**: 445-455
- Zhao J, Davis LC, Verpoorte R** (2005) Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnol Adv* **23**: 283-333
- Zmasek C, Eddy S** (2001) ATV: display and manipulation of annotated phylogenetic trees. *Bioinformatics* **17**: 383-384

Annexes

Annexes

Annexes

Annexes

Annexes

ANNEXES

PUBLICATIONS

C. Hervé, T. Tonon, J. Collén, E. Corre, C. Boyen (2006). NADPH oxidases in Eukaryotes: red algae provide new hints! *Current Genetics*, *in Press*.

Cet article est présenté en annexe.

M. Cock, C. Leblanc, C. Colin, J. Collén, V. Roeder, **C. Hervé**, S. Rousvoal, G. Michel, P. Potin, C. Boyen, B. Kloareg (2004). Genomic analysis of economically important seaweeds. *Marine Biotechnology* (I.F. 1.068), 6, S43-S47

E. Gaquerel, **C. Hervé**, C. Boyen, P. Potin, J-P. Salaün. Evidence for oxylipin synthesis and induction of a new polyunsaturated fatty acid hydroxylase activity in *Chondrus crispus* during the early response to methyljasmonate, *submitted*.

J. Collén, **C. Hervé**, I. Guisle-Marsollier, J. Leger, C. Boyen. Expression profiling of *Chondrus crispus* (Rhodophyceae) after exposure to methyl jasmonate, *in preparation*.

C. Hervé, P-O. Defranco, G. Michel, C. Boyen. Characterization of new glutathione S-transferase classes from the red alga *Chondrus crispus*, *in preparation*.

Cécile Hervé · Thierry Tonon · Jonas Collén
Erwan Corre · Catherine Boyen

NADPH oxidases in Eukaryotes: red algae provide new hints!

Received: 28 July 2005 / Revised: 19 October 2005 / Accepted: 31 October 2005
© Springer-Verlag 2005

Abstract The red macro-alga *Chondrus crispus* is known to produce superoxide radicals in response to cell-free extracts of its green algal pathogenic endophyte *Acrochaete operculata*. So far, no enzymes involved in this metabolism have been isolated from red algae. We report here the isolation of a gene encoding a homologue of the respiratory burst oxidase gp91^{phox} in *C. crispus*, named *Ccrboh*. This single copy gene encodes a polypeptide of 825 amino acids. Search performed in available genome and EST algal databases identified sequences showing common features of NADPH oxidases in other algae such as the red unicellular *Cyanidioschyzon merolae*, the economically valuable red macro-alga *Porphyra yezoensis* and the two diatoms *Phaeodactylum tricorutum* and *Thalassiosira pseudonana*. Domain organization and phylogenetic relationships with plant, animal, fungal and algal NADPH oxidase homologues were analyzed. Transcription analysis of the *C. crispus* gene revealed that it was over-transcribed during infection of *C. crispus* gametophyte by the endophyte *A. operculata*, and after incubation in presence of atrazine, methyl jasmonate and hydroxyperoxides derived from C20 polyunsaturated fatty acids (PUFAs). These results also illustrate the interest of exploring the red algal lineage for gaining insight into the deep evolution of NADPH oxidases in Eukaryotes.

Keywords *Chondrus crispus* · NADPH oxidase · *Acrochaete operculata* · Real-time PCR · Methyl jasmonate

Electronic Supplementary Material Supplementary material is available for this article at <http://dx.doi.org/10.1007/s00294-005-0044-z> and is accessible for authorized users.

Communicated by F.-A. Wollman

C. Hervé · T. Tonon · J. Collén · E. Corre · C. Boyen (✉)
UMR7139 (CNRS-UPMC-LIA DIAMS), Station Biologique,
F-29682 Roscoff cedex, France
E-mail: boyen@sb-roscoff.fr
Tel.: +33-298292331
Fax: +33-298292385

Introduction

Rapid generation and accumulation of reactive oxygen species (ROS), also named oxidative burst, represents an early characteristic feature of the response following perception of pathogen signals in plants (Baker and Orlandi 1995; Lamb and Dixon 1997; Wojtaszek 1997), animals (Wientjes and Segal 1995; Segal 2005) and algae (Potin et al. 2002).

NADPH oxidase is assumed to be the key enzyme involved in the antipathogen action by triggering the generation of the oxidative burst. The membrane-bound enzyme catalyses the production of superoxide anions O₂⁻ from oxidation of intracellular NADPH, O₂⁻ being subsequently dismutated to H₂O₂ and other ROS used for host defense (Sutherland 1991). It is admitted that rapid electron flow takes place from the cytosolic NADPH electron donor to the extracellular O₂ electron acceptor via FAD and the two independent hemes (Vignais 2002). This cellular process is well described and understood in phagocytic cells. The leukocyte NADPH oxidase is composed of two main subunits anchored in the membrane: the glycoprotein gp91^{phox} (phox for phagocyte oxidase), also known as Nox2, which conserved all the catalytic machinery, and the p22^{phox}. The others components are cytosolic and assemble to the complex upon stimulation. All of them are needed for the NADPH oxidase activity in mammals neutrophils (Leusen et al. 1996; Vignais 2002).

In recent years, it has become clear that non-phagocytic cells also generate superoxide at lower levels. The subsequent search for gp91^{phox} homologues in mammals led to the identification of two additional families: NADPH oxidase family members (Nox) which have approximately the same length as gp91^{phox}, and Dual oxidase family members (Duox) which contain an N-terminal extension consisting of two Ca²⁺-binding EF-hand motifs, an additional transmembrane helix, and a peroxidase domain (Banfi et al. 2001). The Nox family includes Nox1, also known as Mox1 (Suh et al. 1999),

Nox3, Nox4, also designated Renox (Geiszt et al. 2000; Shiose et al. 2001), and Nox5. Among the Nox family members, Nox3 is the most similar to gp91^{phox} and Nox5 the most divergent (Cheng et al. 2001). Nox5 is different from all other members by its unique N-terminal extension that contains three EF-hand motifs. The Duox family includes the Duox1 and Duox2 isoforms, also termed ThOX1 and ThOX2 (Dupuy et al. 1999), identified in humans. Homologues have also been found beyond mammal group in *Caenorhabditis elegans* and *Drosophila melanogaster*.

Since the late 1990, a number of homologues of gp91^{phox}, named respiratory burst oxidase homologues (rboh), have been discovered in higher plants. Plant homologues have been isolated from rice (Groom et al. 1996; Torres et al. 1998), *Arabidopsis thaliana* (Desikan et al. 1998; Keller et al. 1998; Torres et al. 1998), tomato (Amicucci et al. 1999), potato (Yoshioka et al. 2001) and tobacco (Simon-Plas et al. 2002; Yoshioka et al. 2003). Antibodies to either p22^{phox} enzymatic component, or the regulatory ones p47^{phox} and p67^{phox}, have detected cross-reacting plant proteins of similar molecular mass (Desikan et al. 1996). However, plant genes that encode any of these components have never been reported. In addition, no significant evidence for their existence has been identified in the complete *A. thaliana* genome. Furthermore, Sagi and Fluhr (2001) have shown that the plant plasma membrane NADPH oxidase in tomato can produce O₂⁻ in absence of additional cytosolic components. The large subunit homologue to gp91^{phox} seems thus to be the unique protein required for NADPH oxidase activity in plants.

In organisms where several NADPH oxidases have been isolated, each isoform may have distinct implication in generation of defence reactions. Gp91^{phox} homologues encoded by genes constitutively expressed contribute to phase I of the oxidative burst whereas gp91^{phox} homologues genes which are specifically induced by elicitors are responsible of de novo proteins synthesis required for phase II of the burst (Yoshioka et al. 2001). *StrbohA* and *NbrbohA* in potato and tobacco respectively, are constitutively expressed, while *StrbohB* and *NbrbohB* genes are induced by pathogenic elicitors, by salicylic acid and arachidonic acid (Yoshioka et al. 2001, 2003). In *A. thaliana*, the *AtrbohD* gene is induced by H₂O₂ and harpin (Desikan et al. 1998). In mammals, the expression patterns of NADPH oxidase genes are tissue specific and do not correspond to the expression profile of gp91^{phox} (Banfi et al. 2001; Cheng et al. 2001). Differences in gene expression mechanisms and rates may reflect functional specificities, which in some cases go beyond implications in defence immunity. New insights attribute additional roles to NADPH oxidase isoforms as cellular growth regulation. ROS generated by NADPH oxidase isoforms have role in development and sexual differentiation in fungi (Lara-Ortiz et al. 2003; Aguirre et al. 2005). In mammals, Nox5 is likely to be involved in cell division during spermatogenesis (Banfi et al. 2001). In recent years, it

has been shown that ROS produced by NADPH oxidase homologues in plants were implicated in a wide range of plant responses, such as plant cell expansion through the activation of Ca²⁺ channels (Foreman et al. 2003), stomatal closure (Kwak et al. 2003), accumulation of stress hormones (Vranová et al. 2002) and induction of a large set of defence-related genes (Hancock et al. 2001; Neill et al. 2002). Complexity in specific roles and in regulation of these enzymes are supported by different tissue distribution, variation in gene expression and amounts of superoxide produced by all NADPH oxidase isoforms.

Ferric reductases have been identified in yeasts, higher plants, and share striking similarities with NADPH oxidases homologues. Topology and catalytic machinery are conserved. Six transmembrane domains identified in gp91^{phox} are conserved in ferric reductases from yeast and the N-terminal region slightly longer can carry one additional hydrophobic stretch (Martins et al. 1998; Waters et al. 2002). These enzymes are responsible for reducing extracellular Fe³⁺ by one electron before high-affinity uptake and use cytosolic NADPH as electron donor. Transfer takes place through FAD and hemes to the extracellular Fe³⁺ electron acceptor (Grotz and Gueriot 2002; Schroder et al. 2003). By analogy to gp91^{phox}, superoxide might be generated as a transient intermediate to reduce Fe³⁺ (Schroder et al. 2003). However, ferric reductases and NADPH oxidases homologues in yeast and higher plants exhibit major different regulation traits as ferric reductase genes are usually induced under iron or copper deficiencies (Waters et al. 2002; Schroder et al. 2003).

Generation of H₂O₂ has been demonstrated during infection of marine macro-algae by pathogens including bacteria (Weinberger and Friedlander 2000; Kupper et al. 2001; Weinberger et al. 2001) and endophytic filamentous algae (Bouarab et al. 1999; Kupper et al. 2001, 2002). Elicitors released from wounding such as oligoguluronates also induce an oxidative burst in the brown alga *Laminaria digitata* (Kupper et al. 2001). In *Gracilaria conferta*, oligoagars gave a similar response (Weinberger et al. 2001). Gametophytes of the red alga *Chondrus crispus*, when triggered with cell-free extracts of its green alga endophyte *Acrochaete operculata*, generate an oxidative burst, which is inhibited by diphenylene inodiuim (DPI), an inhibitor of flavoenzymes like NADPH oxidases. Moreover, when inoculated with DPI the gametophytes lost their resistance to *A. operculata* infection (Bouarab et al. 1999), suggesting the involvement of a NADPH oxidase homologue in the generation of oxidative stress and subsequent protective metabolisms in the red alga.

