

Sommaire :	1
Abréviations	7
Index des figures	9
Index des tables et tableaux	13
Introduction :	15
1-Présentation du modèle biologique : <i>Laminaria digitata</i>	17
1-1 Ecologie	17
1- 2 Cycle de vie, développement	17
1- 3 Composition de la paroi cellulaire	21
1-3-1 L'alginate, composant principal de la parois cellulaire	21
1-3-2 Intérêt économique de l'alginate	23
1-4 Polysaccharides de stockage et oligosaccharides stimulants les mécanismes de défense des plantes	27
1-5 Intérêt économique en quelques chiffres	29
1-6 Concentration de l'iode	31
2- Le stress : perception, transduction du signal et mécanismes de réponse	33
2-1 Le stress chez les plantes supérieures	35
2-1-1 La perception du stress et les différents types de senseurs	35
2-1-2 Transduction du signal	37
2-1-2-1 Le Calcium	37
2-1-2-2 La voie SOS	39
2-1-2-3 Les Protéines kinases dépendantes du calcium (CDPKs)	41
2-1-2-4 Les voies des MAPKinases	43
2-1-2-5 Les phospholipases	45
2-1-3 Les modifications transcriptionnelles suite aux signaux de stress : acteurs et régulation	47
2-1-4 Expression de protéines responsables de la résistance au stress	49
2-1-4-1 La production d'osmoprotectants	49
2-1-4-2 Les protéines chaperonnes	53
2-1-4-2-1 Les HSPs	53
2-1-4-2-2 Les LEA	57
2-1-5 Les EAO (Espèces Activées de l'Oxygène)	59
2-1-5-1 La production d'EAO	59
2-1-5-2 Mécanisme de contrôle de la quantité d'EAO dans la cellule	61
2-1-5-2-1 Réactions de détoxification indirecte	61
2-1-5-2-2 Réactions de détoxification directe	61

2-1-5-3 Rôle des EAO dans le stress abiotique	63
3- La réponse au stress chez les macro-algues	67
3-2 La perception du stress	67
3-2 La transduction du signal	69
3-3 Réponse des macro-algues en condition de stress	71
3-4 Le stress chez <i>L. digitata</i>	71
3-5 Conclusion	73
4- Introduction du travail de thèse	75
4-1 Contexte scientifique	75
4-2 Objectifs de la thèse	75
4-3 L'outil biologique : le protoplaste	77
4-4 Identification de marqueurs moléculaires de la réponse au stress	77
4-5 Peut-on distinguer les gènes de réponse au stress des gènes de défense ?	79
4-6 Etude de la famille multigénique des mannuronane-C5-épimérase	81

RESULTATS 85

Chapitre I : Etude d'une banque orientée d'ADNc de protoplastes de *Laminaria digitata* 87

1- Résultats relatifs à la construction de la banque d'ADNc	87
1-1 Préparation des protoplastes	87
1-2 Extraction des ARNm	89
1-3 Construction et contrôle de la banque	89
2- Séquençage et analyse des séquences	91
2-1 Traitement des séquences et contigage	91
2-2 Annotation des séquences	95
2-3 Séquences les plus représentées	99
3- Comparaison des EST de protoplastes avec les EST de sporophytes	101

3-1 seconde analyse de la banque EST de sporophytes de <i>L. digitata</i>	101
3-2 comparaison entre les 2 banques EST	103
3-3 comparaison statistique des transcrits les plus représentés dans les 2 banques	105
4-Marqueurs moléculaires potentiels de défense et de la réponse au stress	107
5 Discussion	111
5-1 Transcrits correspondant à des gènes impliqués dans la réponse au stress	113
5-2 Les espèces activées de l'oxygène	115
5-3 Halopéroxydases	119
5-4 Gènes impliqués dans la néosynthèse de la paroi cellulaire	121
5-5 Stratégie EST, intérêt et limites	123

Chapitre II : Mise en évidence de transcrits induits lors de l'élicitation de *L. digitata*

129

1-Construction et analyse de la banque par hybridation soustractive	129
1-1 Obtention de la banque soustractive et séquençage des clones générés	129
1-2 Analyse des séquences obtenues	133
2- Validation de la banque soustractive	133
3- Distinction entre gènes de stress et gènes de défense	137
4- Discussion	139
4-1 Différenciation stress / défense	139
4-1-1 Marqueurs de stress	139
4-1-2 Marqueurs de défense	141
4-1-3 Cas particulier des bromoperoxydases	143
4-2 Ambiguïté des EAO	143

4-3 Limites de la méthode	145
---------------------------	-----

Chapitre III : Etude de la famille multigénique des Mannuronane-Mannuronane-C5-épimérases

149

1- Identification des enzymes chez le protoplaste	149
2 Recherche de séquences entières	149
3 Obtention de nouvelles séquences de C5-épimérases par RT-PCR	155
4- Validation des clusters de C5-épimérases par PCR quantitative	159
4-1 Résultats obtenus chez les protoplastes	161
4-2 Résultats obtenus chez les sporophytes	163
5- Expression hétérologue de gènes de C5-épimérase	163
6- Discussion	165
7- Conclusion	171

Matériels et méthodes

173

1- Construction d'une banque orientée d'ADNc de protoplastes de <i>Laminaria digitata</i>	175
1-1 Obtention de protoplastes de <i>Laminaria digitata</i>	175
1-2 Purification des ARNm	177
1-3 Synthèse des ADNc	177
1-4 Encapsidation	179
1-5 Titrage de la banque	181
1-6 Amplification de la banque	181
1-7 Vérification de la taille des inserts	183
2- Séquençage	183
2-1 Mise en culture des clones recombinants	183
2-2 Isolement de l'ADN plasmidique	183
2-3 Réaction de séquençage	185
2-4 Traitements informatiques	185

3- Construction de la banque d'ADNc spécifique de sporophytes élicités	185
3-1 Matériel biologique	187
3-2 Extraction des ARN et synthèse des ADNc	187
3-3 Hybridation soustractive	189
3-4 Clonage	191
3-5 Séquençage et analyse des séquences	191
4- Validation de l'approche d'hybridation suppressive soustractive par hybridation sur membrane	191
4-1 Dépôt des ADN sur membrane	191
4-2 Marquage des sondes	193
4-3 Hybridation des sondes	193
5- Obtention de séquences complètes pour les gènes de C5-épiméras	193
5-1 Matériel biologique utilisé	195
5-2 Synthèse d'ADNc simple brin et amplification par PCR	195
5-3 Essais d'amplification à partir de la banque d'ADNc de protoplastes	197
5-4 Purification des bandes et clonage	197
5-5 Séquençage et analyse des séquences	197
6- Mesure de l'accumulation de transcrits par PCR quantitative	199
6-1 Préparations des échantillons d'ARN totaux	199
6-2 Elicitation des sporophytes	199
6-3 Extraction des ARN	199
6-4 Synthèse des ADNc	201
6-5 Détermination des couples amorces	201
6-6 Préparation des réactions de PCR quantitative et paramètres de l'amplification	203
6-7 Analyse des Résultats	203
Conclusions et perspectives	205
Annexes	239

Abréviations

6PGDH : 6-phosphogluconate-déshydrogénase
ABA : acide abscissique
ABC : ATP-binding cassette
ADN : acide désoxyribonucléique
ADNc : acide désoxyribonucléique complémentaire
ADP : adénosine diphosphate
APX : ascorbate peroxydases
ARN : acide ribonucléique
ARNm : acide ribonucléique messager
ATP : adénosine triphosphate
BPO : Bromoperoxydase dépendante du vanadate
CAT : catalases
CBF : C-repeat-binding-factor
CDPK : calcium dependant protein kinase
da : daltons
DBD: DNA Binding Domain
DHA : déhydroascorlate
DHAR : dehydroascorlate reductases
DREB : dehydration responsive element binding factor
EAO : espèces activée de l'oxygène
EF1 α : facteur d'élongation 1 α
EST : expressed sequence tag / étiquette de séquence transcrite
G : acide α -L-gulonique
G6PDH : glucose-6-phosphate dehydrogenase
GDP : guanosine diphosphate
GG : oligogulonates
GPX : glutathion peroxydases
GR : glutathion reductases
GSH : glutathion
GSSG : glutathion oxydé
GST : glutathion-S-transférase
HK : histidine kinases
HPt : Histidine containing Phosphotransfer
HSE : Heat Stress promoter Element
HSF : Heat Shock Factor
HSP : Heat Shock Proteins
Ld-vBPO : *Laminaria digitata* vanadium bromoperoxydase
LEA : late embryogenesis abundant proteins
LHCF : Light harvesting complex factor
M : acide β -D-manuronique
Man-C5 : mannuronane-C5-épimérase
MAPKinases : mitogen activated protein kinases
MDA : monodehydroascorbate
MDAR : monodehydroascorbate réductase
MIPS : Munich Information center for Protein Sequences
NADPH : nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NCBI : National Center for Biotechnology Information
NIH : National Institutes of Health

NLS : nucléaire localisation factor
Pb : paire de base
PCR : polymerase chain reaction
pfu : plaque forming units
PLD : phospholipases D
pLd-vBPO : protoplaste Ld-vBPO
PME : pectine-methyl-esterases
RT-PCR : reverse transcription PCR
sHSP : small Heat Shock Proteins
SIMKK : Stress Induced MAPKK
SOD : superoxyde dismutases
SOS : salt overly sensitive
SSH : suppressive subtractive hybridization ou SSH
TPS : tréhalose phosphate synthase
UV : ultraviolet

Index des figures

Figure 1 : Arbre phylogénétique des eucaryotes, d'après Baldauf et <i>al.</i> , 2003	16
Figure 2 : Zone d'habitat de <i>Laminaria digitata</i>	16
Figure 3 : Schéma de l'estran (source Ifremer)	18
Figure 4 : Cycle de vie hétéromorphe de <i>Laminaria digitata</i> (d'après F. Crépineau)	19
Figure 5 : Anatomie de <i>L. digitata</i> .	19
Figure 6 : Représentation théorique de la paroi des Phéophycées, d'après Kloareg et Quatrano (1988)	20
Figure 7 : Structure de l'alginate	20
Figure 8a :différentes étapes de la synthèse de l'alginate chez <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , d'après Gacesa 1998	22
Figure 8b Modèle de la biosynthèse et de l'assemblage de l'alginate chez <i>P. aeruginosa</i> d'après Ramsey et al, (2005)	22
Figure 9 : Organisation et contrôle des gènes de synthèse de l'alginate chez <i>P. aeruginosa</i> , d'après Gacesa (1998)	24
Figure 10 : Voie de synthèse de l'alginate chez les algues brunes, déduite d'analyses biochimiques	24
Figure 11 : Représentation de l'organisation type « boîte à œuf » des chaînes d'alginate en présence du cation divalent Ca^{2+}	26
Figure 12 : Schéma simplifié d'une chaîne de laminarine (β 1,3-glucane)	28
Figure 13 : Four à Goémon des côtes bretonnes	30
Figure 14 : Représentation générale de la réponse au stress chez les plantes (D'après Wang et al 2003)	34
Figure 15 : Différents systèmes de transduction du signal par phospho-relais (d'après Urao et <i>al.</i> , 2000)	36
Figure 16 : Signaux calciques transitoires après perception du signal de stress d'après Xiong et <i>al.</i> (2002)	38
Figure 17 : Régulation de l'homéostasie ionique suivant un stress salin d'après Chinnusamy et <i>al.</i> (2004)	40
Figure 18 : Voies des MAPK kinases activées lors de différents stress chez <i>A. thaliana</i> , <i>Medicago trunculata</i> et la tomate (.Nakagami et <i>al.</i> , 2005)	42

Figure 19 : Production et effets de l'acide phosphatidique	44
Figure 20 : Régulation de l'expression de CBF/DREB1 en réponse aux basses températures, d'après Novillo et <i>al.</i> (2004)	46
Figure 21 : Structure peptidique des 3 classes de HSF chez <i>A. thaliana</i> (Baniwal et <i>al.</i> , 2004)	48
Figure 22 : Rôles des HSF comme régulateurs de la réponse au stress thermique (Baniwal et <i>al.</i> , 2004)	48
Figure 23 : Activation et mécanisme d'action concerté des HSP (Wang et <i>al.</i> , 2004)	52
Figure 24 : Interactions supposées des HSP avec d'autres mécanismes de réponse au stress (Wang et <i>al.</i> , 2004)	54
Figure 25 Cycle glutathion-ascorbate (d'après Appel et <i>al.</i> , 2004)	62
Figure 26 : Production et effets des EAO au cours de l'attaque par un pathogène ou en condition de stress abiotique (d'après Appel et <i>al.</i> , 2004)	64
Figure 27. Les différentes réactions catalysées par les halopéroxidases	
Figure 28 : Implications présumées des halopéroxidases dans les mécanismes de réponse au stress, d'après Colin (2004)	72
Figure 29 : Le protoplaste : un outil méthodologique pour étudier le stress	76
Figure 30 : Représentation schématique d'une EST	78
Figure 31 : Protoplastes obtenus à partir de sporophytes de <i>Laminaria digitata</i>	86
Figure 32 : Fractions d'ADNc obtenues à partir des ARNm de protoplastes de <i>L. digitata</i>	88
Figure 33 : Schéma général d'acquisition et d'analyse des EST	90
Figure 34 : Explication des différentes possibilités pour un même transcrit, exprimés de façon multiples, d'aboutir à plusieurs EST de séquences différentes	92
Figure 35 : Principe des contigs et du contigage	94
Figure 36 : Evolution de la redondance en fonction du nombre de séquences obtenues	94
Figure 37 : Alignement des séquences en acides aminés des vanadium bromopéroxidases identifiées chez <i>L. digitata</i>	100
Figure 38 : Répartition des EST de sporophytes et de protoplastes de <i>L. digitata</i> dans les différentes catégories fonctionnelles	104

Figure 39 : Schéma récapitulant le protocole d'obtention des différents pools d'ADNc pour la construction de la banque d'ADNc spécifique de laminaires élicitées par hybridation soustractive	130
Figure 40 : Schéma de la membrane utilisée pour la validation de la banque soustractive	134
Figure 41 : Principe de validation de la banque soustractive par hybridation en dot-blot	136
Figure 42 : Résultats d'hybridation pour la validation de la banque soustractive	138
Figure 43 : Alignement de la région bordant le site catalytique des mannuronane-C5-épipéras	146
Figure 44 : Analyse par Southern-blot des mannuronane-C5-épipéras chez <i>L. digitata</i>	146
Figure 45 : Analyse de l'expression de ManC5-E1 chez le protoplaste par Northern-blot et RT-PCR semi-quantitative	148
Figure 46 : Cartographie des mannuronane-C5-épipéras identifiées chez les protoplastes de <i>L. digitata</i>	150
Figure 47 : Analyse par Northern-blot de l'induction de ManC5-E1 après élicitation des sporophytes par des oligogulonates	154
Figure 48 : Dendrogramme des mannuronane-C5-épipéras identifiées chez <i>L. digitata</i>	156
Figure 49 : Alignement des séquences partielles de Man-C5 obtenues par RT-PCR	158
Figure 50 : Mesure de la quantité de transcrits de 4 gènes de mannuronane-C5-épipéras chez des protoplastes de <i>L. digitata</i> maintenus en culture pendant 24 heures	160
Figure 51 : Mesure de la quantité de transcrits de 4 gènes de mannuronane-C5-épipéras chez des jeunes plantules de sporophytes de culture de <i>L. digitata</i> lors d'une cinétique d'élitation par des oligogulonates	162
Figure 52 : Mesure de la quantité de transcrits de 4 gènes de mannuronane-C5-épipéras chez des jeunes plantules sauvages de <i>L. digitata</i> lors d'une cinétique d'élitation par des oligogulonates	162
Figure 53 : Expression de ManC5-E6 et ManC5-E7 dans les différentes conditions testées, exprimées en pourcentage de transcription par rapport à la protéine de référence rpl14	164

Figure 54 : Schéma récapitulant le protocole d'obtention des différents pools d'ADNc pour la construction de la banque d'ADNc spécifique de laminaires élicitées par hybridation soustractive	186
Figure 55 : Principe de fonctionnement de l'hybridation soustractive, d'après le protocole du kit BD PCR-Select™ cDNA Subtraction (Clontech, 2003)	188
Figure 56 : Principe de fonctionnement de la Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE) d'après le kit BD SMART™ RACE cDNA Amplification (Clontech, 2002)	194

Index tableaux

Tableau 1 : Les 10 contigs correspondant aux gènes les plus représentés dans la banque d'ADNc de protoplastes	98
Tableau 2 : Les 10 contigs correspondant aux gènes les plus représentés dans la banque d'ADNc de sporophytes de <i>L. digitata</i>	102
Tableau 3 : Expression différentielle des 10 contigs les plus représentés chez le protoplaste après comparaison avec les ESTs de sporophytes, d'après Audic et Claverie (1997)	106
Tableau 4 : Liste des EST issues des banques de protoplastes, sporophytes et gamétophytes de <i>L. digitata</i> présentant des similitudes avec les ADNc spécifiques de sporophytes élicités	132
Tableau 5 : Résultats de l'observation visuelle de l'intensité des spots sur membrane après hybridation avec les 4 pools d'ADNc	140
Tableau 6 : Récapitulatifs des expériences de RACE PCR réalisées pour obtenir des ADNc pleine longueur de mannuronanemannuronane-C5-épimérases	152
Tableau 7 : Composition des différents milieux utilisés pour la préparation des protoplastes de <i>L. digitata</i>	174
Tableau 8 : Composition des milieux de culture de bactéries	180
Tableau 9 : Composition des milieux utilisés pour l'amplification de la banque	180
Tableau 10 : Conditions de séquençage	184
Tableau 11 : Composition des milieux utilisés lors de l'hybridation sur membrane	190
Tableau 12 : amorces utilisées lors des expériences de RACE PCR et de PCR quantitative	196

INTRODUCTION

Figure 1 : Arbre phylogénétique des eucaryotes, d'après Baldauf et *al.*, 2003. La majorité des eucaryotes peuvent être répartis en 8 groupes. Le point commun des hétérocontes est l'existence à au moins un stade de leur vie, de cellules dont les flagelles sont de taille différente, l'un portant des mastigonèmes l'autre étant lisse. L'arbre est basé sur un consensus de données moléculaires et structurales et inclut des données brutes de nouvelles ciPCR « taxa » (Culture indépendant PCR) indiquées par des lignes pointillées. Cette technique est utilisée pour détecter des gènes chez des organismes non cultivés permettant ainsi un raccourci vers la reconnaissance de gènes spécifiques dans un échantillon contenant différents organismes. Un astérisque précédant le nom du taxon indique un groupe probablement paraphylétique

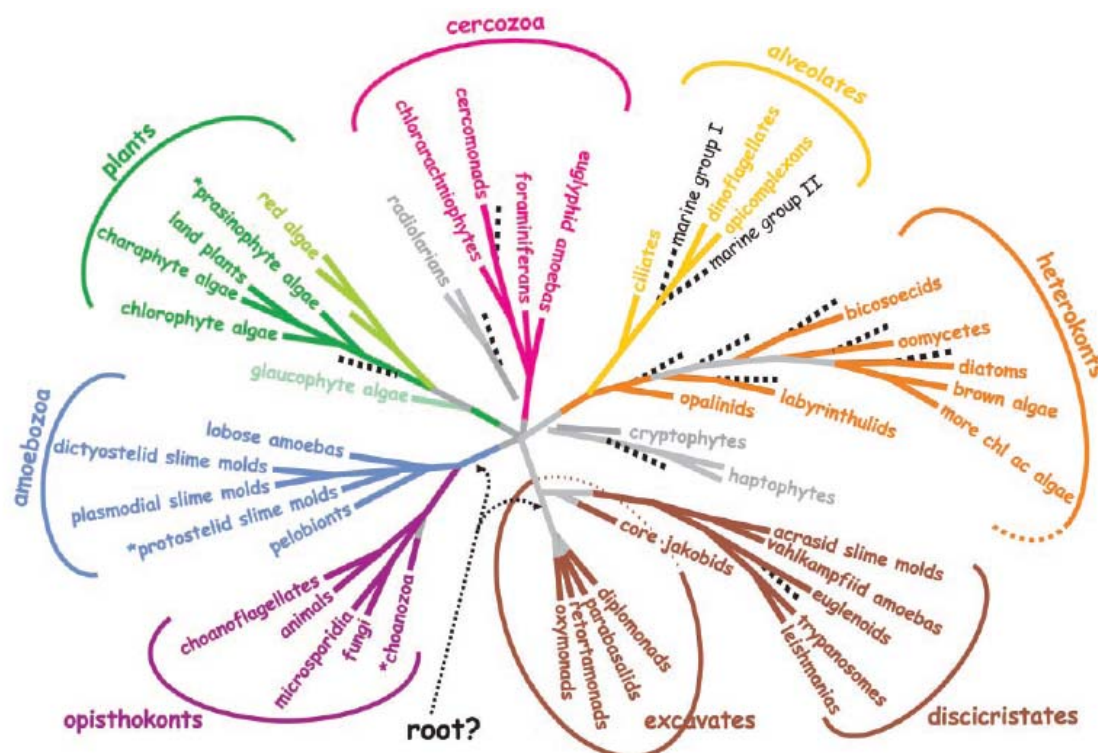
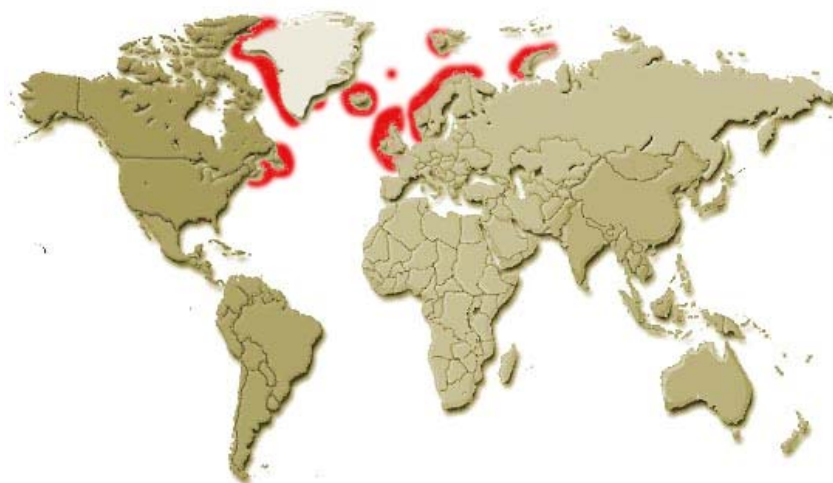


Figure 2 : Zone d'habitat de *Laminaria digitata*. Les champs naturels de *L. digitata* ne sont localisés que dans l'hémisphère nord, dans des eaux ne dépassant pas les 18°C en été. Ils sont situés principalement sur les côtes de l'Europe de l'ouest et du nord, puis au nord et à l'ouest des côtes nord-américaines.



Introduction

1- Présentation du modèle biologique

1-1 Ecologie

Laminaria digitata est une macroalgue marine brune, appartenant à la classe des Phéophycées, qui se positionne au sein de la lignée des hétérochontes (fig. 1). Cette lignée constitue un phylum eucaryotique indépendant, au même titre que les algues rouges ou les plantes vertes. Elle comprend de nombreuses autres classes d'algues telles que les Diatomophycées, les Chrysophycées ou les Pelagophycées, ainsi que des protistes hétérotrophes tels que les Oomycètes (Guillou et *al.*, 1999).

Comme les autres espèces de laminariales, *L. digitata* est une algue d'eau froide dont la température ne dépasse pas 18°C en été (Van Den Hoek et *al.*, 1982). Sa répartition géographique se situe des côtes du Spitzberg aux côtes de Gascogne. Cette algue se développe dans les étages littoraux inférieurs et infralittoraux, où elle reste immergée en permanence, à l'exception des basses mers de fort coefficient (au moins 90) (fig. 2 et 3). De part sa position sur l'estran, *L. digitata* est exposée à une intensité lumineuse réduite, comprise entre 10 et 20 % de la lumière incidente (Lüning et *al.*, 1992). De plus, cette algue n'est que très rarement exposée à la dessiccation ou aux variations de salinité du milieu liées au marnage.

1-2 Cycle de vie, développement

L. digitata possède un cycle de vie très hétéromorphe comportant une phase haploïde filamenteuse microscopique (gamétophyte) et une phase diploïde macroscopique (sporophyte). Le sporophyte produit des spores méiotiques (zoospores) qui vont germer en gamétophytes mâles et femelles, la fécondation de ces gamètes permettant la formation de jeunes plantules (fig. 4). La taille du génome haploïde a été estimée à 640 Mpb par la technique de cytométrie de flux (Le Gall et *al.*, 1993) et le nombre de chromosomes est de 31 (Lewis et *al.*, 1996).

Les sporophytes de laminaires se décomposent en 3 parties principales : le crampon, servant à la fixation au substrat rocheux, le stipe et la lame. La croissance de celle-ci

Figure 3 : Schéma de l'estran (source Ifremer). Seules des espèces appartenant aux algues brunes sont présentées dans cette figure. Les plus exposées aux marées sont *Ascophyllum nodosum* et les différentes espèces de *Fucus*, alors qu'*Himanthalia elongata* et *L. digitata* sont situées plus bas sur l'estran.



Figure 4 : Cycle de vie hétéromorphe de *Laminaria digitata* (d'après thèse F. Crépineau, 2000), caractérisé par une alternance de phase : Une phase diploïde macroscopique (sporophyte) et une phase haploïde microscopique (gamétophyte).

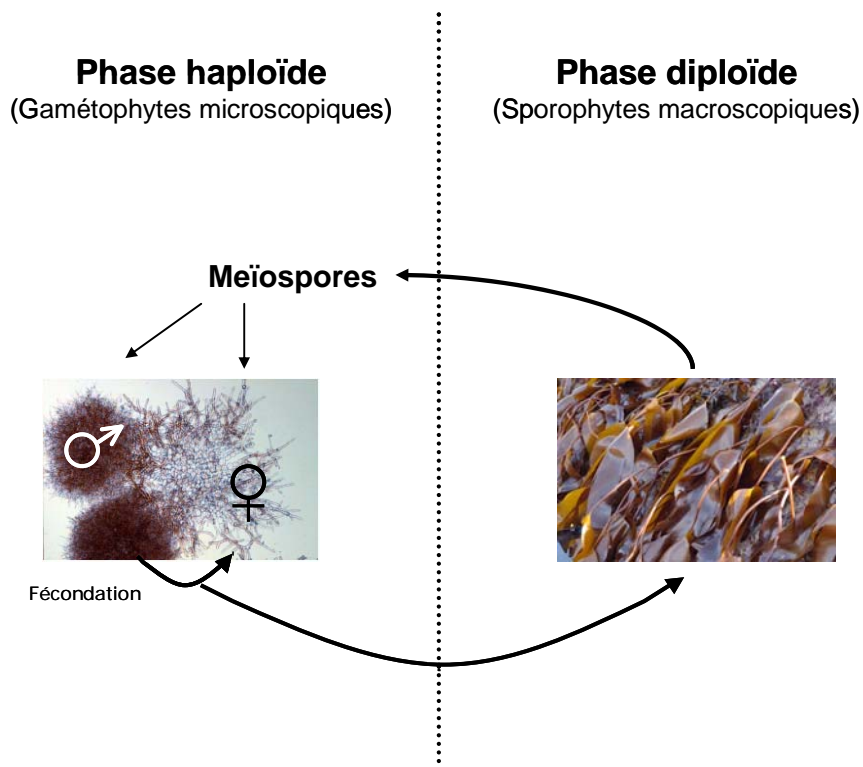


Figure 5 : Anatomie de *L. digitata*. A : Sporophyte entier. B : Coupe Transversale au niveau de la lame.

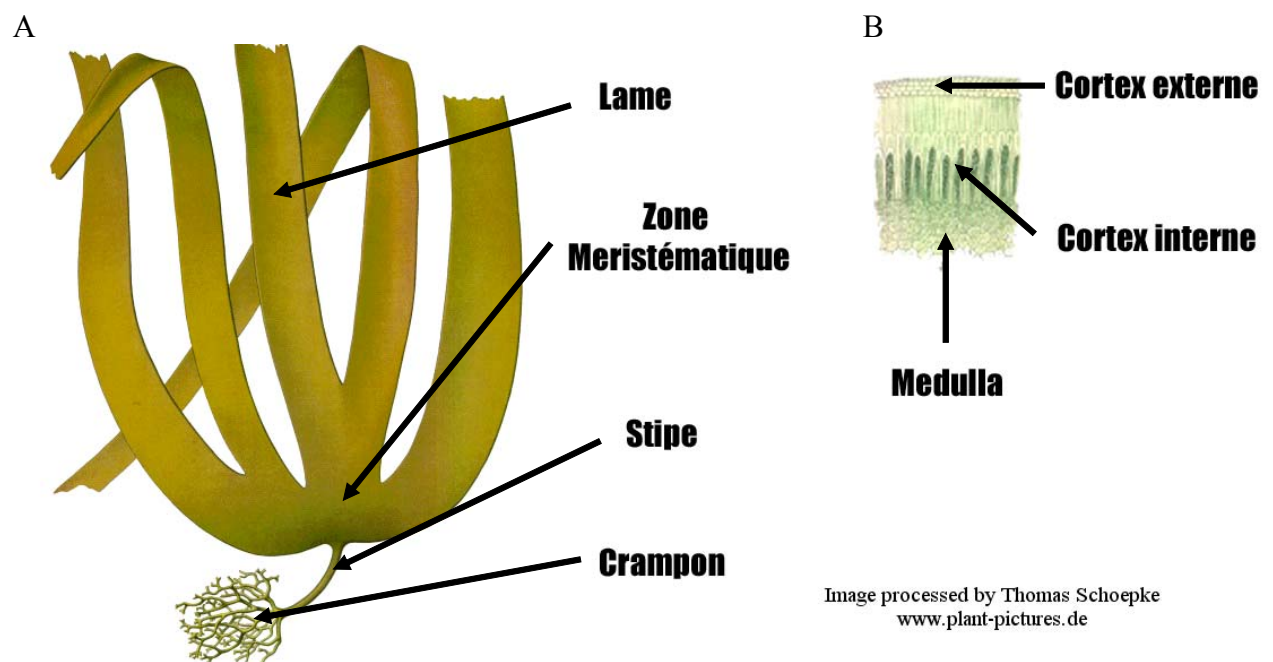


Figure 6 : Représentation théorique de la paroi des Phéophycées, d'après Kloareg et Quatrano (1988). Les chaînes de cellulose sont organisées en microfibrilles engoncées dans une matrice tridimensionnelle d'alginate. Les xylo-fuco-glycanes sont liés aux microfibrilles de cellulose par des liaisons covalentes ou des liaisons hydrogènes. Les Xylo-fuco-glycuronanes sont liés à l'alginate par une association de conformation entre leur squelette polyglycuronique et les polyguluronates. Les homofucanes n'apparaissent pas liés de façon covalente à la structure de la paroi cellulaire.

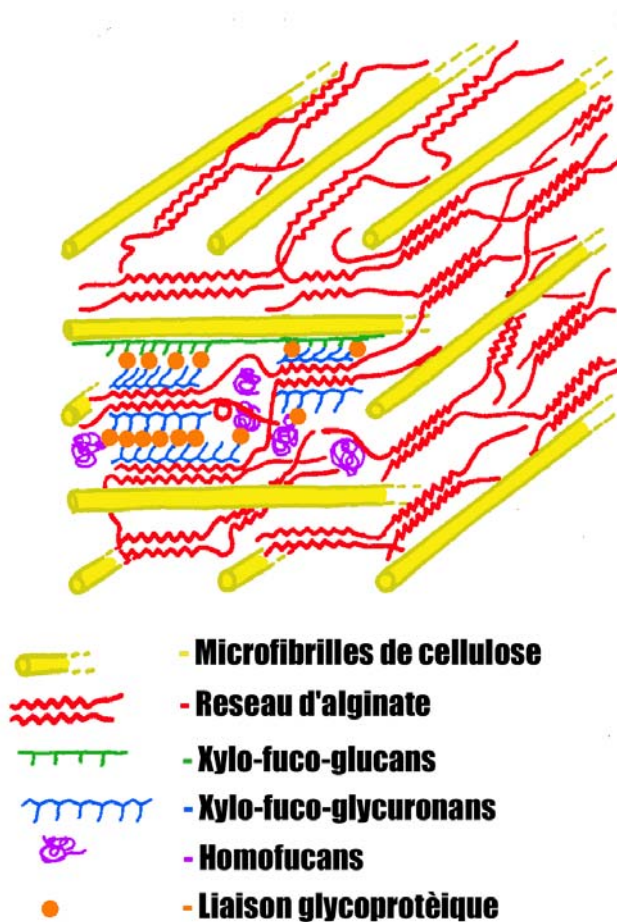
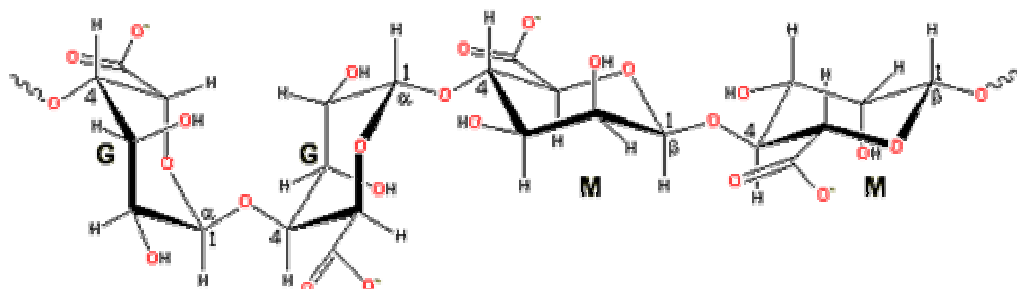


Figure 7 : Structure de l'alginate : G = acide α -L-guluronique, M = acide β -D-mannuronique



s'effectue à partir du méristème, zone reliant le stipe à la lame (fig. 5). La structure interne est différenciée en plusieurs types cellulaires. Les cellules composant la médula sont allongées, entrecroisées et forment un tissu lâche. Les cellules du cortex interne sont volumineuses, allongées et vacuolisées, tandis que les cellules du cortex externe sont plus petites, d'aspect cuboïde, riches en plastes, et recouvertes d'une couche d'alginate et de fucanes.

D'une façon générale, on observe chez les sporophytes de laminaires un pic de croissance au printemps et une période de reproduction atteignant son maximum à l'automne. Les périodes exactes dépendent des espèces et éventuellement de la localisation géographique de l'algue (Lüning, 1982).

1-3 Composition de la paroi cellulaire

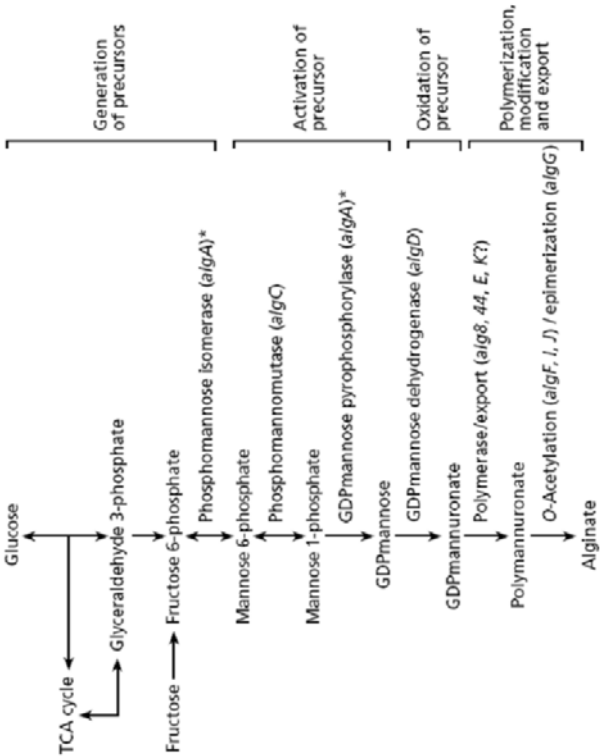
Comme pour les plantes terrestres, la paroi des algues brunes peut se diviser en 2 phases : une phase cristalline (le squelette) entourée d'une phase plus amorphe (la matrice). Cependant, la portion de matrice est beaucoup plus importante chez les algues que chez les plantes. De plus, la paroi des algues contient des polysaccharides sulfatés, qui sont absents des parois des plantes terrestres ou d'eau douce.

Le squelette est constitué de cellulose et de différents types de xylanes tandis que la matrice est composée principalement de fucanes sulfatés et d'alginate. La figure 6 (Kloareg et *al.*, 1988) présente un modèle hypothétique de l'organisation de la paroi cellulaire des algues brunes. Chez *L. digitata*, le constituant principal de la paroi est l'alginate, qui peut représenter jusqu'à 45 % de la masse sèche de l'algue (Kloareg et *al.*, 1989).

1-3-1 L'alginate, composant principal de la paroi cellulaire

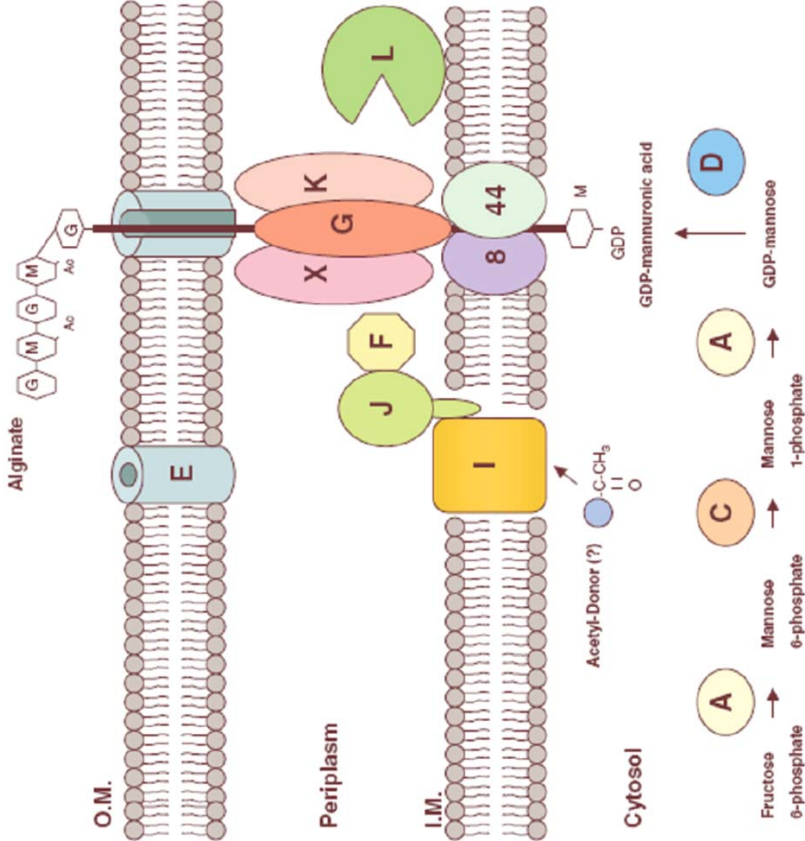
L'alginate est une chaîne linéaire constituée par l'enchaînement d'acides α -L-guluroniques (G) et d'acides β -D-manuroniques (M) liés en α -1,4 (fig. 7). Trois types de blocs peuvent former une chaîne d'alginate : les blocs MM, MG et GG. La proportion relative de ces blocs et la fréquence des sous unités M et G sont exprimées en calculant le rapport M/G (Grasdalen et *al.*, 1979). En effet, différents types d'alginate peuvent être rencontrés, avec des propriétés rhéologiques différentes. Plus une chaîne d'alginate sera riche en G, plus elle sera rigide. L'alginate n'est donc pas de composition uniforme chez *L. digitata*. En plus de modifications en fonction des saisons, le rapport M/G varie entre les différentes parties de la plante (lame, le stipe, le crampon, médula, cortex). Ainsi, la proportion en blocs G est plus

Figure 8a :différentes étapes de la synthèse de l'alginate chez *Pseudomonas aeruginosa*, d'après Gacesa (1998)



Note : * *algA* code pour l'enzyme bi fonctionnelle phosphomannose isomérase / GDP mannose phosphorylase.

Figure 8b : Modele de la biosynthèse et de l'assemblage de l'alginate chez *P. aeruginosa* d'après Ramsey et al, (2005). Schéma récapitulatif des publication recentes concernant la localisation des enzymes de biosynthèse de l'alginate dans la cellule. (Franklin et al, 2002 ; Gimmetstad et al, 2003 ; Robles-Price et al, 2004). Les lettres A à X et les nombre 8 et 44 indiquent les enzymes de biosynthèse (A pour *algA*, ETC). I.M. : membrane interne ; O.M. : membrane externe ; G : guluronate, M : mannuronate ; Ac : groupement acétyles.



importante dans le crampon ou le stipe de l'algue, les rendant plus rigides par rapport à la lame (Haug *et al.*, 1974).

Si l'alginate a été historiquement découvert chez les algues, sa voie de biosynthèse a été surtout étudiée chez les bactéries. En effet, *Pseudomonas aeruginosa*, bactérie associée aux infections pulmonaires de patients atteints de fibrose kystique (mucoviscidose), produit de l'alginate (Linker *et al.*, 1966, May *et al.*, 1991). De plus, *Azotobacter vinelandii* synthétise ce polysaccharide au cours de son processus d'enkystement. Les deux principaux précurseurs de l'alginate sont le fructose et le glucose qui sont utilisés pour former du mannose 6-phosphate. Celui-ci est activé sous la forme de GDP-mannose, qui est ensuite oxydé. Ces étapes de préparation à l'assemblage de la chaîne polysaccharidique sont effectuées dans le cytosol. La polymérisation ainsi que l'exportation de la chaîne d'alginate sont effectuées par un complexe multienzymatique situé dans le périplasme de la bactérie. Une représentation schématique de la synthèse et de l'assemblage de l'alginate chez *P. aeruginosa* est présentée en figure 8. Les gènes responsables de la biosynthèse de l'alginate chez *P. aeruginosa* sont organisés en 2 opérons. Un premier opéron regroupe les gènes codant les enzymes assurant la biosynthèse de l'alginate proprement dite. Un second opéron contient les gènes codant les facteurs de régulation du premier opéron. AlgU est le premier gène de l'opéron de régulation et régule positivement le promoteur du gène AlgD du second opéron, permettant ainsi la transcription des enzymes de biosynthèse de l'alginate. Les mécanismes de régulation de l'expression des gènes impliqués dans cette voie métabolique sont détaillés à la figure 9. Chez les algues brunes, les données relatives à la voie de synthèse de l'alginate sont beaucoup plus limitées et sont résumées dans la figure 10. Cette voie est déduite d'analyses biochimiques effectuées sur *Fucus gardneri* (Lin *et al.*, 1966) pour les 5 premières étapes, ainsi que sur *L. digitata* (Hellebust *et al.*, 1969) et *Pelvetia caniculata* (Madgwick *et al.*, 1973) pour la dernière étape. Celle-ci est réalisée par des mannuronane-C5-épimérases qui catalysent l'épimérisation des résidus M en G.