We report here the first identification of genes encoding homologues of the respiratory burst oxidase in two independent eukaryotic lineages, the Rhodophyta (red algae) and the diatoms. The term algae actually encompasses several distinct photosynthetic eukaryotes lineages, which emerged independently in the course of evolution. Green algae are the ancestor of the terrestrial

plants and belong to the so-called green lineage. Red algae are considered as a sister group to green plants, which are derived from a primary endosymbiosis event (Baldauf 2003). Diatoms belong to the major monophyletic group of Heterokonta also comprising the Phaeophyta (brown algae), which acquired their plastids through a secondary endosymbiosis event (Falkowski et al. 2004). Protein sequences deduced from these genes were compared with previously characterized NADPH oxidases and ferric reductases in order to gain insight into the phylogenetic relationships of eukaryotic NADPH oxidases and homologues. We also investigated changes in *Ccrboh* transcription during infection of *C. crispus* by *A. operculata* and after different chemical treatments.

Materials and methods

Plant material, infection experiments and chemical treatments

Experiments were performed with gametophytic *C. crispus* unialgal isolates (strain JC 001 PC-G). Cultivation was carried out at 13°C in enriched seawater medium SFC (Correa et al. 1988), using a photoperiod of 10 h of light and 14 h of darkness. Photon flux density was 40 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$, and the culture medium was changed weekly. Large-scale unialgal cultures of *A. operculata* (isolate KH 040687-1-1) were grown in enriched seawater medium SFC by using a photoperiod of 16 h of light and 8 h of darkness at a photon flux density of 40 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$. The culture medium was changed weekly.

For infection trials, 200 mg of fresh weight green alga was first incubated in 100 ml SFC medium in Petri dishes during 18 h at 4°C in darkness to induce release of zoospores. At maximum sporulation, inoculation was performed by culturing ten 200 mg fragments of *C. crispus* gametophytes, first maintained in fresh seawater during at least 18 h, each in 100 ml *A. operculata* sporulation medium. Zoospores states, from release until fixation at the surface of *C. crispus* fronds and germ-lings, were verified with a light microscope during the 96-hour periods of infection trials. Thallus in seawater SFC medium were used as controls. Samples were harvested after different times of incubation.

Ten mM stock solutions of CdCl_2 (Sigma, Deisenhofen, Germany), CuSO_4 (Prolabo), ZnCl_2 (Prolabo), AlCl_3 (Sigma), stock solution of H_2O_2 (Sigma) at 500 mM, dichlorvos (Sigma), glyphosate (Sigma), paraquat (Sigma) at 25 mM, stock solution of Messenger[®] (EDEN Bioscience, USA) at 10 g/l, were prepared in seawater. One hundred mM stock solutions of salicylic acid (Sigma), metolachlor (Sigma), atrazine (Sigma) and 2,4-D (Sigma) were prepared in acetone. Ten mM stock solution of methyl jasmonate (Sigma) was prepared in DMSO. All stocks were stored at -80°C . Five mM solution of hydroxyperoxides of polyunsaturated fatty acids (PUFAs) [13S-hydroperoxy-9Z,11E-

octadecadienoic acid: 13(S)-HpODE; 13S-hydroperoxy-9Z,11E,15Z-octadecatrienoic acid: 13(S)-HpOTE; 12-hydroperoxy-5Z,8Z,10E,14Z-eicosatetraenoic acid: 12(\pm)-HpETE; and 15S-hydroxy-5Z,8Z,11Z,13E-eicosatetraenoic acid: 15(S)-HETE] (Cayman Chemicals, MI, USA) were prepared in DMSO immediately before used. To perform chemical treatment, 100 mg of *C. crispus* gametophytes were first maintained in Petri dishes with seawater during at least 18 h. Chemicals were then added at a final concentration of 10 mM for H_2O_2 , 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ for Messenger (to have an estimated final harpin concentration of 6 $\mu\text{g}/\text{ml}$), 500 μM for salicylic acid and for all the pesticides tested, 200 μM for all the heavy metals, 100 μM for methyl jasmonate and 50 μM for each oxygenated derivatives of PUFAs. An equal volume of solvent was used in each corresponding control treatment. After 3 h of incubation, plants were harvested, frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until use.

DNA and RNA isolation

For extraction of genomic DNA, frozen gametophyte tissues were first ground to a fine powder in liquid nitrogen and homogenized in extraction buffer containing 100 mM Tris-HCl pH 8.0, 2% CTAB, 1.5 M NaCl, 50 mM EDTA, 50 mM DTT. DNA was then extracted by two phases partitioning with chloroform and finally precipitated with isopropanol. The pellet was re-suspended in 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM EDTA (TE) before purification by cesium chloride gradient.

For total RNA extraction, frozen gametophyte tissue was ground to a fine powder in liquid nitrogen and homogenized in extraction buffer, containing 100 mM Tris-HCl pH 7.5, 2% CTAB, 1.5 M NaCl, 50 mM EDTA, 50 mM DTT. Total RNA was then extracted by two phase partitioning with chloroform and precipitated with lithium chloride. To eliminate the residual genomic DNA present in the preparation, the extracts were treated by an RNase-free DNase I (Stratagene) according to the manufacturer's instructions.

Cloning and sequencing

Alignment of human gp91^{phox}, plant rboh and algal NADPH oxidase homologues permitted the design of degenerated primers. One was NOX1, 5'-CA(A/C)TGGCA(C/T)CCNTT(C/T)ACNAT(A/C/T)-3' and the other NOX2, 5'-NGCNGG(A/G)CTNCC(A/G)TANGG-3'. Using genomic DNA as template, these primers amplified a fragment that was cloned in the pCR2.1[®]-TOPO (Invitrogen) and subsequently sequenced. This 165-bp fragment was labelled with [α -³²P]-dCTP using the ReadyPrime[™] Random Primed DNA Labelling kit (Amersham-Biosciences, USA). A *C. crispus* cDNA thallus library (Collén et al. 2006, in Press) was then screened using this probe. Hybridization

and signal detection were carried out according to the manufacturer's protocol. Positive clones were sequenced and they were all corresponding to the same cDNA, which contained an incomplete ORF. The full-length cDNA was obtained by 5'-RACE PCR, using the SMARTTM RACE cDNA amplification kit (BD Biosciences, USA) and a specific primer NOX3, 5'-CCA CCGGAGATGAGAACGACTCGC-3'. Positive DNA fragments were additionally sub-cloned and sequenced.

The cDNA inserted in the clone AV429771 ordered from the *Porphyra yezoensis* EST resource was fully sequenced. This sequence was assembled with overlapping EST of the *P. yezoensis* showing high similarity to NADPH oxidases from mammals, to obtain the full-length sequence *Pyrboh*.

Southern blot analysis

Genomic DNA (5 µg) was digested with several restriction endonucleases (*EcoRI*, *HindIII* and *XhoI*) and then separated by electrophoresis on a 0.8% agarose gel. The gel was denatured and blotted onto a Hybond N+ nylon membrane (Amersham Pharmacia Biotech, Chalfont, USA) by the method of Southern (Southern 1975). A fragment of 556-bp corresponding to the N-terminal portion of *Ccrboh*, including FAD and NADPH-ribose binding sites, was amplified with the primers NOX4 (5'-TCAGTACGCAGAGGTCCAGGT-3') and NOX5 (5'-GGCATCGACCATCTCCACTTC-3') using one of the positive clones mentioned above as template. This specific probe was then labelled with fluorescein-11-dUTP using the GeneImagesTM Random Primed Labelling kit (Amersham-Biosciences) to hybridized the blot under high stringency condition: hybridization was performed overnight at 60°C, and the membrane filter was washed at 60°C once with 1×SSC, 0.1% SDS for 15 min, and then washed once with 0.5×SSC, 0.1% SDS for 15 min. Chemiluminescence detection was carried out according to the manufacturer's instructions.

DNA and amino acid sequence analysis

Amino acid sequence of red algal and diatom NADPH oxidases homologues were aligned with previously characterized *rboh*, *Duox*, *Nox* and ferric reductase sequences using the Mafft program at <http://bioinformatics.uams.edu/mafft/> and alignments were edited in ESPrit 2.2-ENDscript 1.0 at <http://espript.ibcp.fr/ESPrpt/cgi-bin/ESPrpt.cgi>.

Alignment performed on the full-length sequences was used for phylogenetic analyses. By the global gap removal mode, 292 informative sites were recognized on such alignment using the Phylowin program. Consensus tree presented was then made using the neighbour joining method with the PAM matrix and 1,000 bootstraps replicates. Trees obtained by the Phylowin program were then edited in TreeView.

Hydropathy analyses were performed using the Kyte–Doolittle algorithm with a window screen of 19 at http://occawlonline.pearsoned.com/bookbind/pubbooks/bc_mcampbell_genomics_1/medialib/activities/kd/kyte-doolittle.htm.

Real-time PCR

Total RNA was extracted as previously described, quantified by spectrophotometry, and loaded on an agarose gel to check their integrity. Total RNA (4.2 µg) was reverse transcribed using the Superscript II RT kit (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions.

Real-time PCR was performed in a GeneAmp 5700 sequence detection system (Applied Biosystems, Washington, UK) 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). They are targeted against sequences of the *Ccrboh* gene. The primers had the following sequence: NOX6 was 5'-CCCCAAGGCTTTCAGTTACCA-3'; and NOX7 was 5'-GGTGCCACTCACGGTTAATGA-3', enclosing an amplicon of 73 bp covering nucleotides 844–917 according to the *Ccrboh* gene. All 40 PCR cycles were performed according to the following temperature regimen: 95°C for 15 s, 60°C for 60 s. To generate a standard curve, genomic DNA of *C. crispus* was used as a reference matrix. Aliquots of fivefold serial dilution of this genomic DNA were used as a standard during each real-time PCR setup. Knowing the mass of the genome of *C. crispus* gametophyte (0.16 pg) permit to determine the number of genomes presents in this dilution range, and these values were used as reference for the calculation of the number of cDNA molecules present in each sample tested. This quantity in unknown samples was calculated by the GeneAmp 5700 system according to the generated standard curve and expressed as a number of *C. crispus* genomes per nanogram of total RNA. The same conditions were used with the actin gene as the internal control. In this case, the primers ACT1 (5'-CCGCCGTGGTGTTCTCAT-3') and ACT2 (5'-ATCTTCTCCATGTCGTCGCCAGTT-3') were used for the real-time PCR. These primers were deduced from the *C. crispus* mRNA actin sequence published in Genbank (U03676). The suitability of the primers in term of specificity and efficiency of annealing has been verified by determining the dissociation curve at the end of the experiment and the rate of amplification at each cycle for each couple.