1-3-2 Intérêt économique de l'alginate

L'alginate est un hydrocolloïde, c'est-à-dire une substance composée de micro-particules solubles dans l'eau. Les premières expériences scientifiques menées sur l'extraction des alginates ont été menées par le chimiste anglais E. C. Stanford, à la fin du 19^{ème} siècle, le premier brevet relatif à l'alginate datant du 12 janvier 1881. La production industrielle d'alginates a débuté en Amérique du Nord dans les années 1930 et est estimée aujourd'hui à

Figure 9 : Organisation et contrôle des gènes de synthèse de l'alginate chez *P. aeruginosa*, d'après Gacesa (1998). La transcription des gènes localisés à 34 min sur le chromosome est sous contrôle du promoteur algD qui est régulé positivement par AlgU et AlgR. AlgU régule également de façon positive les gènes algR, algU et rpoH. AlgS (MucA), AlgN (MucB) et AlgW (MucD) atténuent l'expression, ou l'activité, d'AlgU.

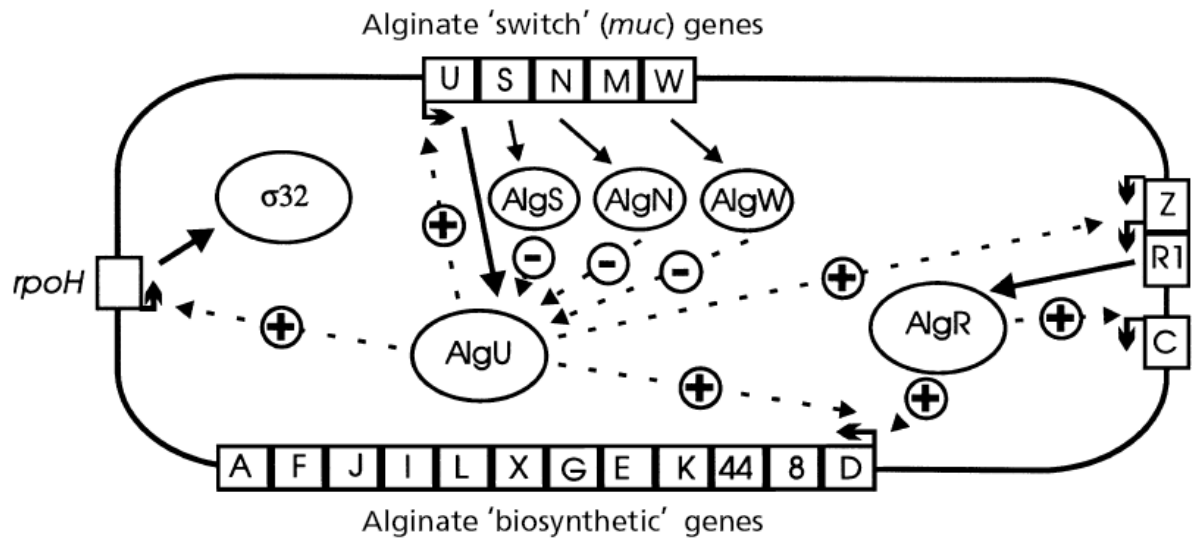
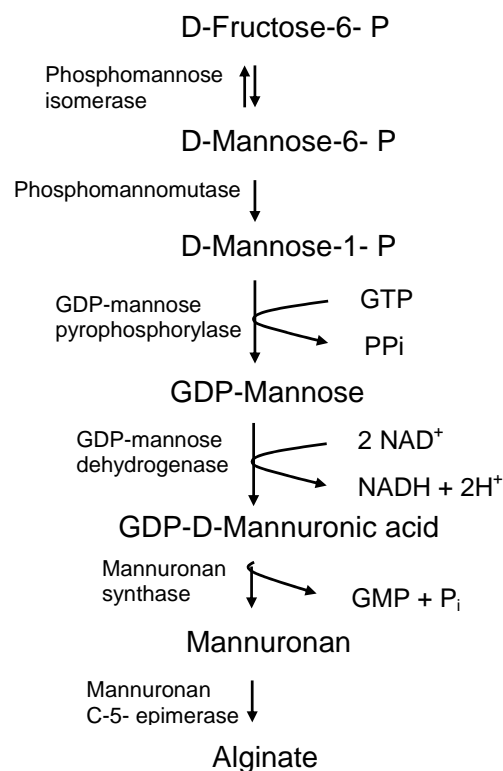


Figure 10 : Voie de synthèse de l'alginate chez les algues brunes, déduite d'analyses biochimiques. Les 5 premières étapes ont été démontrées chez *Fucus gardneri* (Lin et al., 1966), la dernière étape a été démontrée chez *L. digitata* (Hellebust, 1969).



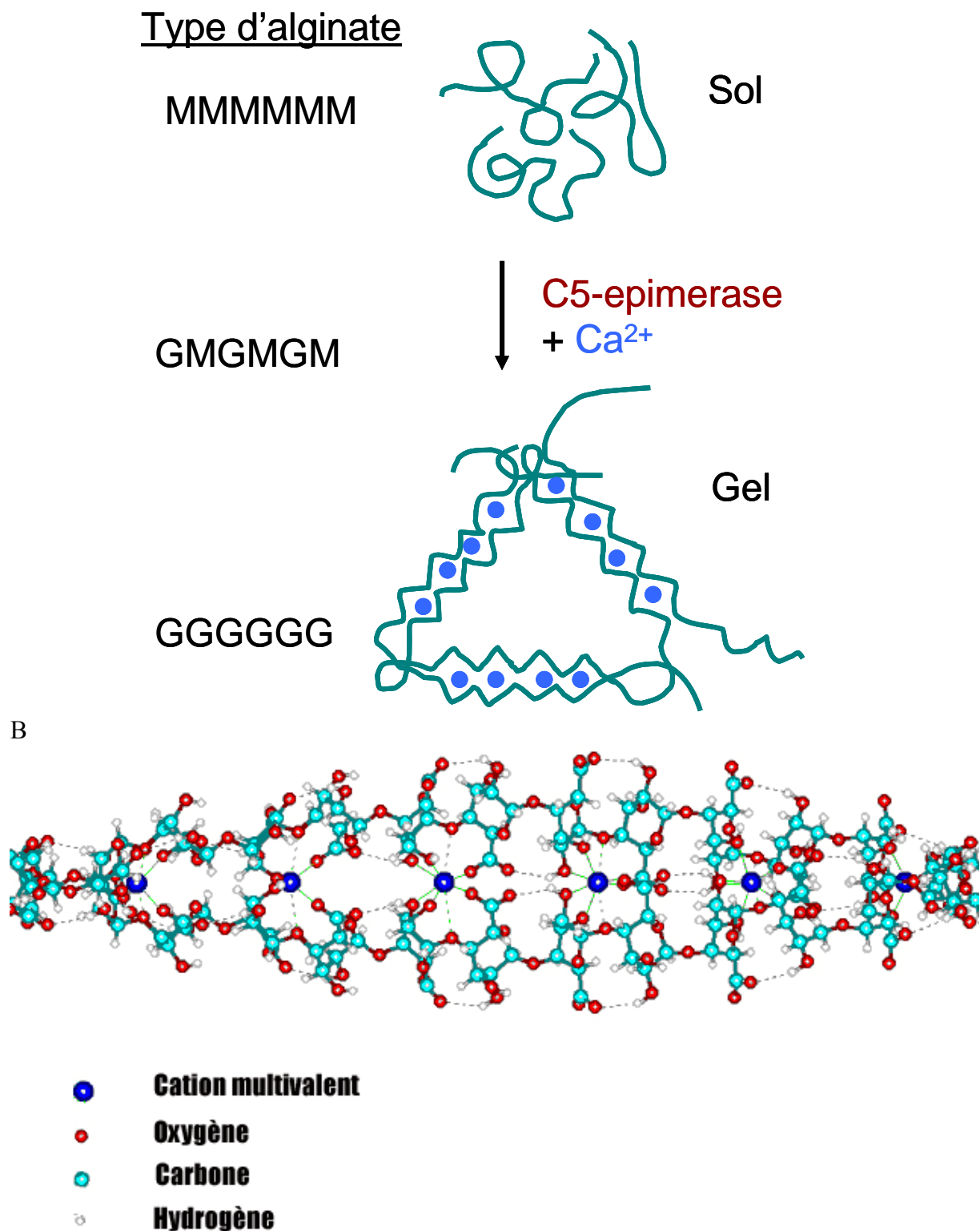
environ 30 000 tonnes au niveau mondial. Différents types de produits sont obtenus en fonction des traitements effectués. L'alginate se présente principalement sous forme d'acide alginique et de sels d'alginate. Les laminaires constituent la seule source d'alginate économiquement rentable, en comparaison de la production de ce polysaccharide par des bactéries. En France, et principalement en Bretagne occidentale, les champs naturels de *L. digitata* sont exploités pour fournir la matière première nécessaire à l'extraction des alginate.

La capacité de l'alginate à former différents types de gels résulte de la présence de blocs G au sein de la chaîne polysaccharidique. En présence d'ions divalents, dont le Ca^{2+} , les chaînes d'alginate, au niveau uniquement des blocs G, vont se dimériser, puis former des agrégats si la concentration en sel calcique est élevée (Smidsrod et *al.*, 1996) (fig. 11). On obtient alors des gels d'alginate calciques qui sont durs, rigides et thermostables. Cette capacité de gélification à froid est une des différences entre les alginate et l'agar (extrait des algues rouges). Les alginate sont employés dans les industries agro-alimentaire et textile, pour la fabrication de papier, dans le traitement des eaux, et enfin en cosmétique, pharmacie et médecine.

L'industrie agroalimentaire est la principale utilisatrice d'alginate. En tant qu'additif alimentaire (codés selon les numéros E400 à E405 dans les compositions d'aliments), l'alginate permet d'améliorer, de modifier, de stabiliser la texture d'aliments pour lesquels la viscosité, la gélification ainsi que le besoin de stabilisation de composés aqueux sont d'importants paramètres. Si certaines de ces propriétés sont intrinsèques à la molécule d'alginate, d'autres sont inhérentes à l'interaction de celle-ci avec les composés constituant l'aliment (tels que les protéines, les acides gras...). Par exemple, l'alginate interagit avec les résidus protéiques chargés positivement des protéines dénaturées. Ces propriétés sont notamment utilisées pour la préparation des aliments pour animaux et des viandes recyclées.

Les alginate sont utilisés dans l'industrie textile car ils sont inertes par rapports aux colorants, aux fibres et favorisent la fixation des colorants tout en contrôlant leur migration au cours de l'impression. Les alginate sont aussi utilisés pour traiter la surface des papiers (coloration, glaçage, couchage des papiers de luxe). Les alginate sont utilisés dans le traitement des eaux de surface pour éliminer les matières en suspension. L'alginate est une molécule d'intérêt pour l'industrie pharmaceutique où il est principalement considéré pour ses propriétés gélifiantes (notamment dans la formulation de composés anti-reflux gastriques). Plus récemment, l'alginate a été utilisé pour enrober des cellules. Celles-ci sont mises en suspension dans une solution d'alginate de sodium qui se gélifie après ajout d'une solution contenant des cations multivalents. Les cellules se retrouvent prisonnières dans une matrice

Figure 11 : Représentation de l'organisation type « boîte à œuf » des chaînes d'alginate en présence du cation divalent Ca^{2+} . A : Transition sol-gel de l'alginate en présence de Ca^{2+} ; B : Structure tri-dimensionnelle d'un gel d'alginate (<http://www.lsbu.ac.uk/water/hyalg.html>). A



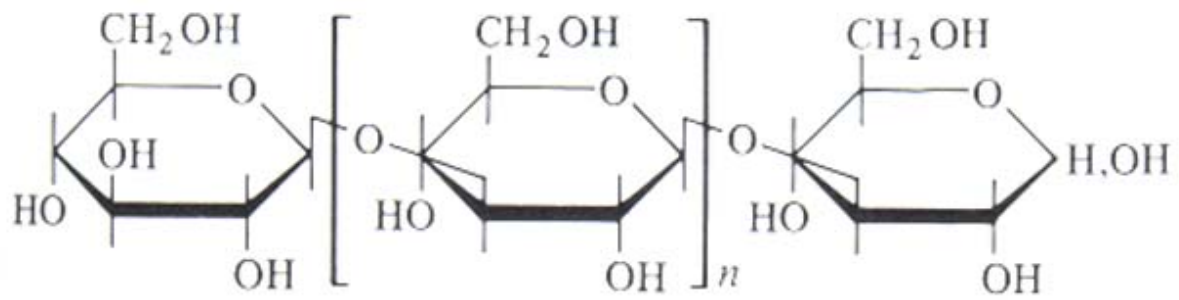
tridimensionnelle. Ce procédé permet d'envisager une transplantation cellulaire, la paroi d'alginate agissant comme barrière contre le système immunitaire. Les alginates sont également incorporés dans le latex, les peintures, les plâtres de moulure, les céramiques, les colles, les résines, les mines de crayon, certains produits horticoles et certaines bombes aérosols.

1-4 Polysaccharides de stockage et oligosaccharides stimulants les mécanismes de défense des plantes

Les polysaccharides de réserve des algues brunes sont la laminarine et le mannitol. Le mannitol est un sucre à 6 carbones acyclique. Il est synthétisé par divers groupes d'organismes incluant les bactéries (Wisselink et *al.*, 2002), les champignons (Jennings et *al.*, 1984), les algues (Ben-Amotz et *al.*, 1983, Kremer et *al.*, 1982), les lichens (Armstrong et *al.*, 1998) et les plantes supérieures (Bielecki et *al.*, 1982). La fonction supposée du mannitol chez *L. digitata* est celle d'un composé de stockage. Les quantités de mannitol présents dans les lames de *L. digitata* varient au cours de l'année, atteignant une quantité maximum au mois d'Octobre et un minimum au mois de Mars (Haug et *al.*, 1956). De plus, il apparaît que des augmentations de l'accumulation de mannitol soient observées chez diverses algues brunes en cas d'exposition à un milieu hyper-salin (Reed et *al.*, 1985). Le métabolisme du mannitol chez les algues brunes est très peu connu. Cependant, le mannitol apparaît comme le principal produit de la photosynthèse chez les algues brunes (Yamaguchi et *al.*, 1966). Il peut composer jusqu'à 30% de la masse sèche de l'algue, même si des variations s'observent entre différentes espèces (Reed et *al.*, 1985).

La laminarine est un polysaccharide constitué de sous-unités de glucanes liées en β 1-3 (fig. 12). Ce glucane a été décrit par Schmiedeberg en 1885 et il a été observé depuis que sa présence est ubiquitaire chez les algues brunes (Quillet et *al.*, 1958). La biosynthèse de la laminarine, ainsi que sa dégradation, restent à l'heure actuelle peu étudiées. On peut toutefois supposer des analogies avec la biosynthèse du paramylon chez le protiste *Euglena gracilis*. Il apparaît probable que la chaîne linéaire de β -D-glucoses liés en 1-3 soit formée par transferts enzymatiques successifs de D-glucose à partir d'UDP-glucose ou un autre nucléoside diphosphate D-glucose. L'accepteur initial de cette réaction pourrait être le mannitol ou un oligosaccharide contenant du mannitol. La dégradation de la laminarine pourrait théoriquement être effectuées par des voies métaboliques phosphorolytiques ou hydrolytiques

Figure 12 : Schéma simplifié d'une chaîne de laminarine (β 1,3-glucane).
 $\beta(1\rightarrow3)$



(Manners et *al.*,1982). Cependant, aucune enzyme de ces voies de dégradation n'a été identifiée chez les algues brunes. Chez *L. digitata*, la laminarine est présente dans la partie distale de la fronde et est invariablement absente du stipe et de la partie basale de la fronde (Black et *al.*,1954). La fonction généralement attribuée à la laminarine chez *L. digitata* est celle d'un polysaccharide de stockage. Sa quantité varie en fonction des saisons et des besoins de l'algue : celle-ci est quasi absente en hiver et peut atteindre 10 à 20 % de la masse sèche de la fronde en fin d'automne (Johnston et *al.*,1977). Il a été observé que les quantités d'alginate évoluent de façon opposée à celles du mannitol et de la laminarine au cours de l'année. Ainsi les quantités de laminarine et de mannitol sont très importantes vers octobre, cette période correspondant à la plus faible quantité d'alginate présente chez l'algue (Haug et *al.*,1956). Lorsque ces observations sont comparées à la croissance de l'algue, on observe que le pic de laminarine et de mannitol (automne) correspond à la période de reproduction tandis que le pic d'alginate (printemps) correspond à la période de croissance.

Des expériences récentes (Klarzynski et *al.*, 2000) ont montré que l'exposition de plants de tabacs à de la laminarine entraînait la production rapide et massive de peroxyde d'hydrogène chez la plante (phénomène appelé burst oxydatif), sans provoquer de mort cellulaire. De plus, il a été observé qu'après 5 jours de traitement, la résistance des plants de tabac à l'attaque par des pathogènes microbiens est grandement renforcée. La laminarine apparaît donc comme un éliciteur effectif chez le tabac, permettant la mise en place de systèmes de défenses efficaces et durables (Klarzynski et *al.*, 2000). D'autres molécules issues d'algues brunes telles que les fucanes sulfatés ont montré des effets similaires à la laminarine (Klarzynski et *al.*, 2002). L'utilisation de ces molécules extraites d'algues sur des cultures économiquement importantes (blé, maïs, pomme de terre...) permet de limiter l'utilisation de fongicides en retardant le moment de leur application dans les champs. Ce phénomène est généralement comparé de façon vulgarisatrice à la vaccination chez l'homme. Une formulation à base de laminarine est disponible dans le commerce depuis le printemps 2003, sous le nom de Iodus 40[®] (www.goemar.com). Elle est utilisée en tant que stimulateur des défenses du blé, notamment contre la septoriose du blé.

1-5 Intérêt économique en quelques chiffres

En 1999, environ 760 077 tonnes sèches de laminaires, toutes espèces confondues, ont été récoltées dans le monde. Les deux principaux pays producteurs de laminaires sont la

Figure 13 : Four à Goémon des côtes bretonnes



Chine (644 464 tonnes sèches) et le Japon (56 000 tonnes sèches) qui pratiquent l'aquaculture de *Laminaria japonica*. En 1996, *L. japonica* était l'espèce d'algue la plus cultivée (4,17 millions de tonnes) pour une valeur économique de 2,95 milliards de dollars. Par opposition aux algues cultivées utilisées en Asie et en Amérique du sud, ce sont principalement des populations naturelles qui sont utilisées en Europe et en Amérique du Nord. Cet intérêt économique pour les laminaires provient principalement de leur capacité à concentrer l'iode et des polysaccharides qu'elles produisent.

1-6 Concentration de l'iode

La première extraction d'iode à partir d'algues marines a été réalisée en 1811 par Courtois alors qu'il tentait d'extraire du nitrate de potassium à partir de ces organismes. Il a été mis en évidence par la suite que les laminaires possédaient la capacité de concentrer l'iode jusqu'à une teneur intracellulaire 30 000 fois supérieures à celle de l'eau de mer (Black et al, 1948 ; Young et *al.*, 1958 ; Saenko et *al.*, 1978), ce qui en faisait une source majeure de cet élément. L'iode possède des applications diverses, notamment en médecine, où il est utilisé comme désinfectant ou encore en photographie. L'iode est également présent dans la thyroïde, l'absence d'iode dans l'alimentation menant à l'apparition de goitres. Sur les côtes bretonnes, l'iode était récupéré lors de la combustion de l'algue dans des fours à goémon (fig. 13). Cette méthode de production d'iode a été utilisée jusque dans les années trente. A l'heure actuelle, seule la Chine continue d'extraire de l'iode à partir de laminaires (Wu et *al.*, 1987). En effet, les méthodes de récupération de d'iode au cours de l'extraction de minéraux ou de gaz ont évolué, rendant la production d'iode à partir des algues économiquement non rentable.

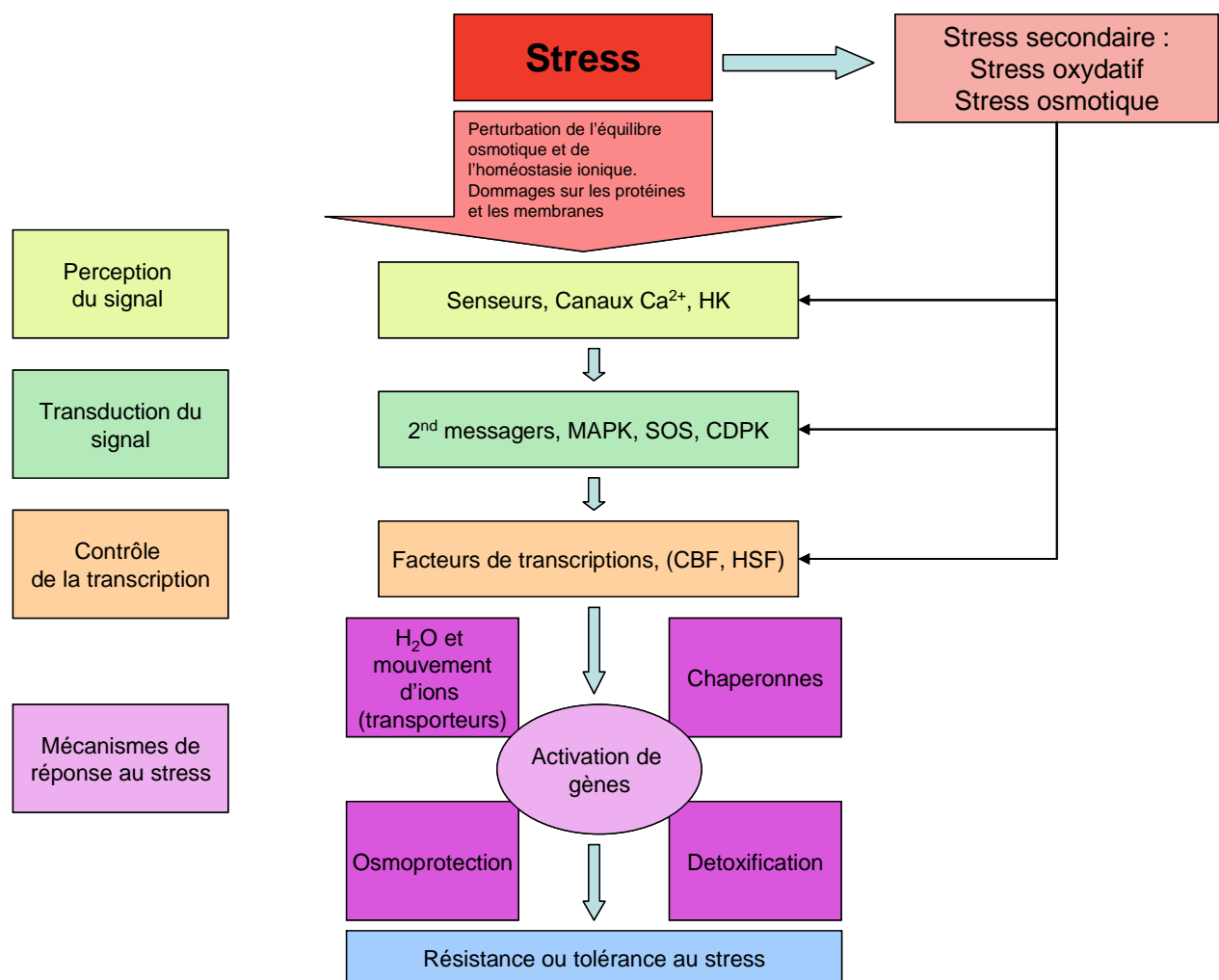
2- Le stress : perception, transduction du signal et mécanismes de réponse

Le mot « stress » est apparu autour de 1940. Il s'agissait d'un mot anglais, employé en mécanique et en physique, qui voulait dire « force, poids, tension, charge ou effort ». Ce n'est qu'en 1963 que Hans Selye utilise ce mot en médecine, où il définit « des tensions faibles ou fortes, éprouvées depuis toujours, et déclenchées par des événements futurs désagréables ou agréables ». C'est cette définition moderne du stress que nous employons couramment aujourd'hui.

Claude Bernard fut le premier à dégager une notion physiologique du stress en 1868. Selon lui, les réactions déclenchées par le stress visaient à maintenir l'équilibre de notre organisme. L'ensemble de ces réactions internes a été nommé homéostasie par le physiologiste américain C. W. Bradford (1915), à partir du grec stasis (état, position) et homoios (égal, semblable à). Il y inclura en outre la notion de stress. Le lien stress-homéostasie-adaptation va perdurer jusqu'à nos jours et les recherches menées concernant ces processus sont à la base d'une littérature abondante. L'association de ces trois notions constitue l'approche biologique du stress et permet notamment d'expliquer l'influence du stress qui est de permettre, lorsqu'il est appliqué dans certaines limites, l'adaptation à l'environnement, et donc au maintien de la vie.

D'une façon plus générale, on peut dire qu'au niveau cellulaire, un stress est causé par la variation d'un paramètre environnemental qui entraîne la mise place des mécanismes de régulation de l'homéostasie. Les organismes sont généralement soumis à deux types de stress : les stress biotiques (dûs à une agression par autre organisme) et les stress abiotiques (qui sont principalement dûs à des facteurs environnementaux). Les études portant sur les mécanismes de réponse au stress sont nombreuses et sont menées à différentes échelles. Dans ce manuscrit, j'ai choisi de présenter les connaissances acquises sur la réponse au stress des plantes supérieures. Les stress chez les plantes terrestres supérieures est largement étudié et est source de nombreuses publications. Ces études constituent une base solide pour étudier et décrire des mécanismes encore inconnus chez les macro-algues, eucaryotes photosynthétiques soumis à des stress différents du fait de leur habitat marin.

Figure 14 : Représentation générale de la réponse au stress chez les plantes (D'après Wang et al., 2003).



2-1 Le stress chez les plantes supérieures.

Les stress abiotiques sont responsables d'une perte de rendement estimée à 50 % pour les cultures les plus répandues (Bray et *al.*, 2000). Ils constituent donc des facteurs limitant non négligeables pour l'agriculture mondiale. Ces stress se traduisent par des changements morphologiques, physiologiques, biochimiques et moléculaires qui affectent négativement la croissance de la plante et sa productivité (Wang et *al.*, 2001).

En condition de stress abiotique, les plantes mettent en place un système de réponse complexe, impliquant plusieurs étapes, plus ou moins spécifiques du type de stress (fig. 14). Dans cette partie, je traiterai donc des différents mécanismes et étapes de réponses au stress chez les plantes, de la perception des variations du milieu jusqu'à l'expression de protéines assurant le maintien de l'homéostasie cellulaire.

2-1-1 La perception du stress et les différents types de senseurs

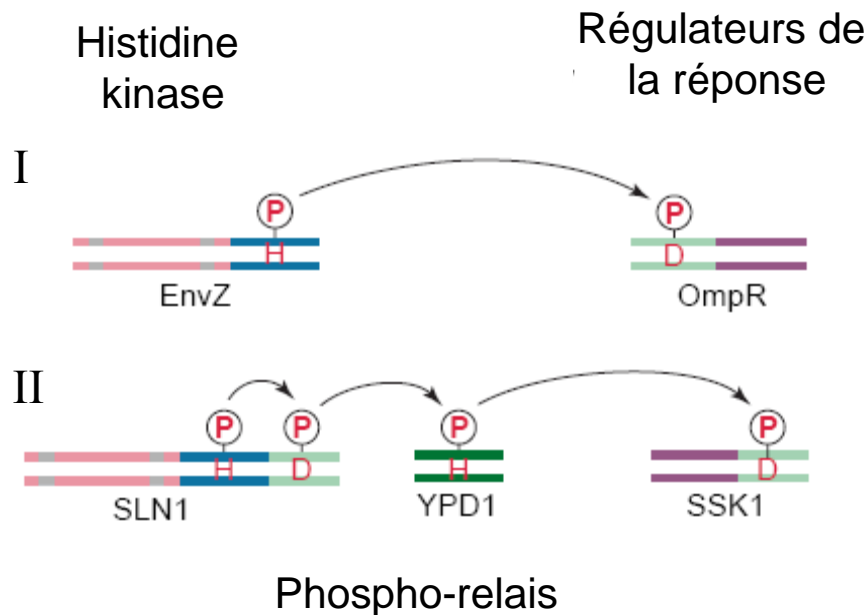
Les conditions de stress abiotique constituent une source de signaux complexes pour les cellules. Un seul type de stress correspond à des variations physiques et/ou chimiques, ces composantes représentant pour la plante des informations différentes. Par exemple, une diminution de température entraîne des contraintes mécaniques, un changement dans l'activité des macro-molécules, ainsi que des modifications des conditions osmotiques du milieu extracellulaire. Les cellules végétales ne possèdent pas un récepteur spécifique d'un stress donné, mais plutôt un ensemble de récepteurs qui vont être sollicités par les différentes composantes du stress.

Parmi les récepteurs identifiés, on trouve les canaux Ca^{2+} . En condition de stress thermique ou salin, il a été observé chez les plantes un influx de calcium dans le cytoplasme. Ce calcium provient soit de l'extérieur de la cellule, soit de stocks internes (Knight et *al.*, 2000). Cet influx résulterait d'une activation des canaux calciques induite par les changements structuraux de la cellule. Cette supposition résulte des études de Pieth (1999) montrant les liens entre les flux de Ca^{2+} et la température, considérant que la réorganisation du cytosquelette et la fluidité de la membrane plasmique sont les premiers changements structuraux liés au froid (Orvar et *al.*, 2000 ; Sangwan et *al.*, 2001 ; Wang et *al.*, 2001).

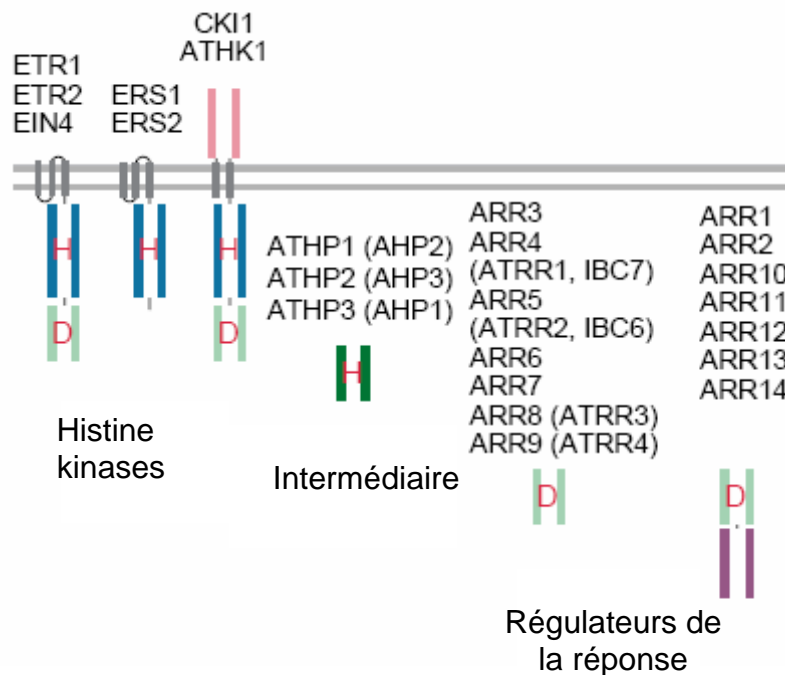
Les histidine kinases (HK) représentent un autre récepteur du stress identifié chez les bactéries et les plantes. Ces enzymes transmettent un signal externe vers

Figure 15 : Différents systèmes de transduction du signal par phospho-relais (d'après Urao et *al.*, 2000). A : système de transduction du signal à 2 composants chez *E. coli* (I) et *Saccharomyces cerevisiae* (II) ; B : histidines kinases chez *A. thaliana*. Le domaine extra-cellulaire est marqué en rose, la région transmembranaire en gris, le domaine kinase en bleu, le domaine récepteur en vert clair, le domaine de réponse en violet. H pour histidine, D pour aspartate.

A



B



l'intérieur de la cellule par un système de phospho-relais à 2 composants. Chez *E. Coli*, les réponses osmotiques sont contrôlées par le système EnvZ-OmpR. Les changements osmotiques du milieu sont perçus par EnvZ, ce qui a pour effet de moduler les activités kinases et phosphatases de cette enzyme. En cas d'hyper-osmolarité du milieu, une histidine du domaine kinase d'EnvZ est phosphorylée. Cette phosphorylation est suivie d'un transfert du groupe phosphorylé sur le régulateur OmpR. Dans le cas d'une hypo-osmolarité du milieu, OmpR est déphosphorylé. L'état de phosphorylation de OmpR influence ses propriétés de liaison à l'ADN, lui permettant de réguler la transcription de gènes cibles. Un système analogue, mais comprenant plus de 2 composants a été identifié chez les levures et les plantes. Ce système fonctionne de façon similaire au système à 2 composants mais inclut un ou plusieurs intermédiaires entre le récepteur membranaire et le facteur de transcription. Ces éléments intermédiaires sont nommés HPt (Histidine containing Phosphotransfer) (fig. 15) (Urao et *al.*, 2000). De tels systèmes ont été identifiés notamment chez *A. thaliana* (fig. 15). En effet, la protéine AtHK1 est fortement suspectée d'être un capteur osmosensible chez cet organisme modèle. AtHK1 possède deux régions hydrophobes trans-membranaires adjacentes à un domaine extra-cellulaire putatif situé en N-terminal, suggérant une homologie fonctionnelle avec l'osmosenseur de levure SLN1. L'expression d'AtHK1 dans des levures mutantes ne possédant pas l'osmosenseur SLN1 permet à ces dernières de se développer normalement en conditions hyper-osmotiques (Urao et *al.*, 1999). Cependant, ces protéines HK interviennent aussi dans la perception d'autres signaux, tels que l'éthylène et les cytokines (Urao et *al.*, 2001).

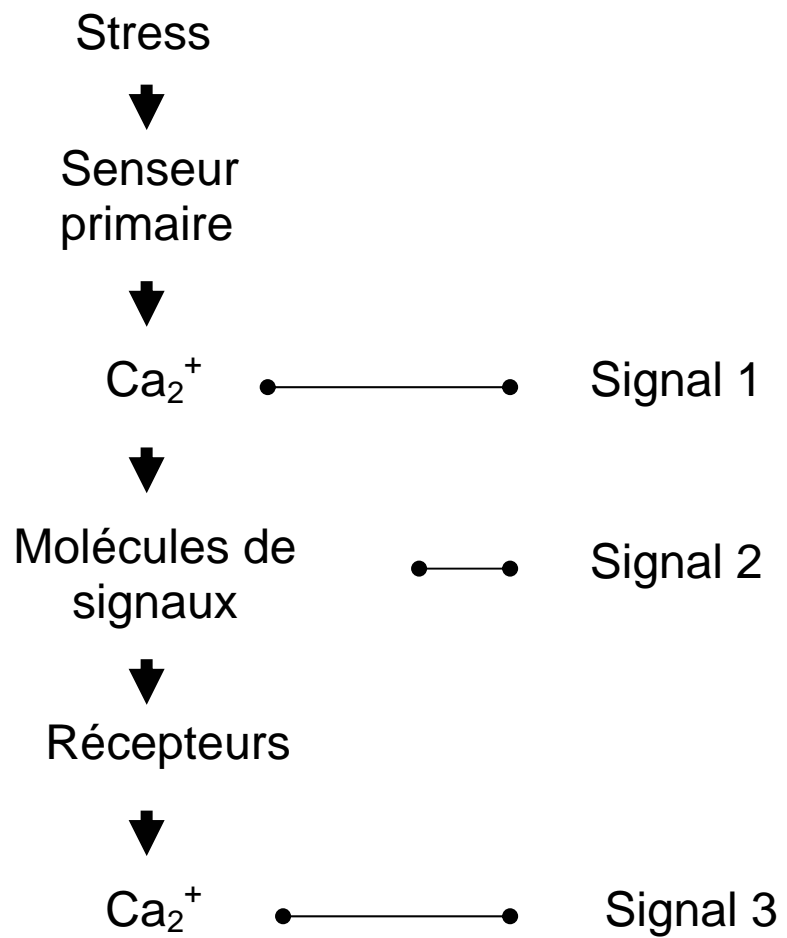
2-1-2 Transduction du signal

Suite à la perception du stress, le signal créé par les récepteurs doit être transmis à l'intérieur de la cellule. Cette transduction du signal est assurée par des seconds messagers qui vont activer des voies enzymatiques assurant le fonctionnement de la cascade de réaction et permettant à la cellule de répondre au stress perçu.

2-1-2-1 Le calcium

L'entrée de Ca^{2+} dans les cellules végétales a été observée en condition de stress abiotique, mais également lors de stress hormonaux (ABA : acide abscissique), biotiques ou lors de processus liés au développement. Cette augmentation transitoire de la concentration

Figure 16 : Signaux calciques transitoires après perception du signal de stress d'après Xiong et *al.* (2002).

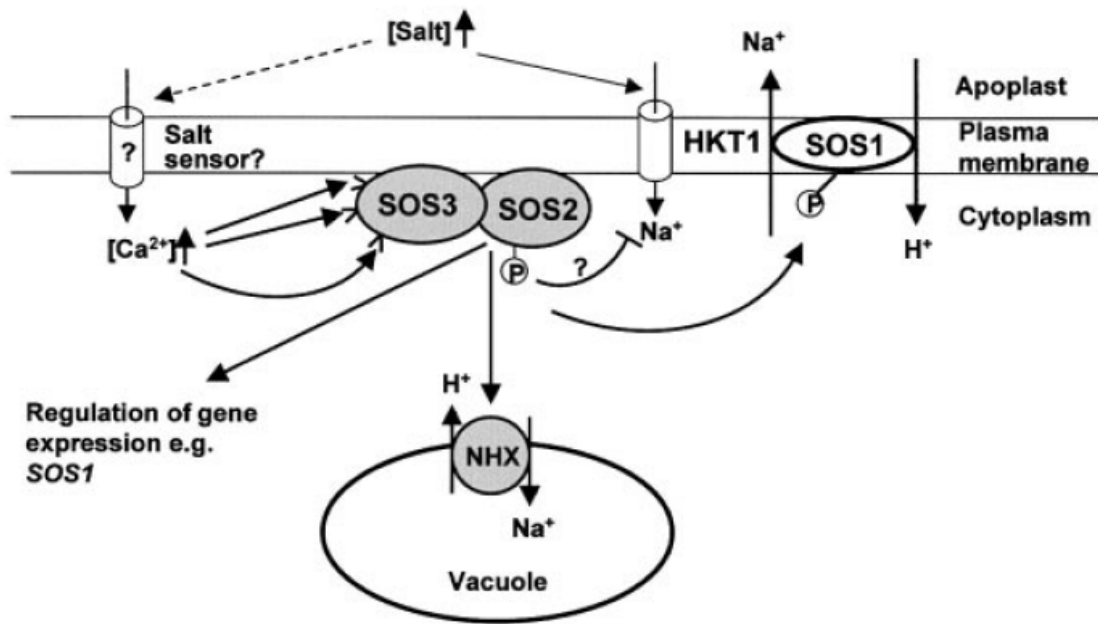


interne de calcium est due soit à un influx de calcium extracellulaire soit à une libération des stock intracellulaires (Knight et *al.*, 2000, Sanders et *al.*, 1999). La libération interne de Ca^{2+} est contrôlée par des canaux dépendant de ligands. Ces ligands sont les seconds messagers décrits chez les cellules animales (inositol polyphosphates, ribose ADP cyclique), qui ont une action similaire chez les plantes (Schroeder et *al.*, 2001). Ainsi la libération primaire de Ca^{2+} constitue un signal dont l'une des conséquences sera la production d'autres seconds messagers qui eux-mêmes provoqueront la libération interne de Ca^{2+} , chacune de ces différentes étapes provoquant une cascade de réactions (fig. 16). Un aspect important du Ca^{2+} en tant que messenger est la présence d'oscillations régulières de concentrations. Ces oscillations spécifiques sont par exemple responsables de la fermeture des stomates (Allen et *al.*, 2000). De plus, ces variations dépendent de stress particuliers (Kiegle et *al.*, 2000), de l'intensité du stress (Plieth et *al.*, 1999) ainsi que de l'exposition précédente aux mêmes conditions de stress (Knight et *al.*, 1997).

2-1-2-2 La voie SOS

Parmi les voies métaboliques activées par le calcium et participant à la transduction du signal, une des plus étudiées à l'heure actuelle est la voie SOS (Salt Overly Sensitive). L'analyse de mutants SOS chez *A. thaliana* a permis l'identification de 3 protéines (SOS1, SOS2, SOS3), impliquées dans la réponse au stress salin. Le processus impliquant les SOS débute après la fixation de calcium sur la protéine SOS3 qui contient 3 sites de fixation du calcium et un site de N-myristylation (Ishitani et *al.*, 2000). Les modifications conformationnelles provoquées par la liaison de Ca^{2+} à SOS3 vont permettre sa fixation à SOS2. Cette serine/thréonine kinase comporte un site catalytique kinase en N-terminal et une partie régulatrice très longue en C-terminal (Liu et *al.*, 2000). En condition normale, les sites régulateurs et catalytiques interagissent entre eux, empêchant la phosphorylation d'un substrat car il y a blocage de l'accès au site catalytique. La fixation de SOS3 à la partie régulatrice permet de libérer la partie catalytique (Halfter et *al.*, 2000). L'interaction entre SOS2 et SOS3 se ferait grâce à la présence sur la partie régulatrice de SOS2 du motif peptidique FISL, dont la présence est nécessaire et suffisante pour une activation de cette protéine (Guo et *al.*, 2001). La première cible identifiée est SOS1, un antiport Na^+/H^+ situé dans la membrane plasmique, qui serait activé suite à la phosphorylation catalysée par la kinase du complexe SOS2-SOS3 (Quintero et *al.*, 2002) (fig. 17). La reconstitution fonctionnelle de cette voie chez *Saccharomyces cerevisiae* a permis de vérifier que l'influx de calcium consécutif à un stress

Figure 17 : Régulation de l'homéostasie ionique suivant un stress salin d'après Chinnusamy et *al.* (2004). Les flèches indiquent une régulation positive, les traits une régulation négative. SOS ; Salt Overly Sensitive, NHX ; échangeur Na^+/H^+ vacuolaire, HKT1; Histidine kinase. :

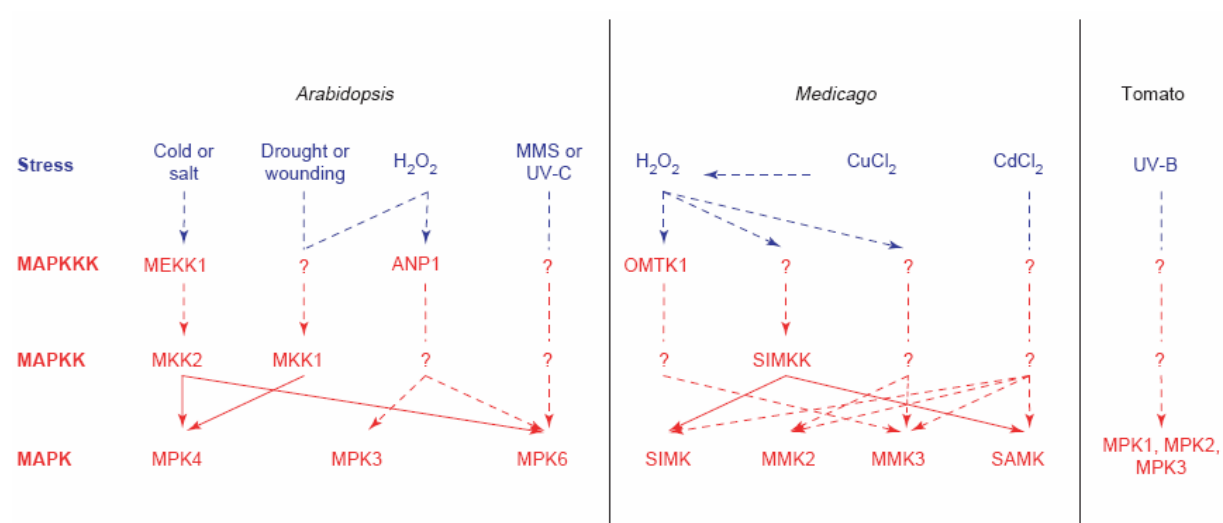


salin déclenchait la voie SOS (Quintero et *al.*, 2002). D'autres cibles pour la voie SOS ont depuis été suggérées, notamment AtHK1 dont l'activité serait régulée par SOS2-SOS3 (Zhu et *al.*, 2002). Ce même système serait activateur de l'antiport Na^+/H^+ des vacuoles (Qiu et *al.*, 2003). De même, d'autres protéines similaires à SOS3 (nommées ScaBPs) et SOS2 (nommées PKSs) ont été identifiées chez *A. thaliana* (Guo et *al.*, 2001). Des études menées par inhibition de certains de ces gènes indiquent que les protéines ScaBP5 et PKS3 interagiraient entre elles de façon analogue à SOS2 et SOS3. Le complexe formé permettrait de transmettre le signal résultant de l'influx de calcium provoqué par la présence d'ABA. On peut donc supposer que des systèmes analogues au système SOS sont impliqués dans les mécanismes de réponses à d'autres stress que les stress salins.

2-1-2-3 Les Protéines kinases dépendantes du calcium (CDPKs)

Au contraire des kinases de type SOS2 et PKS, les CDPK (Protéines kinases dépendantes du Calcium) interagissent directement avec le calcium. Les CDPKs possèdent une structure caractéristique composée d'un domaine sérine / thréonine protéine kinase qui est fusionné en C-terminal à un domaine calmoduline-like, contenant des sites de fixation aux calcium (Cheng et *al.*, 2002 ; Harmon et *al.*, 2001). Le domaine de jonction entre les domaines kinase et calmoduline-like agit comme un substrat auto-inhibiteur de phosphorylations en absence de calcium, réduisant ainsi l'activité de la protéine (Harmon et *al.*, 1994). Trente-quatre gènes codants des CDPKs ont été identifiés chez *A. thaliana*. Si les domaines catalytiques et régulateurs sont bien conservés, on observe des variations importantes dans la portion N-terminale, dont la longueur peut varier de 21 à 85 acides aminés et présenter des pourcentages d'identité variant entre 15 % et 91 % (Harmon et *al.*, 2001 ; Hrabak et *al.*, 2000). Les recherches menées sur ces enzymes ont montré leur implication dans une variété de voies de réponses à différents stress. Par exemple, la sur-expression chez le riz (*Oryza sativa*) d'OsCPK7 entraîne une augmentation de la tolérance au froid, à la sécheresse et au stress salin (Saijo et *al.*, 2000). La surexpression d'AtCPK1 dans des protoplastes de tomate (*Lycopersicon esculentum*) aboutit à une induction de l'activité de la NADPH oxydase et du burst oxydatif (Xing et *al.*, 2001).

Figure 18 : Voies des MAPK kinases activées lors de différents stress chez *A. thaliana*, *Medicago trunculata* et la tomate (.Nakagami et *al.*, 2005). Les flèches en pointillés représentent des interactions potentielles, les points d'interrogation représentent des composants/intermédiaires inconnus.

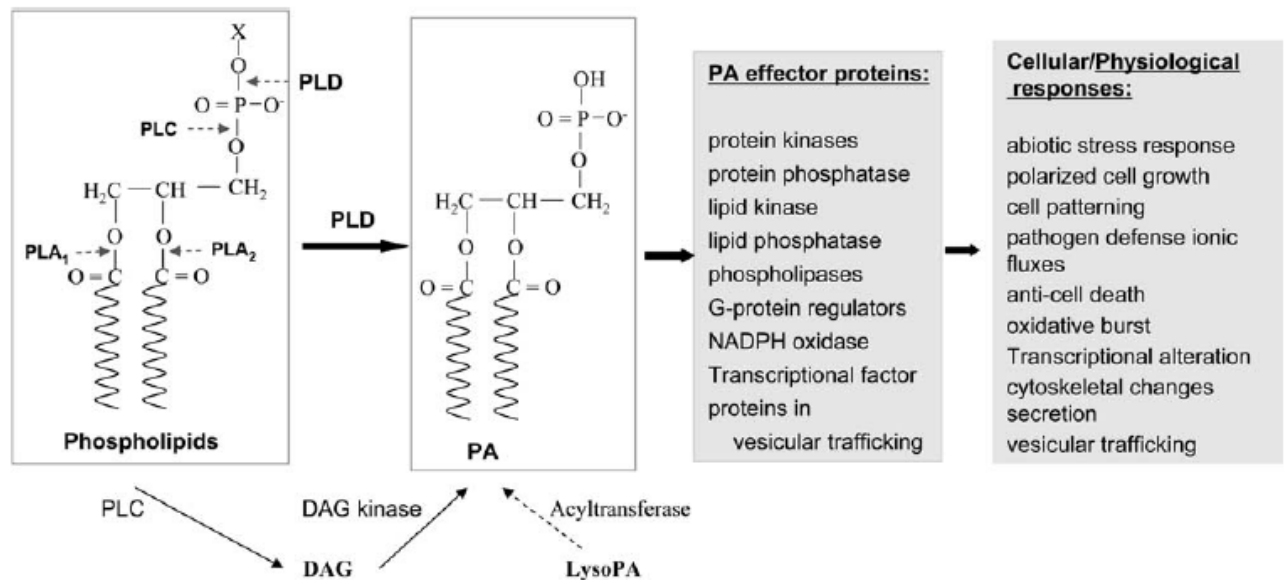


2-1-2-4 Les voies des MAPKinases

La cascade type de la voie des MAPKinases (mitogen activated proteine kinases) est constituée du système MAPKKK-MAPKK-MAPK (fig. 18). Cette cascade est activée soit par une interaction physique directe entre le récepteur et une MAPKKK soit par la phosphorylation de médiateurs externes ou de MAPKKKK intermédiaires, provoquée par ces mêmes récepteurs. Les MAPKKK sont des sérine / thréonines kinases qui activent les MAPKK par la phosphorylation de 2 résidus sérine / thréonine placés au sein d'un motif conservé ST-X_{3,5}-S/T. Ces MAPKK sont des kinases à spécificité double qui phosphorylent les thréonine et tyrosine des MAPK sur le motif TXY. Les MAPK sont des sérines / thréonines kinases qui phosphorylent une variété de substrats, parmi lesquels des facteurs de transcription, d'autres protéines kinases et des protéines associées au cytosquelette. Suite au séquençage complet du génome d'*A. thaliana*, 20 MAPK, 10 MAPKK et 60 MAPKKK ont été identifiées. Des protéines similaires ont été aussi isolées chez d'autres végétaux (Nakagami et *al.*, 2005). Les MAPKKK, premières kinases intervenant dans la cascade de phosphorylation, forment un groupe très hétérogène. L'appartenance d'une kinase au groupe des MAPKKK dépend de sa capacité à phosphoryler des MAPKK. Ainsi, les kinases de type MEKK sont des kinases dont le rôle de MAPKKK a été confirmé, tandis que celui-ci reste à vérifier pour les kinases de type RAF (MAPK Group, 2002). Les différentes MAPKK présentent une conservation du motif N-terminal de fixation aux MAPK. La présence de ce motif K/R-K/R-K/R-X₁₋₆-L-X-L/V/I sur la SIMKK (Stress Induced MAPKK) de *Medicago truncatula* est nécessaire mais non suffisante à l'activation de MAPK (Kiegler et *al.*, 2000). Les MAPK présentent un motif de phosphorylation soit TEY, soit TDY sur le site actif. Contrairement aux TEY MAPK, les TDY MAPK possèdent de longues extensions C-terminales. A l'heure actuelle, les seules données fonctionnelles accessibles sur les TDY MAPK le sont par l'étude de la BWMK1 chez le riz (He et *al.*, 1999 ; Cheong et *al.*, 2003). Les TEY MAPK ont fait l'objet d'un nombre beaucoup plus important d'études chez divers organismes (Nakagami et *al.*, 2005). Il a été prouvé que les différents membres des voies des MAPK sont impliqués dans les mécanismes de réponses aux stress abiotiques et biotiques chez de nombreux organismes, notamment AtMEKK1, AtMKK1 et AtMKK2 en réponse au froid et au stress salin chez *A. thaliana* (Teige et *al.*, 2004). OsEDR1 intervient dans les mécanismes de réponse au stress et à la défense chez le riz (Kim et *al.*, 2003). Une liste non exhaustive des différents acteurs des voies des MAPK intervenant dans les mécanismes de

Figure 19 : Production et effets de l'acide phosphatidique. La phospholipase D catalyse la formation d'acide phosphatidique, qui à son tour active des effecteurs protéiques impliqués dans différentes réponses cellulaires. (D'après Wang *et al.*, 2005).

PLD : Phospholipase D. PLC : Phospholipase C, PA : Acide Phosphatidique, DAG.



réponse au stress et dans les processus de défense est accessible dans la revue de Nakagami et *al.* (2005).

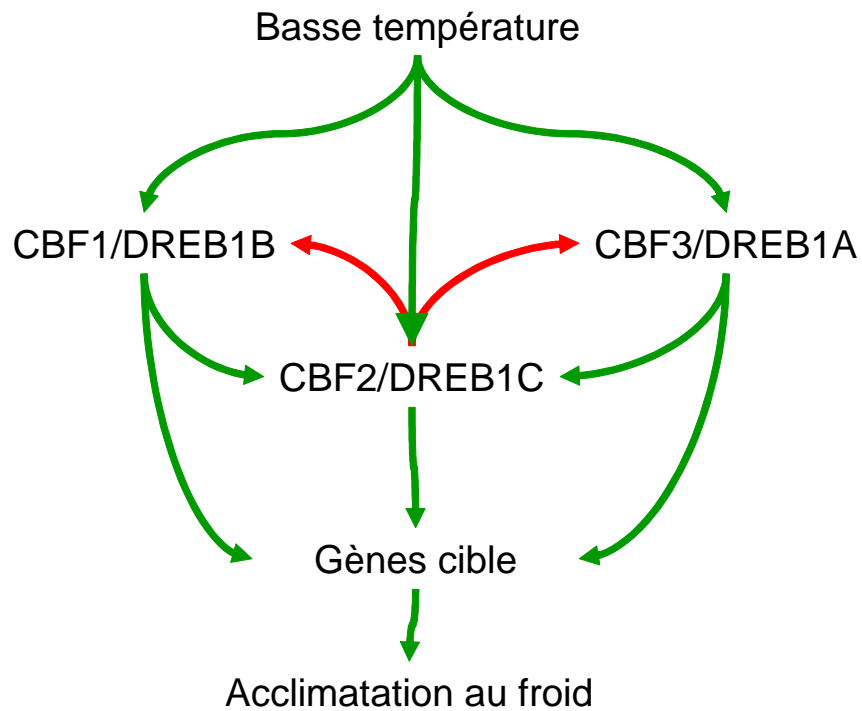
Si le fonctionnement de la voie des MAPKinases est relativement bien documenté, très peu de choses sont connues concernant le substrat des dernières enzymes de cette voie, les MAPK. Une étude récente (Feilner et *al.*, 2005), utilisant une technique de micro-arrays protéiques, a permis d'identifier 48 substrats potentiels pour MPK3 et 39 pour MPK6, 26 de ces candidats étant communs aux 2 enzymes. Ces substrats correspondent à des facteurs de transcription, mais aussi à des facteurs d'épissage, des récepteurs ou des histones.

Considérant les réactions catalysées par ces kinases, le système MAPKKK-MAPKK-MAPK illustre la complexité et l'interdépendance des différentes voies de signalisation visant à organiser au niveau cellulaire une réponse appropriée à un stress donné.

2-1-2-5 Les phospholipases

Une autre forme de la transduction du signal résulte de l'action des phospholipases. Les phospholipases D (PLD) hydrolysent les phospholipides et produisent de l'acide phosphatidique (PA). Les PA agissent sur différentes protéines (par exemple des protéines kinase, des NADPH oxydases) qui à leur tour entraînent une réponse cellulaire (fig. 19). Douze gènes codants des PLDs ont été identifiés chez *A. thaliana*, tandis que seulement 2 ont été identifiés chez les mammifères et un chez *S. cerevisiae* (Wang et *al.*, 2002, 2004). Si les mécanismes d'activation de ces protéines ne sont pas connus, leur activité est augmentée principalement par l'ABA et les EAO. Ainsi, ces enzymes sont plus actives en conditions de stress tels que l'exposition au froid et l'absence d'eau (Welti et *al.*, 2002 ; Frank et *al.*, 2000 ; Katigiri et *al.*, 2001). Les PLD jouent un rôle important dans les mécanismes de la réponse au stress, mais ce rôle varie d'une PLD à une autre. Par exemple, la suppression de PLD δ chez *A. thaliana* entraîne une baisse de la tolérance au froid tandis que sa sur-expression entraîne une meilleure tolérance chez ce même organisme (Li et *al.*, 2004). Par comparaison, la suppression de PLD α 1 entraîne une meilleure résistance au froid (Welti et *al.*, 2002).

Figure 20 : Régulation de l'expression de CBF/DREB1 en réponse aux basses températures, d'après Novillo et *al.* (2004). Les flèches vertes représentent une régulation positive, les flèches rouges une régulation négative CBR ; C-repeat-binding-factor, DREB ; dehydration responsive element binding factor.



2-1-3 Les modifications transcriptionnelles suite aux signaux de stress : acteurs et régulation

En plus d'activer des voies métaboliques telles que celle des SOS, les signaux transmis dans la cellule suite à un stress vont activer la transcription de gènes permettant à la cellule de survivre dans des conditions hostiles. L'activation de la transcription de ces gènes se fait par l'intermédiaire de facteurs de transcription. Ces protéines se fixent à l'ADN au niveau de motifs précis et induisent la transcription du gène en aval de ce motif. Par exemple, les facteurs de transcription CBF (C-repeat-binding-factor) ou DREB (dehydration responsive element binding factor) se lient à l'ADN au niveau de l'élément régulateur du froid et de déshydratation dénommé DRE (aussi appelé CRT pour C-repeat). Cet élément régulateur contient la séquence conservée CCGAC. La présence de cette seule séquence est suffisante pour induire la transcription de gènes en cas de stress liés au froid (Baker et *al.*, 1997). Cet élément de régulation est aussi présent dans la région promotrice située en amont de nombreux gènes activés en réponse aux basses températures (Tomashow et *al.*, 1999). Le génome des plantes contient un grand nombre de ces facteurs de transcription. Par exemple, 5,9% du génome d'*A. thaliana* code de telles protéines (soit environ 1500) (Riechmann et *al.*, 2000). La majorité de ces facteurs appartiennent à de larges familles multigéniques (MYB, AP2/EREBP, bZIP, WRKY). L'étude du lien existant entre ces facteurs de transcription et un stress spécifique est rendue particulièrement difficile par l'expression de membres différents d'une même famille multigénique lors de stress différents. Des expériences de micro-arrays ont permis d'éclaircir le fonctionnement de ces systèmes de régulation complexes. Par exemple, les facteurs de transcription CBF/DREB, qui appartiennent à la famille des AP2/EREBP (Apetala 2 / ethylene-responsive element-binding protein), ne sont pas uniquement régulés par le froid et ses effets secondaires (dont la déshydratation), mais également par des variations du cycle circadien (Harmer et *al.*, 2005). Pour ajouter à la complexité du système, certains facteurs de régulation de la transcription se régulent entre eux. C'est le cas notamment de CBF2/DREB1C qui régule négativement CB1/DREB1B et CBF3/DREB1A en cas d'exposition au froid chez *A. thaliana* (fig. 20) (Novillo et *al.*, 2004).

Une autre famille de facteurs de transcription impliquée dans les mécanismes de réponse au stress est constituée par les HSF (Heat Shock Factor). Ils sont responsables de l'activation de la transcription des protéines de choc thermique HSP (Heat Shock Proteins). Les HSFs sont très nombreux et complexes chez les plantes. On compte 21 HSF chez

Figure 21 : Structure peptidique des 3 classes de HSF chez *A. thaliana* (Baniwal et *al.*, 2004)

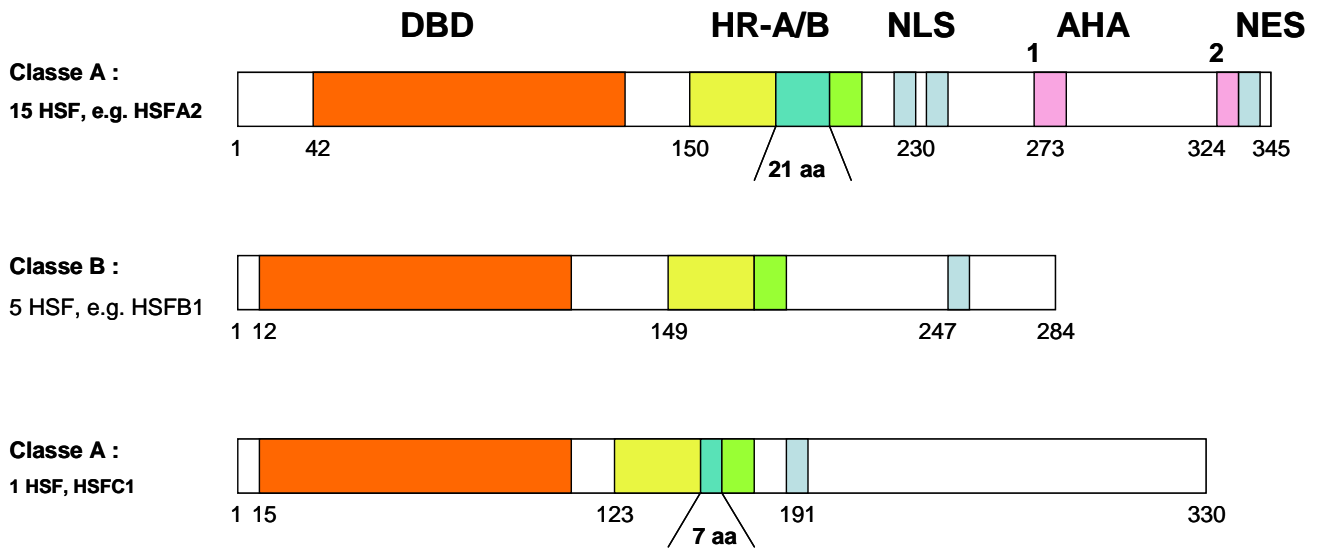
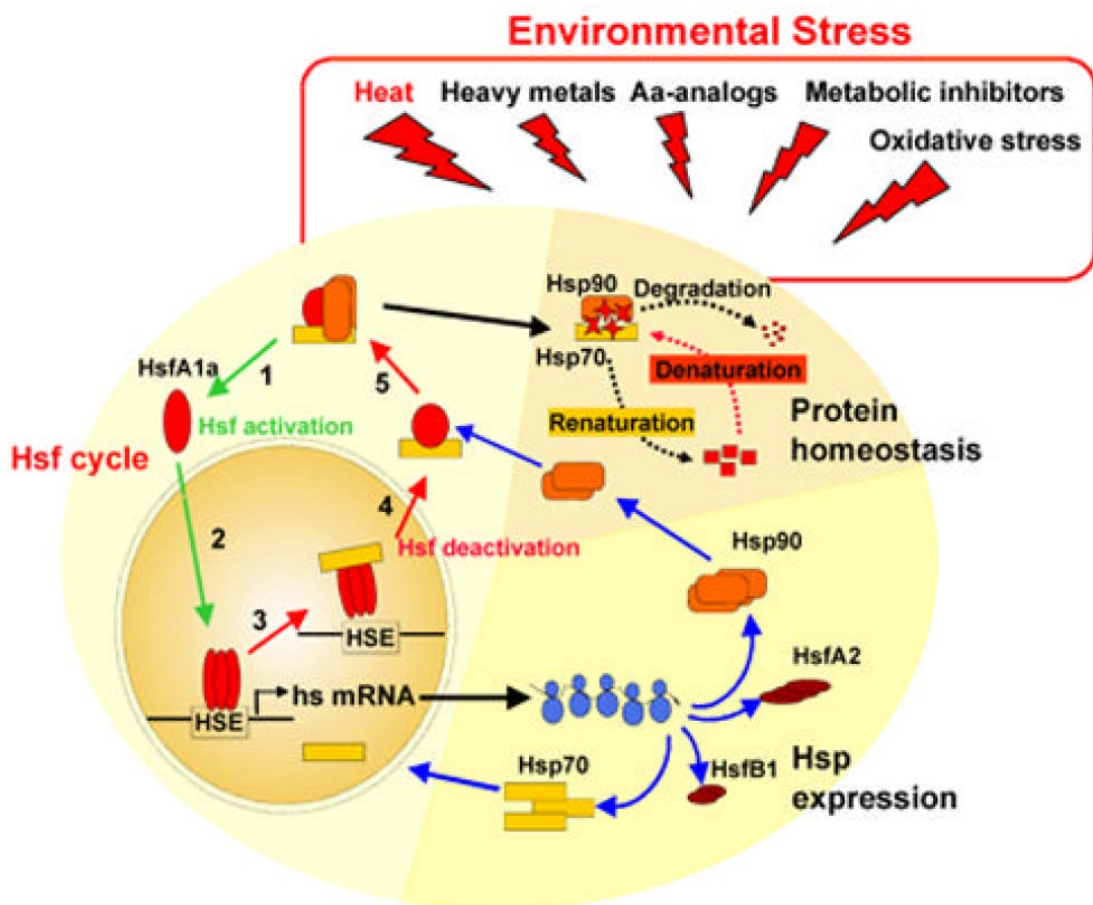


Figure 22 : Rôles des HSF comme régulateurs de la réponse au stress thermique (Baniwal et *al.*, 2004). Lors de l'exposition de la cellule à un stress environnemental, les HSF sont activés et induisent la transcription de gènes porteurs du HSE (Heat Shock promoter Element). Ces gènes codent notamment des HSP 70 et des HSP 90 qui assurent le maintien de l'homéostasie cellulaire.



A. thaliana, 23 chez *Oryza sativa* et un nombre supérieur à 18 chez la tomate (The Arabidopsis Genome initiative, 2000 ; Goff et *al.*, 2002 ; Yu et *al.*, 2002 ; Mishra et *al.*, 2002). Ces protéines possèdent une structure primaire et plusieurs domaines bien conservés. Le site de fixation à l'ADN (DBD, DNA Binding Domain) est situé près de la partie N-terminale, et reconnaît les sites HSE (Heat Stress promoter Element) (Cicero et *al.*, 2001). Ces sites sont formés par la répétition d'un motif palindromique AGAANNTTCT, situé en amont de la TATA box des gènes inductibles par choc thermique (Nover et *al.*, 1991). Le domaine d'oligomérisation (HR-A/B, (Hydrophobic Residues)) est lié au domaine DBD par un linker de longueur variable (15 à 80 aa) (Peteranderl et *al.*, 1999). Les HSF des plantes sont répartis en 3 catégories principales (A, B et C), en fonction des particularités du linker et du domaine HR-A/B. Les HSF possèdent également un signal de localisation nucléaire (NLS), ainsi que des motifs activateurs de la traduction (motifs AHA) localisés dans la partie C-terminale (fig. 21). Un schéma de fonctionnement de la régulation de l'expression des HSFs est présenté en figure 22.

2-1-4 Expression de protéines responsables de la résistance au stress

A la fin de la cascade de signalisation et suite à l'activation de facteurs de transcription, certains gènes vont être régulés afin de rétablir l'homéostasie cellulaire et contribuer ainsi à la résistance ou à l'adaptation de la cellule à un stress donné. Ces gènes codent généralement des enzymes impliquées dans la production de molécules osmorégulatrices, des transporteurs, des enzymes de détoxification, des chaperonnes.

2-1-4-1 La production d'osmoprotectants

Le maintien de la pression osmotique cellulaire est assuré par divers métabolites tels que des acides aminés (proline), des composés quaternaires ou autres amines (glycine bêtaïne, polyamines), et plusieurs types de sucres ou alcools (tréhalose, mannitol).

Chez les plantes supérieures, la proline est accumulée en cas de stress, aussi bien suite à une augmentation de sa production que par une réduction de sa dégradation (Nakashima et *al.*, 1998). Chez le tabac et *A. thaliana*, des études décrivant simultanément la sur-expression du gène codant la delta-pyroline-5-carboxylase, (Konstantinova et *al.*, 2002) et

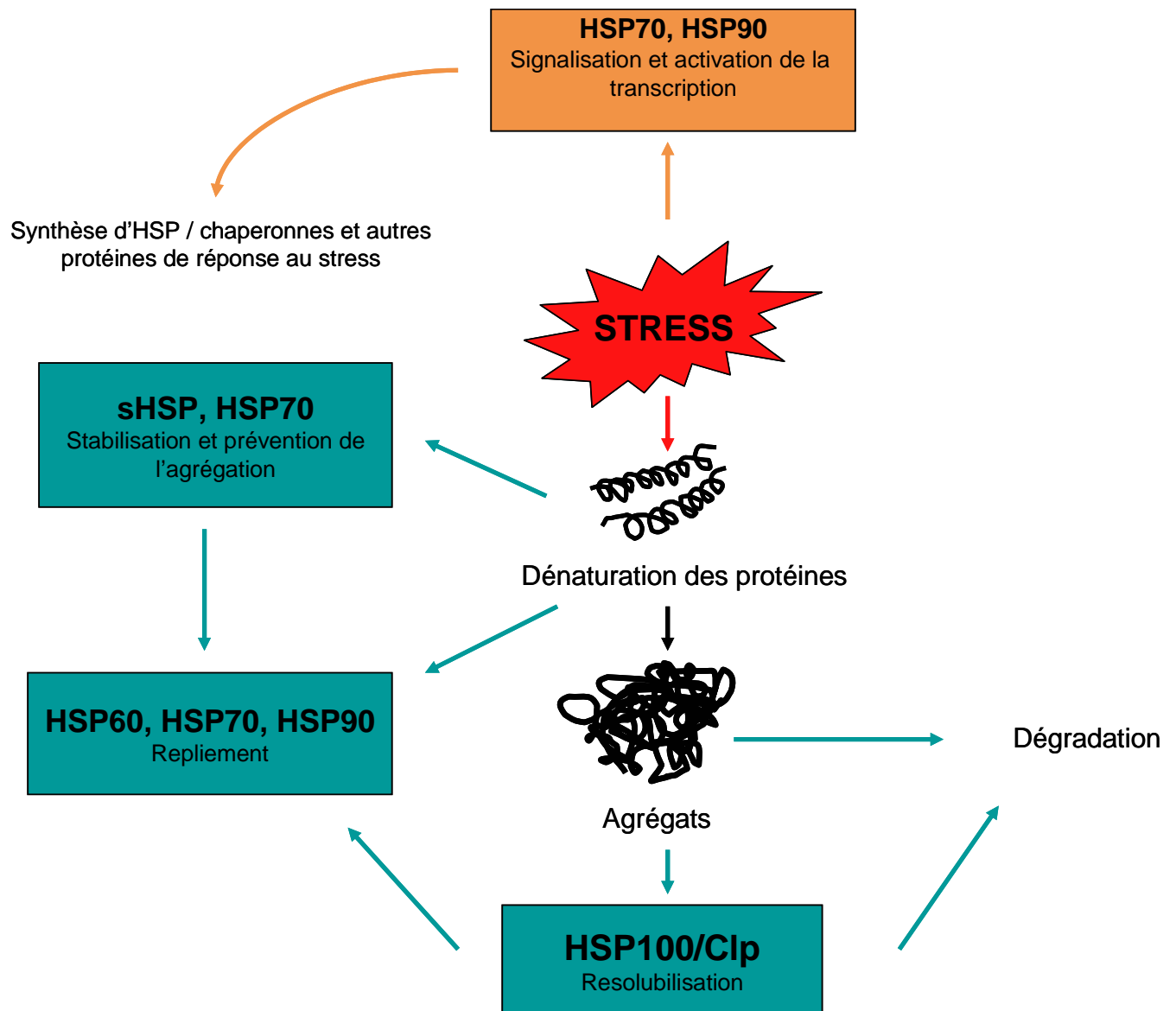
l'inactivation du gène codant la proline déshydrogénase (Mani et *al.*, 2002 ; Maggio et *al.*, 2002) montrent que les plantes ainsi modifiées résistent mieux à un stress salin..

La glycine bêtaïne est une amine quaternaire qui est présente chez plantes supérieures, les microorganismes et les animaux (Rhodes et *al.*, 1993). Son rôle de protection s'opère par stabilisation de la structure quaternaire des protéines et par ajustement de l'équilibre osmotique du cytoplasme afin d'assurer le maintien de la quantité d'eau à l'intérieur de la cellule. La synthèse de glycine bêtaïne a lieu en 2 étapes. Elle débute par la conversion d'une choline en aldéhyde bêtaïque par la choline monooxygénase (Brouquisse et *al.*, 1989), puis l'aldéhyde bêtaïque est transformé en glycine bêtaïne par une aldéhyde déshydrogénase (Weigel et *al.*, 1986). Les aldéhydes déshydrogénases forment une famille multigénique chez *A. thaliana*. L'étude récente de cette super famille (Kirsh et *al.*, 2005) a montré que l'expression de certains membres (ALDH3I1, et ALDH7B4) était induite en condition de stress salin et osmotique.

Les polyamines sont des petites amines aliphatiques qui sont dérivées de l'ornithine et de l'arginine par décarboxylation et sont notamment impliquées dans la réponse au stress salin (Friedman et *al.*, 1989). Les trois polyamines les plus représentées chez les plantes sont la putrécine, la spermidine et la spermine. Toutefois, malgré des corrélations observées entre le taux de polyamines et l'exposition au stress osmotique et salin (Watson et *al.*, 1998), leur fonction exacte reste inconnue (Walters et *al.*, 2003). Cependant, il a été montré chez *Pringlea antiscorbutica* que le gène *PaADC2*, codant une arginine décarboxylase, enzyme clef de la biosynthèse des polyamines, était induit en cas de stress salin et en condition de basse température (Hummel et *al.*, 2004).

Le tréhalose est un disaccharide non réducteur constitué de 2 glucoses liés de façon glycosidique en 1-1. S'il existe potentiellement 3 types de liaisons 1-1 (α α 1-1, β β 1-1 et α β 1-1) seule la première à été observée chez des organismes vivants. Le tréhalose est synthétisé par de nombreux eucaryotes et les procaryotes (Elbein et *al.*, 2003). Plusieurs fonctions de protection ont été identifiées pour le tréhalose, parmi lesquelles la stabilisation des membranes et des protéines en cas de déshydratation. Au moins 3 voies de synthèses du tréhalose ont été identifiées, la principale impliquant la tréhalose phosphate synthase (TPS) (Elbein et *al.*, 2003). Une étude récente menée sur le coton a mis en évidence l'induction du gène codant la TPS lors de l'exposition de plants à des conditions de sécheresse (Kosmas et *al.*, 2005).

Figure 23 : Activation et mécanisme d'action concerté des HSP (Wang et al., 2004).



2-1-4-2 Les protéines chaperones

Les chaperonnes constituent des composants majeurs impliqués dans le maintien de l'homéostasie cellulaire en conditions normales et de stress. Ces protéines sont responsables de l'assemblage, du repliement, de la translocation et de la dégradation des protéines au cours de nombreux procédés cellulaires normaux. Elles permettent le repliement des protéines dans des conditions de stress, ainsi que de désagréger les protéines dénaturées.

2-1-4-2-1 Les HSP

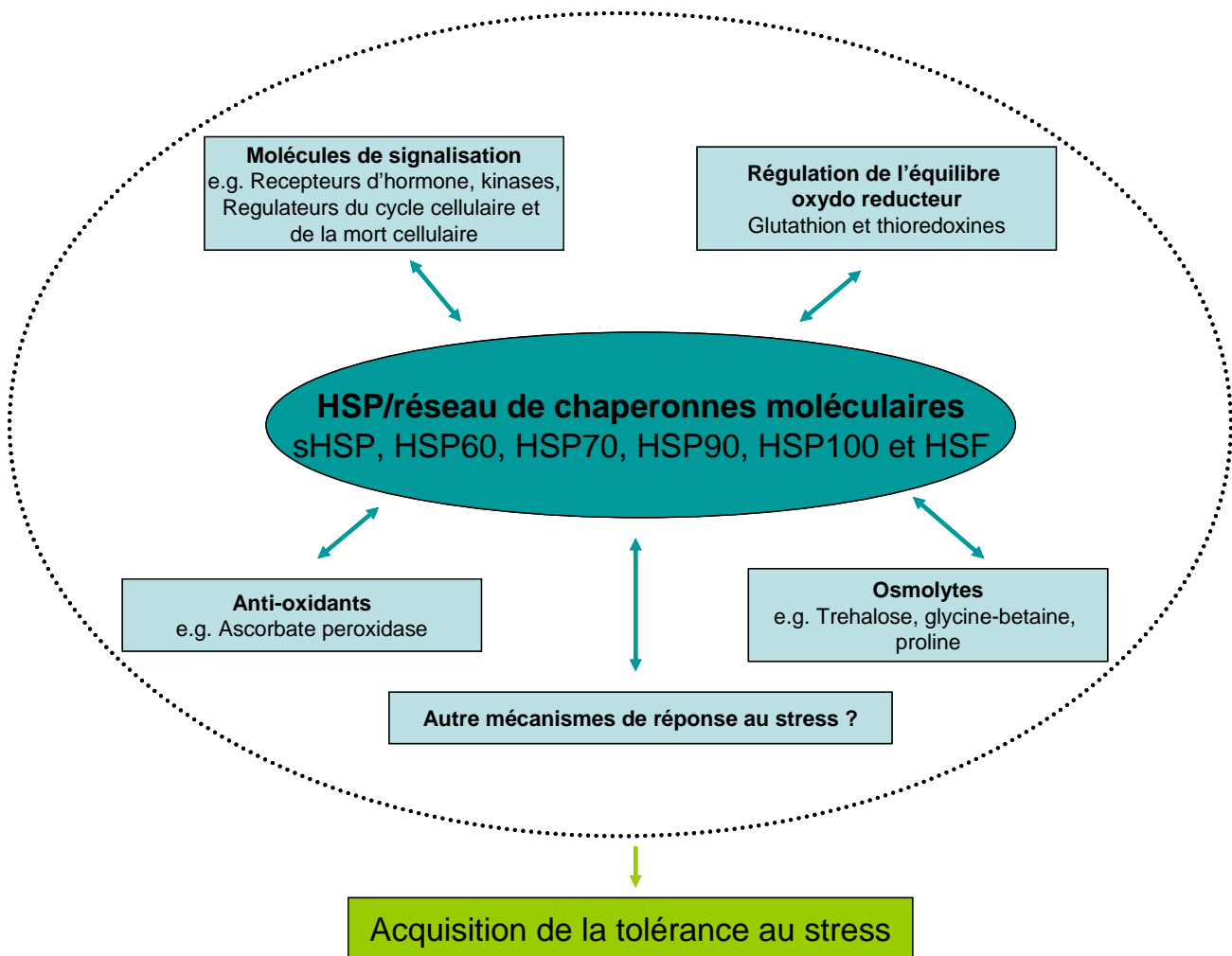
Les protéines de choc thermique (HSP) sont des chaperonnes référencées selon les conditions de stress qui ont permis leur identification. Celles-ci se répartissent en 5 classes majeures, nommées en fonction du poids moléculaire des protéines : les HSP 70 (DnaK), les chaperonines (GroEL et HSP 60), les HSP 90, les HSP 100 et les sHSP (small heat shock proteins).

La fonction essentielle des HSP 70 est de limiter l'agrégation et de participer au repliement de protéines dénaturées, dans des conditions normales ou de stress (Frydman et *al.*, 2001). Elles sont également impliquées dans les processus d'importation et de translocation, ainsi que dans l'adressage de protéines instables vers les lysosomes ou le protéasome (Hartl et *al.*, 1996). Certaines HSP 70 sont exprimées de façon constitutive (les HSC70, Heat Shock Cognate), d'autres ne sont exprimées qu'en cas d'exposition de la cellule à un stress. De plus, certains membres de la famille des HSP 70 interviennent dans le contrôle de l'activité biologique de protéines régulatrices, et peuvent servir de régulateurs négatifs de la transcription des HSF en se fixant à ceux-ci (fig. 22).

Si les HSP 70 sont exprimées en réponse à différents stress (basse température, choc thermique, sécheresse) (Sung et *al.*, 2001), et leur induction corrélée avec l'acquisition d'une tolérance thermique (Lee et *al.*, 1996) ainsi qu'à une résistance accrue à différentes stress environnementaux (forte température, concentration en sels élevées, stress hydrique) (Sung et *al.*, 2003), le mécanisme cellulaire de fonctionnement des HSP 70 reste largement inconnu.

Les chaperonines (HSP 60) sont des chaperonnes qui ont été identifiées chez les procaryotes, puis dans les mitochondries et les plastides des eucaryotes. Leur caractérisation fonctionnelle chez les plantes est limitée. Il a été rapporté que ces protéines assisteraient les protéines plastidiales telles que la rubisco (Boston et *al.*, 1996).

Figure 24 : Interactions supposées des HSP avec d'autres mécanismes de réponse au stress (Wang et *al.*, 2004).



Les HSP 90 diffèrent des autres chaperonnes dans la mesure où leurs substrats identifiés correspondent à des protéines de transduction du signal tels que des récepteurs hormonaux et des protéines kinases (Young et *al.*, 2001). Ainsi, bien que leur fonction principale reste le repliement des protéines (Buchner et *al.*, 1999 ; Frydmann et *al.*, 2001), elles jouent un rôle important dans la transmission du signal, le contrôle du cycle cellulaire, la dégradation et le transport protéique (Pratt et *al.*, 2001 ; Richter et *al.*, 2001). De plus, elles seraient impliquées dans le développement cellulaire d'*A. thaliana* (Queitsch et *al.*, 2002). Chez cette plante, l'expression des HSP 90 est modulée par des conditions de stress telles que la chaleur, le froid, les stress salins, l'exposition aux métaux lourds (Krishna et *al.*, 2001).

Les HSP 100 sont membres de la super famille des AAA ATPases (ATPases possédant un motif hautement conservé AAA) dont les membres interviennent dans de nombreux processus cellulaires (Patel et *al.*, 1998 ; Agarwal et *al.*, 2001). Contrairement aux autres HSP dont la fonction principale est le repliement des protéines, les HSP 100 sont responsables de la désagrégation et de la dégradation de polypeptides potentiellement dangereux pour la cellule, principalement des agrégats de protéines dénaturées. Une fois les agrégats démantelés par les HSP 100, les peptides obtenus sont repliés par les HSP 70. Les HSP 100 sont exprimées de façon constitutive et leur niveau d'expression augmente lors de variations des conditions environnementales (température, concentration en NaCl) (Agarwal et *al.*, 2001).

Les sHSP sont des chaperonnes de faible poids moléculaire (compris entre 12 et 40 kDa). Ces protéines n'ont pas la capacité de replier directement les protéines dénaturées, mais peuvent se lier aux protéines non natives, probablement par des interactions hydrophobes (Ehrnsperger et *al.*, 1997). Ainsi, ces sHSP stabilisent et empêchent l'agrégation de protéines non natives, ce qui facilite l'action des HSP 70 (Mogk et *al.*, 2003). Parmi les 5 classes de HSP, les sHSP sont les plus répandues chez les plantes (Verling et *al.*, 1991).

L'effet protecteur des chaperonnes résulte de l'action concertée des différentes HSPs (fig. 23). Ces protéines interagissent également avec d'autres mécanismes de réponse au stress (fig. 24). Ainsi, certains osmoprotectants pourraient agir comme « chaperonnes chimiques » chez *E. coli* (Diamant et *al.*, 2001). Le tréhalose semble agir de façon synergique avec la sHSP p26 pendant et après un stress thermique (Viner et *al.*, 2001). De plus, les HSP 70 et 90 interagissent avec d'autres effecteurs impliqués dans la réponse au stress, dont les serine / thréonine kinases, ce qui suggère leur participation active dans les mécanismes de transduction du signal (Ellen et *al.*, 2002).