Each chemical treatment was repeated at least two times independently, and inoculation of *C. crispus* gametophytes with *A. operculata* was repeated twice. Within each experiment, at least two data were averaged for each sample. To standardize the data, the ratio of the absolute transcript level of the NADPH oxidase homologue to the absolute transcript level of

actin was calculated for each sample. The relative changes in *Ccrboh* mRNA expression were calculated as *x*-fold changes relative to the appropriate control experiment for the different chemical treatments. For the infection experiment, the relative changes in *Ccrboh* mRNA expression were calculated as *x*-fold changes relative to the expression in non-infected thallus.

Results

Isolation of NADPH oxidase homologue genes from *C. crispus* and other algae

Search of the first large-scale red algae database publicly available, i.e. the *P. yezoensis* EST database (Nikaido et al. 2000; Asamizu et al. 2003) for gp91^{phox} homologues revealed the presence of eleven ESTs presenting high similarity to previously isolated mammals NADPH oxidases. Assembling of these ESTs did not permit to obtain the full-length sequence of a *Porphyra* gp91^{phox} protein. However, the EST AV429771, giving the highest score in the search analysis, was aligned with previously characterized plant and mammalian gp91^{phox} homologues to design degenerated primers. Using *C. crispus* genomic DNA as template, a fragment of 165 bp was amplified, labelled and utilized to screen a *C. crispus* thallus cDNA library. Hybridization on 4×10^5 pfu lead to the identification of four positive clones corresponding to the same cDNA of 2,513-bp encoding a partial peptide showing high similarity to gp91^{phox} protein. The 5'-end of this cDNA was isolated by 5'-RACE PCR. A 1,014-bp long fragment containing a translation start codon followed by an open reading frame with a coding capacity of 234 aa was isolated. Both sequences were assembled to form a contiguous sequence of 2,708 bp. Assuming that the coding region within this cDNA is full-length, *Ccrboh* is a 2,478-bp ORF, with 5'-UTR and 3'-UTR of 76 and 154 bp respectively. It encodes a protein of 825 amino acids with a predicted molecular mass of 93 kDa. *Ccrboh* amino acid sequence exhibited 21% of similarity to the human gp91^{phox}, with highest identity in the conserved motifs such as the FAD and NADPH binding sites (Fig. 1).

To establish the copy number of *Ccrboh*, Southern blot hybridization was performed on *C. crispus* gametophyte genomic DNA in high stringency conditions. A cDNA probe of 556-bp corresponding to the N-terminal portion of *Ccrboh*, including FAD and NADPH-ribose sites and thus covering positions 871–1,426 of the 2,708-bp cDNA fragment, was used to probe genomic DNA restricted by one or two restriction enzymes. It revealed one major band for each condition tested (Fig. 2). Two minor bands were detected in the *EcoRI* lane. Size of the major bands revealed in the different restriction conditions was in agreement with

what was expected from the restriction map of the 2,708-bp cDNA sequence, where two *EcoRI* sites were identified at position 1,546 and 2,446, one *HindIII* site at position 359 and one site for *XhoI* at position 1,826. These results suggest that a single copy of *Ccrboh* gene is present in the *C. crispus* genome.

In addition, total RNA from *C. crispus* gametophytes, was fractionated on denaturing agarose gel and used for Northern blotting. Hybridization was carried out with the probe mentioned above. The size of the transcript was estimated at 3,000-bp, in the same range that the length expected from the cDNA sequence (data not shown).

In parallel with the cloning of *Ccrboh*, the *P. yezoensis* clone AV429771 was fully sequenced to obtain a cDNA sequence of 3,294 bp, named *Pyrboh*, containing an ORF of 2,712 bp, with 5'-UTR and 3'-UTR of 220 and 362 bp, respectively. It encodes a protein of 903 aa with a predicted molecular weight of 98 kDa. *Pyrboh* showed 33% of similarity with *Ccrboh* and 19% with human gp91^{phox}. The two red macro-algal NADPH oxidase related sequences, *Ccrboh* and *Pyrboh*, were used to identify homologues by blast analysis in available micro-algal EST and genome databases. Two homologues, called arbitrarily *Cmrboh1* (locus CMG089C) and *Cmrboh2* (locus CMR353C), were identified in the genome of the primitive red unicellular *Cyanidioschyzon merolae* (Matsuzaki et al. 2004). *Cmrboh1* was 2,595 bp long, with an intron of 141 bp between the nucleic acid 1,975 and 2,115 of this locus. After in silico splicing of the intron, *Cmrboh1* display a 2,454-bp ORF and *Cmrboh2* a 2,808-bp ORF, encoding protein of 817 and 935 amino acids, respectively. These two amino acid sequences were 50% similar and 31% identical. Data mining allowed identifying four full-length cDNA homologues from diatom genomes. From the *Phaeodactylum tricorutum* EST database (Maheswari et al. 2005), two putative rboh genes, named respectively *Ptrboh1* (ORF of 1,779 bp) and *Ptrboh2* (ORF of 1,569 bp) were isolated, encoding for proteins of 592 and 522 amino acids, respectively. In the *Thalassiosira pseudonana* genome (Armbrust et al. 2004) other putative isoforms, called *Tprboh1* (TPFRO96211, ORF of 1,806 bp) and *Tprboh2* (TP93FRO, ORF of 1,869 bp) and encoding for protein of 601 and 622 amino acids, respectively, were also identified by blast analysis. It is interesting to note that the length of the diatoms amino acid sequences was approximately of the same size than the human gp91^{phox} protein (570 aa), whereas the red algal NADPH oxidase homologues were at least 200 amino acids longer than these sequences. Percentage of similarity determined between the two *T. pseudonana* sequences and between both *P. tricorutum* ones, i.e. 75 and 71% respectively, were higher than the value observed for the comparison of the two *C. merolae* sequences (50%).

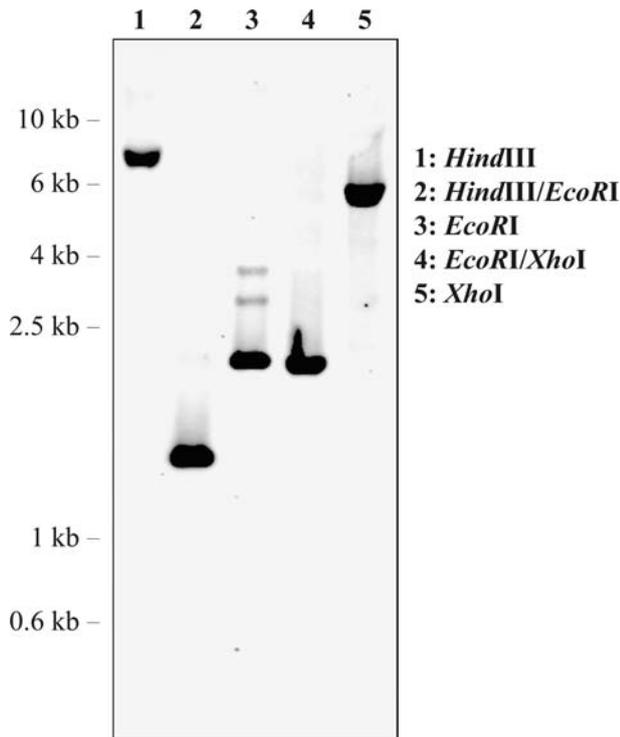


Fig. 2 Southern blot analysis of *C. crispus* genomic DNA, with a *Ccrboh* specific probe. Genomic DNA was restricted with *HindIII*, *HindIII/EcoRI*, *EcoRI*, *EcoRI/XhoI*, *XhoI* and hybridized with a specific fluorescein-11-dUTP labeled *Ccrboh* probe. Numbers to the left are sizes of the molecular markers

ified in the C-terminal part of the four new red algal sequences (Fig. 1b). The hydropathy profiles show that the six hydrophobic stretches, usually identified in the C-terminal region from gp91^{phox} and plants homologues, are conserved in the algal sequences, with the transmembrane domains 3 and 5 containing the two pairs of histidine. However, the red algal sequences exhibit a singular extended sequence of nearly 300 amino acids inserted between the two NADPH binding sites. One part was suspected to be cytosolic but did not seem to have a catalytic function when studied apart from the overall sequence. Hydropathy analysis of this insert showed that the second half of the red algal sequences carried four additional transmembrane domains (Fig. 3a). Despite the low degree of sequence similarity on this fragment, the same topology is conserved in the four red algal sequences. This insert can be considered as an evolutionary signature, typical of red algal NADPH oxidase related sequences and strongly suggesting that they all display the same function. Such an insertion in the sequence remote the two NADPH binding sites one from each other, which will need to be brought closer in the active enzyme, as shown in the schematic representation of the red algal NADPH oxidase homologues topology (Fig. 3b). This feature will probably influence the folding of the protein through the membrane. No putative calcium-binding domain was identified in the algal sequences. Thus, the red algal sequences are

predicted to have ten transmembrane-spanning domains where the six firsts correspond to those identified in gp91^{phox} or homologues and the last ones are situated in the insert.