2-1-4-2-2 Les LEA

Les LEA (Late Embryogenesis Abundant proteins) ont été identifiées chez le coton et le blé ainsi que chez les animaux et les algues. Elles sont produites en abondance durant le développement des graines et peuvent représenter jusqu'à 4% des protéines cellulaires totales (Roberts *et al.*, 1993). Elles sont classées en 6 groupes, numérotés de 1 à 6 en fonction de leurs conditions d'expression et de leurs séquences (Wise *et al.*, 2003). Les groupes majeurs sont les groupes 1,2 et 3. Le groupe 1 est constitué de LEA qui ne possèdent naturellement pas de structure tertiaire déterminée en présence d'eau, possèdent un motif conservé de 20 aa (GGQTRREQLGEEGYSQMGRK), et qui n'ont été isolées que chez les plantes. Le groupe 2 contient les LEA également connues sous le nom de déhydrines, et sont présentes aussi bien chez les plantes que chez les algues (Close *et al.*, 1989). Elles sont caractérisées par la présence de 3 motifs conservés : le domaine-K (riche en lysine), le domaine-Y (DEYGNP), et le segment-S (poly-sérine). Elles ne possèdent pas de structure tertiaire stable en solution. Le groupe 3 est caractérisé par un motif répété de 11 aa dont la séquence consensus a été définie comme étant $\Phi\Phi E/QX\Phi KE/QK\Phi XE/D/Q$ où Φ est un résidu hydrophobe (Dure *et al.*, 2001). Des homologues de ces protéines ont été identifiés chez d'autres organismes que les plantes, notamment les nématodes *Caenorhabditis elegans*, *Steinernema feltiae*, *Aphelenchus avenae*, et les procaryotes *Deinococcus radiodurans*, *Bacillus subtilis* et *Haemophilus influenzae* (Dure *et al.*, 2001 ; Solomon *et al.*, 2000 ; Browne *et al.*, 2002). Certaines LEA du groupe 3 acquièrent une structure tertiaire efficace en absence d'eau.

Les fonctions précises des LEA restent inconnues, mais leur sur-expression en cas d'exposition au froid est connue chez *A. thaliana* (Wellin *et al.*, 1994). Suite à des observations réalisées chez le blé et le maïs transgénique, il a été supposé que leur fonction est de protéger les structures cellulaires et moléculaires en cas d'exposition à la sécheresse et au froid (Sivamani *et al.*, 2000 ; Xu *et al.*, 1996). Récemment, Goyal *et al.* (2005) ont montré que la LEA recombinante AaeVLEA1 du nématode *Aphelenchus avenae*, exprimée chez *E. coli*, permet d'éviter l'agrégation de protéines dénaturées par des hautes ou faibles températures. Cette étude montre également que cette LEA agit conjointement avec le tréhalose pour empêcher l'agrégation.

2-1-5 Les EAO (Espèces Activées de l'Oxygène)

En cas de stress biotique ou abiotique, on observe chez les plantes une production rapide et massive d'espèces activées de l'oxygène. De nombreuses études ont été menées, notamment chez les plantes, afin de préciser quels facteurs entraînent ce phénomène. De nombreuses conditions environnementales ont ainsi été définies : la sécheresse, les stress thermiques (hautes et basses températures), l'exposition aux métaux lourds, aux ultra-violets, aux polluants aériens tels que l'ozone et le SO₂, les stress mécaniques, les carences en nutriments, les attaques de pathogènes, et les fortes expositions à la lumière (Dat et *al.*, 2000 ; Asada, 1999 ; Hammond-Kosack, 1996 ; Grant, 2000 ; Polle, 2001 ; Bowler et *al.*, 1992 ; Noctor et *al.*, 1998 ; Desikin et *al.*, 2001 ; Allen, 1995). Cette production d'EAO est donc considérée comme une réponse générale de la plante à un stress.

2-1-5-1 La production d'EAO

Elle est assurée par différents mécanismes, présents dans la cellule de façon constitutive ou induits en fonction des conditions d'incubation. Une des principales sources d'EAO est l'appareil photosynthétique. L'accepteur final d'électrons de la photosynthèse est le CO₂. Cependant, la fixation de CO₂ chez les plantes ne permet pas d'utiliser plus de 50% de l'énergie lumineuse absorbée (Baker, 1991). D'autres accepteurs que le CO₂ sont donc utilisés, parmi eux l'O₂, précurseur (entre autre) de l'H₂O₂. Des conditions de stress limitant la fixation du CO₂ entraînent une surproduction de O₂ et donc à terme de H₂O₂. Les mitochondries sont aussi productrices de H₂O₂ dans certaines conditions (Eltner, 1982). La chaîne de transport d'électrons au sein de la mitochondrie est constituée d'un certain nombre de complexes déshydrogénases qui réduisent un pool commun d'ubiquinone (Eltner, 1994). Cet ubiquinone est ensuite oxydée par la voie des cytochromes ou la voie de l'oxydation alternative. Des travaux menés sur la voie alternative d'oxydation ont apporté des preuves supplémentaires de l'implication des mitochondries dans la production EAO en cas de stress (Vanlerberghe et *al.*, 1997). De manière générale, les principaux générateurs d'ion superoxydes dans la mitochondrie sont les radicaux d'ubiquinone et la NADH déshydrogénase (Richter et *al.*, 1997). Par exemple, on observe une participation des mitochondries dans la production des EAO lors d'expositions à des faibles températures (Prasad et *al.*, 1995). Quel que soit le stress abiotique considéré, l'augmentation de la

production d'EAO dans la cellule est principalement liée à un déficit en CO₂ en tant qu'accepteur d'électrons au sein de la chaîne photosynthétique. En cas de stress biotique, la production des EAO est assurée principalement par des peroxydases de type NAD(P)H oxydases (Bolwell et *al.*, 2002 ; Desikan et *al.*, 1996). Toutefois, l'implication de cette enzyme n'est pas liée qu'aux conditions de stress biotiques, car les hautes températures (Dat et *al.*, 1998) ou des contraintes mécaniques (Orozco-Cardenas, 2001) peuvent aussi induire la production d'EAO par ce type d'enzyme.

2-1-5-2 Mécanismes de contrôle de la quantité d'EAO dans la cellule

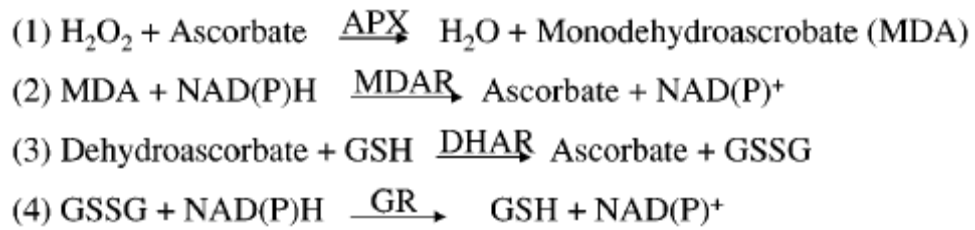
Les espèces activées de l'oxygène sont toxiques pour la cellule de part leur capacité à causer des dommages oxydatifs aux protéines, à l'ADN et aux lipides. Ces EAO sont pourtant continuellement produits par la cellule en tant que dérivés de la photosynthèse. La cellule dispose donc de moyens efficaces pour éliminer ces EAO. Ces mécanismes peuvent être divisés en 2 catégories selon qu'ils impliquent des enzymes de façon directe ou indirecte.

2-1-5-2-1 Réactions de détoxification indirectes

La détoxification indirecte met en jeu des molécules et peptides permettant à la cellule de maintenir son équilibre oxydo-réducteur, principalement l'ascorbate et le glutathion (GSH), mais aussi le tocophérol, les flavonoïdes, les alkaloïdes et les caroténoïdes. Ainsi, des mutants d'*A. thaliana* et de tabac pour lesquels les productions d'acide ascorbique et GSH ont été diminuées sont hypersensibles au stress (Conklin et *al.*, 1996 ; Creissen et *al.*, 1999). Les EAO oxydent le GSH en glutathion oxydé (GSSG) et l'ascorbate en monodehydroascorbate (MDA) et déhydroascorbate (DHA). Ces composés sont ensuite réduits au cours du cycle ascorbate-glutathion. En cas de stress, la cellule a tendance à augmenter la production de GSH (Noctor et *al.*, 2002). De forts taux de GSH et d'ascorbate réduits sont maintenus par l'action de plusieurs enzymes : les glutathion reductases (GR), les monodehydroascorbate reductases (MDAR) et les déhydroascorbate reductases (DHAR), qui utilisent le NADPH comme pouvoir réducteur (Tsugane et *al.*, 1999).

2-1-5-2-2 Réactions de détoxification directe

Figure 25 Cycle glutathion-ascorbate (d'après Appel et *al.*, 2004). Le glutathion et l'ascorbate sont oxydés par les EAO, ce qui diminue la quantité intracellulaire de ces dernières. Les APX, MDAR, DHAR et GR permettent de réduire les composés oxydés en utilisant du NA(D)PH.



Plusieurs enzymes sont impliquées dans ce type de réactions. Ce sont principalement les superoxyde dismutases (SOD), les ascorbate peroxydases (APX), les glutathion peroxydases (GPX) et les catalases (CAT). Les SOD constituent la première forme de défense en catalysant la génération d'H₂O₂ à partir d'O₂⁻. Les CAT, GPX, et APX agissent ensuite en éliminant le peroxyde d'hydrogène. Pour fonctionner, l'APX nécessite des cofacteurs qui sont fournis par le cycle ascorbate-glutathion (fig. 25). L'APX permet la détoxification H₂O₂ en H₂O en oxydant l'ascorbate en MDA. Celui-ci peut être réduit par la MDA réductase (MDAR) qui utilise du NAD(P)H comme cofacteur. La régénération de l'ascorbate est réalisée par la DHAR qui fonctionne en présence de GSH et produit du GSSG. Ce dernier peut-être réduit à nouveau en GSH par la glutathion reductase (GR) en présence de NAD(P)H. Tout comme l'APX, la GPX détoxifie également H₂O₂ en H₂O, la réaction se faisant en présence de GSH et génère du GSSG. La réduction du GSSG se fait également par la GR. Les plantes possèdent un grand nombre de gènes codant les SOD et APX (Mittler et *al.*, 2004), différentes isoformes étant retrouvées dans différents compartiments intracellulaires (Asada et *al.*, 1987). Contrairement aux GPX et APX, la catalase fonctionne sans cofacteurs et catalyse directement la réaction $\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{H}_2\text{O} + \frac{1}{2} \text{O}_2$. La GPX est cytosolique tandis que la catalase se trouve principalement dans les péroxysomes.

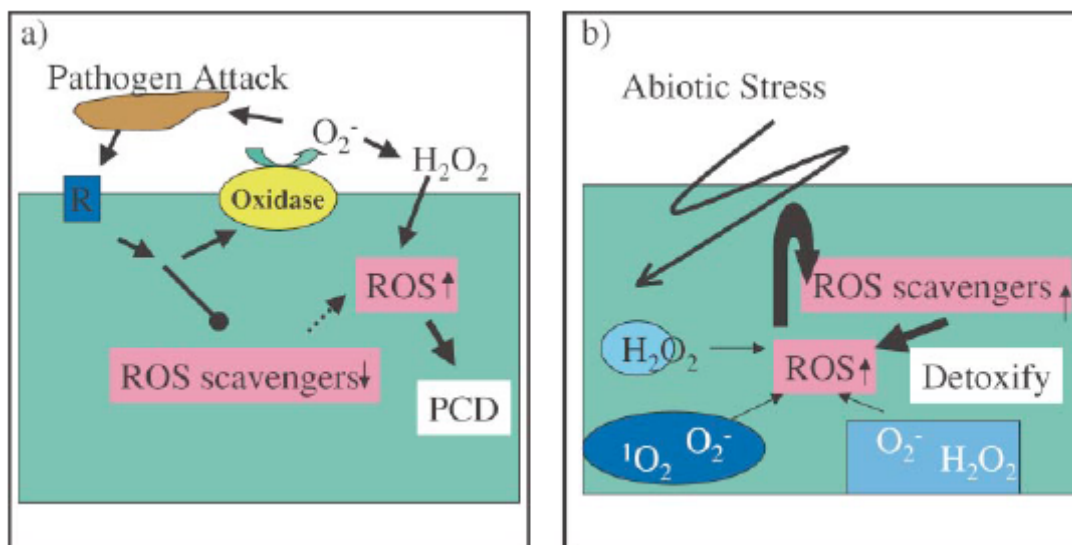
L'équilibrage des activités SOD, APX, GPX et CAT est primordiale pour le contrôle de la quantité d'EAO dans la cellule. Toutefois, la suppression de l'activité de ces enzymes peut avoir des effets surprenants. Par exemple des plants de tabac mutants ne possédant ni CAT, ni APX sont plus résistants au stress oxydatif que des plants de tabac pour lesquels une seule catégorie de ces enzymes est inactive (Rizhsky et *al.*, 2004).

2-1-5-3 Rôle des EAO dans le stress abiotique

Alors que dans le cadre d'une réponse à un stress biotique les EAO ont un rôle de défense car ils sont toxiques pour l'organisme agresseur, ces molécules jouent un rôle de second messenger dans la réponse à un stress abiotique. Très peu de senseurs de ces EAO sont connus chez les plantes. Ce rôle de détection est assuré chez les procaryotes et les champignons par certaines histidines kinases (Quinn et *al.*, 2002). La présence d'un nombre élevé de gènes codant ces protéines chez *A. thaliana* (Hwang et *al.*, 2002) suggère un rôle des histidine kinases comme senseurs des EAO chez cet organisme.

Chez *A. thaliana*, le H₂O₂ active les MAPK MPK3 et MPK6 via la MAPKKK ANP1 (Kovtun et *al.*, 2000). L'expression de cette dernière enzyme a permis d'augmenter la

Figure 26 : Production et effets des EAO au cours de l'attaque par un pathogène (a) ou en condition de stress abiotique (b). (Appel et *al.*, 2004).



résistance aux chocs thermiques, à l'exposition au froid et à la salinité chez des plants de tabac qui expriment un orthologue d'ANP1 (KNP1) constitutivement actif (Kovtun et *al.*, 2000). Il apparaîtrait également que les EAO jouent un rôle dans l'activation de facteurs de transcription. Cette régulation de la transcription s'opérerait grâce à des interactions entre des facteurs de transcription et des éléments *cis* spécifiquement sensibles au stress oxydatif situés dans la région promotrice de certains gènes. Cette hypothèse a été explorée chez *A. thaliana* et a permis d'identifier plusieurs gènes pouvant être régulés de la sorte (Desikan et *al.*, 2001). De plus, 175 gènes dont l'expression était modifiée suite à l'exposition de la cellule à des EAO ont été identifiés. Ces gènes codent des protéines assurant des fonctions anti-oxydantes, ou étant associées aux mécanismes de défense et de réponse au stress. Les EAO se retrouvent donc à l'interface de toutes les étapes des mécanismes de la réponse à un stress abiotique et biotique. Leur rôle dans ces 2 situations est différent (fig. 26) ce qui pose la question de savoir comment la plante régule la quantité d'EAO lors d'une exposition simultanée à ces 2 types de stress.

En conclusion, la réponse aux stress chez les plantes est un phénomène complexe, dont la cascade de réactions fait intervenir un grand nombre d'enzymes et de composés, qu'il s'agisse de protéines ou de molécules signal. Si une image des différentes étapes peut être déduite d'un grand nombre d'études, les connexions existantes entre ces différentes étapes n'ont pas encore été clairement établies. De plus, les voies de réponse à différents stress passent souvent par des intermédiaires communs. Il devient alors très difficile de discerner, de la perception à l'expression des gènes de réponse, les différents types de réponse de la cellule en fonction des divers types de stress.

3- La réponse au stress chez les macro-algues

De par leur milieu de vie, les macro-algues marines sont soumises à des stress de natures différentes de ceux des plantes terrestres supérieures. Par exemple, les variations de températures engendrées par les saisons ou les cycles journaliers sont moins importantes dans l'eau que dans l'air. Dans les zones de forts marnages, telles que les côtes bretonnes, les macro-algues sont également soumises à la dessiccation liée aux marées. L'intensité de cette dessiccation varie suivant la position des algues sur l'estran. Les algues situées en haut de l'estran se retrouvent exposées à l'air libre plusieurs fois par jour tandis que les algues situées en bas de l'estran ne le sont qu'une fois par mois.

Les études menées sur le stress chez les macro-algues sont diverses et portent principalement sur les effets du stress sur le développement de l'organisme. Très peu de travaux portent sur les mécanismes moléculaires de la réponse aux stress, qu'il s'agisse de la perception du stress, de la transduction du signal généré au cours de ce stress, ou de la régulation des différents mécanismes de réponse visant à rétablir l'homéostasie cellulaire. Ce manque de données disponibles sur la réponse cellulaire du stress chez les algues est imputable à plusieurs facteurs, tels que l'absence d'organisme modèle ou de données de génomique à grande ou moyenne échelle (Pearson *et al.*, 1996).

Cependant, certains travaux permettent d'établir un parallèle avec ce qui est déjà connu chez les plantes supérieures, mais également de distinguer des originalités dans les mécanismes de rétablissement de l'homéostasie cellulaire chez les macro-algues.

3-1 La perception du stress

Si les travaux sur les mécanismes de la réponse au stress chez les macro-algues sont limités, plusieurs théories ont été émises pour expliquer les différentes étapes de cette réponse. Ces études étaient généralement très descriptives, faisant principalement intervenir des notions physiologiques. Dans le cas de stress liés à des variations de salinité, les travaux menés dans les années 1980 suggèrent l'intervention de capteurs situés au niveau de la membrane cellulaire (Kirst *et al.*, 1989). Ces études suggèrent 3 hypothèses pour expliquer les mécanismes de la reconnaissance du stress par des macro-algues. La première est basée sur le modèle du changement anisotrope de la membrane plasmique qui implique que celle-ci est pressée contre la paroi cellulaire par la pression de turgescence, ce qui a pour effet d'activer

des protéines membranaires inconnues. Une seconde hypothèse repose sur le modèle de la compression électro-mécanique de la membrane et suppose que celle-ci soit considérée comme un condensateur électrique. La pression de turgescence affecte l'épaisseur de la membrane, entraînant un changement du champ électrique intrinsèque de la membrane ou de l'activité des canaux et des pompes situés sur la membrane, ce qui aboutit à des modifications du transport des ions à travers cette membrane. La troisième hypothèse implique des canaux qui sont activés suite aux déformations de la cellule provoquées par la pression de turgescence. Ces hypothèses aboutissent toutes à un changement ionique intracellulaire qui serait responsable de la mise en route des voies de réponse au stress. La dernière hypothèse pourrait suggérer l'implication de canaux Ca^{2+} comme capteur des stress suite à des modifications de la forme de la cellule, ce qui se rapproche de ce qui est connu chez les plantes.

3-2 La transduction du signal

Une fois le stress perçu, le signal généré doit être transmis par la cascade de signalisation. Comme je l'ai mentionné précédemment, ces systèmes sont complexes chez les plantes et font intervenir soit des enzymes (voies des MAPK, SOS) soit des molécules telles que le Ca^{2+} ou les EAO. Parmi ces différents mécanismes décrits chez les plantes, l'implication du Ca^{2+} en tant que second messager est sans doute le processus le plus étudié chez les algues. Des travaux récents menés sur les embryons de *Fucus serratus*, en condition de stress osmotique, ont permis d'observer une corrélation entre la production d'EAO suite à la perception du stress et les influx de calcium (Coelho et *al.*, 2002). De plus, une mobilisation du calcium intracellulaire a été démontrée. Ce type de relation a également été observé chez le même organisme en présence de cuivre (Nielsen et *al.*, 2003). Tout comme chez les plantes, le calcium et les EAO semblent donc jouer le rôle de second messager dans la transduction du signal de stress chez *F. serratus*. Toutefois, les mécanismes par lesquels cette transduction se fait sont encore inconnus. A ma connaissance, aucun résultat concernant le rôle potentiel de la voie SOS et des MAPkinases chez les macro-algues exposées à un stress n'est accessible pour l'instant.

3-3 Réponse des macro-algues en condition de stress

Si les précédentes étapes de la réponse au stress (reconnaissance, transduction et régulation de la transcription) n'ont pas fait l'objet de nombreuses études chez les macro-algues, plusieurs gènes et protéines exprimées en cas de stress chez ces organismes ont été étudiés. Des travaux réalisés sur *Fucus vesiculosus* ont permis d'identifier certains gènes induits lors de conditions de dessiccation (Pearson et *al.*, 2001). Ces gènes sont majoritairement reliés à la photosynthèse (Rubisco, protéines de photosystèmes, protéines de liaison à la chlorophylle). De même, certains mécanismes présents chez les plantes ont été mis en évidence chez les algues. Par exemple, il apparaît que la macro-algue rouge *Gracilaria tenuistipitata* synthétise des EAO lorsqu'elle est exposée à des métaux lourds (Collén et *al.*, 2003). De même, des variations d'activité des enzymes responsables du contrôle cellulaire de la quantité d'EAO, corrélées à une baisse de la quantité d'EAO cellulaire, ont été observées chez l'algue brune *Fucus vesiculosus* lors de changement de température (Collén et *al.*, 2001). Ces changements laissent supposer une participation des EAO dans la réponse à l'exposition aux basses températures. S'il apparaît que les EAO jouent un rôle dans les mécanismes de la réponse au stress chez différentes algues, les mécanismes de la production de ces EAO ne sont pas encore clairement établis. Des observations analogues sur les enzymes de contrôle de la quantité des EAO (SOD, APX, GR) ont été faites chez les algues rouges *Mastocarpus stellatus* et *Chondrus crispus* (Lohrmann et *al.*, 2004). De plus, il apparaît que ces enzymes interviendraient dans les mécanismes assurant la survie de la cellule lors d'un stress de dessiccation chez une autre algue rouge *Stictosiphonia arbuscula* (Burritt et *al.*, 2002). Un autre travail réalisé sur les embryons de *Fucus spiralis* et de *Fucus vesiculosus* a montré l'importance de l'environnement parental sur la survie des embryons exposés à de hautes températures. Ces travaux ont aussi mis en évidence une forme d'adaptation/tolérance à ce stress suite à des incubations du même type d'embryon en condition d'hyper-salinité et de choc thermique (Li, 2003). Ces acclimatations seraient associées à la présence d'HSP 60 en plus grande quantité chez les embryons résistants.

3-4 Le stress chez *L. digitata*

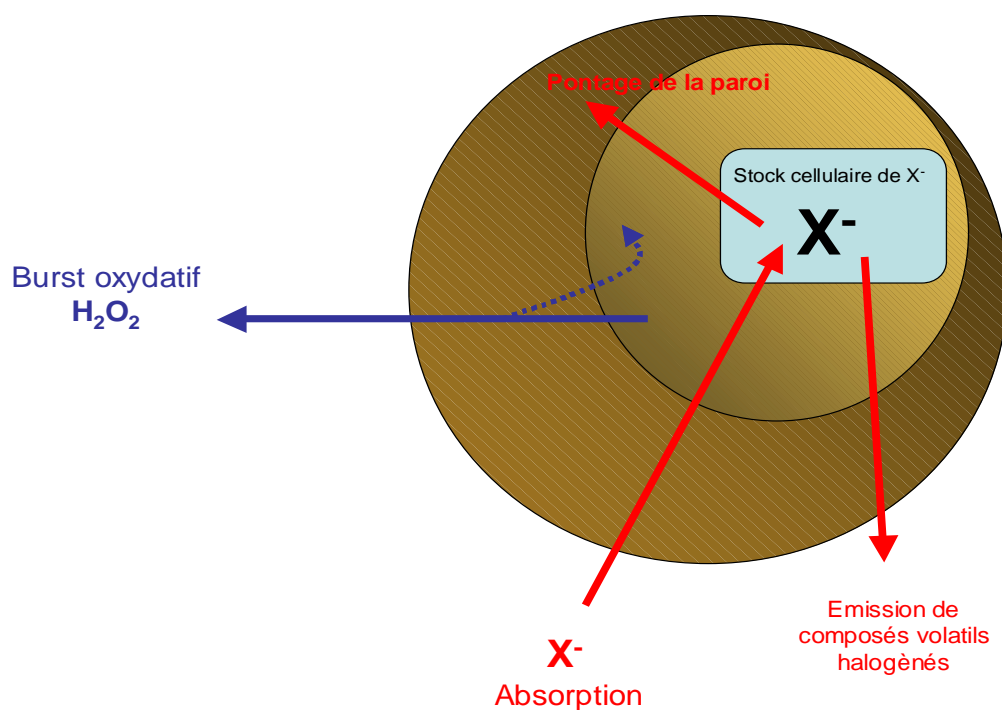
Les connaissances acquises sur les mécanismes de réponse au stress chez *L. digitata* sont assez récentes. Les études déjà menées sur cet organisme ont porté principalement sur les

Figure 27 : Les différentes réactions catalysées par les halopéroxydases.



X^- : halogénures (I^- , Br^- , Cl^-) ; R-H : substrat organique ; HOX : acide hypohalogéneux.

Figure 28 : Implications présumées des halopéroxydases dans les mécanismes de réponse au stress, d'après Colin (2004). X^- : Halogénure



effets de stress biotique. L'exposition de l'algue à des oligoguluronates, qui sont des fragments de l'alginate constituant de la paroi de *L. digitata*, entraîne chez celle-ci un burst oxydatif (Kupper et *al.*, 2001). En plus de ce burst oxydatif, il a également été observé un efflux d'iodure dans un premier temps, puis une augmentation de l'émission de composés volatiles iodés (Malin et *al.*, 2001). L'iode semble donc jouer un rôle direct dans les mécanismes de réponse au stress. *L. digitata* possède la capacité de concentrer l'iode jusqu'à obtenir une concentration 30 000 fois supérieure à celle observée dans l'eau de mer. Ce processus d'assimilation de l'iode s'effectue grâce à une famille d'enzyme, les halopéroxydases (Kupper et *al.*, 1998). Les halopéroxydases catalysent plusieurs réactions utilisant les halogénures et le peroxyde d'hydrogène comme substrats (fig. 27). Ces enzymes sont capables d'oxyder les halogénures en présence de peroxyde d'hydrogène (équation 1), mais également de produire de façon directe (équation 2) ou indirecte (équation 3) des composés volatiles halogénés (Neidleman et Geibert, 1986). Le peroxyde d'hydrogène étant par nature nocif pour la cellule, les halopéroxydases joueraient donc un double rôle dans les mécanismes de réponse au stress (Colin et *al.*, 2003). Elles contribueraient à contrôler la quantité d'EAO intracellulaire, tout en produisant des composés volatiles halogénés. Le rôle putatif des halopéroxydases dans les mécanismes de réponse au stress est présenté dans la figure 28. L'implication de ces enzymes dans les mécanismes de la réponse au stress constitue une des originalités des macro-algues que l'on ne retrouve pas chez les plantes supérieures.

3-5 Conclusion

Les résultats obtenus chez les macro-algues marines indiquent que celles ci partagent certains mécanismes de la réponse au stress, notamment l'implication du calcium comme second messenger mais également dans l'utilisation des EAO. En revanche, si les grandes lignes de ces mécanismes sont communes, les intervenants semblent différents. Cela est illustré par les bromopéroxydases. Les macro-algues marines et les plantes supérieures sont éloignées phylogénétiquement, les hétérokontes formant une lignée eucaryotique indépendante. L'existence de mécanismes communs de réponse au stress suggère la présence d'un mécanisme analogue chez un ancêtre commun. Cependant des divergences dans ces mécanismes représente une piste évolutive intéressante à explorer.

4- Introduction du travail de thèse

4-1 Contexte scientifique

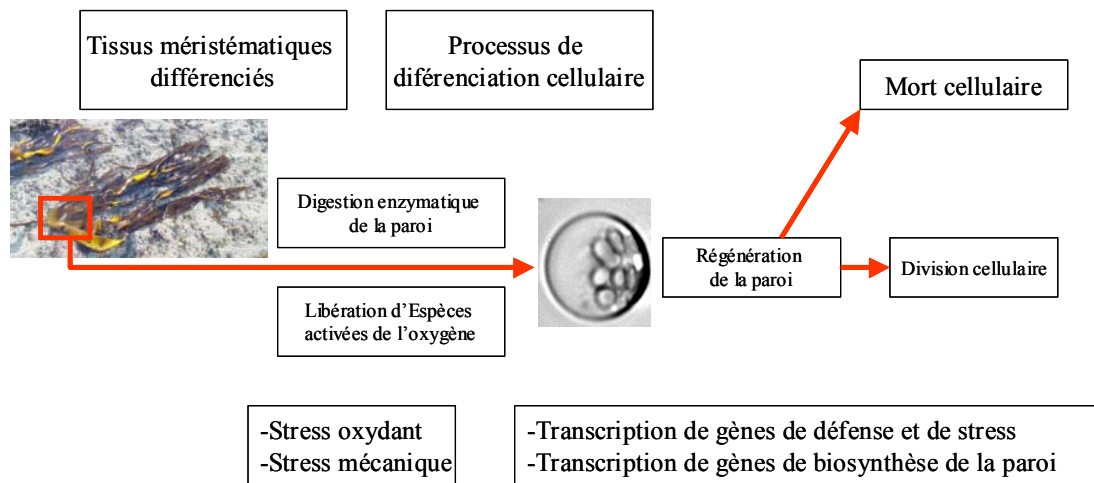
Les progrès réalisés en matière d'acquisition de données génomiques ont été très importants ces dernières années. De plus le séquençage du génome d'un organisme permet d'avoir accès directement à l'information génétique et donc aux gènes présents dans cet organisme. La construction de banques d'ADNc ou la réalisation de banques soustractives permet à la fois d'obtenir des séquences de gènes, mais aussi d'avoir une vue des gènes qui sont exprimés dans des conditions de culture bien définies. Les micro-arrays permettent de déterminer les réseaux de gènes impliqués dans les mécanismes de réponse à telle ou telle condition physiologique, afin d'identifier les acteurs communs ou spécifiques de ces mécanismes. Les puces protéiques permettent de trouver les substrats de protéines surexprimées en cas de stress et ainsi de faire le lien entre les différentes étapes de la réponse au stress. Ces différentes techniques rendent possible l'étude à grande échelle des différents intervenants dans les mécanismes de la réponse au stress.

Cependant, l'utilisation de ces outils pour l'étude d'une condition physiologique déterminée chez les macro algues marines reste très limitée. A l'heure actuelle, aucun génome d'algue brune n'est encore disponible, et un nombre encore restreint de séquences est disponible dans les banques de données. L'amélioration des ressources génomiques constitue la base de toute étude de transcriptomique à moyenne et grande échelle (PCR quantitative, macro et micro-arrays). Au début de la thèse, les seules données disponibles sur les hétérokontes avaient été obtenues grâce aux programmes EST (Etiquettes de Séquences Transcrites) portant sur la diatomée *Phaeodactylum tricornutum* (Bowler, <http://www.szn.it/plant/PhaeodactylumEST/>) et ceux menés par notre laboratoire sur *L. digitata* (Crepineau et *al.*, 2000), dont les résultats ont été considérés pour cette étude.

4-2 Objectifs de la thèse

Les travaux menés au cours de cette thèse visaient à isoler et à étudier des marqueurs moléculaires de la réponse aux stress chez *L. digitata* afin d'identifier, du moins en partie, les bases moléculaires des mécanismes de réponse au stress chez cette algue. La comparaison de ces données avec celles acquises chez d'autres organismes devait permettre de mettre en

Figure 29 : Le protoplaste : un outil méthodologique pour étudier le stress



évidence des transcrits particuliers aux végétaux marins. En effet, les algues ne sont pas soumises aux mêmes conditions environnementales que les organismes terrestres. Les algues subissent des écarts de températures et des variations d'exposition lumineuse moins importants que les végétaux terrestres. Par contre, les variations liées à la succession des marées, principalement l'exposition à l'air libre et l'absence d'eau à marée basse, sont plus spécifiques des macro-algues.

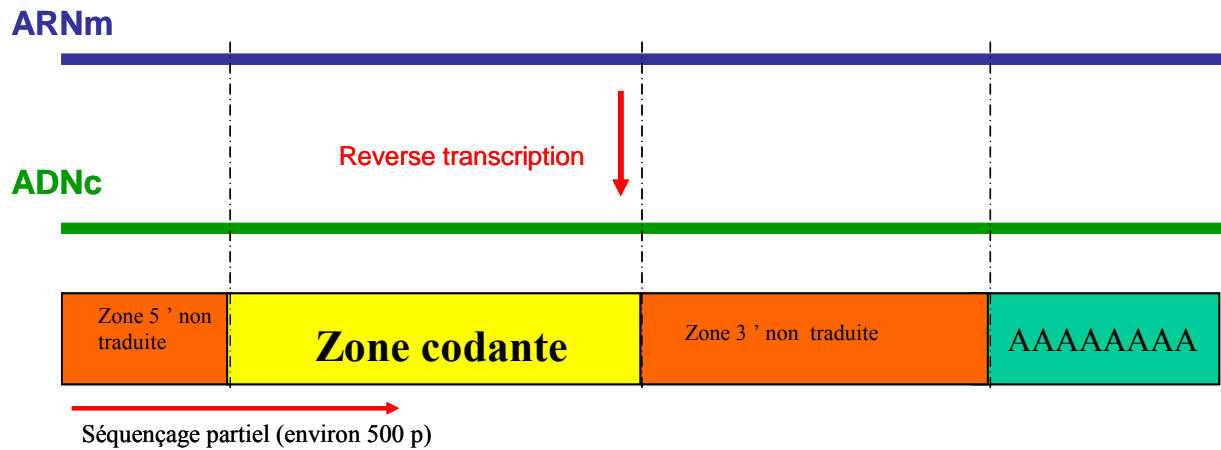
4-3 L'outil biologique : le protoplaste

Afin d'étudier le stress chez *L. digitata*, il fallait tout d'abord définir un stress à étudier. Nous avons choisi d'utiliser le protoplaste comme modèle biologique de l'étude du stress. Les protoplastes sont des cellules végétales dont la paroi a été complètement digérée par voie enzymatique. Ces cellules isolées représentent un stade ultime d'explantation, qui peut être considéré comme une forme extrême de blessure (fig. 29). La perte de la paroi cellulaire et l'isolement des cellules soumettent celles-ci à de nombreuses contraintes, aboutissant à des conditions de stress osmotique et oxydatif. En effet, la digestion de la paroi libère des oligogulonates (GG), qui déclenchent un burst oxydatif chez *L. digitata*. De plus, l'isolement des cellules entraîne une perte de communication inter-cellulaire.

4-4 Identification de marqueurs moléculaires de la réponse au stress

Afin d'identifier des marqueurs moléculaires de la réponse au stress, nous avons décidé d'employer une stratégie EST (Expressed Sequence Tags, ou Etiquette de Sequences Transcrites), que l'on peut définir comme une approche à moyen débit. Cette stratégie est basée sur la construction de banques d'ADNc représentant les ARNm d'une cellule à un temps donné, ou des conditions expérimentales et/ou environnementales précises. En partant du principe que le nombre d'EST isolées représente le niveau de transcription d'un gène donné dans une condition expérimentale bien définie, l'emploi de cette stratégie permet l'identification de transcrits spécifiques d'un tissu ou d'un état physiologique. Ce fut le cas pour le cerveau ou la prostate chez l'homme (Adams et *al.*, 1992 ; Nelson et *al.*, 1997), pour l'embryon d'oursin (Lee et *al.*, 1999) ou encore pour la mise en évidence de gènes liés à l'immunité chez la crevette (Gross et *al.*, 2001). Les clones correspondants à différents fragments d'ADNc sont séquencés partiellement afin de générer des ESTs (fig. 30). Une

Figure 30 : Représentation schématique d'une EST. Une EST est une séquences provenant du séquençage systématique en 5' d'un ADNc issu de la transcription reverse d'ARNm. Suivant la qualité de la reverse transcription, cet ADNc comporte les différentes parties de l'ARNm d'origine : les parties 5' et 3' non traduites, la zone codante (ou ORF) ainsi que la queue poly A



recherche de similitude de ces séquences dans les banques de données protéiques et nucléiques est ensuite effectuée afin d'identifier quel gène est codé par une EST donnée. Cette approche s'est révélée très informative pour divers organismes (mammifères, plantes, insectes) et notamment pour la plante modèle *A. thaliana* dont 175000 séquences sont disponibles actuellement. Plus proche de nos considérations, l'approche EST a déjà été utilisée pour l'étude de protoplastes de cellules végétales, notamment sur *Brassica campestris* (Kwak et al., 1997). Une étude récente menée sur *Thellungiella salsuginea* est basée sur l'emploi d'une stratégie EST afin de déterminer quels étaient les transcrits communs à la réponse de l'organisme dans différentes stress (Wong et al., 2005). Une étude similaire à celle menée sur les protoplastes de *L. digitata* a été réalisée au laboratoire sur des protoplastes de l'algue rouge *Chondrus crispus* (Collén et al., 2006 (sous presse)). L'un des principaux avantages de la stratégie EST est de fournir un nombre important d'informations supplémentaires à celles recherchées initialement. C'est pourquoi l'utilisation de cette stratégie sur des protoplastes de *L. digitata* avait également comme objectif d'identifier des gènes impliqués dans les processus de régénération de la paroi cellulaire et de façon plus générale accroître la quantité de données génomiques et transcriptomiques pour cette algue. De plus les clones générés lors de cette étude pourront être utilisés pour des études ultérieures sur des transcrits particuliers, et les banques de données constituées après l'analyse des séquences serviront entre autres pour l'annotation d'autres séquences d'organismes proche phylogénétiquement.

4-5 Peut-on distinguer les gènes de réponse au stress des gènes de défense ?

Bien que le protoplaste semble un outil adapté à l'étude du stress chez *L. digitata*, celui-ci présente toutefois des limites. En effet, la digestion enzymatique de la paroi libère des oligoguluronates, qui agissent comme éliciteurs sur *L. digitata* (Kupper et al., 2001). Les protoplastes sont donc des cellules en état de stress intense mais également en état de défense face à une attaque pathogène. Il devient alors impossible par la seule analyse des EST issues de protoplastes de différencier les gènes exprimés dans le cadre de la réponse au stress de ceux exprimés dans le cadre de la défense face à un pathogène. Afin de voir s'il était possible de différencier ces 2 types de gènes, et d'identifier des gènes des mécanismes de défense, nous avons isolé des transcrits spécifiques de sporophytes élicités en présence d'oligoguluronates grâce à l'emploi de la technique d'hybridation suppressive et soustractive

(suppressive subtractive hybridization ou SSH). L'utilisation de cette technique a déjà permis de caractériser des gènes impliqués dans la formation des dents chez l'homme, (Buchaille et *al.*, 2001) ainsi que des gènes induits par le nitrate chez le riz (Wang et *al.*, 2002). Plus proche de notre sujet d'étude, la SSH a été utilisée pour isoler des transcrits correspondant aux gènes responsables de la résistance de certains cultivars de *Malus domestica* au pathogène *Venturia inaequalis* (Degenhardt et *al.*, 2005), ou pour étudier des gènes induits par dessiccation chez l'algue brune *Fucus vesiculosus* (Pearson et *al.*, 2001). La comparaison des séquences obtenues par SSH avec les EST obtenues chez le protoplaste devait permettre d'établir quels étaient les gènes impliqués dans les mécanismes de réponse au stress chez *L. digitata*.

4-6 Etude de la famille multigénique des mannuronane-C5-épimérasases

La composition de la paroi cellulaire des algues brunes est très différentes de celle des plantes. En plus de son rôle protecteur du contenu intracellulaire, la paroi permet de maintenir la rigidité de la cellule, et la circulation des éléments nutritifs (eau, minéraux). Chez les plantes, la paroi contient des protéines spécialisées dans la régulation de la croissance et la protection contre les agressions (Yoshiba et *al.*, 2001 ; Cornels et *al.*, 2000). Elle représente aussi la première barrière de protection contre les stress. Malgré son importance, peu d'études ont porté sur les modifications de sa composition, notamment au niveau de la matrice extracellulaire, lors de l'exposition de plantes à différents stress. Il a toutefois été démontré récemment que certains gènes codant la cellulose synthase chez *A. thaliana* seraient impliqués dans les mécanismes de réponse à la sécheresse et à la dessiccation (Chen et *al.*, 2005). La paroi cellulaire de *L. digitata* est majoritairement constituée d'alginate, ce qui lui confère une rigidité plus ou moins grande. La dernière étape dans la biosynthèse de l'alginate est assurée par différentes mannuronanes-C5-épimérasases (Man-C5), qui forment une famille multigénique comprenant de nombreux membres (Nyvall et *al.*, 2003). L'étude EST menée sur les sporophytes de *L. digitata* a permis l'identification de plusieurs gènes de Man-C5 (Crepineau et *al.*, 2000). De plus, des expériences préliminaires menées au laboratoire indiquent que certains membres de la famille multigénique seraient induits en cas d'éllicitation des sporophytes par des oligoguluronates. Au cours de ma thèse, des fragments d'ADNc supplémentaires correspondant à des Man-C5 ont été obtenus par une approche de RT-PCR. L'analyse de ces nouvelles séquences et de celles disponibles dans les différents types de banque d'ADNc a permis de grouper les Man-C5 en fonction de leur profil d'expression. Ces

observations ont été complétées par l'étude transcriptomique de plusieurs Man-C5, représentant chacune un groupe, en employant la technique de PCR quantitative.

RESULTATS

Figure 31 : Protoplastes obtenus à partir de sporophytes de *Laminaria digitata*.



Chapitre I : Etude d'une banque orientée d'ADNc de protoplastes de *Laminaria digitata*

Au cours de ce chapitre, je présenterai les résultats relatifs à la construction de la banque d'ADNc issus de protoplastes de *L. digitata*, du séquençage de ces ADNc et de l'analyse de ces séquences.

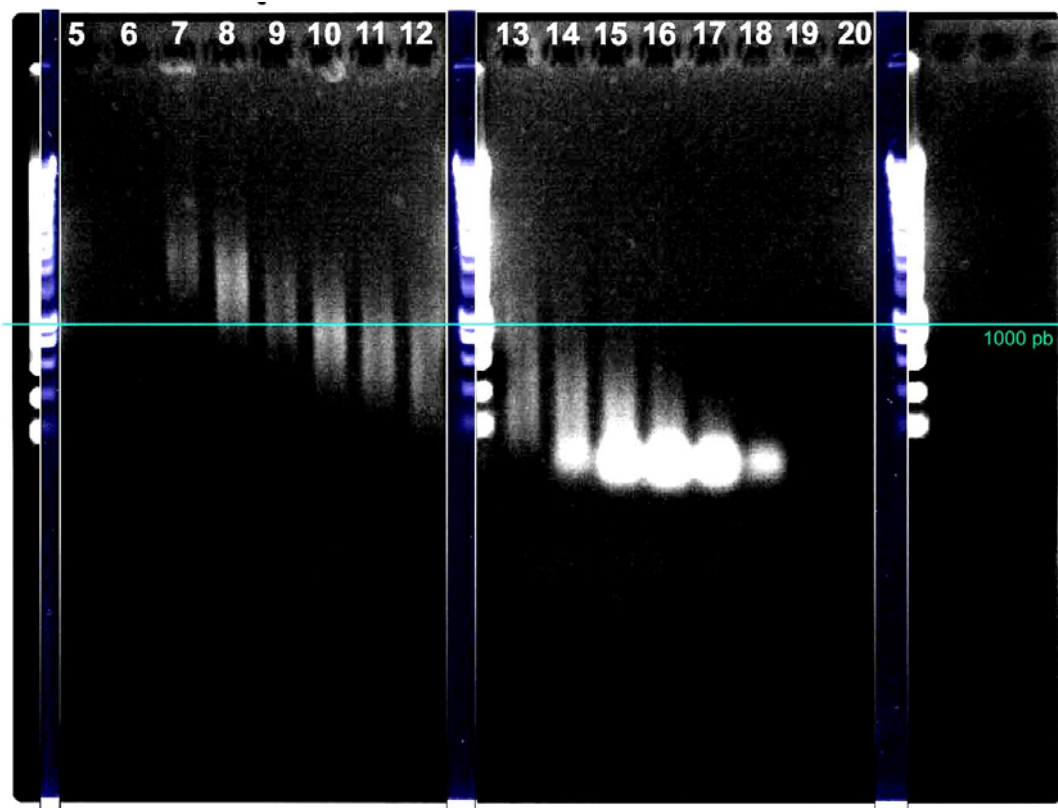
1- Résultats relatifs à la construction de la banque d'ADNc

Les protoplastes sont des cellules végétales dont la paroi a été complètement digérée par voie enzymatique (fig. 31). Ces cellules isolées peuvent être considérées comme un stade ultime d'explantation, car elles sont soumises à un large éventail de stress (osmotiques, mécaniques et oxydants) et à l'absence de communication intercellulaire. On peut considérer que les protoplastes sont confrontés à trois problèmes majeurs : ils doivent réagir au stress causé par la perte de la paroi cellulaire, répondre à l'action des oligogulonates qui miment une attaque pathogène et ils doivent se protéger des espèces actives de l'oxygène (EAO) produites lors de la digestion de la paroi et ensuite. L'utilisation d'une stratégie EST pour analyser au niveau moléculaire la réponse des protoplastes visait trois objectifs principaux. Tout d'abord, nous envisagions ainsi identifier des marqueurs moléculaire de la réponse au stress chez *L. digitata* pour lesquels nous n'avions que très peu de données. Ensuite, nous espérions isoler des transcrits codants des protéines impliquées dans la biosynthèse de la paroi cellulaire. En effet la banque a été construite à partir d'ARN messagers extraits à différents temps de culture, et nous avons montré qu'au cours de la culture les protoplastes commencent à re-synthétiser une paroi. Enfin, ce type d'approche permet toujours au minimum de générer des catalogues de nouvelles données et donc d'enrichir le nombre de séquences disponibles chez *L. digitata*.

1-1 Préparation des protoplastes

Les protoplastes ont été isolés au cours de 6 manipulations où nous avons utilisé environ 20 g de tissus frais prélevés sur la zone méristématique de l'algue (fig. 5) Au total, 123 g de tissus ont été traités. Nous avons obtenu des rendements variant de 2.3×10^7 à 3.9×10^7

Figure 32 : Fractions d'ADNc obtenues à partir des ARNm de protoplastes de *L. digitata*. La fraction 8 a été utilisée pour la construction de la banque.



protoplastes par gramme de tissu frais. Ces résultats sont comparables à ceux observés lors de travaux antérieurs (Benet et *al.*, 1997). Par souci d'homogénéité pour la suite des expériences, tous les protoplastes obtenus ont été dilués de façon à obtenir une concentration de 2×10^6 cellules par ml.

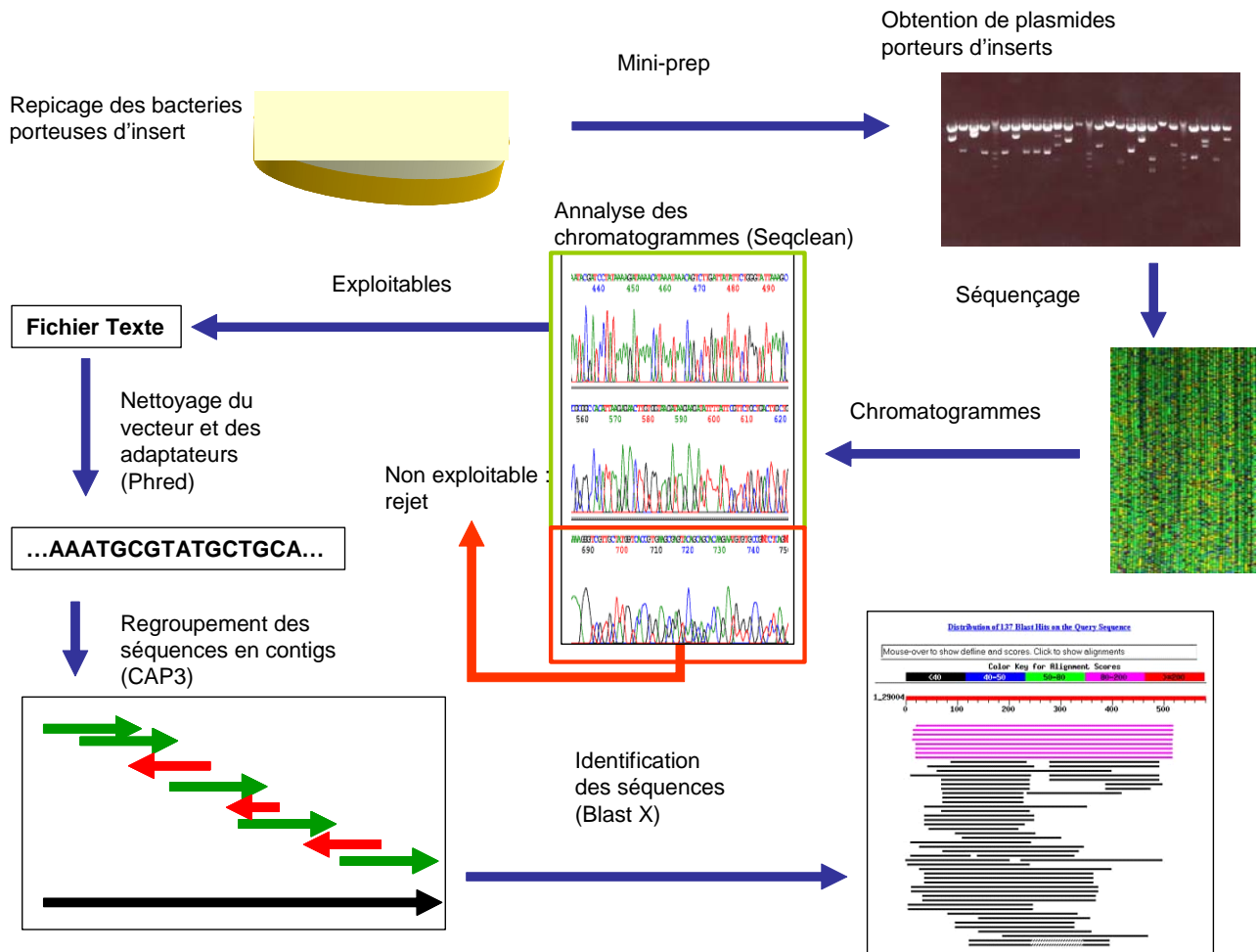
1-2 Extraction des ARN totaux

Les rendements obtenus lors des premières extractions d'ARN totaux étaient assez faibles et nous avons tenté dans un premier temps d'optimiser le protocole afin d'obtenir la quantité nécessaire à la réalisation de la banque (1 mg d'ARN totaux). Nous avons modifié certaines étapes du protocole afin par exemple de tester l'effet du volume de tampon d'extraction ou de l'étape de précipitation des polysaccharides par l'éthanol sur le rendement final. Aucun de ces essais n'a réellement permis d'améliorer le rendement et la seule possibilité a alors été de produire un grand volume de protoplastes : 1,820 l final à une concentration de 2×10^6 cellules / ml. Nous avons ainsi pu isoler 1,3 mg d'ARN totaux.

1-3 Construction et contrôle de la banque

Nous avons réussi à isoler 7,3 μ g d'ARNm à partir de ces 1,3 mg d'ARN totaux au cours de 2 purifications. Après synthèse des ADNc et ligation des adaptateurs *EcoRI* et *XhoI* nécessaires à l'orientation de la banque, nous avons fractionné les ADNc en fonction de leur taille, en les éluant sur une colonne de chromatographie. Vingt quatre fractions ont été collectées (fig. 32). Les résultats obtenus lors de la précédente étude EST menée sur *L. digitata* (Crepineau et *al.*, 2000) ont montré que la partie 3' non traduite des ADNc est de taille élevée. Par conséquent, nous avons choisi pour construire la banque d'utiliser la fraction 8 qui contient des ADNc dont la taille est comprise entre 800 et 1500 bp, ce qui devait permettre d'obtenir suffisamment d'information sur la partie codante. Après l'étape d'encapsidation, nous avons obtenu une banque non amplifiée de titre 2×10^6 pfu /ml pour un volume total de 500 μ l. Cette banque a ensuite été amplifiée et le titre final était de 2×10^9 pfu/ml pour un volume total de 200 ml. Ces résultats sont légèrement supérieurs à ceux obtenus lors de la précédente étude menée sur *L. digitata* et suggère une bonne représentativité des transcrits.

Figure 33 : Schéma général d'acquisition et d'analyse des EST.



Lors de la première excision de masse, nous avons effectué une digestion par *EcoRI* et *XhoI* à partir de 24 clones afin de vérifier la taille des inserts. L'analyse sur gel d'agarose a montré que la taille des inserts variait de 800 à 2500 pb, ce qui correspondait à la taille attendue.

2- Séquençage et analyse des séquences

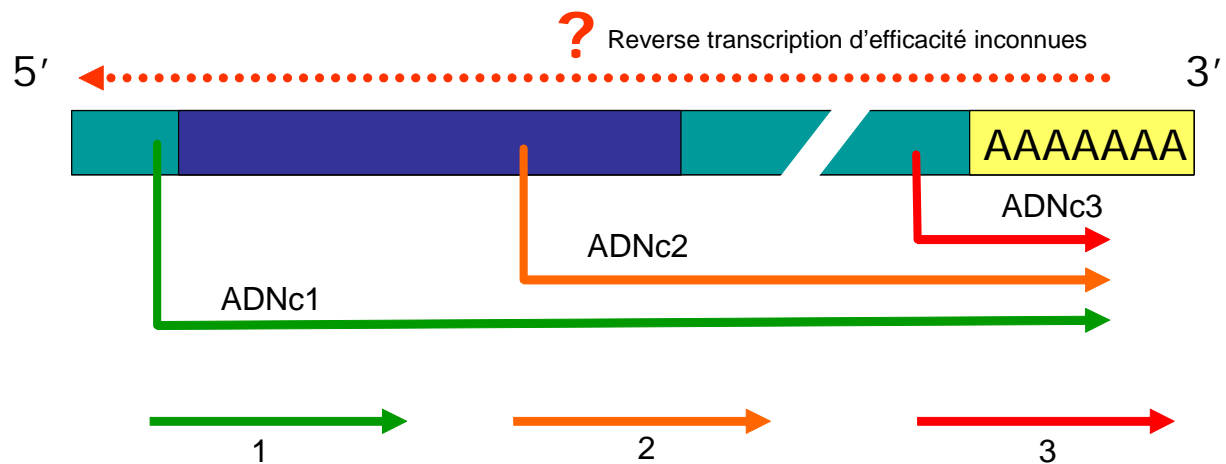
Le traitement d'un nombre aussi important de séquences nécessite de mettre en place un protocole standard. Ce protocole a ensuite été automatisé afin d'identifier plus rapidement les séquences. L'ensemble de la démarche depuis le clonage des ADNc jusqu'à leur identification est présenté à la figure 33.

2-1 Traitement des séquences et contigage

Typiquement, la construction d'une banque dans le cadre d'une approche EST est conçue de façon à orienter les inserts dans le vecteur plasmidique. Nous avons donc procédé au séquençage systématique et aléatoire de 2270 ADNc issus d'ARNm de protoplastes de *L. digitata* à partir de la zone 5' non traduite. Cette approche classique vise à obtenir directement des informations sur la partie codante des transcrits. Lors de la phase d'acquisition des séquences, un contrôle qualité a été opéré sur les chromatogrammes à l'aide des logiciels PHRED et Seqclean. PHRED attribue un indice de qualité à chaque pic (nucléotide) constituant le chromatogramme. Lorsque les pics de mauvaise qualité sont éliminés, afin de « nettoyer » la séquence des nucléotides incertains ou illisibles, le fichier texte est transformé en fichier FASTA. Ce fichier FASTA est ensuite traité par le logiciel Seqclean qui recherche et élimine par comparaison à une banque de donnée spécifique les portions de séquences non informatives telles que les fragments de vecteurs, les adaptateurs utilisés lors de la construction de la banque et les séquences d'ARN ribosomiaux et mitochondriaux. Après traitement des chromatogrammes par ces 2 logiciels paramétrés par défaut, 1985 séquences (87%) d'une longueur moyenne de 500 paires de bases (pb) ont été retenues pour poursuivre l'étude.

Un même gène peut être transcrit plusieurs fois, il est donc possible d'obtenir plusieurs ARNm correspondant à un même gène. En outre, au moins deux facteurs peuvent avoir une influence sur la taille finale de l'ADNc synthétisé. Ainsi, l'efficacité de la transcriptase

Figure 34 : Explication des différentes possibilités pour un même transcrit, exprimés de façon multiples, d'aboutir à plusieurs EST de séquences différentes.



Un gène peut être représenté par plusieurs ARNm en fonction de son taux d'expression dans la cellule au moment de l'extraction d'ARN. A partir de ces ARNm, des ADNc de taille variable peuvent être obtenus, en fonction de l'efficacité de la transcriptase inverse. 1, 2, 3 sont 3 ESTs de longueur identique mais qui se positionnent de façon différente par rapport à l'ARNm initial. 1 sera riche en information sur la partie codante, 2 sera assez informatif mais incomplet, 3 sera très peu informatif de par sa position dans la partie 3' non traduite et sera difficile à identifier s'il n'est pas associé à 1 et 2.

inverse qui dépend notamment de sa capacité à remonter en amont du point d'initiation de la synthèse de l'ADNc peut aboutir à la synthèse d'un ADNc partiel. De même, la fragilité des ARNm et leur dégradation éventuelle peut conduire à un ADNc incomplet. Ces artéfacts expérimentaux peuvent en fait être exploités par la suite. En effet, les EST obtenus à partir de ces ADNc partiels peuvent représenter des portions différentes d'un même ARNm et permettre de reconstituer plus ou moins entièrement le transcrit initial (fig. 34). Une étape primordiale lors de l'analyse des séquences est le regroupement des EST qui correspondent à un même ARNm (et donc à un même gène) afin d'ordonner ces fragments d'ADN contigus et de construire ce que l'on appelle un contig. Cette étape a été réalisée en utilisant deux programmes du TGICL (TGI Clustering Tool : <http://www.tigr.org/tdb/tgi/software/>): Megablast et CAP3. Megablast compare toutes les séquences deux à deux, avec comme critère de sélection pour les séquences chevauchantes une homologie de 94 % sur une longueur minimum de 30 pb (Perteau et *al.*, 2003). CAP 3 regroupe ces séquences chevauchantes en contig en prenant comme critère de sélection une homologie de 93 % sur une longueur de 50 pb. Le but de ce regroupement est d'obtenir des séquences plus longues, donc plus informatives et d'identifier des séquences inconnues parce qu'elles appartiennent à un contig dont la fonction a déjà été identifiée (fig. 35). De plus, ce regroupement permet de calculer la redondance de la banque. La redondance correspond à la probabilité qu'un ADNc nouvellement séquencé soit déjà présent parmi les EST déjà analysées. La redondance R a été calculée suivant la formule : $R = (1 - (Nu / Nt)) \times 100$, où Nu est le nombre de séquences uniques et Nt le nombre de séquences totales. Ainsi, lorsqu'on atteint une valeur de redondance de 50%, cela signifie qu'il y a une chance sur deux que le séquençage d'un ADNc conduise à obtenir une séquence déjà présente dans le catalogue d'EST. Plus la redondance est élevée, plus l'effort de séquençage afin d'obtenir des données nouvelles est important. Cette valeur de redondance est donc intéressante à suivre pour estimer le moment où l'on souhaite arrêter le séquençage aléatoire de la banque.

Nous avons identifié par cette méthode 230 contigs et 854 singletons (EST uniques non incorporées dans un contig), soit un total de 1084 transcrits différents. Ce regroupement en contigs nous a permis d'estimer la redondance de cette banque d'ADNc à 56%. La redondance augmentant avec le nombre d'ADNc séquencés, nous avons décidé d'arrêter la phase d'acquisition de données (fig. 36). Nous avons en effet estimé que l'effort de séquençage devenait trop important sur les plans humains et financier par rapport aux

Figure 35 : Principe des contigs et du contigage. Les flèches vertes représentent les EST, les parties chevauchantes sont indiquées en orange.

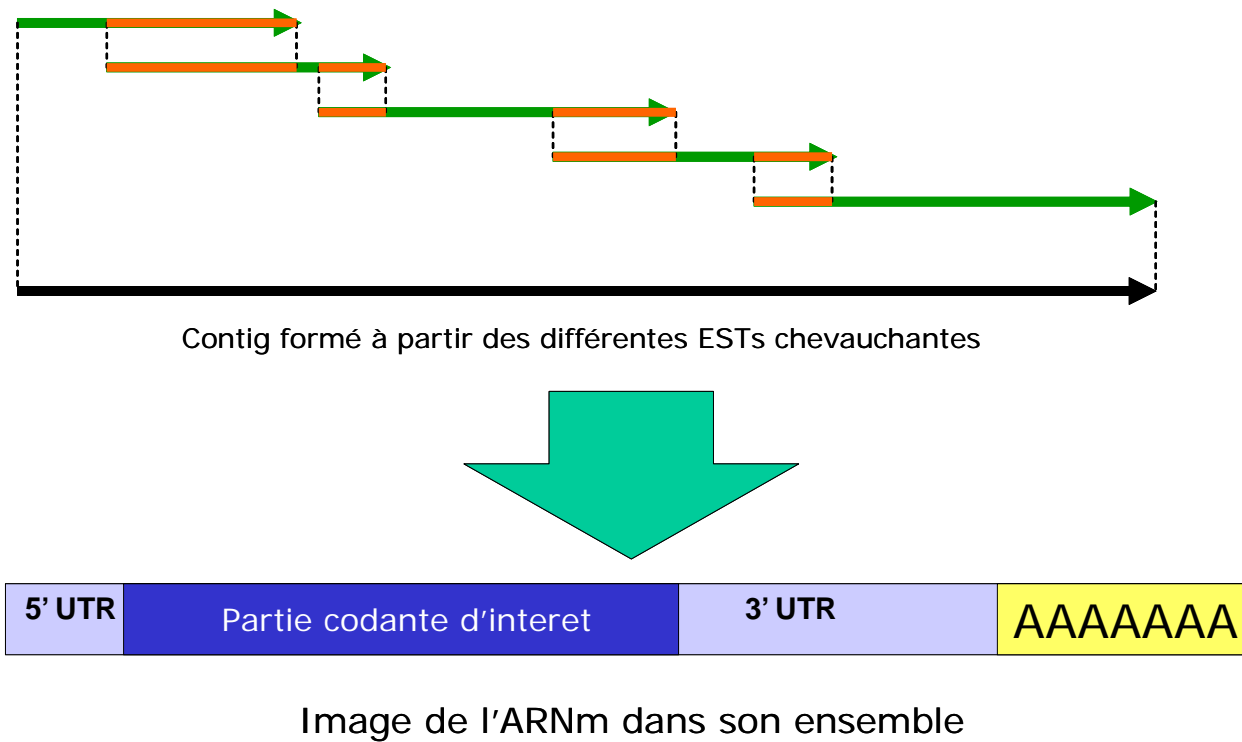
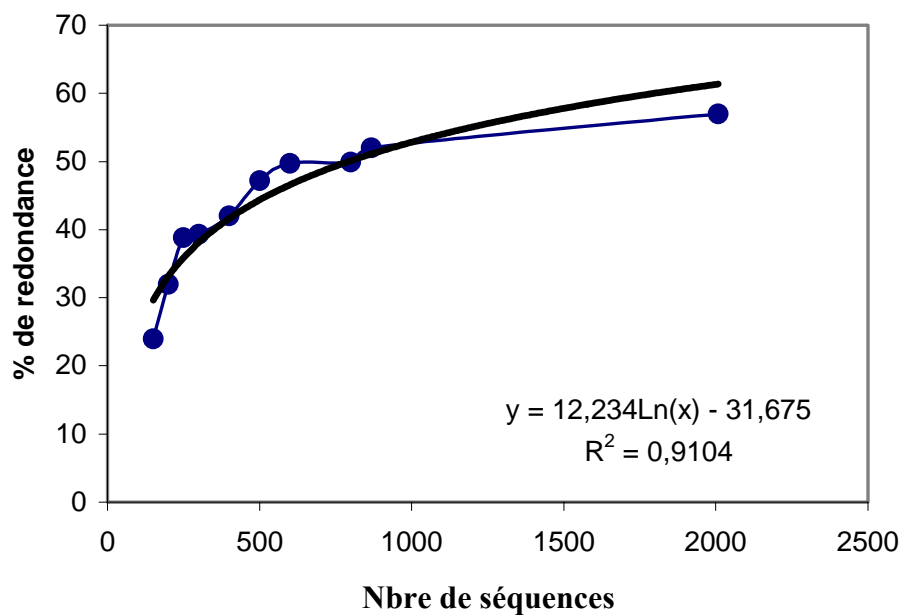


Figure 36 : Evolution de la redondance en fonction du nombre de séquences obtenues.



nouvelles données (séquences non présentes dans la banque EST) pouvant être acquises.

2-2 Annotation des séquences

Les progrès réalisés en bioinformatique ont permis de gagner un temps précieux lors de l'analyse des séquences. Les séquences obtenues lors de ce projet ont permis de tester et de valider les outils créés au sein de la Station Biologique de Roscoff par Olivier Colin et Erwan Corre. Au début du projet, l'analyse des séquences se faisait principalement manuellement. En effet, une suite de programmes disponibles avec le séquenceur permettait de nettoyer les chromatogrammes, c'est-à-dire d'éliminer les séquences ou portions de séquences non lisibles et les portions correspondant au vecteur. Les séquences obtenues après ces traitements étaient analysées les unes à la suite des autres grâce au logiciel Blast disponible sur le site du NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Les résultats étaient répertoriés sous format Excel, avec, pour chaque séquence, son nom, le nom de la séquence présentant le plus de similitudes ainsi la E-value correspondante. La mise en place d'un système automatisé de traitement des séquences a permis d'améliorer grandement le rendement du traitement des séquences. En effet, la suite de programmes mise en place permet d'effectuer automatiquement le nettoyage des séquences, l'analyse par blast, et fournit à l'utilisateur un tableau Excel regroupant l'ensemble des résultats pour chacune des séquences.

L'annotation des ESTs s'est déroulée en plusieurs étapes. Nous avons dans un premier temps comparé les séquences des singletons à la banque de protéines non redondante GenBank (NIH) à l'aide du programme BlastX. Du fait du peu de séquences d'algues brunes disponibles dans ces bases de données, nous avons choisi de retenir une E-value inférieure à 10^{-4} comme valeur seuil d'identification. Le même processus d'identification a été appliqué à l'ensemble des contigs. Dans 95 % des cas, l'identification d'un contig était identique à l'identification des EST formant ce contig. Dans le cas où les deux identifications étaient divergentes, nous avons procédé à une vérification de la qualité de l'assemblage du contig et, lorsque celle-ci nous est apparue satisfaisante, nous avons attribué l'annotation du contig à celle de l'EST. La plupart des EST présentant une identification divergente de celle du contig était soit positionnée dans la partie 3' non traduite du transcrit et donc non identifiable dans les banques de données consultées pour l'annotation individuelle des EST, soit de taille inférieure à celle des autres EST constituant le contig, ce qui peut amener à des identifications

Liste des catégories fonctionnelles utilisées pour l'annotation des ESTs issues de protoplastes de *L. digitata* :

-**Métabolisme** : catégorie regroupant 100 EST codant des protéines impliquées dans différents métabolismes (métabolisme des acides nucléiques, métabolisme du carbone, métabolisme secondaire, métabolisme des acides aminés).

-**Energie** : catégorie regroupant 19 EST codant des protéines impliquées dans la production d'énergie cellulaire et la photosynthèse.

-**Synthèse protéique** : catégorie regroupant 328 EST codant des protéines telles que les protéines ribosomales et les facteurs d'élongation.

-**Destination protéique** : catégorie regroupant 46 EST codant des protéines liées à la modification et l'élimination de protéines telles que l'ubiquitine et les sous unités du protéasome.

-**Transcription** : catégorie regroupant 19 EST codant des protéines impliquées dans la synthèse d'acides nucléiques.

-**Communication cellulaire** : catégorie regroupant 41 EST codant des protéines intervenant dans la communication intra et extra-cellulaire.

-**Stress, défense et vieillissement** : catégorie regroupant 203 EST codant des protéines jouant un rôle dans différents mécanismes de défense.

-**Organisation cellulaire** : catégorie regroupant 120 EST codant des protéines impliquées dans l'organisation intra-cellulaire, la synthèse et la modification de paroi, le cytosquelette de la cellule.

-**Division cellulaire** : catégorie regroupant les 2 EST codant des protéines prenant part aux mécanismes de division cellulaire.

-**Protéines inconnues conservées** : catégorie regroupant 120 EST présentant des homologies avec des séquences de fonction inconnue dans les bases de données.

divergentes. Ce regroupement en contig nous a finalement permis d'identifier un certain nombre d'ESTs pour lesquelles aucune similitude n'avait été obtenue lors de la comparaison avec les banques de données. Ainsi, nous avons pu attribuer une fonction putative à 44 % des transcrits isolés (soit 878 EST). Ce faible pourcentage d'identification s'explique par la principale limitation de la stratégie employée : les EST ne peuvent être identifiées que par comparaison avec ce qui est déjà connu et identifié dans les banques. Autrement dit une séquence entièrement nouvelle ne peut pas être identifiée par cette approche. Il est par conséquent difficile, voir impossible, d'identifier ainsi des séquences spécifiques d'algues brunes pour lesquelles encore très peu de données sont disponibles dans les banques publiques. Après analyse des séquences et le regroupement de celles-ci en contigs, nous nous sommes aperçus que celles-ci se positionnaient principalement dans la partie 3' non traduite de l'ARNm. En effet, nous avons souvent observé la présence de multiples codons stop lors d'analyse des différents cadres de lecture. De plus, suite au regroupement en contigs et à leur identification, il est apparu que ceux-ci, bien que d'une longueur acceptable, ne possédaient qu'une faible partie codante en 5' (permettant l'identification), suivie d'une très longue partie non identifiable généralement terminée par une queue polyA. Cette forte représentation de séquences correspondant à la partie 3' non traduite des ARNm a été observée lors la précédente analyse EST menée sur *L. digitata* (Crépineau et *al.*, 2000) et a rendue difficile l'identification des transcrits.

Les ESTs ont été annotées manuellement et organisées en dix catégories fonctionnelles suivant le modèle utilisé par le MIPS (Munich Information center for Protein Sequences) pour *Arabidopsis thaliana* quand l'identification de l'EST le permettait. Certaines ESTs codantes pour des enzymes absentes chez *A. thaliana*, telles que les vanadium bromoperoxydases et les mannuronanemannuronane-C5-épimérase, ont été classées en considérant les données acquises au laboratoire sur ce type d'enzyme. Nous n'avons pas constaté la présence de séquences qui auraient pu indiquer une contamination de la banque par des séquences provenant d'organismes eucaryotes (levures, champignons...) quelconques au cours du protocole présenté ci-dessus. La liste des catégories fonctionnelles ainsi que le nombre d'EST identifiées dans chacune d'entre elle est présenté sur la page adjacente.

Les catégories fonctionnelles, ainsi que le nombre d'ESTs qui y sont associées, sont détaillées ci-après. Les ESTs ne présentant pas de similitudes significatives lors de l'analyse par comparaison avec les bases de données ont été regroupées dans la catégorie « protéines inconnues ». L'ensemble des ESTs et contigs identifiés au cours de cette étude est disponible sur le site : <http://www.sb-roscoff.fr/laminaria.html>.

Tableau 1 : Les 10 contigs correspondant aux gènes les plus représentés dans la banque d'ADNc de protoplastes. Les contigs 1 et 1 bis étant très proches, le logiciel CAP leur a attribuer une dénomination commune tout en les différenciant.

Nom	Nombre d'EST	Taille de la séquence	Identification putative	Catégorie fonctionnelle	E-value
ctg P 2	50	2670 bp	Heat shock protein 70	Stress, défense	0
ctg P 1	37	2047 bp	Bromoperoxidase (pld1)	Stress, défense	8,00E-85
ctg P 1 (bis)	35	2678 bp	bromoperoxidase (S2)	Stress, défense	1,00E-84
ctg P 3	38	1997 bp	Proteine inconnue	Inconnues	0.002
ctg P 4	27	2175 bp	Proteine inconnue conservée	Inconnue conservées	7,00E-15
ctg P 5	24	2350 bp	Protéine inconnue conservée	Inconnue conservées	5,00E-56
ctg P 6	22	953 bp	Guanine nucleotide binding protein	comunication cellulaire	1,00E-123
ctg P 8	21	1579 bp	Glutathion S transferase	Stress, défense	3,00E-20
ctg P 9	20	1598 bp	Facteur d'élongation 1 alpha	Synthèse protéique	1,00E-172
ctg P 10	17	1841 bp	6 phospho gluconate dehydrogenase	Metabolisme	0

2-3 Séquences les plus représentées

Nous avons choisi de construire une banque non normalisée afin de conserver l'information sur le niveau d'expression relatif des gènes chez les protoplastes en comparaison d'un état physiologique « non stressé » représenté par la banque construite à partir des thalles sauvages de *L. digitata*. Même si on ne peut exclure un biais lors des étapes de synthèse des ADNc et de clonage des inserts, on peut en effet faire l'hypothèse que la représentation des différents gènes dans le catalogue d'EST reflète le niveau d'expression des gènes dans les cellules. Nous avons ainsi choisi d'extraire pour chaque catalogue d'EST les 10 contigs correspondant à des gènes fortement exprimés, c'est à dire les contigs qui regroupent le nombre le plus important d'EST et qui correspondent donc, d'après notre analyse bioinformatique, à la transcription d'un même gène.

Le tableau 1 détaille ces 10 contigs les plus importants chez le protoplaste. Le contig le plus abondant regroupe 50 EST et correspond à un gène de heat shock protein, la HSP70, pour lequel un ADNc pleine longueur a pu être reconstruit. Deux gènes de bromopéroxydase à vanadium sont également très exprimés. Les contigs correspondant à ces 2 gènes regroupent 35 et 37 EST et codent pour 2 bromopéroxydases différentes : une bromopéroxydase de type Ld-vBPO (S2) ayant déjà été identifiée chez *L. digitata* et une bromopéroxydase de type pLd-vBPO (Pld 1) n'ayant jamais été identifiée auparavant chez *L. digitata* (Colin et al., 2003). Les autres gènes qui apparaissent fortement exprimés chez le protoplaste codent pour une glutathion-S-transférase (GST, 21 EST), une 6-phosphogluconate-déshydrogénase (6PGDH, 17 EST), une guanine nucléotide binding protein (22 EST), le facteur d'élongation 1 α (EF1 α , 20 EST) et 3 gènes pour lesquels aucune identification n'a été possible. Si on regarde l'ensemble des EST et non plus seulement les contigs les plus importants en nombre d'EST, on observe qu'un autre contig codant une vanadium bromopéroxydase est présent dans la banque de donnée. Ce contig regroupant 4 EST (Ctg P 75) s'est avéré correspondre au gène de pLd-vBPO. La longueur sur laquelle ce Ctg P 75 chevauche Ctg P 1 était insuffisante selon les critères du programme d'assemblage des EST en contigs pour regrouper ces 2 contigs en un seul. Ce regroupement a été effectué manuellement et sa séquence nucléotidique obtenue a été traduite afin d'aligner les séquences protéiques des 2 bromopéroxydases identifiées chez *L. digitata* (fig. 37). Il apparaît que cette nouvelle protéine présente 71 % de similitudes avec Ld-vBPO. Toujours en regardant l'ensemble des EST identifiées chez le protoplaste, on observe également 4 contigs codant 4 GST différentes qui regroupent en tout 41 EST.

Figure 37 : Alignement des séquences en acides aminés des vanadium bromopéroxydases identifiées chez *L. digitata*. vBP01 (vanadium bromopéroxydase 1) a été caractérisée chez le sporophyte (EMBL accession number AJ491786). CtgP75, CtgP1A, CtgP1B sont des séquences protéiques traduites des contigs CtgP75, CtgP1A, CtgP1B identifiés chez le protoplaste. Les acides aminés associés au site actif sont marqués d'un #

vBP01	MKISSLGLTALLAARAPCLGYEEPP...TQPLLSGNVCRVRDSDLDFLDVPRAKVTLEKRLAIAKDEISVGPTCHINNGDEENVPLFAGQYHKSLPHDKFGQVDEDAV	107
CtgP1B		-
CtgP75	MKISFVGLTALLAARPPCFAAGDHDVVRATLPLLSGSVCRVRDSDLDFLDVPRATVTLEKRLAIAKNEFGVGPTCHITNGDEEDVPLFAGQYHKSLPHDKFGQVDAADY	108
CtgP1A		-
vBP01	KKLLECVFTSDINECEKVPSGAGRRGGAKITNELGGTAHQVTGADSDNVFITTPDSSLSERLAAQCAEVYWMALIRDIPEGEAKNDYVRLAAENLOQLPAFKGLNIPR	216
CtgP1B		18
CtgP75	QKLLDCVFTSDINVCCKVPSGAAGGGGAKIVNEIGGTAHQVTGADSDSVFITTPDALLSERLAAQCTEVYWMALTRDVPEINQFGNDGLVQIAAENLAALPEFKGLSIPR	217
CtgP1A		-
vBP01	SEGGKIDPVTDLFRTITWPGVITGPVVSQFMLSDFLIDSIKVTPKADPLTEGVDMYTAQFWLDVQNGASKLETIFDEENPRFIRNGRDLATIALRDQLYTEAFRAALI	324
CtgP1B	SEGGKIDPVTDLFRTITWPGVITGPVVSQFMLSDFLIDSIKVTPKADPLTEGVDMYTAQFWLDVQNGASKLETIFDEENPRFIRNGRDLATIALRDQLYTEAFRAALI	126
CtgP75	NADG.....	221
CtgP1A	NADGITDPVTQLFRTEWPGVITAGPVVSQFMLSDFLIDSIKVTPEHVTIVERMVMTAFQFWLDVQNGCDSDVVTETETIDPAEELFIRNGRDLANLSFNDQLYTEAFRAALI	109
	# #	
vBP01	LFTEGALGCEVGPYAEABRQQGFATFGEPHILAMASASSVTRHAWYAKWQVHRMLRPEAYGALVHNTLMRDVITPLPDSILRNTBELLNRVEVHNORMNPDGEKTFLLP	433
CtgP1B	LFTEGALGCEVGPYAEABRQQGFATFGEPHILAMASASSSTRHAWYAKWQVHRMLRPEAYGALVHNTLMRDVITPLPDSILRNTBELLNRVEVHNORMNPDGEKTFLLP	235
CtgP75		-
CtgP1A	LFSESVLGCSI GPYAESLRQQGFITFGE SHILAMASSSSSTRHAWYAKWQVHRVLRPEAYGGLVHNTLMRDVITPLPDSILRNTBELLNRVAANNIRMNPDGEKTFLLP	218
	# ### # #	
vBP01	MARAAQGSPTHPAYPSGHAINNCAYITALKAFICYEAGQKCFPNPVVSNDEGTRIRIKYKPSGREIVGECVNEKCKLVEGLTYEGELNKKISANVLLGRSHIGVHWRMMDGVY	542
CtgP1B	MARAAQGSPTHPAYPSGHAINNCAYITALKAFICYEAGQKCFPNPVVSNDEGTRIRIKYKPSGREIVGECVNEKCKLVEGLTYEGELNKKISANVLLGRSHIGVHWRMMDGVY	344
CtgP75		-
CtgP1A	MARAAQGSFNHPAYPSGHAINLCGYITLKAFFVCFEAGQKCFPNVVESSDGLARVPVVTCTGFLEDCVDKDKNKTTLGLTIEGELNKKVASNVIIIGRSHIGVHWRMMDGVY	327
vBP01	GALMGETSVRRRLQOELEGLPEAREVECKKRRGDIPPATYKFRLYSGKILELYCRNLYKLDGKLCGAGTGDGDFCDPIDEDDYSSFDIDIVEEHAQFSLHGHTTEL	646
CtgP1B	GALMGETSVRRRLQOELEGLPEAREVECKKRRGDIPPATYKFRLYSGKILELYCRNLYKLDGKLCGAGTGDGDFCDPIDEDDYSSFDIDIVEEHAQFSLHGHTTEL	448
CtgP75		-
CtgP1A	GALMGETSAVRRRLQOELEGLPEARVVDGARSDDIPPATYKFRLYSGKMLEIFGVTLRYRLDQCLCKGAYTGDDFCNVVNEDEKFEETEDIVKHSATVSVH...TEL	428

Même s'ils ne sont pas parmi les transcrits les plus représentés, il est intéressant de noter que 23 des EST de protoplastes présentent des similitudes significatives avec des séquences nucléotidiques isolées du virus d'*Ectocarpus siliculosus*. Ces 23 séquences peuvent être divisées en 2 catégories. La première regroupe 12 EST présentant des homologies avec des séquences du virus ayant une fonction inconnue (Esv-1-163, Esv-1-164, Esv-1-2, Esv-1-7). La seconde regroupe 11 séquences présentant des homologies avec une protéine du virus identifiée comme une mannuronanmannuronane-C5-épimérase (Esv-1-226). La présence d'un nombre non négligeable de transcrits de *L. digitata* présentant de fortes similitudes avec des séquences du virus infectant l'algue brune *Ectocarpus siliculosus* soulève la question de l'origine de ces gènes ainsi que du rôle qu'ils peuvent avoir chez ce virus et chez *L. digitata*. Nous pouvons formuler l'hypothèse que ces gènes seraient communs à *L. digitata* et *E. siliculosus*, le virus infectant cette dernière les ayant incorporés à son génome par transfert de gènes au cours de son évolution. Cette hypothèse pourra être vérifiée suite au séquençage complet du génome d'*E. siliculosus* (actuellement en cours) qui révélera ou non la présence de ces gènes chez cette algue. Nous pouvons également formuler l'hypothèse inverse, c'est à dire que ces gènes seraient à l'origine virale et auraient été transférés aux algues au cours de l'évolution. La validation de cette seconde hypothèse apparaît beaucoup plus complexe à réaliser. Nous pouvons également nous interroger sur la fonction de ces gènes. Dans le cas d'une origine algale de ces gènes, la question de la fonctionnalité de ceux-ci chez le virus reste à démontrer. La présence d'un gène codant une protéine agissant sur le composant le plus abondant de la paroi des algues brunes laisse supposer une implication de celui-ci dans les processus d'infection.

3- Comparaison des EST de protoplastes avec les EST de sporophytes

3-1 Seconde analyse de la banque EST de sporophytes de *L. digitata*

Afin de pouvoir comparer le catalogue d'EST obtenu à partir des protoplastes avec celui obtenu en 2000 à partir des sporophytes (Crépineau et *al.*, 2000) mais en utilisant un traitement informatique différent, il était nécessaire de procéder à une nouvelle analyse de ce jeu de données. Les 514 EST obtenues chez les sporophytes de *L. digitata* ont donc suivi le même traitement informatique que celles obtenues chez les protoplastes. Les EST du

Tableau 2 : Les 10 contigs correspondant aux gènes les plus représentés dans la banque d'ADNc de sporophytes de *L. digitata*. Synth. Prot, Synthèse protéique ; Dest. Prot. , Destination protéique.

Nom	Nombre d'EST	Taille de la séquence	Identification putative	Catégorie fonctionnelle	E-value
ctg S 1	12	1080 bp	bromoperoxidase (Ld -vBPO S2)	Stress, défense	8,00E-53
ctg S 2	10	749 bp	Ribosomal protein S8	Synthèse protéique	4,00E-45
ctg S 3	8	646 bp	Ubiquitine-ribosomal protein L32 fusion protein	destination protéique	2,00E-05
ctg S 5	7	576 bp	Ribosomal protein L19	Synthèse protéique	4,00E-47
ctg S 6	7	438 bp	Ribosomal protein L26	Synthèse protéique	4,00E-24
ctg S 7	7	683 bp	Unknown protein	Inconnue	0,048
ctg S 8	6	549 bp	Ribosomal protein L13 a	Synthèse protéique	2,00E-63
ctg S 9	6	413 bp	Ribosomal protein L14	Synthèse protéique	2,00E-25
ctg S 10	6	705 bp	Elongation factor 1 alpha	Synthèse protéique	1,00E-102
ctg S12	5	410 bp	Ribosomal protein L10	Synthèse protéique	6,00E-25

catalogue « Sporophyte » ont ainsi été regroupées en 68 contigs et 260 singletons, et la redondance a été estimée à 45 %. Depuis la première annotation de ces EST, le nombre de séquences nucléotidiques disponibles dans les bases de données a doublé (10106023 en 2000, 22318883 en 2002 ; statistiques GeneBank 2003). Ces nouvelles données disponibles pouvant permettre l'identification de séquences inconnues, j'ai donc procédé à l'actualisation de l'annotation du catalogue d'EST disponibles chez le sporophyte. Les banques de données utilisées pour cette mise à jour sont les mêmes que celles utilisées pour l'identification des EST de protoplastes. 253 EST (correspondant à 55 contigs et 58 singletons) de sporophytes (50%) ont pu être identifiées et classées dans les mêmes catégories fonctionnelles que celles établies pour les EST de protoplastes. Bien que cette nouvelle analyse permette de procéder à la comparaison des 2 jeux de données, il est à noter qu'aucune nouvelle identification de séquence n'a pu être effectuée. Malgré cette observation, la mise à jour d'une banque de donnée EST reste à mon sens une étape importante de l'analyse de celle-ci. Cette mise à jour permet éventuellement d'identifier des séquences restées jusqu'alors inconnues et d'augmenter, longtemps après « l'arrêt » du projet, les données disponibles sur l'organisme étudié, en profitant des progrès réalisés dans l'annotation de séquences chez d'autres organismes. On peut ainsi dire qu'un projet EST n'est jamais vraiment achevé et est une source potentielle de nouvelles données longtemps après l'arrêt du séquençage.