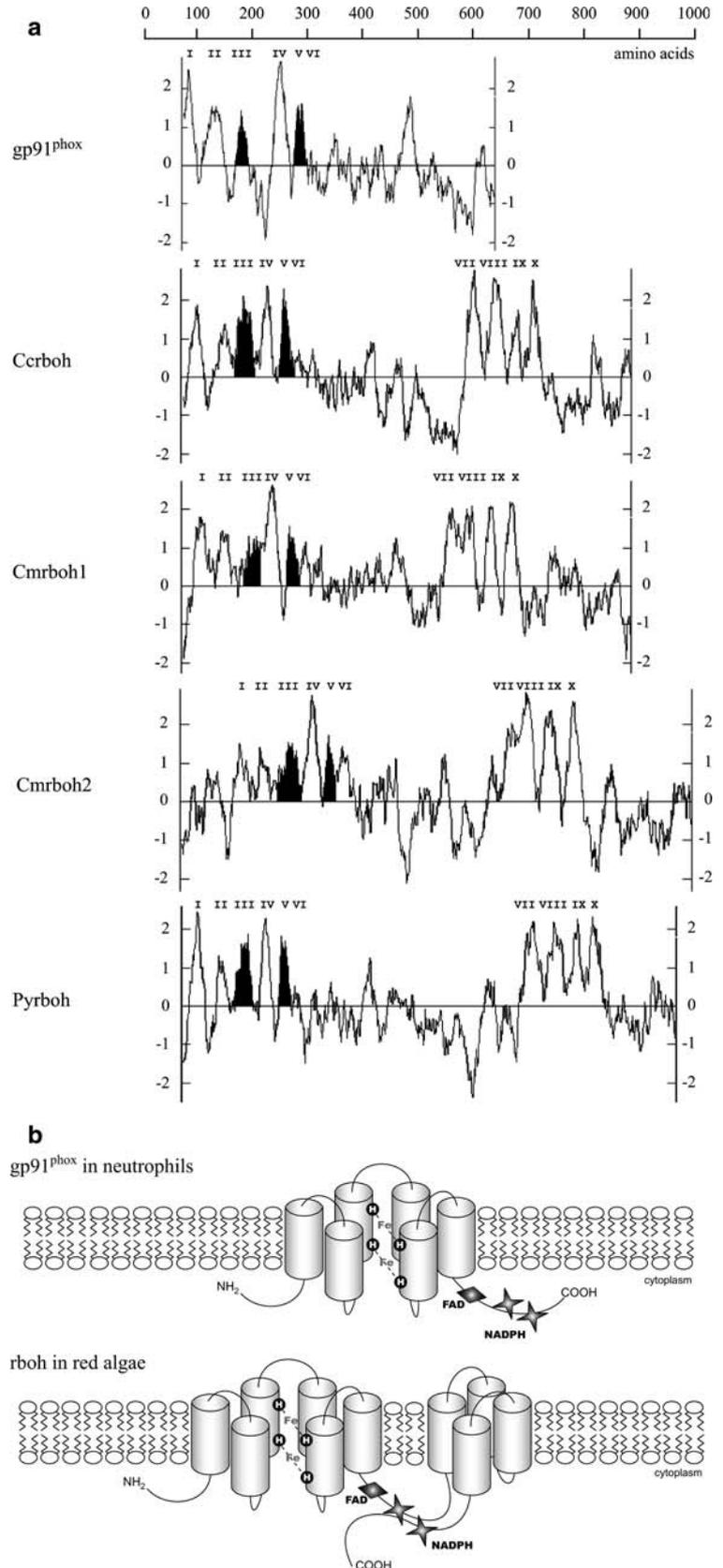
Phylogenetic analyses

Using Mafft program, algal sequences were compared to a set of 34 sequences including Nox, Duox, rboh and ferric reductases from diverse origins. Based on the amino acid sequence alignment, a portion of 292 informative residues was used to construct a consensus phylogenetic tree by the neighbour joining method in order to estimate the evolutionary relationships between the 42 proteins (Fig. 4). Trees revealing the same topology were also obtained using independently fraction of sequence containing the common catalytic sites identified in each type of enzyme, i.e. the transmembrane domains 3 and 5, and binding sites for the FAD, the NADPH-ribose and the NADPH-adenine. Results obtained with the maximum likelihood method were in agreement with those generated by the neighbour-joining algorithm. Additional phylogenetic analyses were also performed using others distance-based methods and gave mainly the same results (electronic supplementary material). From these trees, three main clusters could be distinguished. The first contained the yeast ferric reductases and the *T. pseudonana* sequences. Three sequences representing plant ferric reductases were found to be closely linked to this cluster. The second major cluster included the Nox5 alpha and the newly identified red algal sequences. Bangiophycidae (*Cmrboh1*, *Cmrboh2* and *Pyrboh*) and Florideophycidae (*Ccrboh*) rboh homologues together. *P. tricornutum* sequences were closely related to these sequences, and thus, group separately from the *T. pseudonana* proteins. The third major cluster contains three strongly supported sub-groups. Duox sequences grouped together, with two branches, one corresponding to the mammal enzymes, the other to the *C. elegans* sequence. The second sub-group included the mammalian Nox isoforms. The third sub-group consisted in 14 plant rboh, forming two main clades, independent of the source of the sequences. One group contains *NbrbohA*, *StrbohA* and *Lerboh1* sequences, which are constitutively expressed in tobacco, potato and tomato, respectively. The second group contains *NbrbohB*, *StrbohB* and *AtrbohD* proteins whose transcription has been shown to be induced by pathogen extract (Desikan et al. 1998; Yoshioka et al. 2001, 2003).

Analysis of *Ccrboh* expression

The absolute steady-state transcript level of *Ccrboh* was monitored by quantitative RT-PCR. An average of 150 copies of transcripts (expressed as number of genome equivalents per nanogram of total RNA) was calculated in the gametophyte, showing that the *Ccrboh* gene was

Fig. 3 Topology analyses of the neutrophile gp91^{phox} and the red algae homologues. **a** Hydropathy analyses of human gp91^{phox}, Ccrboh, Cmrboh1, Cmrboh2 and Pyrboh were performed using the Kyte–Doolittle algorithm with a window-screen of 19. Roman numerals indicate the putative transmembrane spans. Hydrophobic domains containing the two pairs of conserved histidine residues are blackened. **b** Schematic representation of human gp91^{phox} and red algae homologues. Indicated are the orientation of the protein in the membrane with the transmembrane domains (*barrels*), the putative position of the two Histidine residues (H), the FAD and the NADPH binding sites. Model for the gp91^{phox} is adapted from Cheng et al. (2001)



constitutively expressed at low level at this stage of the life cycle (data not shown), and confirming the results of a Northern blot analysis. To monitor the potential

variation of *Ccrboh* mRNA transcript accumulation during the interaction red alga-pathogen, *C. crispus* thallus were infected with *A. operculata* spores during

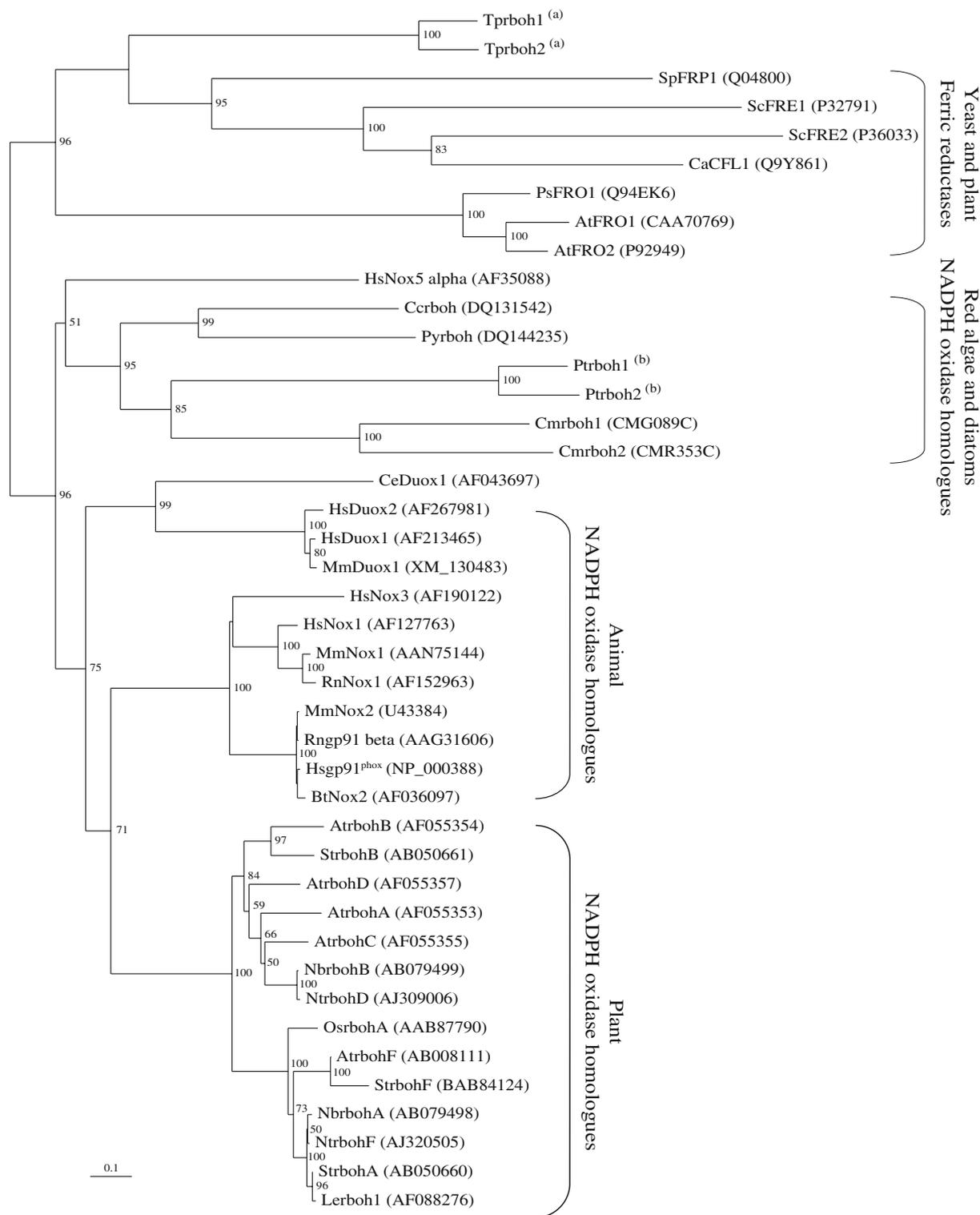


Fig. 4 Unrooted phylogenetic tree of Nox, Duox, rboh and ferric reductases homologues from yeast, plant, animal and algal origin. Accession number of each sequence used for the alignment is indicated between brackets. Only bootstrap values > 50% are shown. The bar indicates a relative measure of the distance in the tree. ^(a)*T. pseudonana* sequences are available on the JGI genome portal at <http://genome.jgi-psf.org/>. ^(b)*P. tricornutum* sequences have been retrieved from a *P. tricornutum* EST database (access generously provided by C. Bowler). Species names are: Tp

Thalassiosira pseudonana, Sp *Schizosaccharomyces pombe*, Sc *Saccharomyces cerevisiae*, Ca *Candida albicans*, Ps *Pisum sativum*, At *Arabidopsis thaliana*, Hs *Homo sapiens*, Cc *Chondrus crispus*, Py *Porphyra yezoensis*, Pt *Phaeodactylum tricornutum*, Cm *Cyanidioschyzon merolae*, Ce *Caenorhabditis elegans*, Mm *Mus musculus*, Rn *Rattus norvegicus*, Bt *Bos taurus*, St *Solanum tuberosum*, Nb *Nicotiana benthamiana*, Nt *Nicotiana tabacum*, Os *Oryza sativa*, Le *Lycopersicon esculentum*

96 h. After the first 6 h of experiment, light microscopic controls revealed that zoospores were highly active, freely swimming in the culture medium, and thus not fixed on *C. crispus* thallus. Simultaneously, a twofold decrease of *Ccrboh* mRNA transcript level was perceptible, suggesting that since the pathogen is not actively fixed at the thallus surface, no defense response involving *Ccrboh* gene activation is induced (Fig. 5a). After 12 h, more than 70% of the zoospores were fixed at surface of *C. crispus* fronds. After 24 h, all zoospores were fixed at surfaces of the Petri dish or to the gametophytes fronds and germlings start to penetrate through the host cell wall. At same time, the transcript level of *Ccrboh* showed a 4-fold induction compared to the control, and a high level of transcription was maintained during at least 12 h, which may be an indication of a response following signal pathogen perception. After 48 h of infection, the quantity of *Ccrboh* mRNA decreased to a basal level. Induction of *Ccrboh* mRNA expression during the interaction with *A. operculata* is thus the result of pathogen attack, occurring when germling zoospores start to penetrate through the host cell wall. Such enhancement takes place during first hours of *A. operculata* attack and may revealed a role of *Ccrboh* mRNA expression in early defense responses.

Variation of transcription of the *Ccrboh* under incubation in presence of diverse chemicals was then analyzed, after 3 h of treatment in order to focus on early response. Changes of *Ccrboh* mRNA expression are presented in Fig. 5b. Messenger is a developed commercial product containing harpin, a protein isolated from gram-negative plant-pathogenic bacteria. It is known to induce a hypersensitive reaction in non-host plants and is therefore used to stimulate growth and stress-defense pathways. Three hours treatment of gametophytes in presence of an equivalent concentration of 6 µg/ml harpin caused a twofold increase in the level of *Ccrboh* transcript. Variation in the same range was observed in presence of H₂O₂, whereas a slight decrease was monitored during incubation with salicylic acid. Metals only induced slight variation in the transcription of the *Ccrboh* gene. Among the pesticides tested, no significant enhancement was observed, except for metolachlor and atrazine. Atrazine, a member of the triazine class of herbicides and one of the most widely used in the world, caused a 14-fold increase in the level of transcription of *Ccrboh*.

Bouarab et al. (2004) have shown that *C. crispus* was likely to use both animal-like (eicosanoid, C20) and higher plant-like (octadecanoid, C18) oxylipins in the regulation of its metabolism toward protection against pathogen. To test if this type of molecules could induce change in the *Ccrboh* mRNA level, incubations of red algal gametophytes were performed in presence of hydroperoxides derived from either C18 PUFAs [methyl jasmonate, 13(S)-HpODE, 13(S)-HpOTE] or C20 PUFAs [12(±)-HpETE, 15(S)-HETE]. All these molecules enhanced the transcription of *Ccrboh*. The main effects were observed in presence of methyl jasmonate and

12(±)-HpETE where levels of *Ccrboh* transcripts were 21 and 4-fold higher, respectively, than in the control condition. Smaller effects were monitored from incubation with 15(S)-HETE (2.5 times induction), 13(S)-HpODE and 13(S)-HpOTE.

Discussion

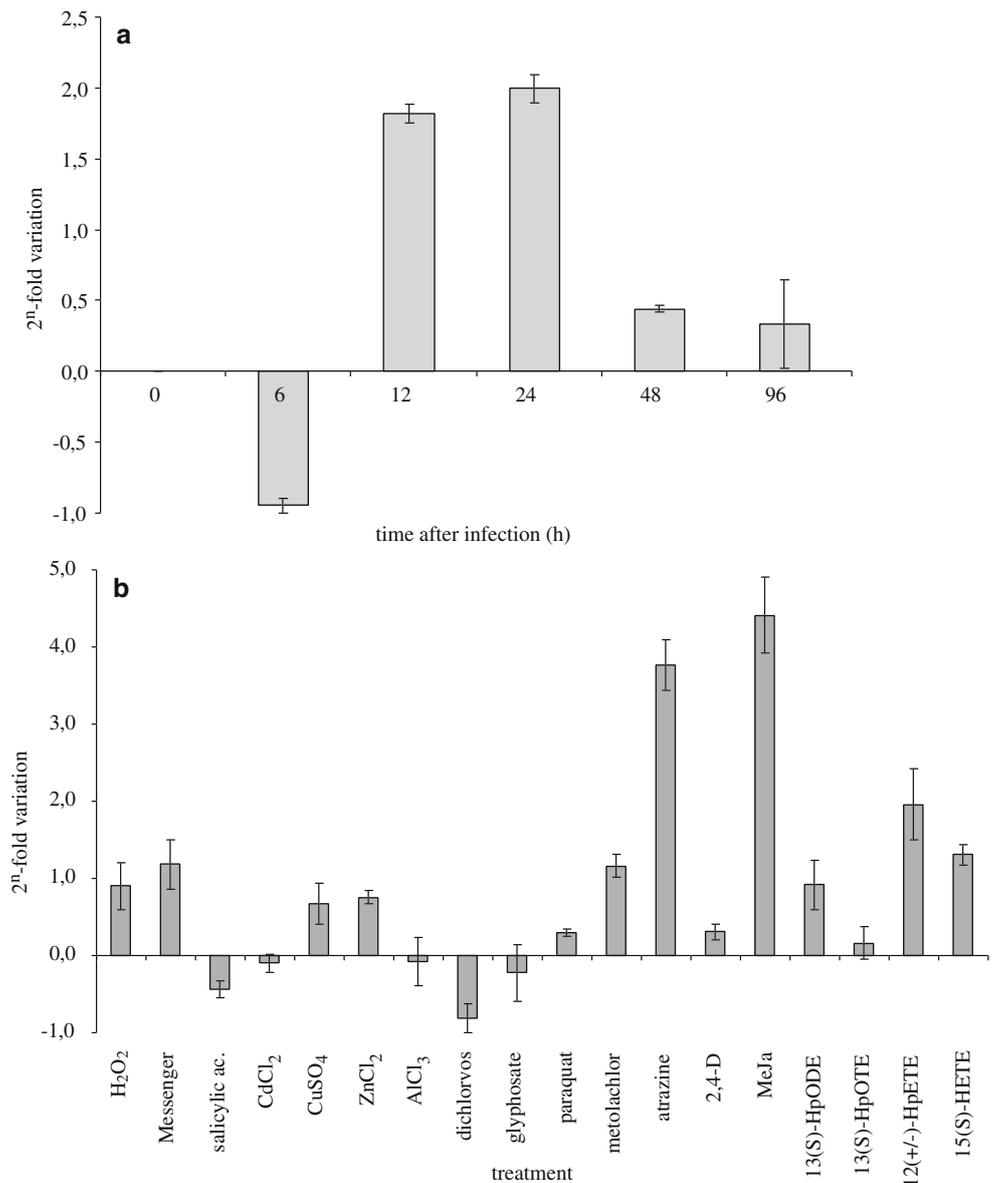
In most plant-pathogen interactions, a DPI-sensitive (O'Donnell et al. 1993), membrane-located, and receptor-activated NADPH-oxidase generates superoxide (Levine et al. 1994; Doke et al. 1996; Lamb and Dixon 1997; Bolwell et al. 2002). NADPH oxidase activity has been reported in *C. crispus* (Bouarab et al. 1999) and other red algae (Weinberger et al. 1999), as well as in brown algae (Kupper et al. 2001; Coelho et al. 2002). Even though more evidence for induced defense reactions of algae upon pathogen recognition is emerging (for reviews, see Potin et al. 2002; Steinberg et al. 2002), the host-microbe interactions of most marine algae remain poorly understood at the molecular level.

cdNA sequences of NADPH oxidase homologues were identified by analysis in the *P. yezoensis* EST resource; this allowed for the identification of a complete ORF of 2,478-bp encoding a protein of 825 amino acids in *C. crispus*. DNA blot analysis showed that only one copy of the *Ccrboh* gene was present on the *C. crispus* genome. However, we cannot exclude the possibility that more *Ccrboh* genes exist. Various isoforms are encountered in mammals (Banfi et al. 2001; Edens et al. 2001; Bokoch and Knaus 2003) and several genes have been identified in higher plants. For instance, the *A. thaliana* genome contains eight *rboh* genes, suggesting that individual isoforms have different functions and participate in multiple distinct signalling pathways (Torres et al. 2002).

Search in the genome of the unicellular red alga *C. merolae* revealed the presence of two genes annotated as encoding proteins similar to respiratory burst oxidase. In addition, two isoforms were also found in the *P. tricornutum* EST database and two genes in the *T. pseudonana* genome. We did not find homologues in the brown algae *L. digitata* EST catalogues (Crepineau et al. 2000; Roeder et al. 2006).

Although, the topology and functions of *rboh* proteins from algae have not been tested experimentally, several features common to NADPH oxidases and contributing to the catalytic activity of these enzymes are conserved. These enzymes are generally roughly divided in two large domains: an N-terminal cluster of hydrophobic membrane-spanning sequences, and a C-terminal flavoprotein domain. In the first half of the sequence, six transmembrane-spanning domains (TMD1 to TMD6) correspond to those identified in gp91^{phox} and can be considered as a common skeleton shared by all isoforms, including ferric reductases from yeast and higher plants. Red algal and diatom sequences TMD3 and TMD5

Fig. 5 Real-time PCR analysis of the *Ccrboh* transcript. Bars: standard error. **a** Relative changes of *Ccrboh* expression level in *C. crispus* gametophyte after different times of infection by spores of *A. operculata*. **b** Relative changes in *Ccrboh* expression level in *C. crispus* gametophyte after three hours under different chemical treatments



contain pairs of invariant His residues that have been shown to be important for heme binding in the human NADPH oxidase (Finegold et al. 1996). However, no calcium binding-EF hand motif was found as an extension of the N-terminal end of algal enzymes. This is in contrast with the Duox and the plant rboh proteins, where calcium-binding activity of these domains, suggesting direct regulation of the plant enzymes by Ca²⁺, was found experimentally by Keller et al. (1998). Moreover, Duox enzyme features an N-terminal peroxidase domain separated from dual EF-hands by an additional transmembrane segment.

The C-terminal regions of each NADPH oxidase homologue contain conserved FAD, NADPH-ribose, and NADPH-adenine binding sites, which are likely to be located in the cytoplasm. In all the Nox forms, the first NADPH-ribose binding domain (GXGXXP) is followed by an F, which is typical of NADPH-rather

than NADH-specific enzymes (Cheng et al. 2001). In the red algal sequences, this phenylalanine residue was found in the *Chondrus* and *Porphyra* sequences, and was replaced by a methionine in the *C. merolae* ones. In addition, in the red algal sequences, four additional transmembrane domains were predicted in an insertion zone between the two NADPH binding sites. This zone probably influences the folding of the protein through the membrane. The topology model proposed for the red algal sequences denotes that the first part of this fragment is cytosolic, the second probably carries the four additional transmembrane domains.

To complete these topological data, trees were constructed for establishing phylogenetic relationships between the different types of enzymes. Since their structure and activity exhibit some homology to the gp91^{phox} subunit of mammalian NADPH complex, sequences of membrane-bound Fe³⁺-chelate reductase

were also considered for this comparison. Membrane-bound ferric reductases have been very well described in *Saccharomyces cerevisiae*. Homologues have also been found in plants: the *A. thaliana* genome contains at least five ferric reductase members, each of which may carry out specific functions in different organs or cell types (Robinson et al. 1999; Waters et al. 2002).