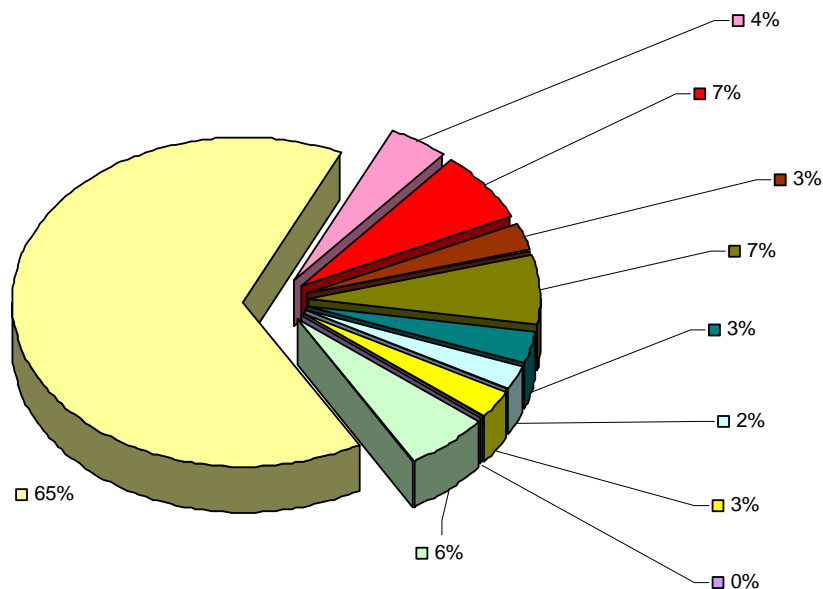
J'ai ensuite extrait les 10 contigs correspondant aux gènes les plus abondamment transcrits chez le sporophyte (tableau 2) afin de pouvoir les comparer aux 10 contigs les plus important chez les protoplastes.

3-2 Comparaison entre les 2 banques EST

La répartition des EST issues des protoplastes et des sporophytes dans les différentes catégories fonctionnelles est présentée en figure 38. Pour cette analyse comparée, on ne considère pas les gènes dont la fonction n'a pas été identifiée. La catégorie synthèse protéique est majoritaire pour les deux états considérés mais apparaît plus réduite chez le protoplaste (37%) que chez le sporophyte (65%). On remarque que la catégorie « stress, défense et vieillissement » chez le protoplaste comporte une proportion plus importante d'EST (23%) que chez le sporophyte (7%). Le même résultat est observé pour la catégorie métabolisme. La répartition des EST dans les autres catégories est équivalente. Ces observations ont été corrélées statistiquement selon Audic et Claverie (1997) avec un indice de confiance de 0,95.

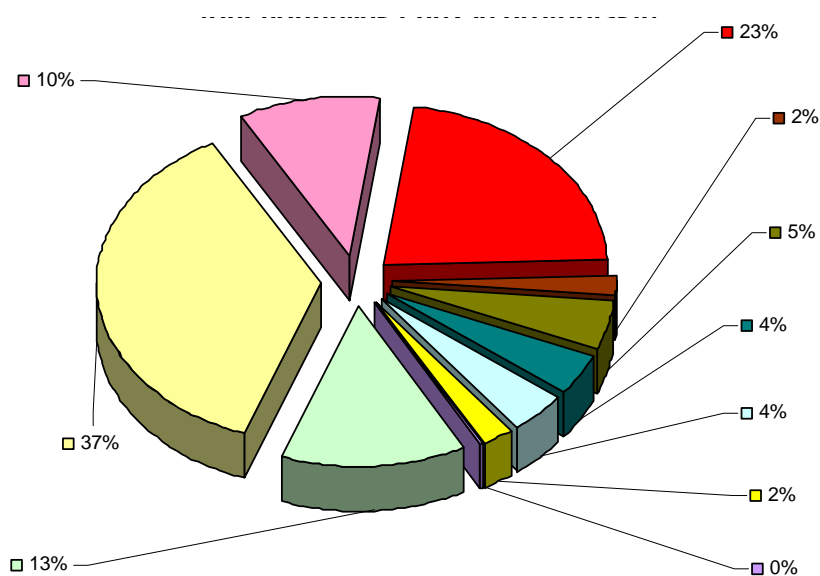
Figure 38 : Répartition des EST de sporophytes et de protoplastes de *L. digitata* dans les différentes catégories fonctionnelles.

A : Répartition des ESTs identifiées chez le sporophyte dans les différentes catégories fonctionnelles.



Synthèse protéique	Communication Cellulaire
Metabolisme	structure cellulaire
Sress, défense et vieillissement	transcription
Energie	Division cellulaire
Destination protéique	Inconnues conservées

B : Répartition des ESTs identifiées chez le protoplaste dans les différentes catégories fonctionnelles.



L'analyse comparée des 10 contigs les plus abondants pour chacune des banques révèle deux profils complètement différents. Chez le protoplaste, ces contigs codent pour les protéines déjà citées plus haut (HSP, BPO, GST, EF1-a, 6PGDH, protéines inconnues et inconnues conservées). Chez le sporophyte, 9 des 10 contigs les plus abondants codent pour des protéines impliquées dans la synthèse protéique et correspondent à des protéines ribosomales (S8, L32, L19, L26, L36, L13a, L14, L10) et au facteur d'élongation 1 α . Toutefois, le transcrit le plus présent chez le sporophyte code pour la bromopéroxydase Ld-vBPO S2. Le fait que l'on retrouve la bromoperoxydase Ld-vBPO exprimée en grande quantité chez les sporophytes et les protoplastes pourrait s'expliquer par le stress subi par les sporophytes lors de l'extraction des ARNm. On remarque également que les contigs les plus importants chez les sporophytes sont formés à partir d'une quantité d'EST beaucoup plus faible que celle observée chez le protoplastes. Cette différence peut s'expliquer par une transcription plus intense de certains gènes chez le protoplaste, notamment les gènes impliqués dans les mécanismes de défense et de réponse au stress.

3-3 Comparaison statistique des transcrits les plus représentés dans les 2 banques

J'ai recherché quels transcrits étaient différentiellement exprimés chez le protoplaste en procédant à une comparaison statistique entre les deux catalogues d'EST. Pour cela, j'ai tenu compte des paramètres de cette étude, c'est-à-dire la taille respective des deux populations d'EST (2270 EST de protoplastes et 514 EST pour le sporophyte), et des critères déterminés par Audic et Claverie (1997). J'ai ainsi déterminé qu'un transcrit devait être présent dans la banque de donnée des protoplastes en au moins 15 exemplaires et absent dans la banque de donnée des sporophytes pour que la différence d'expression soit statistiquement valide avec un indice de confiance de 0.95. Tous les gènes représentés par au moins 15 EST chez le protoplaste ont été recherchés dans la banque de sporophytes à l'aide du programme BlastN. Deux séquences présentant une E-value inférieure à 10^{-80} ont été considérées comme identiques afin de séparer au maximum les membres d'une famille multigénique. J'ai ensuite procédé à la comparaison statistique en utilisant l'interface disponible à l'adresse suivante : <http://igs-server.cnrs-mrs.fr/~audic/winflat.cgi> . Les résultats obtenus (tableau 3) montrent que la HSP 70, les GSTs, pLd-BPO, ainsi que 3 contigs de fonction inconnue, sont statistiquement plus représentés chez le protoplaste.

Tableau 3 : Expression différentielle des 10 contigs les plus représentés chez le protoplaste après comparaison avec les ESTs de sporophytes, d'après Audic et Claverie (1997). Les noms des séquences ainsi que le nombre d'EST correspondent aux résultats observés chez le protoplaste.

Nom	Nombre d'EST	Taille de la séquence	Identification putative	Expression différentielle	Valeur de confiance
ctg P 2	50	2670 pb	Heat shock protein 70	Protoplastes>Sporophyte	0,99
ctg P 1	37	2047 pb	Bromoperoxidase (pld1)	Protoplastes>Sporophyte	0,99
ctg P 1 (bis)	35	2678 pb	bromoperoxidase (S2)	Non	0,85
ctg P 3	38	1997 pb	Inconnu	Protoplastes>Sporophyte	0,99
ctg P 4	27	2175 pb	Inconnu conservé	Protoplastes>Sporophyte	0,98
ctg P 5	24	2350 pb	Single tandem repeat	Non	0,85
ctg P 6	22	953 pb	Guanine-nucleotide-binding-protein	Non	0,55
ctg P 8	21	1579 pb	Glutathion S-transferase	Protoplastes>Sporophyte	0,99
ctg P 9	20	1598 pb	Elongation factor 1 alpha	Non	0,1
ctg P 10	17	1841 pb	6-phospho-gluconate dehydrogenase	Non	0,85

Il est important de noter que le nombre d'EST codant des protéines ribosomales, tant chez le sporophyte que chez le protoplaste, est conséquent. Les raisons d'une telle représentation sont inconnues. Toutefois, nous pouvons supposer que ce résultat soit un biais dû à la méthode utilisée. En effet, ces protéines de petite taille sont largement référencées dans les banques de données et très conservées chez les eucaryotes, ce qui rend leur identification aisée. La partie 3' non traduite des ARNm de *L. digitata* étant très longue, les ADNc correspondant à ces protéines ont plus de chance d'être obtenus en pleine longueur et identifiés que d'autres codant des protéines de taille plus importante. Une telle proportion de protéines ribosomales n'a pas été observée au cours d'une étude similaire menée chez *Chondrus crispus*, chez qui la partie 3' non traduite est beaucoup moins longue. En revanche, même si la proportion d'EST codant ces protéines ribosomales est importante comparée aux autres catégories fonctionnelles chez le sporophyte et le protoplaste, les différences observées pour cette même catégorie entre le sporophyte et le protoplaste semble valide d'après l'analyse statistique. Les sporophytes expriment comparativement plus de protéines ribosomales que les protoplastes.

4- Marqueurs moléculaires potentiels de défense et de la réponse au stress

En partant du principe qu'il existe une corrélation entre le niveau d'ARNm et le nombre d'EST (Ohlrogge et Bennings, 2000), l'étude comparée des EST issus de protoplastes et de sporophytes indique que les cellules de protoplastes expriment un nombre plus important de transcrits impliqués dans les mécanismes de défense et de réponse au stress.

C'est le cas pour les protéines HSP 70. Ces chaperonnes sont codées par une famille multigénique très conservée chez les eucaryotes, et sont connues pour jouer un rôle crucial dans les mécanismes permettant à la cellule de retrouver son homéostasie (Nollen et *al.*, 2002). Les transcrits codants ces protéines sont induits par différents stress tels que les changements de température (Sanders et *al.*, 1992), la présence de polluants organiques (Sanders, 1990) ou de métaux lourds (Sanders et *al.*, 1991 ; Bauman et *al.*, 1993, Williams et *al.*, 1996), et l'exposition aux radiations UV (Nepple et Bachofen, 1997). En conditions normales, ces protéines chaperonnes permettent l'acquisition d'une structure tertiaire par les protéines néo-synthétisées. En cas de stress, elles empêchent l'agrégation de protéines mal repliées (Sheffield et *al.*, 1990), et permettent le repliement fonctionnel de protéines

dénaturées (Lee et *al.*, 1995). La comparaison du nombre d'EST obtenues dans les différentes catégories fonctionnelles indique que les protoplastes synthétisent moins de protéines que les sporophytes. Les HSP de protoplastes pourraient donc être majoritairement impliquées dans le repliement de protéines dénaturées. Si les causes de cette dénaturation ne sont pas déterminées, on peut suspecter que les EAO synthétisées par les protoplastes contribuent à ce phénomène.

Les EST codant deux bromopéroxydases différentes sont les plus nombreuses dans la catégorie « stress et défense » chez le protoplaste, et pLd-BPO y est le contig le plus représenté. Les bromopéroxydases catalysent l'oxydation du brome et de l'iode, sont impliquées dans l'élimination du peroxyde d'hydrogène nocif (Manley et *al.*, 2001), et jouent probablement un rôle prépondérant dans l'absorption et la concentration des halogènes chez *L. digitata* (Küpper et *al.*, 1998). Elles participent à la synthèse de composés volatiles halogénés (Wever et *al.*, 1991 ; Butler et *al.*, 1998) qui présentent des activités anti-herbivores (McConnell et *al.*, 1980) et anti-microbiennes (Neidleman et *al.*, 1986). Même si le rôle exact des bromopéroxydases reste à déterminer, leur représentation élevée, ainsi que la présence d'une nouvelle forme de bromopéroxydase, semblent confirmer leur participation aux mécanismes de défense induits chez le protoplaste.

Un nombre importante d'EST codant les enzymes de type glutathion-S-transférase (GST) a été observée chez le protoplaste. Les GSTs isolées chez le protoplaste semblent appartenir à la classe sigma. Les GSTs ont été identifiées chez tous les organismes vivants, dont les eucaryotes (Edwards et *al.*, 2000) et sont généralement considérées comme des enzymes de détoxification (Marrs et *al.*, 1996 ; Armstrong et *al.*, 1997 ; Hayes et *al.*, 1999). Ces enzymes catalysent la conjugaison du tri-peptide glutathion à une large variété de substrats hydrophobiques, électrophobiques et souvent cytotoxiques (Marrs et *al.*, 1996). Les substrats conjugués sont ensuite dirigés vers le compartiment cellulaire approprié, généralement la vacuole dans le cas des plantes. Les GSTs sont connues pour leur participation active dans les mécanismes de réponse au stress oxydatif et dans les mécanismes de défense (Marrs et *al.*, 1996, Hayes et *al.*, 1999). Jusqu'à présent, les GSTs de la classe sigma n'ont été identifiées que chez les mammifères. Elles sont impliquées dans la détoxification de produits exogènes toxiques, dans le métabolisme de produits lipidiques peroxydés, et présentent une activité prostaglandine synthase (Hayes et *al.*, 1999). De plus, il est intéressant de noter que 4 EST codant une protéine ATP-binding cassette de transport (ABC) ont été identifiées. Ces protéines interviennent directement dans les processus de

détoxication en permettant le passage des composés conjugués au glutathion vers des compartiments cellulaires spécifiques ou l'extérieur de la cellule. Nous pouvons donc supposer que les GSTs et ces protéines sont impliquées dans le même processus de détoxication.

Plusieurs EST codant des thiorédoxines et thiorédoxines peroxydases ont aussi été identifiées. Les thiorédoxines sont des enzymes ubiquitaires et sont induites lors de stress oxydatifs chez les bactéries, les levures et les mammifères (Ritz et *al.*, 2000 ; Muller et *al.*, 1991). L'identification d'EST codant ces types de protéines laisse supposer que ces 2 enzymes prennent part à la protection contre les EAO chez *L. digitata*, même si de tels mécanismes n'ont pas encore été démontrés jusqu'à présent chez cet organisme.

Les EST codant la 6-phosphogluconate-déhydrogénase (6PGDH) sont aussi nombreuses chez le protoplaste. Cette enzyme clé de la voie des pentoses phosphates catalyse la déshydrogénation du 6-phospho-D-gluconate en 6-phospho-2-déhydro-D-gluconate. Cette réaction a lieu en présence de NADP, et libère du NADPH, principal agent réducteur cellulaire. De par cette libération de NADPH, qui peut-être notamment utilisé comme substrat par les thiorédoxine peroxydases, nous pouvons supposer que la 6PGDH participe également à la protection contre les EAO chez le protoplaste et que c'est pour cette raison que ce gène est fortement exprimé.

5- Discussion

Les objectifs de cette étude étaient d'identifier des marqueurs moléculaires de la réponse au stress chez *L. digitata*, d'identifier des gènes impliqués dans la biosynthèse de la paroi cellulaire et d'augmenter le nombre de séquences disponibles pour cet organisme. La comparaison des données obtenues au cours de ce projet avec celles obtenues lors d'une étude EST menée sur des sporophytes de *L. digitata* montre que les protoplastes expriment un nombre plus important de transcrits codant des protéines impliquées dans les mécanismes de réponse au stress et de défense. Le protoplaste apparaît donc comme un outil adapté pour identifier de nouveaux marqueurs moléculaires de la réponse au stress même si finalement le nombre de nouveaux gènes identifiés peut paraître décevant. Parmi les transcrits impliqués dans cette réponse au stress, on trouve principalement des vanadium

bromopéroxydases, dont une nouvelle forme encore non identifiée auparavant, des HSP de différents poids moléculaire ainsi que des GST. Si les HSP apparaissent comme des protéines « universelles » de réponse au stress, l'implication des vanadium bromopéroxydases dans les mécanismes de réponse au stress constitue une des différences majeures existant entre les plantes et les algues marines. Cette étude soulève également la question de l'implication des GST chez les algues brunes dans ces mécanismes de réponse au stress chez qui l'implication, à ma connaissance, n'a pas été démontrée jusqu'à présent. Il est à noter que peu d'enzymes spécifiques d'algues brunes ont été identifiés par cette approche. Ce manque de spécificité dans les transcrits identifiés est principalement imputable à la méthode utilisée pour cette étude, les bases de données consultées ne contenant que très peu de séquences d'algues brunes. Un nombre élevé de transcrit n'a pas été identifié, certains apparaissant exprimés de façon plus importante chez le protoplaste que chez le sporophyte, ce qui en fait de potentiels marqueurs moléculaires de la réponse au stress. C'est notamment le cas du contig Ctg P 3 fortement présent dans la banque EST de protoplastes et très faiblement présent dans la banque EST de sporophytes. On peut espérer que l'acquisition de données chez d'autres organismes permettra une annotation de ce contig lors d'une prochaine mise à jour de l'annotation des EST de protoplastes. Suivant le même principe, on peut également envisager qu'une étude bioinformatique utilisant des données de motifs de séquences permette d'identifier un éventuel site catalytique caractéristique d'une activité, à défaut d'une identification complète de la partie codante de ce contig.

5- 1 Transcrits correspondant à des gènes impliqués dans la réponse au stress

Les mécanismes de la réponse au stress se divisent en plusieurs étapes : reconnaissance du stress, transduction du signal, régulation de la transcription, expression de protéines assurant le retour à l'homéostasie cellulaire. En suivant l'exemple d'annotation d'EST obtenus chez d'autres organismes, notamment *A. thaliana*, seuls les transcrits codant des protéines impliquées dans cette dernière étape ont été classés dans la catégorie fonctionnelle « Stress, Défense et Vieillesse ». C'est le cas pour les différentes vanadium bromopéroxydases, des thiorédoxines peroxydases, des GST ainsi que des HSP de différents poids moléculaire. A l'exception de ces dernières, ces transcrits codent pour des enzymes impliquées dans la détoxification des EAO. Il apparaît donc que les protoplastes sont soumis à

des stress oxydatifs. Le protoplaste a été choisi comme outil biologique car la digestion de la paroi entraîne l'exposition de la cellule à de nombreux stress cumulés, l'idée de départ étant que l'ensemble de ces différents stress entraînerait l'expression d'une grande variété de transcrits permettant le retour à l'homéostasie cellulaire. Bien que la quantité de transcrits identifiés comme codant des enzymes impliquées dans la réponse au stress soit importante, la variété de ces transcrits est relativement faible. Il est tout à fait possible que le métabolisme cellulaire du protoplaste soit complètement dévié vers la detoxification des EAO, le stress oxydatif étant finalement le plus dangereux pour la cellule. Cette déviation du métabolisme empêcherait la mise en place d'autres voies métaboliques en réponse aux autres stress subits par le protoplaste. Afin d'augmenter les chances d'obtenir des séquences différentes, les ARNm de protoplastes à différents temps de régénération, allant jusqu'à 48h, ont été poolés lors de la construction de la banque. Cependant, le taux de mortalité des protoplastes étant très élevé après 24 heures de culture, très peu d'ARNm correspondant à des temps de régénération supérieurs ont pu être utilisés pour la construction de la banque. On peut supposer que les ARNm codant les enzymes de ces voies métaboliques impliquées dans d'autres stress, sont minoritaires dans la banque de données, comparé à ceux identifiés dans cette étude. Cette hypothèse pourrait être vérifiée par l'utilisation de puces à ADN regroupant l'ensemble des EST de protoplastes recueillies lors de ces travaux et hybridées avec des ARNm de protoplastes à différents temps de régénération. L'utilisation d'une telle méthode pourrait rendre possible l'identification de gènes impliqués dans les autres étapes de la réponse au stress, telle que l'activation de la transcription.

5-2 Les espèces activées de l'oxygène

Les transcrits identifiés chez le protoplaste comme prenant part à la réponse au stress sont principalement impliqués dans la detoxification des EAO. Ces EAO sont exprimées en cas de stress biotiques et abiotiques. Dans le cadre d'une attaque pathogène (stress biotique), les EAO sont utilisées comme composés toxiques envers l'organisme agresseur. Dans le cas d'une réponse à un stress abiotique, les EAO servent principalement de messagers secondaires. Dans le cas du protoplaste, la perte de la paroi engendre des stress osmotiques et la perte de communication inter-cellulaire, mais aussi des conditions de stress biotique. En effet, lors de la digestion de la paroi, les oligogulonates libérés par dégradation de l'alginate ont pour effet d'élucider les cellules, mimant l'attaque de l'algue par un pathogène. Les

protoplastes doivent donc réagir face à ce type d'environnement. Les mécanismes de défense font alors intervenir les EAO. La forte présence de protéines de détoxification de ces composés apparaît donc cohérente avec l'implication de ce type de molécules. Même s'il apparaît que le stress principal auquel sont soumis les protoplastes est un stress oxydatif, aucune EST codant une enzyme de type NADPH oxydase, enzyme clé impliquée dans la génération de $O_2^{\cdot -}$, ni pour les SOD, CAT, APX et GPX, n'a été caractérisée parmi les EST de protoplastes. De plus, la NADPH oxydase, ou ses équivalent chez les plantes, possède une séquence suffisamment connue et conservée pour permettre une identification dans les banques de données. Même si le stress considéré pour cette étude est différent de celui étudié par Kawack et *al.* (2003), il est à noter qu'une augmentation du nombre de transcrits d'une enzyme de type NADPH oxydase a été observée chez les cellules de garde d'*A. thaliana* (gènes *AtrbohD* et *AtrbohD*) en cas d'exposition à l'ABA. Cette observation laisse supposer que la transcription de ce type d'enzyme est inductible chez *A. thaliana* suivant certaines conditions. Un gène codant une protéine homologue d'une NADPH oxydase a d'ailleurs été identifié par une approche similaire à celle employée dans cette étude chez l'algue rouge *C. crispus* (Collèn et *al.*, 2006). Ce gène *Ccrboh* a été identifié grâce à un singleton présentant une homologie avec la protéine gp91^{phox}, sous-unité de la NADPH oxydase du leukocyte. Une étude plus approfondie de l'expression de cette enzyme a été menée chez *C. crispus* (Hervé et *al.*, sous-presse). Il en ressort que l'expression de ce gène *Ccrboh* serait induite lorsque *C. crispus* est incubé en présence d'atrazine, de méthyle jasmonate et d'hydroperoxydes dérivés d'acides gras C20 polyinsaturés. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer l'absence de telles séquences dans le jeu de données. Tout d'abord, cette enzyme pourrait être constitutive et donc exprimée à un niveau constant mais faible dans l'algue. Elle pourrait également être exprimée de façon très précoce en cas de stress, dans notre cas lors de la digestion de la paroi et non pendant la régénération des protoplastes. Des transcrits codant cette enzymes pourraient également être présents dans nos données mais non encore identifiés car les séquences des EST concernées ne seraient disponibles que dans la partie 3' non traduite, ce qui rendrait l'identification par comparaison de séquences impossible.

Il est également intéressant de noter qu'aucune enzyme clé de la détoxification des EAO, telles que les catalases, ascorbate peroxydases, superoxyde dismutases, glutathion peroxydases, qui sont induites dans les cellules soumises à un stress oxydatif (Manley et *al.*, 2002), n'ont été identifiées parmi les EST de protoplastes. Plusieurs possibilités peuvent expliquer l'absence de telles séquences dans la banque protoplaste. Tout d'abord, ces séquences sont peut-être présentes parmi les EST séquencées mais n'ont pas été identifiées en

suivant la même hypothèse que celle énoncée dans le cas de la NADPH oxydase. Ces protéines peuvent aussi être faiblement exprimées, ce qui expliquerait leur absence dans le jeu de données. Enfin, ces protéines ne sont peut-être pas du tout exprimées chez le protoplaste. En effet, il est possible d'envisager que le contrôle de la quantité d'EAO intracellulaire est réalisé par d'autres enzymes telles que des vanadium bromopéroxydases ou d'autres protéines encore inconnues.

5-3 Halopéroxydases

Parmi les protéines les plus exprimées chez le protoplaste, on trouve des vanadium bromopéroxydases (BPO). Ces enzymes sont largement impliquées dans le métabolisme de l'iode chez *L. digitata* et forment une famille multigénique chez cet organisme (Colin et *al.*, 2003). Les fonctions exactes des BPO de *L. digitata* ne sont pas encore connues, mais leur implication dans les mécanismes de réponse au stress ou dans les mécanismes de défense semble certaine. En effet, ces enzymes peuvent protéger l'organisme d'une attaque pathogène par la production de composés volatiles halogénés, participer à la régulation de la quantité d'EAO intracellulaire, et enfin renforcer la paroi cellulaire. L'étude des EST de protoplastes a permis l'identification d'un nouveau membre de cette famille multigénique, sans toutefois permettre de déterminer une fonction précise de ces protéines, ni dans quel mécanisme de réponse au stress celles-ci interviennent. La nouvelle forme de BPO identifiée chez le protoplaste (pLd-vBPO) présente 70% de similitude avec les précédentes Ld-vBPO identifiées chez *L. digitata*. Nous pouvons supposer que les membres de cette famille multigénique interviennent dans différents mécanismes de la réponse au stress. PLd-BPO pourrait, par exemple, posséder des propriétés enzymatiques qui lui permettraient de participer de façon plus concrète à la protection contre le peroxyde d'hydrogène en réduisant de façon plus efficace cette molécule que Ld-vBpo. De plus, chez *Fucus disticus*, des BPO extracellulaires permettent le pontage des polyphénols en présence d'halogénure et de peroxyde d'hydrogène (Berglin et *al.*, 2004). Cette réaction est impliquée dans les mécanismes d'adhésion des zygotes à un substrat (Vreeland et *al.*, 1999) et a pour effet d'épaissir la paroi cellulaire afin de la renforcer. De part sa présence exclusive dans les EST issus de protoplastes, et sa forte représentation dans cette banque d'ADNc, pLd-BPO pourrait également être une bromopéroxydase extracellulaire, principalement impliquée dans les mécanismes de pontage de la paroi. Son fort taux d'expression chez les protoplastes

correspondrait à un besoin de la cellule de renouveler ces enzymes après la dégradation de la paroi.

5-4 Gènes impliqués dans la néo-synthèse de la paroi cellulaire

Très peu de transcrits différents codant des protéines impliquées dans la néo-synthèse de la paroi cellulaire ont été identifiés dans cette étude. Seuls des transcrits correspondant à des mannuronanemannuronanes-C5-épimérases qui sont impliqués dans la synthèse et la modification de la paroi ont été identifiés. Ces enzymes catalysent l'épimérisation de l'acide β -1,4-D-mannuronique en acide α -1,4-L-guluronique, cette réaction étant la dernière étape de la biosynthèse de l'alginate (Madgwick et *al.*, 1973), principal composant de la paroi cellulaire de *L. digitata*. La présence d'un nombre important d'EST codant ces enzymes confirme donc bien que des gènes impliqués dans la biosynthèse de la paroi cellulaire sont exprimés chez le protoplaste. Lors de la première étude EST menée sur les sporophytes de *L. digitata*, les transcrits codant des mannuronane-C5-épimérases de *L. digitata* ont été identifiés grâce à leur homologies de séquences avec les mannuronane-C5-épimérases d'origines bactériennes, ces homologies s'observant principalement au niveau du site catalytique. Si la biosynthèse de l'alginate bactérien fait intervenir de nombreuses enzymes organisées en opérons, nous n'avons toutefois pas identifié d'homologues de ces enzymes parmi les EST de protoplastes. L'absence d'autres gènes impliqués dans les mécanismes de biosynthèse de la paroi dans cette banque peut s'expliquer par le manque de séquences codant de telles enzymes dans les banques de données. En effet, les autres enzymes impliquées dans la biosynthèse de l'alginate sont très méconnues chez les algues, très peu d'études aboutissant à l'obtention de séquences dans les banques de données ayant été réalisées. L'alginate bactérien étant beaucoup plus simple dans son alternance de motifs M/G que l'alginate des algues brunes, nous pouvons supposer que ces mécanismes chez *L. digitata* comportent plus d'acteurs enzymatiques et éventuellement d'étapes. De plus, beaucoup de transcrits codant des mannuronane-C5-épimérases différentes ont été identifiées chez le protoplaste. Si l'implication de cette enzyme dans la biosynthèse de la paroi ne fait aucun doute, nous pouvons également supposer que certains membres de cette famille pourraient être impliqués dans les mécanismes de la réponse au stress. Ces différentes mannuronane-C5-épimérases présentent des similitudes avec la protéine GP1 du virus (EsV-1) infectant

l'algue brune *E. siliculosus* (Delaroque et *al.*, 2001). D'autres EST issues de protoplastes de *L. digitata* présentent des similitudes avec des ORFs du génome de EsV-1, sans toutefois avoir de fonction bien définie. Ces observations soulèvent la question de l'origine biologique de ces gènes ainsi que de leur fonction. Il a été suggéré que les gènes ManC5-E sont d'origine algale plutôt qu'importés récemment d'un génome viral (Nyvall et *al.*, 2003). On peut supposer que les homologues des gènes de *L. digitata* présents chez EsV-1 sont dus à un transfert latéral de l'algue vers le génome viral. Une étude plus approfondie de la famille multigénique des mannuronane-C5-épimérase est présentée dans le chapitre III de ce manuscrit.

5-5 Stratégie EST : intérêt et limites

L'emploi d'une stratégie EST sur les protoplastes de *L. digitata* a permis d'accroître la quantité de données génomiques pour cette algue, notamment en ce qui concerne les gènes exprimés en condition de stress. En effet, ce projet a permis d'une part de multiplier par 4 le nombre de séquences nucléotidiques disponibles pour cet organisme et d'autre part d'identifier des marqueurs pertinents et spécifiques pour lesquels des projets d'études ciblées ont été initiées (BPO, GST et C5-épimérase). Toutefois, nous nous sommes retrouvés confrontés à la principale limitation de la stratégie EST lors de l'analyse des séquences. L'identification et l'annotation des EST se faisant par comparaison avec des banques de données, il n'est possible d'identifier chez l'organisme étudié que des séquences déjà annotées chez d'autres organismes. C'est pour cela qu'un nombre élevé de séquences n'a pas été identifié. Les développements technologiques récents ont permis de gagner un temps précieux, tant dans l'acquisition des données brutes, que dans l'analyse des séquences. En effet, il y a 5 ans seulement, le traitement des EST se faisait de façon manuelle, chacune des EST étant analysée de façon indépendante. Il est aujourd'hui possible de traiter automatiquement un projet EST, du repiquage des clones recombinants jusqu'à l'identification putative des séquences correspondant aux inserts contenus dans ces clones. Cependant, même si le temps gagné est considérable, une analyse manuelle et poussée de ces séquences est indispensable. Les contigs formés par le regroupement de plusieurs EST ne sont que des séquences virtuelles et souvent partielles, du moins dans notre étude. L'assemblage en contig se fait par reconnaissance de séquences quasi-identique sur une longueur donnée. Il est

tout à fait possible que 2 EST codants 2 protéines différentes possèdent une partie commune suffisante pour permettre la création d'un contig à partir de ces 2 EST. Ce cas arrive fréquemment avec des EST codant différents membres d'une famille multigénique, et est source d'erreur d'annotation. Cette configuration s'est présentée dans cette étude dans le cas des mannuronane-C5-épimérases. Ces enzymes présentent un très fort taux de similitude dans leur partie codante, ainsi que des motifs répétés dans leur partie 3' non traduite. Ces particularités de séquences ont abouti au regroupement en un même contig de plusieurs EST codant des mannuronane-C5-épimérases différentes par les logiciels de contigage. Le séquençage d'un nombre croissant de banque d'ADNc et le développement des outils d'acquisition et de traitement des séquences entraîne une croissance exponentielle du nombre de séquences disponibles dans les bases de données. Dès lors que ces bases de données sont consultées pour l'identification de transcrits chez d'autres organismes, il apparaît primordial que l'annotation des séquences déposées dans ces banques de données soit faite de façon rigoureuse au moment de l'étude, qu'elle soit consultable dans ces banques de données et puisse être éventuellement modifiée suivant les progrès scientifiques réalisés. En effet, lorsqu'on utilise ces outils génomiques pour réaliser l'annotation d'une banque nouvellement séquencée, il faut considérer que les données permettant l'annotation sont en perpétuelle évolution et qu'une mise à jour régulière de l'annotation du nouveau catalogue d'EST sera à réaliser.

Parallèlement à l'accroissement du nombre de bases de données consultables pour l'identification de séquences par Blast, ces dernières années ont également vu le développement de nouveaux outils et bases de données permettant l'annotation de séquences. Des programmes tels que HMMER (<http://hmmer.wustl.edu/>), RPS Blast (Reverse position specific Blast ; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>), PRATT (<http://idefix.univ-rennes1.fr:8080/PatternDiscovery/ALGOS/Pratt.html>) permettent par exemple de rechercher des motifs protéiques conservés au sein de séquences proches. Il devient alors possible de comparer ces motifs à des banque de motifs connus (PROSITE, ou PRINT) à l'aide de logiciels tels que STAN ou WAPAM ou Grappe (<http://idefix.univ-rennes1.fr:8080/PatternMatching/>). D'autres outils plus spécifiques de l'annotation des EST sont actuellement en cours de développement

Au final, l'emploi de la stratégie EST s'est avéré fructueuse à plus d'un titre. Nous avons pu ainsi identifier des marqueurs potentiels de la réponse au stress tels que des bromopéroxydases et des glutathion S-transférases, qui apparaissent jouer un rôle original

dans le cas de la réponse au stress chez *L. digitata*. Nous avons également grandement augmenté le nombre de séquences disponibles sur cet organisme. Même si l'emploi d'autres méthodes, telles que les banques soustractives, auraient pu être employées pour l'identification de marqueurs de la réponse au stress, la stratégie que nous avons employée reste à mon avis la plus adaptée à l'organisme étudié. Comme très peu de données de séquences étaient disponibles avant ce projet, l'identification des d'ADNc issus d'une technique SSH auraient été très difficile à identifier. Nous aurions pu éventuellement utiliser un autre outil biologique que le protoplaste pour la recherche de marqueurs de stress. Cependant, au début de cette étude, cet outil nous est apparu comme le plus raisonnable d'emploi. En effet, la technique d'isolement des protoplastes était parfaitement maîtrisée au laboratoire, l'intérêt de pouvoir étudier des conditions de stress multiples ne faisait aucun doute. L'utilisation d'une stratégie visant à se concentrer sur un type particulier de stress dès le début de cette étude nous paraissait peu adapté à un programme de séquençage d'EST. L'emploi d'une stratégie générale de découverte de séquences telle que la stratégie EST appliquée à un outil biologique tel que le protoplaste, subissant de multiple stress, m'apparaît toujours comme étant le meilleur moyen de rassembler un maximum d'information sur les gènes exprimés lors d'un stress chez *L. digitata*, ceci dans des conditions financières et humaines raisonnables.

Chapitre II : Mise en évidence de transcrits induits lors de l'éllicitation de *L. digitata*

L'emploi de la stratégie EST sur les protoplastes de *L. digitata* devait permettre l'identification de transcrits impliqués dans les mécanismes de réponse au stress. Les résultats de cette étude ont montré qu'un nombre important de transcrits correspondant à des gènes liés au stress et à la défense sont exprimés dans les protoplastes. Cependant, la seule étude de ces EST ne permet pas de différencier les gènes induits par les stress générés par la digestion de la paroi, et ceux de défense induits par les oligoguluronates libérés lors de cette dégradation.

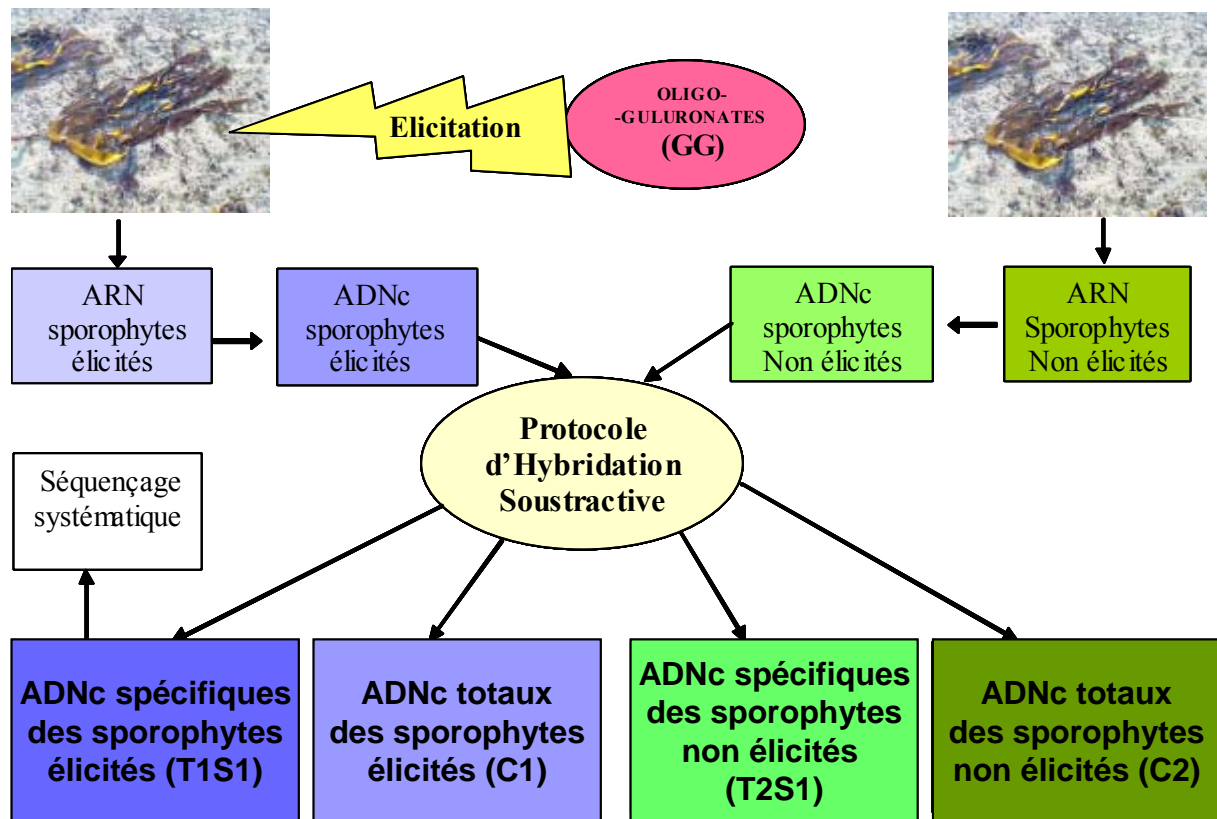
Afin de pouvoir effectuer cette distinction entre les gènes de défense et ceux de stress, nous avons procédé à l'étude d'une banque d'ADNc spécifiques de laminaires élicitées par des oligoguluronates. La comparaison des séquences des ADNc isolés par cette méthode avec les données issues des EST de protoplastes devait permettre d'identifier certains gènes impliqués plus spécifiquement dans les mécanismes de défense ou dans les mécanismes de réponse au stress. Lors de l'annotation des EST de protoplastes, nous avons observé que les transcrits pouvant intervenir dans ces 2 situations, peuvent se répartir en 3 catégories. La première regroupe les transcrits identifiés directement dans la fonction stress et défense. C'est le cas des HSP 70, des bromopéroxydases, des GST et de la thiorédoxine peroxydase. La seconde regroupe les transcrits classés dans d'autres catégories que stress et défense mais qui semblent être induits en condition de stress. C'est le cas des 6PGDH, G6PDH et LHCF6. La troisième catégorie contient des transcrits pour lesquels aucune fonction n'a pu être attribuée, et statistiquement plus exprimés chez les protoplastes que les sporophytes.

1- Construction et analyse de la banque obtenue par hybridation soustractive

1-1 Obtention de la banque soustractive et séquençage des clones générés

Pour cette expérience, des jeunes sporophytes sauvages ont été récoltés sur la grève. L'utilisation de jeunes sporophytes a été décidée car ceux-ci apparaissent plus sensibles à l'éllicitation que des sporophytes adultes, ces derniers montrant des variations dans la réponse

Figure 39 : Schéma récapitulant le protocole d'obtention des différents pools d'ADNc pour la construction de la banque d'ADNc spécifique de laminaires élicitées par hybridation soustractive.



à l'élicitation suivant la zone de l'algue traitée. Ainsi, la lame des jeunes sporophytes semble être la plus sensible à l'élicitation tandis que la zone méristématique des sporophytes adultes est la moins sensible (Küpper et *al.*, 2000). Si le burst oxydatif a lieu dans les secondes suivant l'élicitation, l'extraction des ARNm a été effectuée 6 heures après celle-ci, afin de favoriser au maximum l'expression de gènes de défense. Il en résulte donc que l'expression précoce de gènes suite à la reconnaissance d'une attaque pathogène ne pourra être détectée. La production d'ADNc spécifiques d'un état donné, en l'occurrence de jeunes sporophytes incubés en présence d'oligogulonates, a été rendue possible grâce à l'emploi de la méthode d'hybridation suppressive soustractive, dont le principe de fonctionnement est décrit dans la partie matériels et méthodes. La banque a été construite par hybridation entre les ADNc synthétisés à partir d'ARNm extraits après 6 heures d'élicitation (pool d'ADNc C1), et les ADNc synthétisés à partir d'ARNm extraits de sporophytes non élicités (pool d'ADNc C2). L'emploi d'amorces spécifiques de l'adaptateur ligé aux ADNc de sporophytes élicités a permis l'amplification exponentielle des ADNc propres aux sporophytes élicités (pools d'ADNc T1S1). Un pool d'ADNc spécifique aux sporophytes non élicités a également été constitué dans le but de trouver des gènes éventuellement réprimés lors de l'élicitation (pool d'ADNc T2S1) (fig. 39).