All ferric reductase sequences group into a single cluster used as an outgroup to facilitate tree display. This result is in agreement with the hypothesis that NADPH oxidases and ferric reductases genes are a closely related protein family (Finegold et al. 1996). Since both enzymes can be found in plants and fungi, we can postulate that two genes were present in the eukaryotic common ancestor and that subsequent loss of one of the two genes occurred in mammalian eukaryotic lineages. The topology of the tree also suggests that the *T. pseudonana* sequences first identified as NADPH oxidase genes by blast searches are more probably ferric reductase genes.

Another striking group identified from this phylogenetic analysis contained the four red algal sequences and the *P. tricornutum* sequences which are branching together to form a cluster that is strongly supported by a bootstrap value of 95 and that is more closely related to Duox and Nox enzymes than to plant and yeast ferric reductases. Interestingly, this cluster also groups with the human Nox5 sequence that appears quite distantly related to other Duox and Nox isoforms. Based on sequence relationships analysis among Nox family members, Cheng et al. (2001) showed that Nox5 was quite divergent, and based on its position on the family tree, may represent the gene which is closest to the primordial Nox. Studies of genomic organization of human Nox gene showed that the exon-intron of the gene Nox5 is very different from members of the Nox and Duox families. Thus, it appears to be a considerable evolutionary distance between Nox5 and other member of the Nox and Duox families (Banfi et al. 2001). Taken together these results suggest that diatom and red algae NADPH oxidases have less diverged from the primitive Nox compared to other Nox representatives.

Lalucque and Silar (2003) postulated that NADPH oxidases were specifically present in organisms that differentiate multicellular structures during their life cycle and were absent from unicellular life forms. Their hypothesis was that NADPH oxidases constitute the redox signalling system that allows the gaining of multicellularity in the course of evolution. Only five independent eukaryotic lineages have evolved multicellularity: animals, fungi, green plants, red algae and brown algae. However, our results show that NADPH oxidases homologues are also present in eukaryotic unicellular algae such as diatoms and the red alga *C. merolae* and thus question the assumption mentioned above. No NADPH oxidase homologue was identified in *Chlamydomonas reinhardtii* by these authors. However, new search in the completed genome of this organism identified two sequences showing similar-

ities to NADPH oxidase and ferric reductase homologues (C_30094; C_30095 at the JGI genome portal). However, green algal sequences look quite divergent from others and no corresponding EST can be identified for these predicted genes (Asamizu et al. 2004). Therefore, expression of these genes has to be checked and if corresponding transcripts are isolated, it will suggest that NADPH oxidase homologues may have also been present in eukaryotic unicellular organism belonging to the green lineage.

Nothing is known about the regulation of the algal NADPH oxidases homologues, except that no direct calcium-dependent regulation is suspected, since no Ca^{2+} -binding EF-hands motif was found in sequences analyzed in this study. In mammals gp91^{phox}, regulation involved its associated membrane-bound subunit and cytosolic factors. However Banfi et al. (2001) have reported that in non-phagocytic cells Nox4 do not need regulation factors to be active. In the same way, no genes encoding homologues of p22^{phox}, p47^{phox}, p60^{phox} and p67^{phox} have been identified by blast analysis in algal genomes or EST databases. In plants, no genomic sequences corresponding to these proteins have been isolated, even if antibodies against p22^{phox}, p47^{phox} and p67^{phox} have detected cross-reacting proteins of similar molecular mass (Desikan et al. 1996). Some genes can be constitutively expressed at a low level and induced when needed to participate in signalling or defense responses, whereas others genes can be expressed only in some tissues. Such variation of expression may be linked to specific functions of each isoform encountered, such as cell development or defense reactions.

Analyses of accumulation of *Ccrboh* mRNA were monitored by real time PCR experiments. This showed that the *Ccrboh* gene was expressed at a basal low level in the algal gametophyte. Changes in *Ccrboh* transcript level were then monitored during infection of *C. crispus* gametophyte by spores of *A. operculata*. The level of *Ccrboh* mRNA decreased before showing a significant induction during at least 24 h, where the quantity of transcript was maintained at high level. A net decrease in expression was then observed. Induction of *Ccrboh* mRNA accumulation occurred when germling zoospores started to penetrate through the host cell wall. These observations suggest that the pathogen is recognized by *C. crispus* gametophytes, resulting in the increase of *Ccrboh* transcript level. Compounds generated by invasive filaments or oligocarrageenans released from pathogen degradation of the host cell-wall matrix can be detected as infection signals by the red alga gametophytes.

To complete this analysis, treatment with different substances were carried out on *C. crispus* gametophytes. H_2O_2 , harpin and salicylic acid induced slight effects on *Ccrboh* transcription. This is in contrast with observations in higher plants where harpin and H_2O_2 have been shown to increase the expression level of *AtrbohD* and to elicit a DPI-sensitive production of ROS in *A. thaliana* suspension cells (Desikan et al. 1998). Salicylic acid also

increased the expression level of *NbrbohA* and *NbrbohB* 9–24 h after injection in *Nicotiana benthamiana* leaves, were such accumulation of transcripts is sufficient to induce the oxidative burst in plant cell suspensions (Yoshioka et al. 2003). Main changes on *Ccrboh* transcript level were observed in response to the pesticide atrazine, and the hydroperoxides of PUFA, methyl jasmonate and 15(S)-HETE. Such results with lipid hydroperoxides are in agreement with previous observation demonstrating that such oxylipins act as essential intermediates in the innate immunity of *C. crispus* gametophytes (Bouarab et al. 2004). Signalling cascades involving compounds derived from the oxidative metabolism of PUFAs are known to operate in response to external stimuli. In animal systems, eicosanoids, i.e. hydroperoxides derived from 23 carbons PUFAs, regulate cell differentiation, immune response and homeostasis (Funk 2001). In contrast, terrestrial plants use derivatives of 16 and 18 carbons PUFAs as developmental or defenses hormones (Weber 2002). In most of plants methyl jasmonate is involved in completion of the life-cycle as cellular regulators, in various developmental processes, and is known to activate biosynthetic pathways recruited during inducible defense against pathogens or in response to wounding or environmental stresses (Cheong and Choi 2003). However, methyl jasmonate has been shown to have no effect on transcript level in tomato and tobacco and therefore do not appear to play a role in the oxidative burst (Amicucci et al. 1999; Yoshioka et al. 2003). Altogether, these transcription data indicate that *Ccrboh* gene exhibits expression features, which are similar to higher plants NADPH oxidases genes.

Conclusion

In this study, we described the characterization at the molecular level of the enzyme suspected being involved in ROS production during pathogen attack in *C. crispus*. Generation of an oxidative burst when triggered by pathogen extracts or elicitors appears to be a common defense feature shares by eukaryotes as it is referenced in animals, plants, red algae and diatoms. The phylogenetic analysis revealed that NADPH oxidases homologues in red algae and diatoms constitute an independent cluster, which emerged early in evolution from a common ancestor of the ferric reductases and NADPH oxidases. Moreover, expression pattern provide clear evidences that *Ccrboh* gene encodes a NADPH oxidase homologue and not a ferric reductase homologue. The presence of a conserved insertion in all red algal NADPH oxidase related sequences thus allow to infer that these sequences also encode NADPH oxidase homologues. Consequently, the hypothesis put forward by Lalucque and Silar (2003) is not valid for the red algal lineage, which include both unicellular and multicellular species featuring NADPH oxidase homologues. Our results also indicate that red algae and diatoms contain only a few

NADPH oxidase-homologues genes compared to the large families that have been described in plants and animals. We cannot completely exclude that additional isoforms might be identified in the future. Contrary to Nox5, NADPH oxidases isoforms from red algae and diatoms do not contain EF-hands motifs in the N-terminal region. It would thus be too speculative at this stage to infer more specific functional properties from the evolutionary affiliation among red algae and diatoms NADPH oxidases and Nox5.

If mechanism of ROS production is conserved in NADPH oxidase homologues, various regulation processes could be documented, as enzyme structure seems to have evolved through evolution. Identification of such diverse homologues goes with attribution of new extended functions to these enzymes, as novel roles distinct from host defense such as sensing and growth, are attributed to ROS. Our results also show that NADPH oxidase-homologue gene expression in *C. crispus* is related to both the eicosanoid and octadecanoid signalling pathways, a striking feature, which has not been observed so far in other eukaryotic phyla. Others enzymes are involved in the rapid defensive reaction of algae, such as the recently characterized L-asparagine oxidase from *C. crispus* implicated in the control of its endophytic pathogen (Weinberger et al. 2005). In this organism, current research is underway to identify others components involved in the defense mechanism activated during infection by *A. operculata*.

Acknowledgements We thank N. Kusuhara for generously providing the clone AV429771 from the *P. yezoensis* EST database, C. Bowler for giving us access to the diatoms sequences and K. Jabbari for having carried out the diatom databases searches. We also thank E. Billard and D. Scornet for technical support and B. Charrier for her helpful advice on real-time PCR experiments. We are grateful to anonymous reviewers whose sharp comments greatly helped us in improving the final manuscript. C. Hervé was supported by a BDI fellowship from the Centre National de la Recherche Scientifique. Part of this work was performed in the frame of “Marine Genomics Europe” NoE (EC contract No GOCE-CT-2004-505403).

References

- Aguirre J, Rios-Momberg M, Hewitt D, Hansberg W (2005) Reactive oxygen species and development in microbial eukaryotes. *Trends Microbiol* 13:111–118
- Amicucci E, Gaschler K, Ward JM (1999) NADPH oxidase genes from tomato (*Lycopersicon esculentum*) and curly-leaf pondweed (*Potamogeton crispus*). *Plant Biol* 1:524–528
- Armbrust EV, Berges JA, Bowler C, Green BR, Martinez D, Putnam NH, Zhou S et al (2004) The genome of the diatom *Thalassiosira pseudonana*: ecology, evolution, and metabolism. *Science* 306:79–86
- Asamizu E, Nakajima M, Kitade Y, Saga N, Nakamura Y, Tabata S (2003) Comparison of RNA expression profiles between the two generations of *Porphyra yezoensis* (Rhodophyta), based on expressed sequence tag frequency analysis. *J Phycol* 39:923–930
- Asamizu E, Nakamura Y, Miura K, Fukuzawa H, Fujiwara S, Hirono M, Iwamoto K, Matsuda Y, Minagawa J, Shimogawara K, Takahashi Y, Tabata S (2004) Establishment of

- publicly available cDNA material and information resource of *Chlamydomonas reinhardtii* (Chlorophyta), to facilitate gene function analysis. *Phycologia* 43:722–726
- Baker CJ, Orlandi EW (1995) Active oxygen in plant pathogenesis. *Annu Rev Phytopathol* 33:299–321
- Baldauf SL (2003) The deep roots of eukaryotes. *Science* 300:1703–1706
- Banfi B, Molnar G, Maturana A, Steger K, Hegedus B, Demaurex N, Krause KH (2001) A Ca(2+)-activated NADPH oxidase in testis, spleen, and lymph nodes. *J Biol Chem* 276:37594–37601
- Bokoch GM, Knaus UG (2003) NADPH oxidases: not just for leukocytes anymore! *Trends Biochem Sci* 28:502–508
- Bolwell GP, Bindschedler LV, Blee KA, Butt VS, Davies DR, Gardner SL, Gerrish C, Mimbayeva F (2002) The apoplastic oxidative burst in response to biotic stress in plants: a three-component system. *J Exp Bot* 53:1367–1376
- Bouarab K, Adas F, Gaquerel E, Kloareg B, Salaun JP, 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
- Cheng G, Cao Z, Xu X, van Meir EG, Lambeth JD (2001) Homologs of gp91^{phox}: cloning and tissue expression of Nox3, Nox4, and Nox5. *Gene* 269:131–140
- Cheong JJ, Choi YD (2003) Methyl jasmonate as a vital substance in plants. *Trends Genet* 19:409–413
- Coelho SM, Taylor AR, Ryan KP, Sousa-Pinto I, Brown MT, Brownlee C (2002) Spatiotemporal patterning of reactive oxygen production and Ca(2+) wave propagation in fucus rhizoid cells. *Plant Cell* 14:2369–2381
- 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*, in Press
- Correa JA, Nielsen R, Grund DW (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
- Crepineau F, Roscoe T, Kaas R, Kloareg B, Boyen C (2000) Characterisation of complementary DNAs from the expressed sequence tag analysis of life cycle stages of *Laminaria digitata* (Phaeophyceae). *Plant Mol Biol* 43:503–513
- Desikan R, Burnett EC, Hancock JT, Neill S (1998) Harpin and hydrogen peroxide induce the expression of a homologue of gp91^{phox} in *Arabidopsis thaliana* suspension cultures. *J Exp Bot* 49:1767–1771
- Desikan R, Hancock JT, Coffey MJ, Neill SJ (1996) Generation of active oxygen in elicited cells of *Arabidopsis thaliana* is mediated by a NADPH oxidase-like enzyme. *FEBS Lett* 382:213–217
- Doke N, Miura Y, Sanchez LM, Park HJ, Noritake T, Yoshioka H, Kawakita K (1996) The oxidative burst protects plants against pathogen attack: mechanism and role as an emergency signal for plant bio-defence—a review. *Gene* 179:45–51
- Dupuy C, Ohayon R, Valent A, Noel-Hudson MS, Deme D, Virion A (1999) Purification of a novel flavoprotein involved in the thyroid NADPH oxidase. Cloning of the porcine and human cDNAs. *J Biol Chem* 274:37265–37269
- Edens WA, Sharling L, Cheng G, Shapira R, Kinkade JM, Lee T, Edens HA, Tang X, Sullards C, Flaherty DB, Benian GM, Lambeth JD (2001) Tyrosine cross-linking of extracellular matrix is catalyzed by Duox, a multidomain oxidase/peroxidase with homology to the phagocyte oxidase subunit gp91^{phox}. *J Cell Biol* 154:879–891
- Falkowski PG, Katz ME, Knoll AH, Quigg A, Raven JA, Schofield O, Taylor FJ (2004) The evolution of modern eukaryotic phytoplankton. *Science* 305:354–360
- Finegold AA, Shatwell KP, Segal AW, Klausner RD, Dancis A (1996) Intramembrane bis-heme motif for transmembrane electron transport conserved in a yeast iron reductase and the human NADPH oxidase. *J Biol Chem* 271:31021–31024
- Foreman J, Demidehik V, Bothwell JH, Mylona P, Miedema H, Torres MA, Linstead P, Costa S, Brownlee C, Jones JD, Davies JM, Dolan L (2003) Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth. *Nature* 422:442–446
- Funk CD (2001) Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. *Science* 294:1871–1875
- Geiszt M, Kopp JB, Varnai P, Leto TL (2000) Identification of renox, an NAD(P)H oxidase in kidney. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:8010–8014
- Groom QJ, Torres MA, Fordham-Skelton AP, Hammond-Kosack KE, Robinson NJ, Jones JD (1996) *rbohA*, a rice homologue of the mammalian gp91^{phox} respiratory burst oxidase gene. *Plant J* 10:515–522
- Grotz N, Guerinet ML (2002) Limiting nutrients: an old problem with new solutions? *Curr Opin Plant Biol* 5:158–163
- Hancock JT, Desikan R, Neill SJ (2001) Role of reactive oxygen species in cell signalling pathways. *Biochem Soc Trans* 29:345–350
- Keller T, Damude HG, Werner D, Doerner P, Dixon RA, Lamb C (1998) A plant homolog of the neutrophil NADPH oxidase gp91^{phox} subunit gene encodes a plasma membrane protein with Ca²⁺ binding motifs. *Plant Cell* 10:255–266
- Kupper 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
- Kupper 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. *J Chem Ecol* 28:2057–2081
- Kwak JM, Mori IC, Pei ZM, Leonhardt N, Torres MA, Dangl JL, Bloom RE, Bodde S, Jones JD, Schroeder JI (2003) NADPH oxidase *AtrbohD* and *AtrbohF* genes function in ROS-dependent ABA signaling in *Arabidopsis*. *Embo J* 22:2623–2633
- Lalucque H, Silar P (2003) NADPH oxidase: an enzyme for multicellularity? *Trends Microbiol* 11:9–12
- Lamb C, Dixon RA (1997) The oxidative burst in plant disease resistance. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 48:251–275
- Lara-Ortiz T, Riveros-Rosas H, Aguirre J (2003) Reactive oxygen species generated by microbial NADPH oxidase NoxA regulate sexual development in *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol* 50:1241–1255
- Leusen JH, Verhoeven AJ, Roos D (1996) Interactions between the components of the human NADPH oxidase: a review about the intrigues in the phox family. *Front Biosci* 1:d72–d90
- Levine A, Tenhaken R, Dixon R, Lamb C (1994) H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell* 79:583–593
- Maheswari U, Montsant A, Goll J, Krishnasamy S, Rajyashri KR, Patell VM, Bowler C (2005) The diatom EST database. *Nucl Acids Res* 33:D344–D347
- Martins LJ, Jensen LT, Simon JR, Keller GL, Winge DR (1998) Metalloregulation of *FRE1* and *FRE2* homologs in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 273:23716–23721
- Matsuzaki M, Misumi O, Shin IT, Maruyama S, Takahara M, Miyagishima SY, Mori T et al (2004) Genome sequence of the ultrasmall unicellular red alga *Cyanidioschyzon merolae* 10D. *Nature* 428:653–657
- Neill SJ, Desikan R, Clarke A, Hurst RD, Hancock JT (2002) Hydrogen peroxide and nitric oxide as signalling molecules in plants. *J Exp Bot* 53:1237–1247
- Nikaido I, Asamizu E, Nakajima M, Nakamura Y, Saga N, Tabata S (2000) Generation of 10,154 expressed sequence tags from a leafy gametophyte of a marine red alga, *Porphyra yezoensis*. *DNA Res* 7:223–227
- O'Donnell BV, Tew DG, Jones OT, England PJ (1993) Studies on the inhibitory mechanism of iodonium compounds with special reference to neutrophil NADPH oxidase. *Biochem J* 290(Pt 1):41–49
- Potin P, Bouarab K, Salaun JP, Pohnert G, Kloareg B (2002) Biotic interactions of marine algae. *Curr Opin Plant Biol* 5:308–317

- Robinson NJ, Procter CM, Connolly EL, Guerinot ML (1999) A ferric-chelate reductase for iron uptake from soils. *Nature* 397:694–697
- Roeder V, Collén J, Rousvoal S, Corre E, Leblanc C, Boyen C (2006) Identification of stress genes transcripts in *Laminaria digitata* (Phaeophyceae) protoplast cultures by expressed sequence tag analysis. *J Phycol* 41:1227–1235
- Sagi M, Fluhr R (2001) Superoxide production by plant homologues of the gp91^{phox} NADPH oxidase. Modulation of activity by calcium and by tobacco mosaic virus infection. *Plant Physiol* 126:1281–1290
- Schroder I, Johnson E, de Vries S (2003) Microbial ferric iron reductases. *FEMS Microbiol Rev* 27:427–447
- Segal AW (2005) How neutrophils kill microbes. *Ann Rev Immunol* 23:197–223
- Shiose A, Kuroda J, Tsuruya K, Hirai M, Hirakata H, Naito S, Hattori M, Sakaki Y, Sumimoto H (2001) A novel superoxide-producing NAD(P)H oxidase in kidney. *J Biol Chem* 276:1417–1423
- Simon-Plas F, Elmayan T, Blein J-P (2002) The plasma membrane oxidase NtrbohD is responsible for AOS production in elicited tobacco cells. *Plant J* 31:137–147
- Southern EM (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 98:503–517
- Steinberg PD, De Nys R, Kjelleberg S (2002) Chemical cues for surface colonization. *J Chem Ecol* 28:1935–1951
- Suh YA, Arnold RS, Lassegue B, Shi J, Xu X, Sorescu D, Chung AB, Griendling KK, Lambeth JD (1999) Cell transformation by the superoxide-generating oxidase Mox1. *Nature* 401:79–82
- Sutherland MW (1991) The generation of oxygen radicals during host plant responses to infection. *Physiol Mol Plant Pathol* 39:79–93
- Torres MA, Dangl JL, Jones JD (2002) Arabidopsis gp91^{phox} homologues *AtrbohD* and *AtrbohF* are required for accumulation of reactive oxygen intermediates in the plant defense response. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:517–522
- Torres MA, Onouchi H, Hamada S, Machida C, Hammond-Kosack KE, Jones JD (1998) Six *Arabidopsis thaliana* homologues of the human respiratory burst oxidase (gp91^{phox}). *Plant J* 14:365–370
- Vignais PV (2002) The superoxide-generating NADPH oxidase: structural aspects and activation mechanism. *Cell Mol Life Sci* 59:1428–1459
- Vranova E, Inze D, Van Breusegem F (2002) Signal transduction during oxidative stress. *J Exp Bot* 53:1227–1236
- Waters BM, Blevins DG, Eide DJ (2002) Characterization of FRO1, a pea ferric-chelate reductase involved in root iron acquisition. *Plant Physiol* 129:85–94
- Weber H (2002) Fatty acid-derived signals in plants. *Trends Plant Sci* 7:217–224
- Weinberger F, Friedlander M (2000) Response of *Gracilaria conferta* (Rhodophyta) to oligoagars results in defense against agar-degrading epiphytes. *J Phycol* 36:1079–1086
- Weinberger F, Friedlander M, Hoppe HG (1999) Oligoagars elicit a physiological response in *Gracilaria conferta* (Rhodophyta). *J Phycol* 35:747–755
- Weinberger F, Pohnert G, Berndt ML, Bouarab K, Kloareg B, Potin P (2005) Apoplastic oxidation of L-asparagine is involved in the control of the green algal endophyte *Acrochaete operculata* Correa and Nielsen by the red seaweed *Chondrus crispus* Stackhouse. *J Exp Bot* 56:1317–1326
- Weinberger F, Richard C, Kloareg B, Kashman Y, Hoppe HG, Friedlander M (2001) Structure-activity relationships of oligoagar elicitors toward *Gracilaria conferta* (Rhodophyta). *J Phycol* 37:418–426
- Wientjes FB, Segal AW (1995) NADPH oxidase and the respiratory burst. *Seminars Cell Biol* 6:357–365
- Wojtaszek P (1997) Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection. *Biochem J* 322(Pt 3):681–692
- Yoshioka H, Numata N, Nakajima K, Katou S, Kawakita K, Rowland O, Jones JD, Doke N (2003) *Nicotiana benthamiana* gp91^{phox} homologs *NbrbohA* and *NbrbohB* participate in H₂O₂ accumulation and resistance to *Phytophthora infestans*. *Plant Cell* 15:706–718
- Yoshioka H, Sugie K, Park HJ, Maeda H, Tsuda N, Kawakita K, Doke N (2001) Induction of plant gp91 *phox* homolog by fungal cell wall, arachidonic acid, and salicylic acid in potato. *Mol Plant Microb Interact* 14:725–736

...