J'ai procédé au clonage et au séquençage de 272 des ADNc issus de la population d'ADNc T1S1. Les séquences obtenues ont suivi le même traitement informatique que celles des ESTs de protoplastes en ce qui concerne l'analyse de la qualité des séquences et le regroupement de celles-ci en contigs. Les 207 séquences exploitables ont une longueur moyenne de 300 pb et ont été regroupées en 41 contigs et 45 singletons. Malgré le faible nombre d'ADNc séquencés, la redondance a été estimée à 58 %.

La taille réduite des séquences obtenues s'explique par la méthode utilisée lors de la synthèse des ADNc qui fait intervenir une enzyme de restriction spécifique. En suivant le raisonnement appliqué aux EST de protoplastes, le taux de redondance élevé m'a incité à ne pas continuer le séquençage du pool T1S1. Cette forte redondance indique également une quantité faible de transcrits spécifiques de sporophytes élicités. J'ai également procédé au séquençage de 96 clones de la banque T2S1 (ADNc spécifiques des sporophytes non élicités). Les 90 séquences exploitables codaient des protéines ribosomales. Les banques d'ADNc C1 et C2 n'ont pas été séquencées car elles n'étaient pas spécifiques d'un état donné.

Tableau 4 : Liste des EST issues des banques de protoplastes, sporophytes et gamétophytes de *L. digitata* présentant des similitudes avec les ADNc spécifiques de sporophytes élicités. Contig XXX : Contig issu de la banque EST de protoplastes, PldXXXXXX : singleton issu de la banque EST de protoplastes, LDS XXX : singleton issue de la banque EST de sporophyte, LDG XXX : singleton issu de la banque EST de gamétophyte.

Nom de la séquence	Identification putative	Nombre de sequences dans la banque soustractive	Catégorie fonctionnelle
Contig 48	Light harvesting complex 6	33	Energie
Contig 18 bis	Inconnue	27	Inconnue
Contig 1 bis	Ld-vBPO	23	Stress et défense
Contig 5	Inconnue	14	Inconnue
Contig 10	6 phospho gluconate dehydrogenase	8	Métabolisme
Contig 25	Inconnue	8	Inconnue
Pld001E03	Inconnue	6	Inconnue
Contig 9	Elongation factor 1 alpha	6	Synthèse protéique
Contig 2	Heat shock protein 70 Kd	5	Stress et défense
LDG111	Inconnue	4	Inconnue
Contig 44	Ribosomal protein L3	4	Synthèse protéique
Contig 38	Hypothetical protein	4	Inconnue conservée
Contig 18	Inconnue	3	Inconnue
LDS458	Inconnue	3	Inconnue
Pld006E09	Inconnue	3	Inconnue
Contig 40	Heat shock protein 90	3	Stress et défense
Contig 100	Inconnue	3	Inconnue
Contig 4	Inconnue	2	Inconnue conservée
LDS292	Inconnue	2	Inconnue
Contig 207	Thioredoxine peroxidase	2	Stress et défense
Contig 85	Inconnue	2	Inconnue
Contig 63	Ribosomal protein L36	1	Synthèse protéique
Contig 195	Inconnue	1	Inconnue
LDS278	Inconnue	1	Inconnue
Pld004B05	Inconnue	1	Inconnue
Pld013H09	Inconnue	1	Inconnue
Pld008F07	Inconnue	1	Inconnue
Contig 74	Glucose 6 phosphate dehydrogenase	1	Métabolisme
Contig 3	Inconnue	1	Inconnue
LDS345	Inconnue	1	Inconnue
Pld014H08	Inconnue	1	Inconnue
Pld022E12	Inconnue	1	Inconnue
Pld005C01	Inconnue	1	Inconnue

1-2 Analyse des séquences obtenues

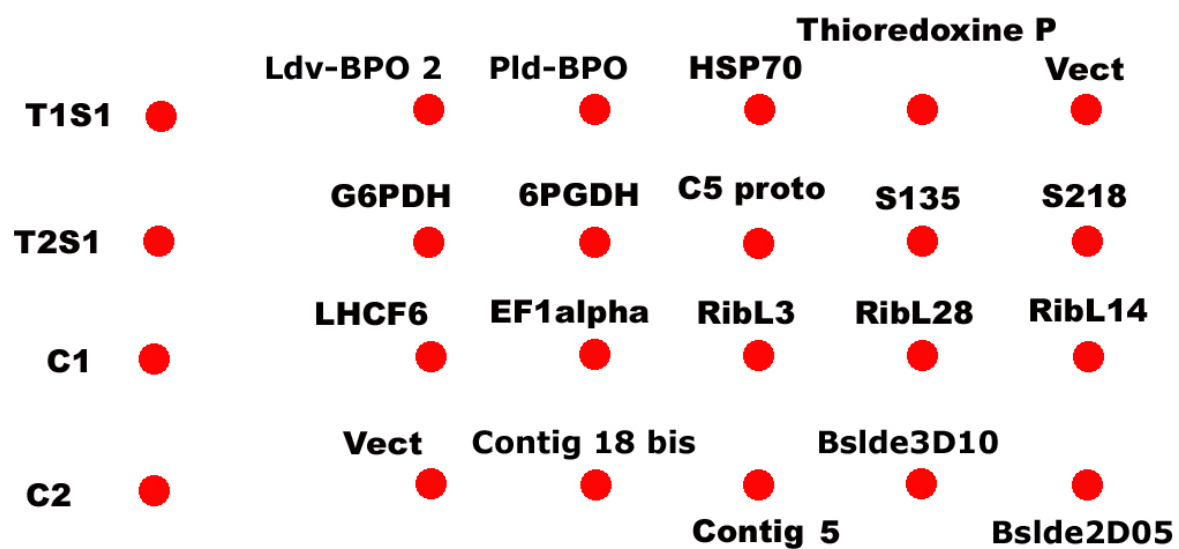
Les séquences obtenues ont d'abord été comparées aux bases de données protéiques et nucléotidiques GenBank à l'aide des programmes BlastX et BlastN, en prenant comme critère d'identification une E-value ou valeur $E < 10^{-4}$. Aucune homologie significative n'a été observée. Ces mêmes séquences ont ensuite été comparées aux données obtenues par les différents programmes EST menés sur *L. digitata* (protoplastes, sporophytes et gamétophytes) à l'aide du programme BlastN. 177 séquences (sur 207, donc 86 % des séquences exploitables) présentaient des homologies avec des EST issues de *L. digitata* (tableau 4). De plus, il apparaît que les ADNc obtenus après soustraction et amplification par PCR correspondent très majoritairement à la partie 3' non traduite du transcrit, qui n'est pas conservée et peut être très longue chez *L. digitata* (Moulin et *al.*, 1999).

Les séquences ont été annotées et réparties dans des catégories analogues à celles utilisées pour la banque EST de protoplastes. Les séquences classées dans la catégorie « protéines inconnues » représentent la moitié du total. 27 EST ne présentent aucune homologie avec les ESTs disponibles chez *L. digitata* et sont, pour le moment, spécifiques des sporophytes élicités. La catégorie « stress, défense et vieillissement » regroupe 18% des séquences identifiées dans la banque SSH sporophytes élicités. Du fait du protocole utilisé lors de la soustraction, impliquant plusieurs phases d'amplification par PCR, on peut s'interroger sur la représentativité des transcrits. Les ADNc identifiés les plus représentés codent pour le Light Harvesting Complex 6 (LHCF6) (33 EST), Ld-vBPO (23 EST), et un transcrit non identifié déjà isolé chez le protoplaste (27 EST).

2- Validation de la banque soustractive

Le fort taux de redondance observé après contigage des séquences de la banque SSH T1S1 indique que peu de transcrits différents ont été isolés par la technique d'hybridation soustractive. Cette faible quantité peut-être interprétée comme une réussite de la soustraction. On peut penser en effet que, de par leur quantité réduite, les différents transcrits isolés sont bien spécifiques de l'élicitation des laminaires par des oligoguluronates (GG). Afin de vérifier concrètement l'efficacité de la soustraction, des expériences d'hybridation ont été réalisées en s'inspirant, pour leur réalisation et leur interprétation des résultats, du kit PCR-Select Differential

Figure 40 : Schéma de la membrane utilisée pour la validation de la banque soustractive.



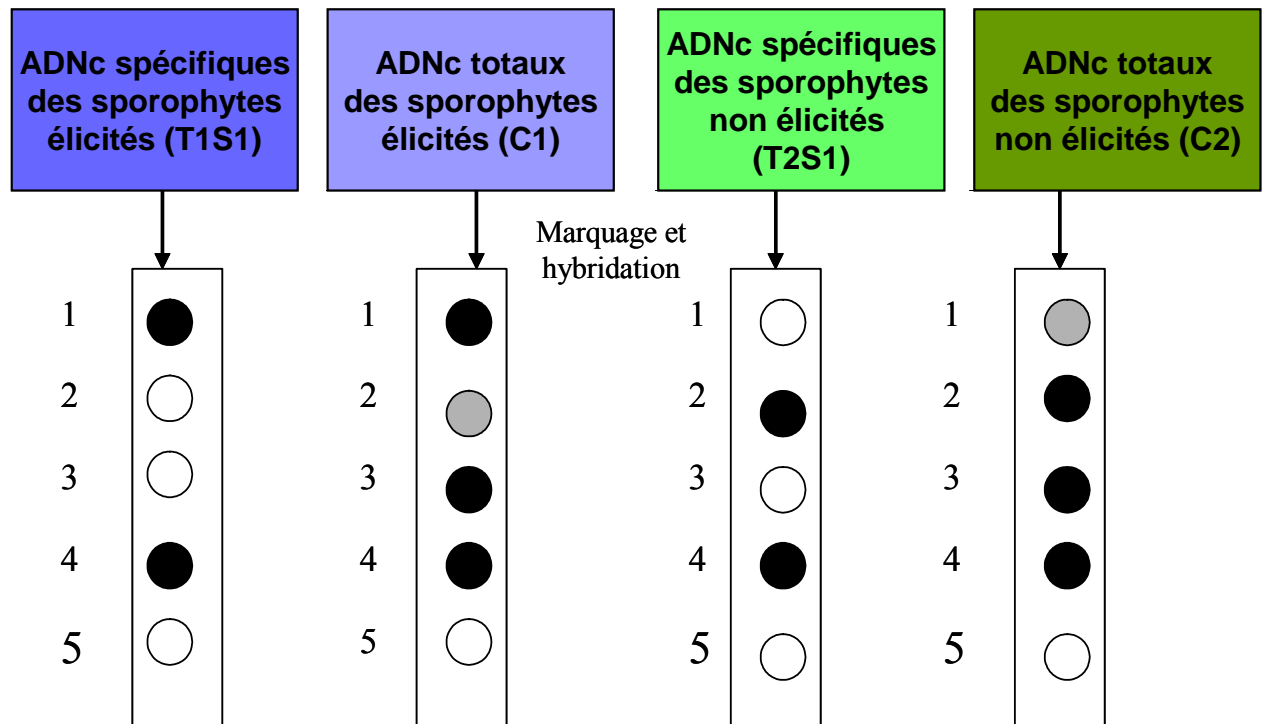
Screening Kit (Clontech). Cette expérience consiste à déposer sur membrane de l'ADN plasmidique correspondant aux clones d'intérêt et d'hybrider cette membrane par les différents pools d'ADNc obtenus suite au protocole d'hybridation soustractive. Cette technique, souvent appelée « reverse Northern » est généralement considérée comme la suite logique de la construction d'une banque soustractive. En effet, suivant la nature des transcrits déposés sur la membrane, elle permet de valider la soustraction, en permettant de distinguer la présence de transcrits exprimés de façon constitutive dans les pools d'ADNc spécifiques d'un état, et également de distinguer quels transcrits sont bien exprimés de façon différentielle. En effet, le protocole d'hybridation soustractive n'est pas efficace à 100% et la présence d'un transcrit X parmi les ADNc spécifique d'un état ne correspond pas forcément à une réelle différence d'expression.

J'ai donc déposé 3 ADNc codant 3 protéines ribosomales différentes sur une membrane, que j'ai hybridée avec 4 pools d'ADNc (C1, C2, T1S1 et T2S1) obtenus lors de la construction des banques. Ces protéines ribosomales peuvent être considérées comme ubiquitaires, et sont exprimées de façon constitutive quelles que soient les conditions d'incubation des sporophytes. J'ai également déposé sur cette membrane 13 ADNc d'intérêt et 2 produits d'amplification par PCR d'ADNc codant des mannuronanemannuronanes-C5-épimérase. Ces ADNc d'intérêt codent pour Ld-vBPO, pLd-BPO, HSP 70, une thiorédoxine peroxydase, G6PDH, 6PGDH, LHCF6, une mannuronanemannuronane-C5-épimérase (Pld 007H03), EF1 α , 2 protéines de fonction inconnue issues de la banque de protoplaste (contigs 5 et 18 bis), ainsi que deux protéines de fonction inconnue spécifiques aux sporophytes élicités (Bslde3E10 et Bslde2D05) (fig. 40).

Après hybridation des membranes avec les pools d'ADNc C1 et C2, j'ai détecté un signal positif avec les transcrits codant des protéines ribosomales et aucun signal d'hybridation n'a été observé lors de l'hybridation avec les pools T1S1 et T2S1. Il semble donc que les ADNc codant ces protéines ribosomales sont absents des pools d'ADNc issus de SSH, indiquant que les transcrits communs aux 2 pools ont été éliminés lors du processus d'hybridation soustractive.

La présence des autres dépôts sur la membrane devait permettre de déterminer si les gènes correspondant aux ADNc T1S1 étaient réellement induits lors de l'élicitation par des oligogulonates ou correspondaient à des artéfacts assez fréquents dans ce type d'approche. En effet, même si normalement les ADNc présents dans ce pool ont été sélectionnés lors de l'étape de soustraction, car ils sont spécifiques de l'état choisi, on ne peut exclure que certains ADNc non spécifiques de l'induction n'aient pas été éliminés lors de l'hybridation. Ces

Figure 41 : Principe de validation de la banque soustractive par hybridation en dot-blot.



Suite au protocole d'hybridation soustractive, 4 pools différents d'ADNc sont obtenus. Ces 4 pools sont marqués et servent à hybrider des spots d'ADNc déposés sur membrane. L'intensité des spots après l'hybridation permet de déterminer quels transcrits sont différentiellement exprimés dans un état A (ici sporophytes élicités) ou dans une état B (ici sporophytes non élicités). Suivant ce crible, chaque ADNc déposé peut appartenir à l'une de ces 5 catégories :

- 1** : transcrit différentiellement exprimé chez A
- 2** : transcrit différentiellement exprimé chez B
- 3** : transcrit non différentiellement exprimé chez A et B
- 4** : transcrit fortement exprimé dans A et B
- 5** : transcrit faiblement exprimé dans A et B

artéfacts peuvent être dus à une mauvaise soustraction, un trop faible taux d'expression ou, au contraire, un trop fort taux d'expression. L'hybridation en utilisant des sondes correspondant aux 4 pools d'ADNc devait donc permettre de vérifier si un ADNc était spécifique ou pas de l'élicitation en suivant le raisonnement schématisé en figure 41. Nous avons fait le postulat suivant : un transcrit peut être considéré comme différentiellement exprimé lorsque l'intensité des dépôts hybridés par T1S1 et C1 (condition « élicité ») est supérieure à celle des dépôts hybridés par T2S1 et C2 (non élicité). Les résultats de ce criblage sont présentés en figure 42 et résumés dans le tableau 5.

Les 15 transcrits d'intérêt peuvent être répartis en 4 catégories selon leur profil d'hybridation avec les différentes sondes :

- transcrits différentiellement exprimés après l'élicitation : Ld-vBPO, thiorédoxine peroxydase, G6PDH, 6PGDH, LHCF6, Bslde3E10
- transcrits non différentiellement exprimés après l'élicitation (donc artéfacts de l'hybridation soustractive) : Bslde2D05, contig 18 bis
- transcrits peu exprimés (intensité des signaux très faible quelle que soit la sonde utilisée) : pLd-BPO, 007H03, ManC5-E1, ManC5-E2, HSP 70
- transcrits fortement exprimés (intensité des signaux très forte quelle que soit la sonde, ne permettant pas de détecter une expression différentielle) : contig 5, EF1 α

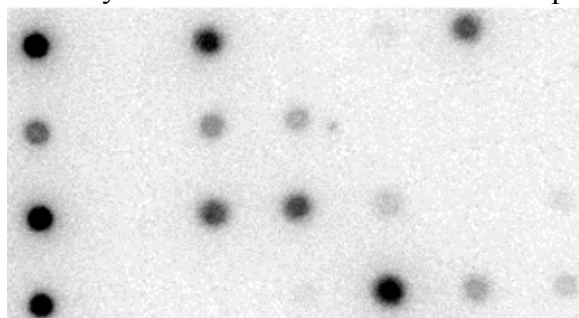
L'induction de la transcription des gènes codant les G6PDH, 6PGDH, LHCF6, ainsi que leur présence dans le pool d'ADNc T1S1 indiquent qu'ils peuvent être considérés comme des marqueurs moléculaires de défense chez *L. digitata*.

3- Distinction entre gènes de stress et gènes de défense

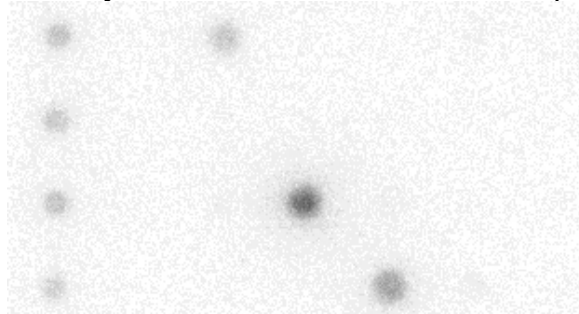
Par comparaison des observations réalisées à partir de la banque protoplaste avec les résultats obtenus lors de l'étude de la banque d'ADNc spécifique aux sporophytes élicités, nous pouvons déduire que les HSP 70 semblent être plus liées à la réponse au stress. En effet, un nombre important d'EST a été isolé dans la banque protoplaste et ce niveau d'expression est statistiquement plus élevé chez le protoplaste que chez le sporophyte. Par contre, le gène de la LHCF6 et celui de la G6PDH semblent être plus impliqués dans les mécanismes de défense : ils apparaissent induits dans la banque soustractive, ce qui traduit une sur-expression en cas d'élicitation. Leur niveau d'expression est considéré comme basal dans la banque EST de protoplaste.

Figure 42 : Résultats d'hybridation pour la validation de la banque soustractive.

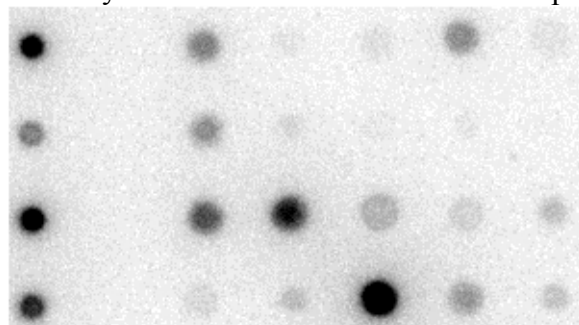
42a : Hybridation de la membrane avec le pool d'ADNc T1S1



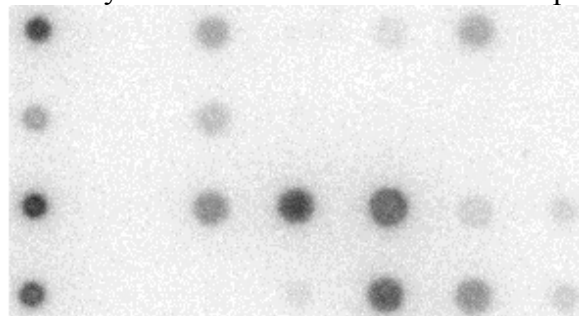
42b : Hybridation de la membrane avec le pool d'ADNc T2S1



42c : Hybridation de la membrane avec le pool d'ADNc C1



42d : Hybridation de la membrane avec le pool d'ADNc C2



Cependant, une telle distinction est beaucoup plus difficile à établir pour d'autres gènes. C'est notamment le cas pour les bromopéroxydases. Ld-vBPO est présent dans les EST de protoplastes et dans les EST issues d'ADNc spécifiques aux sporophytes élicités. PLd-BPO semble spécifique des protoplastes, ce qui en fait un marqueur de stress plus qu'un marqueur de défense. La 6PGDH est également présente dans les deux banques. L'augmentation du nombre de transcrits pour le gène de cette enzyme a été observée chez le riz lors d'un stress salin (Huang et *al.*, 2003), mais également lors de l'élicitation de *Petroselinum crispum* par des éliciteurs fongiques (Batz et *al.*, 1998). La thiorédoxine peroxydase présente la même ambiguïté. Même si cette enzyme est impliquée dans la réponse au stress, elle est présente dans les EST spécifiques de sporophytes élicités et une variation d'expression en cas d'élicitation a été observée.

4- Discussion

4-1 Différenciation stress / défense

4-1-1 Marqueurs de stress

Pour qu'un gène soit classé dans la catégorie stress plutôt que défense, il fallait que celui-ci soit présent dans la banque EST de protoplastes, statistiquement surexprimé chez le protoplaste par rapport au sporophyte, et absent ou faiblement exprimé dans la banque soustractive. Nous pouvons donc retenir, selon ces critères, les gènes codant les HSP, les GST, et pLd-vBPO et dans une moindre mesure Ld-vBPO, la thiorédoxine et la thiorédoxine peroxydase.

Les HSP 70 peuvent être considérées comme les protéines de la réponse au stress par excellence, de part leur surexpression lors de nombreux stress abiotiques (Wang et *al.*, 2004). Les transcrits codant ces protéines sont donc de bons marqueurs moléculaires de la réponse au stress. Toutefois, leur fonction précise dans ces mécanismes reste à déterminer, au moins chez *L. digitata*. En effet, si leur fonction primaire est le repliement des protéines, elles peuvent également servir d'activateur de la transcription des HSF (Baniwal et *al.*, 2004) ou s'inscrire dans un contexte plus général d'interaction avec d'autres HSP (Wang et *al.*, 2004).

Tableau 5 : Résultats de l'observation visuelle de l'intensité des spots sur membrane après hybridation avec les 4 pools d'ADNc.

	T1S1	T2S1	C1	C2
Ld-vBPO	+++	+	+++	++
pLd-BPO	0	0	0	0
HSP 70	0	0	0	0
Thioredoxine peroxidase	+++	0	+++	+
G6PdH	++	0	++	+
6PgludH	++	0	+	0
007H03	0	0	0	0
ManC5-E1	0	0	0	0
ManC5-E2	0	0	0	0
LHCF6	+++	0	+++	++
EF1α	+++	+++	+++	+++
Contig 18 bis	0	0	+	0
Contig 5	+++	++	+++	+++
Bslde3E10	++	0	++	++
Bslde2D05	+	0	+	+

Dans le cas des protoplastes, les causes de dénaturation des protéines nécessitant une action de repliement par des HSP-70 sont inconnues, mais les EAO pourraient y contribuer.

Un autre type protéique identifié comme contenant des marqueurs potentiel de la réponse au stress est celui des Glutathion-S-Transférases. Les EST codant ces enzymes apparaissent surexprimées chez le protoplaste et ne sont pas présentes dans la banque soustractive de sporophytes élicités. Ces enzymes sont généralement impliquées dans le maintien de l'équilibre oxydo-réducteur de la cellule. Elle possède une activité glutathion peroxydase qui permet la réduction des composés hydroperoxydes en leurs dérivés monohydroxydes avec production simultanée de glutathion oxydé (Roxas *et al.*, 2000). Cette activité réductrice constitue une forme efficace de protection contre les EAO libérés au cours du burst oxydant.

4-1-2 Marqueurs de défense

L'étude de cette banque soustractive a permis également de distinguer des marqueurs moléculaires potentiels de la défense face à une attaque d'un pathogène. Ces gènes incluent les thiorédoxine peroxydases, la 6PGDH et potentiellement la G6PDH.

Les thiorédoxine peroxydases catalysent l'oxydation des thiorédoxines par fixation de peroxyde d'hydrogène, participant ainsi au maintien de l'équilibre oxydo-réducteur de la cellule (Holmgren *et al.*, 1989). La thiorédoxine réductase permet la réduction des thiorédoxines grâce à l'oxydation du NADPH (Williams, 1995). L'interaction entre les thiorédoxines peroxydases et les thiorédoxines ainsi que leur implication dans les mécanismes de défense contre les EAO a été démontrée chez les plantes (Broin *et al.*, 2002).

Les EST codant la 6PGDH sont parmi les plus représentées chez le protoplaste et apparaissent différenciellement exprimées lors de l'élicitation des sporophytes. Cette enzyme catalyse la décarboxylation du 6-phospho-gluconate en ribulose 5-phosphate. Cette réaction libère du CO₂, mais également du NADPH, principal agent réducteur cellulaire. Nous pouvons également supposer que la G6PDH est un marqueur de la défense, même si celle-ci n'apparaît pas surexprimée de façon significative chez le protoplaste. En effet, la 6PGDH, ainsi que la G6PDH, sont des enzymes clés de la voie oxydative des pentoses phosphates (OPP), dont l'augmentation d'activité a été montrée chez le tabac en cas d'infection virale (Sindelar *et al.*, 1999, 2002). La stimulation de la voie de l'OPP lors d'une attaque par un pathogène serait connectée à la production de composés phénoliques, permettant une défense active de la cellule (Batz *et al.*, 1998).

4-1-3 Cas particulier des bromopéroxydases

Des transcrits codant différentes bromopéroxydases (pLd-vBPO, Ld-vBPO) ont été identifiés en quantités élevées parmi les EST de protoplastes. Des séquences codant Ld-vBPO ont également été isolées dans la banque soustractive spécifique des sporophytes élicités. Toutefois, l'absence d'une surexpression statistiquement différente chez les protoplastes comparée aux sporophytes ne permet pas d'attribuer de façon claire un rôle de marqueur moléculaire de la défense à Ld-vBPO.

La situation semble plus claire pour la bromopéroxydase spécifique du protoplaste (pLd-vBPO), qui apparaît spécifique de la réponse au stress de par sa forte représentation parmi les EST de protoplastes et par son absence dans la banque soustractive. Cependant, l'hypothèse du rôle préférentiel de ces enzymes dans la rigidification de la paroi cellulaire, que ce soit en réponse à un stress ou lors de la néo-synthèse de celle-ci, ne peut pas être écartée.

4-2 Ambiguïté des EAO

A l'état de protoplaste, la cellule est soumise à la fois à un stress abiotique intense et à une élicitation par des composants de la paroi. La réaction cellulaire commune à ces 2 conditions est l'émission d'EAO. Chez les plantes, le contrôle de la quantité d'EAO est principalement effectué par des superoxyde dismutases, des catalases et des ascorbate peroxydases. Comme je l'ai mentionné dans le chapitre I, aucune de ces enzymes de contrôle de d'EAO intracellulaire n'a été identifiée ni chez les protoplastes, ni parmi les ADNc spécifiques de sporophytes élicités. Une première hypothèse pour expliquer l'absence de telles enzymes dans les 2 banques est liée à la méthode d'identification des séquences. Celles-ci sont peut-être tout simplement présentes dans le jeu de données mais n'ont pas encore été identifiées par comparaison de séquences. Une autre hypothèse serait que ces enzymes aient été réprimées chez les protoplastes et les sporophytes élicités. En effet, les cellules limiteraient l'activité de ces enzymes afin d'augmenter la quantité d'EAO constituant le burst oxydant toxique pour le pathogène. Ce phénomène a notamment été observé chez le tabac (Mittler et *al.*, 1998). Suivant les conditions physiologiques dans lesquelles se trouvent les cellules (stress biotique ou abiotique) les cellules pourraient modifier l'équilibre entre la production d'EAO (stress biotique) et l'élimination de ceux-ci (stress abiotique).

Des expériences récentes ont montré que, chez *A. thaliana*, des doubles mutants ne possédant ni catalase, ni ascorbate peroxydases, étaient moins sensibles au stress oxydant que des mutants pour l'une ou l'autre de ces protéines (Rizhsky et al., 2003). Cette moindre sensibilité serait expliquée notamment par la mise en place de systèmes alternatifs de détoxification des EAO, notamment la voie des pentose phosphates. Les résultats obtenus chez *L. digitata* indiquent que les séquences identifiées comme marqueurs potentiels de la défense ou du stress codent principalement des protéines pouvant jouer un rôle direct dans le contrôle de la quantité d'EAO présentes dans la cellule. Nous pouvons donc supposer que *L. digitata* met en place des systèmes différents de contrôle de la quantité des EAO selon le type de stress, biotique ou abiotique auquel l'algue est exposée. Les enzymes impliquées pourraient être différentes selon les conditions : les GST en cas de stress abiotique, et les thiorédoxine peroxydases en condition d'éllicitation. Il est également possible que les bromoperoxydases prennent part à ces mécanismes de contrôle des EAO, Ld-vBPO en cas de stress biotique et pLd-vBPO en condition de stress abiotique.

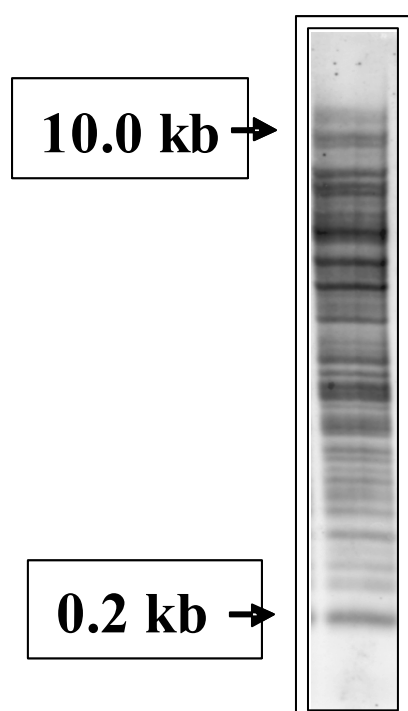
4-3 Limites de la méthode

L'emploi de la stratégie d'hybridation soustractive sur des sporophytes élicités nous a donc permis une première discrimination entre des marqueurs moléculaires de la réponse au stress et de la défense chez *L. digitata*. Bien qu'efficace, cette méthode possède des limites. En effet, l'analyse des séquences obtenues par cette méthode se fait par comparaison avec des banques de données. Elle est donc soumise aux mêmes limites que la stratégie EST. De plus, les inserts obtenus sont de petite taille et se situent généralement dans la partie 3' non traduite des transcrits. Cette partie étant très spécifique de l'organisme considéré, la ou les bases de données utilisées pour effectuer l'identification des séquences doivent être riches en données relatives à cet organisme. L'emploi de techniques telles que les puces à ADN doit permettre d'obtenir des résultats analogues (identification des gènes induits dans une condition donnée) à une échelle plus importante car plusieurs milliers de gènes peuvent être étudiés en même temps. Cependant, les banques soustractives représentent un moyen rapide et efficace pour obtenir des informations sur l'induction de plusieurs gènes dans des conditions particulières.

Figure 43 : Alignement de la région bordant le site catalytique des mannuronane-C5-épimérase. L'asparagine catalytique est marquée d'une étoile, les résidus strictement conservés apparaissent en noir. (Nyvall et *al.*, 2003).

				*							
ManC5	-E1	267	WRRNKMHNRE	YG	FDPH	DD	SFLT	I	HDNKVY	-NGNH	G
GP1EsV	-1	285	LSRNSVYNEV	YG	FDPH	DD	SVNT	I	SHNDVY	-SNFNH	G
AlgE1	-A1	144	LERVEIREMSG	YG	FDPH	EQ	TNLT	I	RDSVAH	-DGLD	G
AlgG	-Azo	292	LKGNITYRDNII	YG	IDPH	DR	SRLV	I	AENHVGIIKKKH		G
AlgG	-Pse	312	VKGNITYRDNIV	YG	IDPH	DR	SHRLI	I	ADNIVHGIRK	KH	G

Figure 44 : Analyse par Southern-blot des mannuronane-C5-épimérase chez *L. digitata*. L'ADN de sporophytes a été digéré par *SalI* et *EcoRI*, et une portion de 1250 pb appartenant à la région codante de ManC5-E1 a été utilisée comme sonde. (Nyvall et *al.*, 2003)

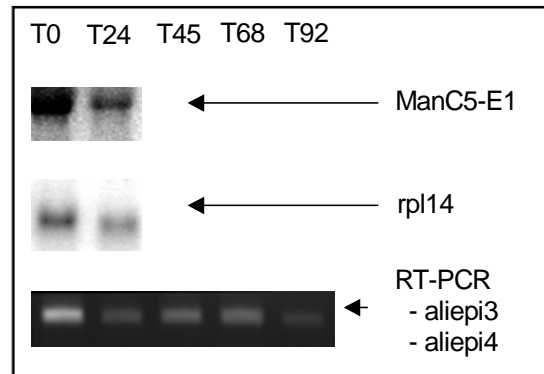


Chapitre III : Etude de la famille multigénique des mannuronane-C5-épimérase

La paroi, en plus de son rôle de maintien de l'intégrité cellulaire, constitue la première barrière de défense de la cellule contre toute forme d'agression physique ou chimique. Lors de la dernière étape de biosynthèse de l'alginate, les mannuronane-C5-épimérase catalysent l'épimérisation des résidus M en résidus G. Cette réaction a pour effet de durcir la paroi cellulaire de l'algue et de changer sa rhéologie. Les activités enzymatiques ManC5-E ont été décrites chez les algues brunes ainsi que chez deux bactéries : *Pseudomonas aeruginosa* et *Azotobacter vinelandii*. Une séquence correspondant à cette enzyme a également été identifiée chez le virus infectant l'algue brune *Ectocarpus siliculosus* (protéine de la capsid GP1) (Delaroque et al., 2001). L'étude EST menée sur les sporophytes de *L. digitata* (Crépineau et al., 2000) avait permis d'isoler 6 ADNc différents (gènes *ManC5-E1*, *ManC5-E2*, *ManC5-E3*, *ManC5-E4*, *ManC5-E5*, *ManC5-E6*) montrant des similitudes avec les enzymes bactériennes productrices d'alginate, ainsi qu'avec la protéine GP1 du virus infectant *E. siliculosus*. Toutes ces séquences ont en commun un domaine conservé. La mutation d'un résidu Asp sur le module A1 d'Alg E1 entraîne la perte de l'activité épimérase, suggérant que ce motif conservé est le site catalytique de ces enzymes (fig. 43).

L'analyse par Southern-blot de la présence de mannuronane C5 épimérase chez *L. digitata* (fig. 44) montre que ces enzymes sont codées par une famille multigénique formée de plus de 40 membres. Parmi les EST identifiées chez le protoplaste, 22 codent des séquences de mannuronanemannuronane-C5-épimérase. La paroi de ces cellules ayant été digérée, il apparaît cohérent que le protoplaste, en plus de répondre aux différents stress, oriente son métabolisme vers la néo-synthèse de la paroi cellulaire. Ainsi, il a été montré par Northern-blot et RT-PCR semi-quantitative que les C5-épimérase étaient exprimées au cours des 12 premières heures suivant la mise en culture de protoplastes de *L. digitata* (fig. 45). De plus, des expériences menées au laboratoire indiquent que certains membres de la famille multigéniques Man-C5E seraient induits chez le sporophyte 6 heures après élicitation par des oligoguluronates. Il semble donc que les nombreux gènes contenus dans cette famille s'expriment dans des conditions physiologiques différentes.

Figure 45 : Analyse de l'expression de ManC5-E1 chez le protoplaste par Northern-blot et RT-PCR semi-quantitative. Un fragment de 405 pb de la partie codante de ManC5-E1 a été utilisé comme sonde. Un fragment de 400 pb appartenant à la partie codante de la protéine ribosomique rpl 14 a été aussi été considéré comme sonde contrôle pour estimer la quantité d'ARN chargée. La RT-PCR a été réalisée à partir des mêmes ARNm que pour le Northern-blot, et les 2 amorces aliepi3 et aliepi4 ont été employées pour amplifier un fragment de 400 pb de la partie codante de ManC5-E1. (Nyvall et *al.*, 2003)



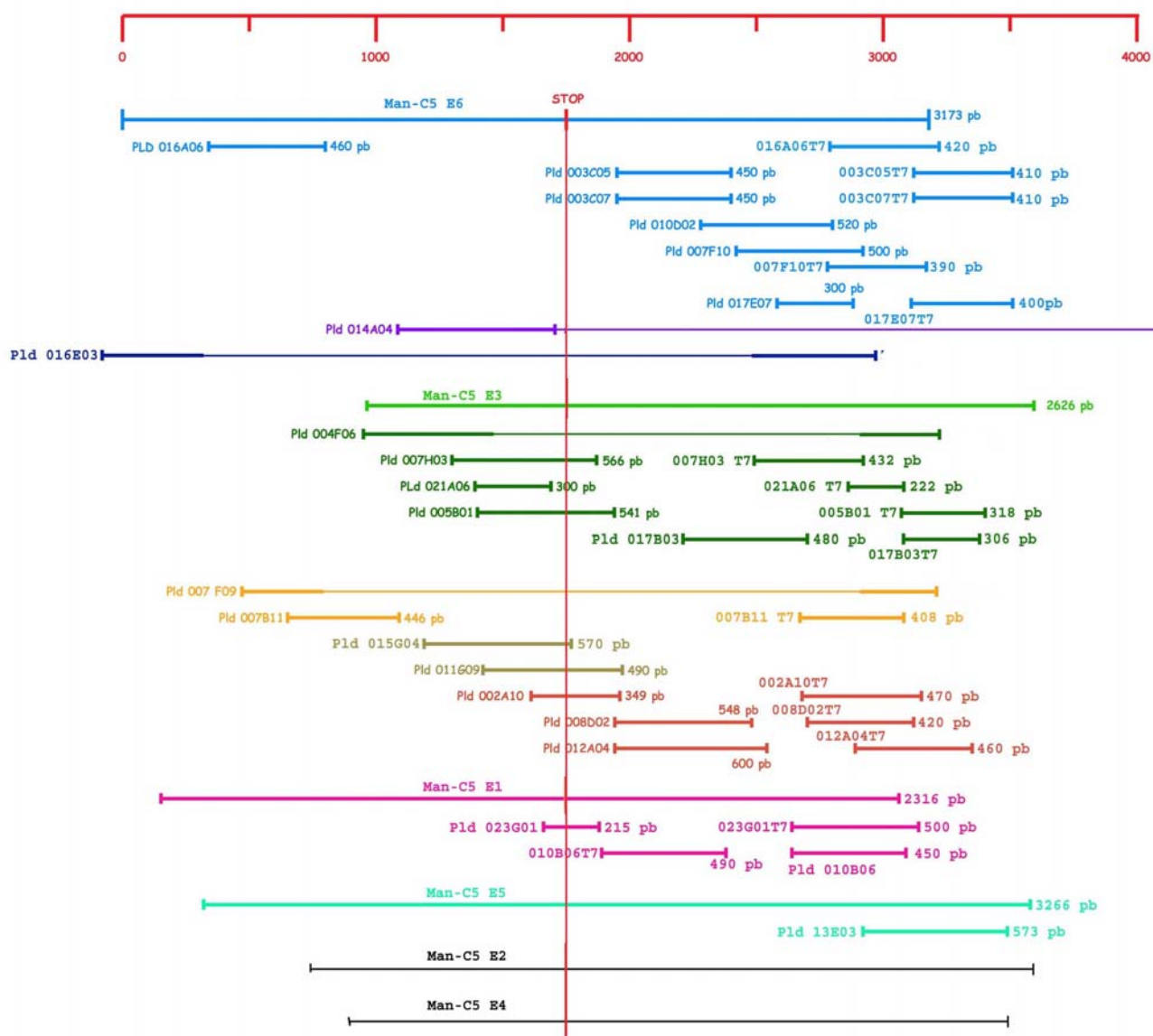
1- Identification des gènes de C5-épipimérases chez le protoplaste

Lors d'une première analyse 2 contigs (composés respectivement de 2 et 6 EST) ainsi que 3 singletons codant des mannuronane-C5-épipimérases ont été identifiés dans le catalogue des EST de protoplastes. Ces gènes appartenant à une famille multigénique nombreuse et très conservée, j'ai analysé indépendamment chaque EST de ces contigs. J'ai également comparé les 6 séquences de mannuronanemannuronane-C5-épipimérase de *L. digitata* disponibles au laboratoire (*ManC5-E1* à *ManC5-E6*) avec l'ensemble des EST de protoplastes. Après cette analyse plus spécifique, j'ai pu ainsi identifier un total de 22 EST codant des mannuronanemannuronane-C5-épipimérase putatives dans la banque de protoplaste. Deux de ces EST s'avèrent être identiques à *ManC5-E1*, une est identique à *ManC5-E5*. Les 19 autres sont très similaires aux autres séquences Man-C5E de la banque de sporophyte, mais présentent suffisamment de différences pour être considérées comme de nouvelles mannuronane-C5-épipimérases. Les séquences obtenues chez le protoplaste peuvent se répartir en plusieurs catégories, cette répartition se faisant par comparaison de leur partie 3' non traduite (fig. 46). J'ai procédé au séquençage complet de 4 de ces ADNc que j'ai choisis d'une part pour leur divergence par rapport aux séquences connues et d'autre part pour la longueur de leur partie codante. J'ai ainsi pu obtenir la séquence complète d'un nouvel ADNc pleine longueur, *ManC5-E7* (clone Pld 016E03) et augmenter les données sur la partie codante de 3 autres séquences : Pld007F09, Pld014A04 et Pld004F06. Même si les informations de séquences recueillies chez le protoplaste sont très fragmentées, les pourcentages d'identité sont très élevés au niveau des parties codantes des différentes séquences. L'analyse des parties 3' non traduites révèle une plus grande diversité, liée à la maturation des ARNm : *ManC5-E7* possède une partie 3' non traduite de 1250 pb, alors que Pld 014A04, possède une partie 3' non traduite de 2050 pb identique à 99% avec *ManC5-E7* sur les 1250 premières pb. De plus, on remarque la présence de plusieurs motifs d'une longueur variant de 100 à 300 pb retrouvés dans plusieurs séquences de gènes *ManC5-E*.