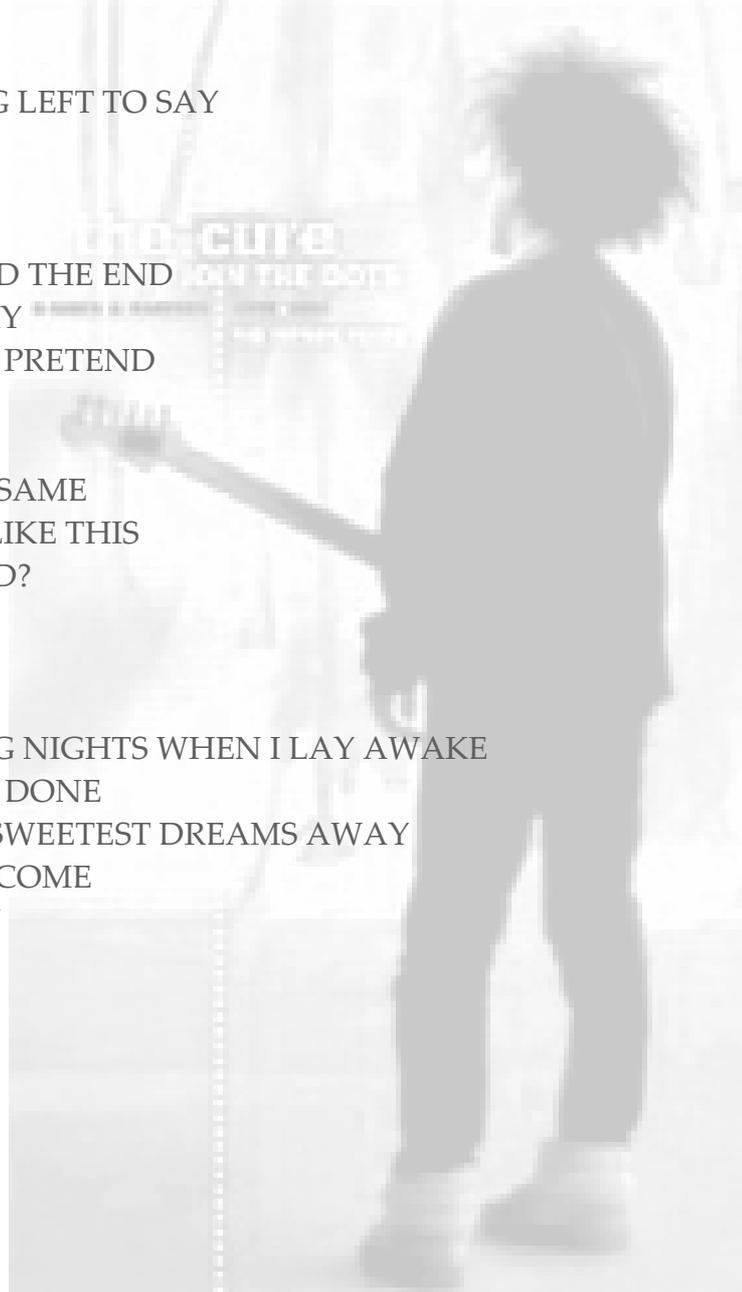
...

SO IF YOU'VE GOT NOTHING LEFT TO SAY
JUST SAY GOODBYE
TURN YOUR FACE AWAY
AND SAY GOODBYE
YOU KNOW WE'VE REACHED THE END
YOU JUST DON'T KNOW WHY
AND YOU KNOW WE CAN'T PRETEND
AFTER ALL THIS TIME
SO JUST LET IT ALL GO
NOTHING EVER STAYS THE SAME
SO WHY DOES IT HURT ME LIKE THIS
TO SAY THAT I'VE CHANGED?
TO SAY THAT I'VE AGED?
SAY I'M AFRAID...

BUT THERE ARE LONG LONG NIGHTS WHEN I LAY AWAKE
AND I THINK OF WHAT I'VE DONE
OF HOW I'VE THROWN MY SWEETEST DREAMS AWAY
AND WHAT I'VE REALLY BECOME
AND HOWEVER HARD I TRY
I WILL NEVER FORGET

I WILL NEVER FORGET

I WILL NEVER FORGET





Couché de soleil sur l'île de Batz - crédit PO Dufrenoy



Résumé

L'algue rouge *Chondrus crispus* a la capacité de générer un burst oxydatif en réponse à une élicitation par des extraits acellulaires de son algue verte endophyte *Achrochaete operculata*. Nous avons isolé chez *C. crispus*, un gène codant pour un homologue de l'oxydase gp91^{phox} (*Ccrboh*). Des analyses des bases de données de génomes et d'EST ont permis d'identifier des séquences présentant également des homologies avec les NADPH oxydases chez d'autres algues rouges, unicellulaires ou multicellulaires, et des diatomées. La topologie des protéines putatives a été analysée, ainsi que les relations phylogénétiques de ces séquences avec des homologues de NADPH oxydases chez les animaux, les plantes et les champignons. L'analyse des profils d'expression du gène de *C. crispus* a montré que celui-ci était induit au cours de l'infection de l'algue par *A. operculata*, et par des traitements à l'atrazine et au méthyle jasmonate. Le gène *Ccrboh* constitue le premier marqueur moléculaire des réponses au stress et à la défense chez notre modèle. Pour compléter cette approche moléculaire, j'ai également analysé deux banques d'EST de *C. crispus* : l'une obtenue à partir des gamétophytes (2052 EST), l'autre à partir de protoplastes (2002 EST). Plusieurs gènes présentant un intérêt particulier dans le cadre de l'étude des réponses au stress et à la défense ont été appréhendés. Ils codent pour des enzymes impliquées dans la génération d'un stress oxydatif ou dans la production de composés halogénés toxiques (bromoperoxydases, myeloperoxydases), des enzymes ayant une activité anti-oxydante (peroxiredoxines), et des enzymes impliquées dans la biotransformation de composés toxiques et dans des métabolismes endogènes potentiels (cytochromes P450, glutathion S-transférases). L'analyse des profils d'expression de ces gènes a montré la forte induction des trois transcrits de glutathion S-transférases (*CcGST1*, *CcGST2*, *CcGST7*) par le méthyle jasmonate. Ces enzymes sont d'un intérêt particulier car leurs gènes sont fortement exprimés dans le protoplaste. Les séquences *CcGST1* et *CcGST2* sont très proches des GST de la classe sigma qui comprend des enzymes ayant une activité prostaglandine synthase. La séquence *CcGST7* présente les similitudes les plus fortes avec des GST des classes beta, epsilon et delta. Les analyses phylogénétiques ont confirmé la distribution singulière de nos enzymes parmi les classes de GST ; elles formeraient de nouvelles classes de GST qui n'ont pas été décrites jusqu'à présent. Les profils d'expression ont été complétés par des traitements incluant des métaux lourds, des pesticides et des dérivés d'acides gras. Les plus fortes inductions sont observées avec les oxylipines, dont le méthyle jasmonate. La séquence *CcGST2* a été exprimée chez *Escherichia coli*, et ses propriétés enzymatiques ont été étudiées.

Mots clés : *Chondrus crispus* ~ algue rouge ~ NADPH oxydase ~ burst oxydatif ~ *Acrochaete operculata* ~ méthyle jasmonate ~ réponses de défense ~ glutathion S-transférase ~ PCR quantitative

Abstract

The red macro-alga *Chondrus crispus* is known to produce an oxidative burst in response to cell-free extracts of its green algal endophyte *Achrochaete operculata*. I report here the isolation of a gene encoding a homologue of the respiratory burst oxidase gp91^{phox} in *C. crispus*, named *Ccrboh*. Search performed in genome and EST databases identified sequences showing common features of NADPH oxidases in other multicellular or unicellular red algae and diatoms. Domain organisation and phylogenetic relationships with animal, plant, fungal and algal NADPH oxidase homologues were analysed. Transcription analysis of the *C. crispus* gene revealed that it was over-transcribed during infection of gametophytes by *A. operculata*, and after incubation in presence of atrazine and methyl jasmonate. The *Ccrboh* gene is the first molecular marker set out in a global stress and defence responses context. To complete this molecular approach, I have analysed two EST databases from *C. crispus*: one obtained from thallus (2052 EST) and one constructed from protoplasts (2002 EST). Several genes were of particular interest to elucidate stress and defence responses in the red algae. They encoded enzymes involved in oxidative stress and toxic halogenated compounds generation (bromoperoxydases, myeloperoxydases), enzymes with anti-oxidative activities (peroxiredoxines) and enzymes involved in biotransformation of toxic compounds and putative endogenous metabolisms (cytochromes P450, glutathione S-transferases). Transcriptions analyses of these genes revealed a significant induction of three glutathione S-transferase transcripts (*CcGST1*, *CcGST2*, *CcGST7*) during a methyl jasmonate treatment. These enzymes are of particular interest as they belong to highly expressed genes in protoplasts. The *CcGST1* and *CcGST2* sequences are very similar to GST belonging to the sigma class, which includes prostaglandin synthase enzymes. The *CcGST7* sequence shows best identities with enzymes from the beta, delta and epsilon classes. Phylogenetic analyses confirmed the singular distribution of these enzymes among all the GST classes; they are supposed to form new GST classes would have not been described so far. Expression profiles were completed after metals, pesticides and fatty acids derivatives treatments, and the highest inductions were observed with oxylipines, including methyl jasmonate. The *CcGST2* sequence has been expressed in *Escherichia coli*, and enzymatic properties have been studied.

Key words: *Chondrus crispus* ~ red alga ~ NADPH oxidase ~ oxidative burst ~ *Acrochaete operculata* ~ methyl jasmonate ~ defense responses ~ glutathione S-transférase ~ real-time PCR