2- Recherche de séquences entières

L'une des principales difficultés lors de l'étude d'une famille multigénique réside dans la forte conservation de séquences des membres la constituant. Cette conservation peut

Figure 46 : Cartographie des mannuronanemannuronane-C5-épimérases identifiées chez les protoplastes de *L. digitata*. L'échelle de taille est donnée en paires de bases. Les séquences sont positionnées horizontalement par rapport au codon stop de ManC5-E6 (séquence la plus longue disponible au moment de l'étude) et verticalement par rapport à leur homologie avec les séquences déjà identifiées chez les sporophytes de *L. digitata*. Les couleurs correspondent aux ressemblances observées entre les nouvelles séquences identifiées chez les protoplastes et les séquences déjà disponibles.



induire des erreurs de distinction entre les différents membres et poser des difficultés lors de l'étude d'une induction de la transcription de plusieurs membres différents. Pour cette étude, la plus grande partie des séquences codant les différents membres de la famille multigénique des mannuronane-C5-épimérase a été obtenue lors d'études EST. Ces séquences sont pour la plupart incomplètes et correspondent à des positions différentes des transcrits. Il est alors impossible de dire si des séquences d'EST non chevauchantes et identifiées comme codant des mannuronane-C5-épimérase correspondent à un même transcrit ou deux transcrits différents. De plus, l'obtention de séquences d'ADNc pleines longueurs, ou du moins correspondant à l'intégralité de la partie codante, doit permettre d'effectuer des comparaisons de séquences et éventuellement de répartir les membres de la famille multigénique en plusieurs classes, suivant l'existence (ou non) de variations de séquences à des positions conservées. L'obtention de séquences pleines longueurs doit également faciliter le dessin d'amorces parfaitement spécifiques d'un gène donné afin d'étudier les facteurs influant sur sa transcription par des méthodes telles que la PCR quantitative, et éviter ainsi les artéfacts dus à l'amplification d'un autre membre de la famille dont la séquence correspondant à la zone d'hybridation des amorces est identique. Enfin, l'obtention d'ADNc pleine longueur ouvre potentiellement la voie d'études biochimiques sur l'enzyme en permettant la surexpression de celle-ci.

Afin d'obtenir des séquences pleine longueur de certains ADNc codant des mannuronanemannuronane-C5-épimérase, j'ai utilisé la technique de RACE PCR. L'alignement des parties codantes disponibles a permis d'observer une forte conservation du site catalytique au niveau nucléotidique à l'intérieur de toutes ces séquences et de définir l'amorce suivante :

5'-GGCTTTGACCCCCACGACGACAGCGAC-3'.

Un oligonucléotide complémentaire de cette séquence a été utilisé afin de générer des ADNc correspondant à la partie 5' de l'ARNm par rapport au site catalytique. L'emploi de cette amorce commune à l'ensemble des membres de la famille multigénique devait permettre d'obtenir, en une seule manipulation de RACE PCR, un maximum d'ADNc codant des mannuronane-C5-épimérase différentes. Les produits d'amplification ayant la taille attendue (environ 1200 pb) ont été clonés et séquencés. Malheureusement, l'utilisation d'ADNc obtenus à partir d'ARNm extraits de sporophytes non élicités, ainsi que des ADNc synthétisés à partir d'ARNm de protoplastes, n'a pas permis d'isoler de fragments correspondant à

Table 6 : Récapitulatifs des expériences de RACE PCR réalisées pour obtenir des ADNc pleine longueur de mannuronanemannuronane-C5-épimérases.

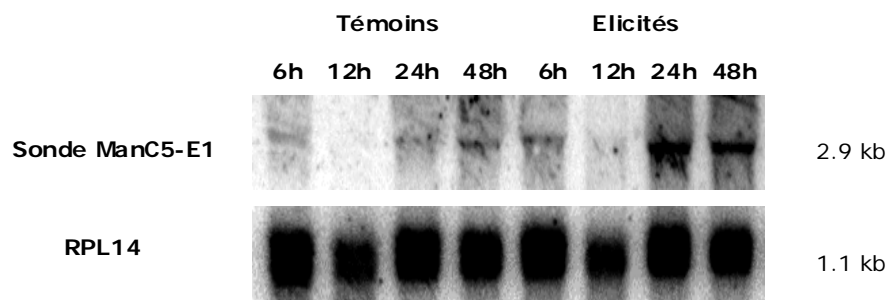
Methode utilisée	Cible	Amorces considérées	Matrice
RACE PCR	tous les membres de la famille multigénique	Amorce du Kit + Site catalytique	ADNc de protoplaste
RACE PCR	tous les membres de la famille multigénique	Amorce du Kit + Site catalytique	ADNc de sporophyte
RACE PCR	ManC5-E2	Amorce du kit + Site spécifique E2	ADNc de sporophyte
PCR sur banque	tous les membres de la famille multigénique	T3 + Site catalytique	Banque EST protoplaste
PCR sur banque	ManC5-E2	T3 + Site spécifique E2	Banque EST protoplaste

l'extrémité N-terminale de *Man-C5E*. Cependant, nous avons pu obtenir une partie plus importante de la partie codante de la séquence E-SWE4. Cette séquence a été obtenue par Sylvie Rousvoal lors d'une expérience d'amplification par PCR utilisant des amorces dégénérées s'hybridant de part et d'autre de la zone correspondant au site catalytique des mannuronane-C5-épimérase. L'utilisation des résultats de cette expérience est discuté dans la partie 3 de ce chapitre.

Etant donné l'échec d'une approche générale visant l'ensemble des membres de la famille multigénique, j'ai cherché à obtenir l'ADNc pleine longueur du gène *ManC5-E2* en utilisant toujours la méthode de RACE PCR et avec une amorce spécifique de ce gène situé en 3'. Nous possédions déjà au laboratoire les ADNc complet de 3 *ManC5E* différentes (*ManC5-E1*, *ManC5-E6* et *ManC5-7*). *ManC5-E2* m'apparaissait comme un bon candidat pour l'obtention d'un ADNc complet. En effet, il ne manquait qu'environ 200 pb pour obtenir un ADNc complet codant cette enzyme. De plus, aucun transcrit codant ce membre de la famille multigénique n'ayant été identifié chez le protoplaste, il était possible que les conditions menant à l'augmentation de sa transcription soient différentes de celles de *ManC5-E1* pour laquelle plusieurs transcrits ont été identifiés chez les sporophytes et les protoplastes. L'utilisation d'amorces en 3' devait permettre l'obtention d'un ADNc pleine longueur afin par exemple de disposer d'un nouveau candidat à la surexpression. Aucun résultat significatif n'a été obtenu. Une hypothèse pouvant expliquer ces échecs serait un mauvais repliement des ARNm, empêchant ainsi la progression de la transcriptase inverse au cours de la synthèse du brin d'ADNc.

La technique de RACE PCR ne donnant pas les résultats escomptés, j'ai tenté d'obtenir les ADNc pleine longueur par une méthode analogue, mais utilisant la banque d'ADNc de protoplastes comme matrice pour les étapes de PCR. En effet, cette banque étant construite de façon orientée, l'utilisation conjointe d'une amorce sens, spécifique du vecteur et d'une amorce antisens spécifique du gène étudié devait permettre l'amplification ciblée d'une partie de l'ADNc recherché. De plus, le titre de cette banque étant élevé, on pouvait supposer une bonne représentation des différents gènes d'intérêt. J'ai utilisé l'amorce correspondant au site catalytique des mannuronanemannuronane-C5-épimérase mentionnées ci-dessus en combinaison avec l'amorce T3 du vecteur, pour tenter d'amplifier tous les ADNc comprenant ce site catalytique. De part la forte conservation des séquences de mannuronanemannuronane-C5-épimérase chez *L. digitata*, j'estimais que la taille des portions 5' correspondant à un ADNc pleine longueur devait avoir une taille supérieure à 1000 pb. Après migration sur gel d'agarose, les bandes correspondantes ont été découpées,

Figure 47 : Analyse par Northern-blot de l'induction de ManC5-E1 après élicitation des sporophytes par des oligogulonates. La sonde ManC5-E1 est la même que celle utilisée lors du Southern-blot.



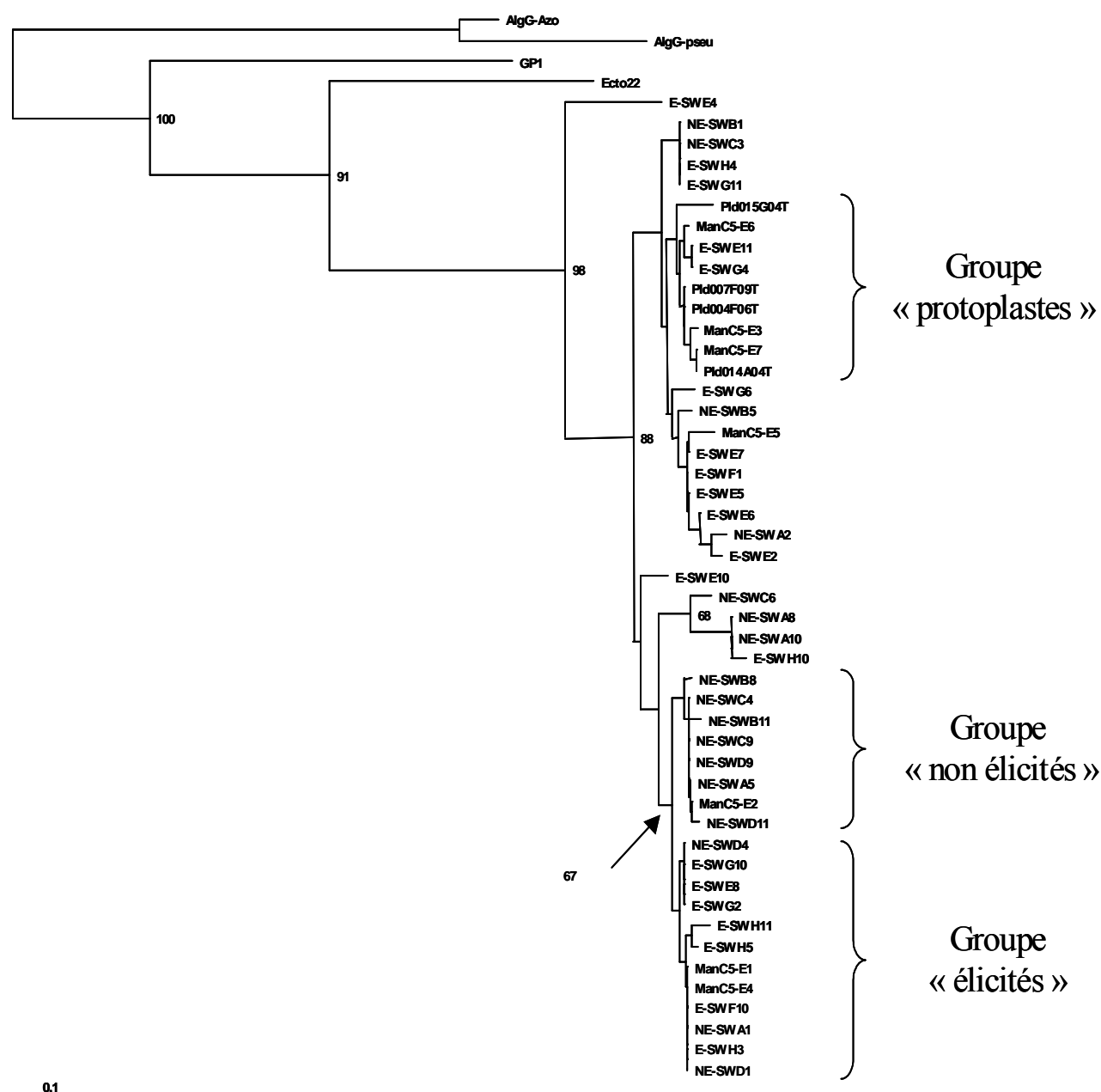
purifiées, clonées et 30 inserts ont été séquencés. Tous correspondaient à la séquence du gène *ManC5-E1*, déjà complète. Le tableau 6 récapitule les différentes tentatives d'obtention d'ADNc pleine longueur de mannuronane-C5-épimérases.

Le fait que des ADNc pleine longueur aient été obtenus pour *ManC5-E1*, *ManC5-E6* et *ManC5-E7* pourrait s'expliquer par une absence de structures secondaires dans les ARNm codant ces protéines. Cette hypothèse s'applique aussi bien à la RACE PCR qu'à la banque EST en général. La seconde hypothèse implique un biais dans l'amplification par PCR qui serait dû à une expression différentielle des mannuronane-C5-épimérases chez le protoplaste. En effet, l'expression de *ManC5-E1* pourrait être induite chez ce dernier. Les ADNc codant ce membre de la famille multigénique seraient présents en quantité plus importante comparé aux autres *ManC5* dans la banque EST de protoplastes, induisant ainsi un biais lors de l'amplification par PCR réalisée directement sur la banque.

3- Obtention de nouvelles séquences de C5-épimérases par RT-PCR

La fonction principale des ces enzymes est de moduler la composition de l'alginate lors de la dernière étape de biosynthèse de ce polysaccharide, en relation avec des stades de développement particuliers et en fonction des tissus considérés. Cependant, les gènes de C5-épimérase chez *Laminaria digitata* constituent une très grande famille multigénique et il est probable que certains gènes jouent également un rôle dans la réponse à des stress biotiques ou abiotiques comme cela a été constaté pour les pectine-méthyl-esterases (PME) chez les plantes supérieures. En effet, certaines PME sont spécifiquement induites lors d'une attaque par un pathogène (Kagan-Zur et al., 1995 ; Mbwaga et al., 1997). Des expériences préliminaires de Northern-blot ont montré qu'il y a bien induction de gènes de C5-épimérases lors d'une élicitation par des oligoguluronates (fig. 47) La sonde utilisée dans cette expérience ne permettait pas de discriminer quel gène de C5-épimérase était spécifiquement induit, car il s'agissait d'une sonde correspondant à une région codante très conservée au sein de toute la famille de gènes. Cependant, l'analyse de la banque soustractive d'ADNc spécifique de sporophytes élicités par les GG n'a pas mis en évidence d'induction spécifique de ces gènes. Cette absence pouvant être due à des limitations de la méthode ou à une faible expression de ces gènes, une approche différente a été entreprise au laboratoire par S. Rousvoal. Cette

Figure 48 : Dendrogramme des mannuronane-C5-épimérases identifiées chez *L. digitata*. La méthode utilisée pour la construction de l'arbre est celle du « neighbor joining » suivant la matrice PAM. La valeur de bootstrap a été fixée à 100. Seules les valeurs significatives (supérieur à 60) ont été conservées sur le graphique. NE-XXX : séquences obtenues chez les sporophytes non élicités ; E-XXX séquences obtenues chez les sporophytes élicités ; Pld0XXX, séquences obtenues chez les protoplastes ; Ecto 22 Séquence obtenue chez *Ectocarpus siliculosus* ; AlgG Azot séquence obtenue chez *A. vinelandii* (numéro d'accension XXXXX); AlgG Pseu, séquence obtenue chez *P. aeruginosa* (numéro d'accension XXXXXX); GP1 séquence obtenue chez le virus infectant *E. siliculosus* (numéro d'accension xxxxxxxxx); ManC5-X, séquence obtenues chez les sporophytes de *L. digitata*.



nouvelle approche visait à construire une « mini banque » d'ADNc partiels de mannuronane-C5-épimérase à partir d'ARNm issus de sporophytes élicités ou non par des GG afin de détecter éventuellement un groupe de C5-épimérase spécifiquement induites en présence de GG. La comparaison des 6 séquences ManC5-E isolées de la banque de sporophyte (ManC5-E1 à ManC5-E6) a permis de déterminer des amorces communes à l'ensemble des C5-épimérase, bornant le site catalytique conservé de ces enzymes et générant un amplifiat de 500 pb. Ces oligonucléotides ont été utilisés en présence d'ADNc produits à partir d'ARNm issus de sporophytes après 12 heures d'élicitation et de sporophytes non élicités (Rousvoal, non publié). Il a été ainsi possible d'obtenir une cinquantaine de fragments différents avec les 2 types de matrice considérés. J'ai procédé à l'analyse détaillée de ces séquences afin de déterminer s'il était possible de regrouper les séquences obtenues en fonction des conditions dans lesquelles les sporophytes avaient été incubés, et d'identifier de nouveaux membres de la famille multigénique. Les séquences en acides aminés déduites de ces fragments ont été alignées avec celles préalablement disponibles chez *P. aeruginosa*, *A. vinelandii*, *L. digitata*, et *E. siliculosus* (Rousvoal et Lacut, non publié) ainsi qu'avec celle codant la protéine GP1 du virus infectant *Ectocarpus siliculosus*. Il a ainsi été possible d'identifier une trentaine de nouveaux membres chez *L. digitata*. Il a surtout été possible de réaliser un dendrogramme (fig. 48) dont l'analyse a permis d'identifier 4 grands groupes de séquences, selon les conditions physiologiques dans lesquelles les gènes sont préférentiellement exprimés. En effet, la première catégorie regroupe 7 séquences obtenues chez les sporophytes non élicités. La seconde rassemble 12 fragments (3 non élicités, 6 élicités, ManC5-E1 et E4) et constitue le groupe dit des « élicités ». La troisième catégorie regroupe 9 séquences : ManC5-E6, ManC5-E7, 2 séquences provenant de sporophytes élicités et 4 de protoplastes. Cette dernière catégorie forme le groupe « protoplaste » des mannuronanes-C5-épimérase. La dernière catégorie est constituée par les 17 autres séquences qui se répartissent dans l'arbre de façon non ordonnée. Il ressort donc que, parmi l'ensemble des mannuronanes-C5-épimérase présentes dans *L. digitata*, il existe des différences de séquences qui permettent de les regrouper de façon cohérente, principalement en fonction du type de tissus (protoplastes/sporophytes) et/ou des conditions d'incubation (présence ou non de GG).

Même si toutes les séquences isolées présentent 90% d'identité entre elles, on observe des zones spécifiques à chaque groupe (fig. 49). Ces variations sont concentrées principalement sur les 2 acides aminés précédant le site catalytique et sur 5 acides aminés situés 30 résidus en aval du site catalytique. On remarque également un changement de nature de l'acide aminé situé 24 résidus en amont du site catalytique, hydrophile ou hydrophobe

Figure 49 : Alignement des séquences partielles de Man-C5 obtenues par RT-PCR. Les séquences sont nommées suivant la nomenclature définie à la figure 48. Les sites de variation sont grisés, le site catalytique est marqué par des pointillés.

.....

AlgG-Azo	ETGKLTDSVFEDIYGGYTYEADDVLKGNTRYDNTYGTDPHDSSELVIAENVEYGTKKKHGIIISREVNSWITNNRTHDN--KLSGIYLRNSEHNLVAYNEVYQNHSD-GITLVESNNLLINGNRLINNRRH
AlgG-pseu	ETGKLTDSVFEDIYGGYTYEADDVLKGNTRYDNTYGTDPHDSSELVIAENVEYGTKKKHGIIISREVNSWITNNRTHDN--KLSGIYLRNSEHNLVAYNEVYQNHSD-GITLVESNNLLINGNRLINNRRH
GP1	VYGNLLGSDVHDLIYGGYTYEADDVLKGNTRYDNTYGTDPHDSSELVIAENVEYGTKKKHGIIISREVNSWITNNRTHDN--KLSGIYLRNSEHNLVAYNEVYQNHSD-GITLVESNNLLINGNRLINNRRH
Ecto22	VYGDLTGSDIHHLYGGYTYEADDVLKGNTRYDNTYGTDPHDSSELVIAENVEYGTKKKHGIIISREVNSWITNNRTHDN--KLSGIYLRNSEHNLVAYNEVYQNHSD-GITLVESNNLLINGNRLINNRRH
ManC5-E1	VYGNLYDSDIHHNHFVGYTYGHEQGDWRRNKMHNNREYGFDPHDDSDFLTIDHNEVYNN-GNHGIIASKRCNGVSIQGNVEYGGSSKSVGIFLHRSSDDAIVKGNVY-HDNGDAGMALMESFNADV-SNNKFEDNKY
ManC5-E4	VYGNLYDSDIHHNHFVGYTYGHEQGDWRRNKMHNNREYGFDPHDDSDFLTIDHNEVYNN-GNHGIIASKRCNGVSIQGNVEYGGSSKSVGIFLHRSSDDAIVKGNVY-HDNGDAGMALMESFNADV-SNNKFEDNKY
ManC5-E2	VYGNLYDSDIHHNHFVGYTYGHEQGDWRRNKMHNNREYGFDPHDDSDFLTIDHNEVYNN-GNHGIIASKRCNGVSIQGNVEYGGSSKSVGIFLHRSSDDAIVKGNVY-HDNGDAGMALMESFNADV-SNNKFEDNKY
ManC5-E3	VYGNLYDSDIHHNHFVGYTYGHEQGDWRRNKMHNNREYGFDPHDDSDFLTIDHNEVYNN-GNHGIIASKRCNGVSIQGNVEYGGSSKSVGIFLHRSSDDAIVKGNVY-HDNGDAGMALMESFNADV-SNNKFEDNKY
ManC5-E5	VYGNLYDSDIHHNHFVGYTYGHEQGDWRRNKMHNNREYGFDPHDDSDFLTIDHNEVYNN-GNHGIIASKRCNGVSIQGNVEYGGSSKSVGIFLHRSSDDAIVKGNVY-HDNGDAGMALMESFNADV-SNNKFEDNKY
ManC5-E6	VYGNLYDSDIHHNHFVGYTYGHEQGDWRRNKMHNNREYGFDPHDDSDFLTIDHNEVYNN-GNHGIIASKRCNGVSIQGNVEYGGSSKSVGIFLHRSSDDAIVKGNVY-HDNGDAGMALMESFNADV-SNNKFEDNKY
ManC5-E7	VYGNLYDSDIHHNHFVGYTYGHEQGDWRRNKMHNNREYGFDPHDDSDFLTIDHNEVYNN-GNHGIIASKRCNGVSIQGNVEYGGSSKSVGIFLHRSSDDAIVKGNVY-HDNGDAGMALMESFNADV-SNNKFEDNKY
Pld007F09T	VYGNLYDSDIHHNHFVGYTYGHEQGDWRRNKMHNNREYGFDPHDDSDFLTIDHNEVYNN-GNHGIIASKRCNGVSIQGNVEYGGSSKSVGIFLHRSSDDAIVKGNVY-HDNGDAGMALMESFNADV-SNNKFEDNKY
E-SWF10	VYGNLYDSDIHHNHFVGYTYGHEQGDWRRNKMHNNREYGFDPHDDSDFLTIDHNEVYNN-GNHGIIASKRCNGVSIQGNVEYGGSSKSVGIFLHRSSDDAIVKGNVY-HDNGDAGMALMESFNADV-SNNKFEDNKY
NE-SWD9	VYGNLYDSDIHHNHFVGYTYGHEQGDWRRNKMHNNREYGFDPHDDSDFLTIDHNEVYNN-GNHGIIASKRCNGVSIQGNVEYGGSSKSVGIFLHRSSDDAIVKGNVY-HDNGDAGMALMESFNADV-SNNKFEDNKY
NE-SWA2	VYGNLYDSDIHHNHFVGYTYGHEQGDWRRNKMHNNREYGFDPHDDSDFLTIDHNEVYNN-GNHGIIASKRCNGVSIQGNVEYGGSSKSVGIFLHRSSDDAIVKGNVY-HDNGDAGMALMESFNADV-SNNKFEDNKY
E-SWF1	VYGNLYDSDIHHNHFVGYTYGHEQGDWRRNKMHNNREYGFDPHDDSDFLTIDHNEVYNN-GNHGIIASKRCNGVSIQGNVEYGGSSKSVGIFLHRSSDDAIVKGNVY-HDNGDAGMALMESFNADV-SNNKFEDNKY
NE-SWB5	VYGNLYDSDIHHNHFVGYTYGHEQGDWRRNKMHNNREYGFDPHDDSDFLTIDHNEVYNN-GNHGIIASKRCNGVSIQGNVEYGGSSKSVGIFLHRSSDDAIVKGNVY-HDNGDAGMALMESFNADV-SNNKFEDNKY
E-SWG6	VYGNLYDSDIHHNHFVGYTYGHEQGDWRRNKMHNNREYGFDPHDDSDFLTIDHNEVYNN-GNHGIIASKRCNGVSIQGNVEYGGSSKSVGIFLHRSSDDAIVKGNVY-HDNGDAGMALMESFNADV-SNNKFEDNKY
NE-SWB1	VYGNLYDSDIHHNHFVGYTYGHEQGDWRRNKMHNNREYGFDPHDDSDFLTIDHNEVYNN-GNHGIIASKRCNGVSIQGNVEYGGSSKSVGIFLHRSSDDAIVKGNVY-HDNGDAGMALMESFNADV-SNNKFEDNKY
E-SWE4	VYGNLYDSDIHHNHFVGYTYGHEQGDWRRNKMHNNREYGFDPHDDSDFLTIDHNEVYNN-GNHGIIASKRCNGVSIQGNVEYGGSSKSVGIFLHRSSDDAIVKGNVY-HDNGDAGMALMESFNADV-SNNKFEDNKY

selon les familles. Bien qu'il ne s'agisse que d'une expérience préliminaire, elle semble, à défaut de confirmer, au moins étayer l'hypothèse de départ : les différents membres de la famille multigénique semble être exprimés de façon dépendante des conditions physiologiques de l'algue. Le fait que l'on observe des variations de séquence à des positions fixes et proches du site catalytique peut également laisser supposer différents modes d'action chez les membres de cette famille. Il est en effet possible que ceux-ci aient des mécanismes enzymatiques différents (processifs ou non), voir des substrats différents (par exemple un motif particulier d'alternance M/G).

4- Validation des groupes de C5-épimérases par PCR quantitative

Nous avons donc décidé d'approfondir cette question en essayant d'identifier le ou les gènes de C5-épimérase spécifiquement induits par les GG. Nous avons opté pour l'utilisation de la technique de RT-PCR en temps réel qui était en cours de mise au point au laboratoire. Dans ce but, deux systèmes expérimentaux ont été utilisés. Le premier est le système « protoplastes en culture ». Le second système expérimental est l'éllicitation de jeunes plantules de *L. digitata* par des GG lors d'une cinétique de 24 heures. Nous avons utilisé des plantules obtenues au laboratoire en conditions de culture contrôlées et des plantules sauvages récoltées en mars lors d'une marée de vives eaux.

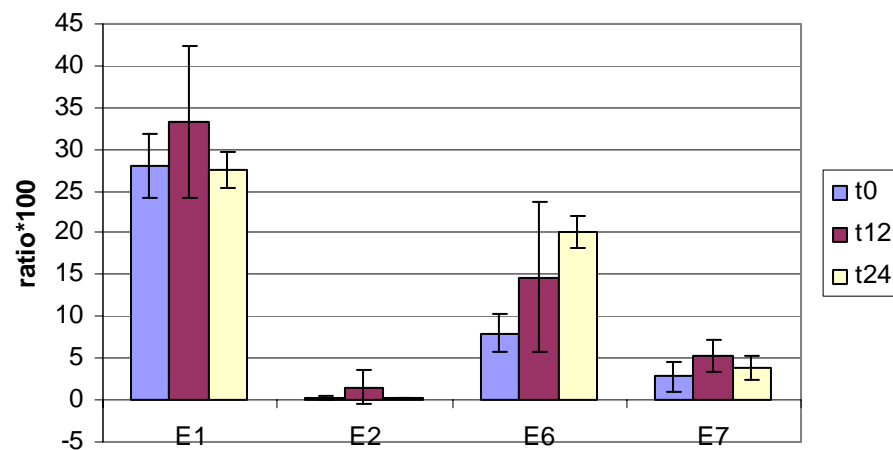
Quatre gènes de C5-épimérase ont été retenus pour cette étude par RT-PCR en temps réel :

- *ManC5-E1*, qui serait induite en cas d'éllicitation par des oligogulonates.
- *ManC5-E2*, dont l'expression ne semble pas modifiée au cours de l'éllicitation en présence d'oligogulonates.
- *ManC5-E6* qui a tout d'abord été identifiée chez le sporophyte mais qui est également fortement exprimée chez les protoplastes.
- *ManC5-E7* qui n'a été isolée que chez les protoplastes.

Pour récapituler, les mesures d'accumulation des transcrits de ces 4 gènes ont été réalisées à partir:

- des ADNc issus d'ARNm de protoplastes à différents temps de régénération (T0, T12, T24 heures),

Figure 50 : Mesure de la quantité de transcrits de 4 gènes de mannuronane-C5-épimérase chez des protoplastes de *L. digitata* maintenus en culture pendant 24 heures. Les données sont exprimées en quantités relatives par rapport au gène témoin rpl14.



- des ADNc issus d'ARNm de sporophytes de culture à différents temps au cours de l'élicitation par des oligogulonates (T0, T6, T12, T24 heures)
- sur des ADNc issus d'ARNm de sporophytes sauvages cultivés à différents temps pendant l'élicitation par les oligogulonates (T0, T6, T12, T24 heures).
-

Cette distinction entre sporophytes sauvages et sporophytes de culture est due aux résultats obtenus lors d'expériences préliminaires menées par S. Rousvoal (non publié) montrant une expression constante de *ManC5-E2* chez les sporophytes élicités, sauvages ou de culture, alors que *ManC5-E1* apparaissait induite chez les sporophytes sauvages 12 heures après élicitation et constante chez les sporophytes cultivés.

Le gène utilisé en tant que témoin de l'expression stable est celui de la protéine ribosomale *rpl 14*. Habituellement dans ce type d'approche ce sont plutôt les gènes de tubuline, d'actine ou du facteur d'élongation *EF1 α* qui sont utilisés. Cependant, chez les protoplastes, ces gènes ne présentent pas de niveau d'expression stable. Nous avons donc préféré le gène *rpl 14* dont le niveau d'expression est constant. Les amorces utilisées pour *ManC5-E1*, *ManC5-E2* et *rpl 14* sont les mêmes que celles utilisés lors des expériences préliminaires et décrites dans le paragraphe précédent. Les amorces spécifiques à *ManC5-E6* et *ManC5-E7* ont été déterminées à l'aide du logiciel Primer express. Afin de vérifier la spécificité de ces 2 couples d'oligonucléotides, j'ai constitué une base de données regroupant l'ensemble des données nucléotidiques disponibles sur les mannuronane-C5-épimérases de *L. digitata*. En comparant les séquences générées par Primer Express à cette base de données, des paires d'amorces spécifiques à ces 2 gènes ont pu être sélectionnées. Cette spécificité a été vérifiée par PCR, puis par séquençage des amplicons obtenus lors des expériences de PCR quantitative. Les expériences ont été effectuées afin de pouvoir exprimer les résultats en quantité absolue (estimation du nombre de copie) et relative (expression par rapport à un gène référent). Cependant, les résultats étant n'ont été présentés que suivant la méthode relative, le gène de référence étudié étant celui de la *Rpl 14*. L'analyse des résultats a également permis d'établir que l'efficacité de d'amplification était comprise entre 97 % et 103 % pour les amorces utilisées.

4-1 Résultats obtenus chez les protoplastes

Chez les protoplastes, on observe des variations de la quantité de transcrit entre les

Figure 51 : Mesure de la quantité de transcrits de 4 gènes de mannuronane-C5-épimérase chez des jeunes plantules de sporophytes de culture de *L. digitata* lors d'une cinétique d'éllicitation par des oligogulonates. Les données sont exprimées en quantités relatives par rapport au gène témoin rpl14.

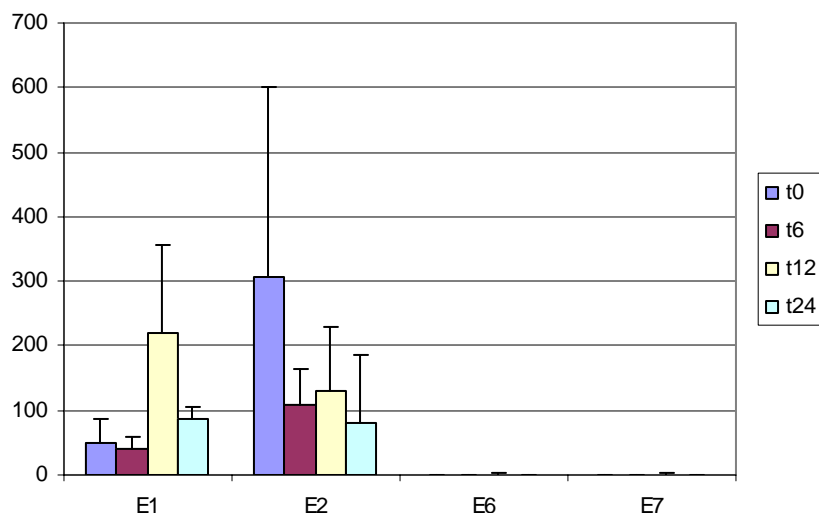
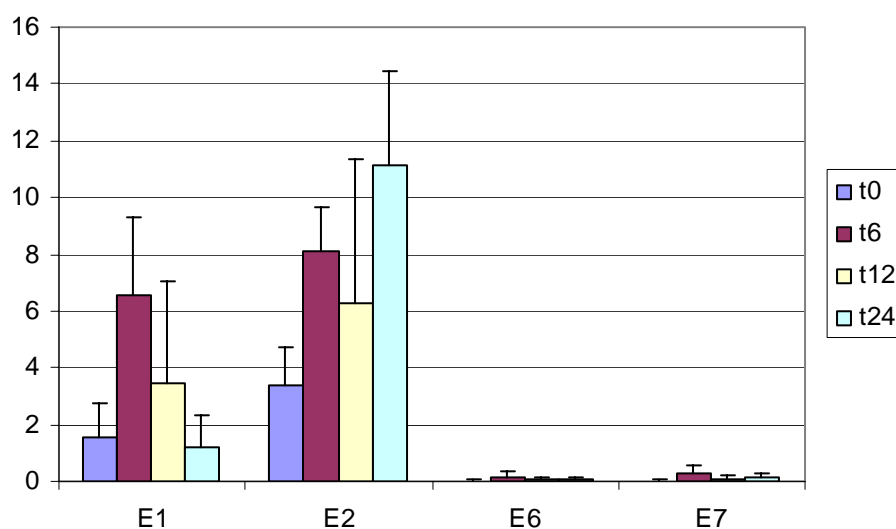


Figure 52 : Mesure de la quantité de transcrits de 4 gènes de mannuronane-C5-épimérase chez des jeunes plantules sauvages de *L. digitata* lors d'une cinétique d'éllicitation par des oligogulonates. Les données sont exprimées en quantités relatives par rapport au gène témoin rpl14.



différents gènes de mannuronane-C5-épipimérase (fig. 50). Cependant cette quantité de transcrits apparaît stable sur les 24 heures pour chaque gène pris indépendamment. *ManC5-E1* est le plus exprimée, son expression représente environ 30% de celle du gène témoin. *ManC5-E6* et *ManC5-E7* sont exprimés de façon moindre avec un taux d'expression de 15 % pour *ManC5-E6* et 5 % pour *ManC5-E7*. *Man-C5 E2* apparaît très faiblement exprimé avec un taux représentant environ 1 % de celui de *rpl 14*. Les pourcentages d'expression des différents gènes de ManC5-E ont été calculés par rapport à une moyenne du nombre de transcrit mesurés pour *rpl 14* aux différents temps.

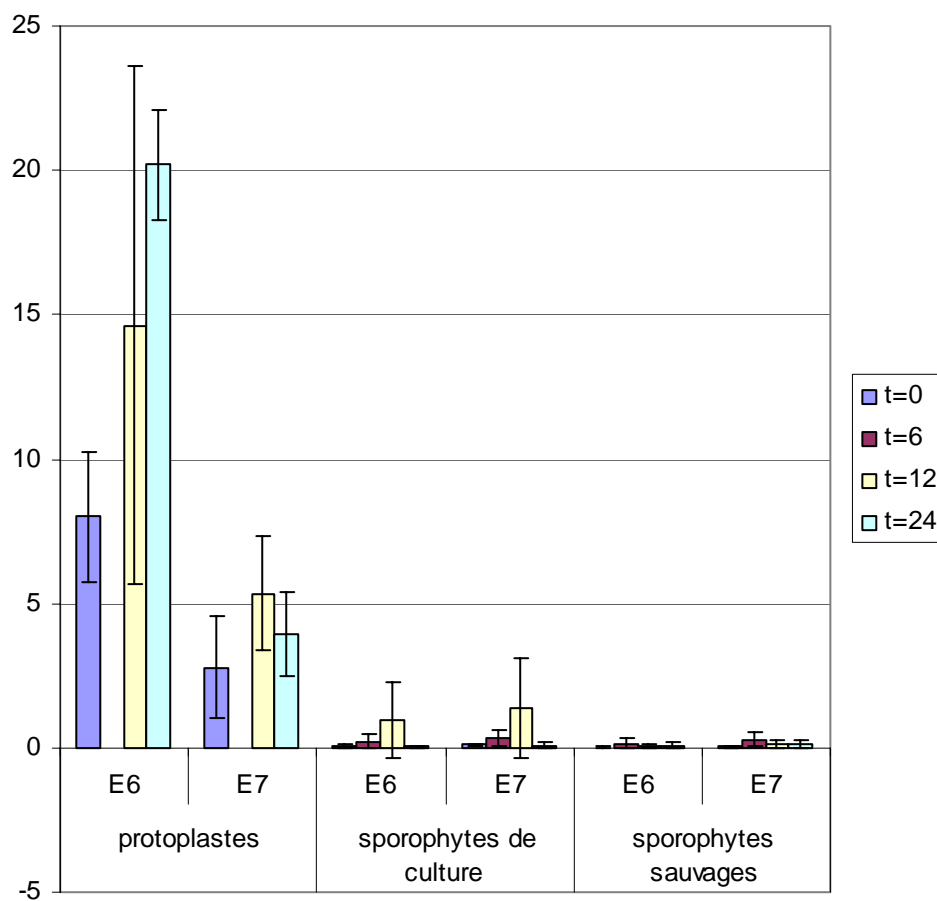
4-2 Résultats obtenus chez les sporophytes

Chez les sporophytes, qu'ils soient de culture ou sauvages, le profil des résultats est identique. *ManC5-E1* et *ManC5-E2* apparaissent comme étant largement plus exprimés que *ManC5-E6* et *ManC5-E7* (fig. 51 et 52). Dans le cas des sporophytes sauvages, on observe une augmentation de la transcription de *ManC5-E1* 6h après élicitation. Cette augmentation semble être réduite après 24h. Ce type de variation n'a pas été observé chez les sporophytes cultivés. De plus, les pourcentages d'expression de *ManC5-E1* par rapport au gène témoin sont très différents suivant la nature des sporophytes (sauvage ou cultivé). *ManC5-E2* ne semble pas réagir à l'élicitation quel que soit le type de sporophyte étudié. En revanche, son taux d'expression est largement inférieur chez les sporophytes sauvages que chez les sporophytes cultivés. Si les résultats relatifs à *ManC5-E1* et *ManC5-E2* sont difficilement interprétables en l'état, les résultats concernant *ManC5-E6* et *ManC5-E7* apparaissent plus clairs. Le taux d'expression de ces 2 gènes reste très bas quel que soit le temps d'élicitation ou la nature des sporophytes utilisés. Il semble donc que leur expression n'est pas dépendante de l'élicitation des sporophytes par des oligogulonates. Un graphique présentant l'expression de *ManC5-E6* et *ManC5-E7* dans les différentes conditions testées est présenté en figure 53.

5- Expression hétérologue de gènes de C5-épipimérase

Depuis plusieurs années, la surexpression de mannuronanes-C5-épipimérase a été l'objet de tentatives diverses (Nyvall et al., 2003) n'ayant malheureusement jamais abouti à l'obtention de protéines solubles et actives. Ces expériences de surexpression ont été réalisées en utilisant plusieurs vecteurs (pET-20b et pET-32a de Promega) et plusieurs souches de

Figure 53 : Expression de ManC5-E6 et ManC5-E7 dans les différentes conditions testées, exprimées en pourcentage de transcription par rapport à la protéine de référence rpl14.



bactéries (Origami B, Rosetta, Rosseta pLysS, de Promega). Des essais ont été également menés par l'intermédiaire de contrats passés avec des entreprises spécialisées dont Protein'expert, qui a utilisé des vecteurs de types pET pour transformer *E. Coli*, et GTP Technology, employant la levure *Pichia pastoris* comme hôte pour l'expression hétérologue. Depuis ces tentatives, un axe transversal de surexpression à moyen débit a été mis en place au sein de l'UMR pour exprimer des protéines de bactéries marines et d'algues. Pour ces dernières, plusieurs EST pleines longueurs obtenues chez le protoplaste, dont les EST codant ManC5-E1 et ManC5-E7, ont servi de matrice pour le clonage dans les vecteurs de surexpression.

Plus particulièrement, des premières données ont été obtenues avec un vecteur de type pF04 permettant l'addition d'une extension His-tag dans la partie N-terminale de la protéine cible et transformation chez *E. coli* BL21(DE3). Un premier crible sur membrane, réalisé par la technique du dot-blot en présence d'anticorps anti-His-tag, a permis d'obtenir un signal positif dans la fraction soluble de deux clones correspondant aux gènes *ManC5-E6* et *ManC5-E7*. Un litre de culture de ces deux clones de surexpression en milieu auto-inductif a été produit. Des essais de purification de la protéine ont été effectués sur une colonne de Nickel par élution avec un gradient 30-300 mM d'imidazole. L'analyse par Western-blot des fractions d'élution a révélé plusieurs bandes. Ces bandes étaient de tailles variables et ne correspondaient pas à la taille attendue pour une C5-épimérase. Nous en avons donc conclu qu'il s'agissait soit d'un artefact lors de la détection par dot-blot, soit d'un problème de dégradation de la protéine lors de la purification. Le projet semblant trop risqué pour être mené dans le cadre d'une dernière année de thèse, nous avons choisi de l'arrêter. Il est maintenant prévu de tester un système de surexpression autre que *E. coli* tel qu'un système eucaryote comme *Pichia pastoris*.

6- Discussion

Il a été montré chez *L. digitata* que les mannuronane-C5-épimérases forment une famille multigénique importante. Le nombre exact de gènes n'est toujours pas déterminé avec précision mais il est probablement supérieur à 30. De plus, des résultats préliminaires semblent indiquer que certains membres de cette famille multigénique sont impliqués dans la réponse à une attaque par un pathogène.

L'ensemble des données de séquences obtenues chez les sporophytes élicités, non élicités ainsi que chez les protoplastes suggèrent qu'il existe un lien entre les mannuronane-C5-épimérasés exprimés et les conditions physiologiques dans lesquelles se trouve l'algue. Les protoplastes sont des cellules en état de stress intense et régénèrent leur paroi, les sporophytes élicités sont en situation de défense face à une attaque pathogène. Ces deux types de situations semblent mettre en oeuvre des mannuronane-C5-épimérasés différentes qui pourraient être impliqués dans des processus distincts : la régénération de paroi ou le renforcement de celle-ci face à une attaque pathogène. De part la position conservée des variations dans les séquences, il semblerait qu'il s'agisse bien de variations effectives pouvant avoir une influence sur les propriétés biochimiques de ces enzymes, et non des variations liées à un polymorphisme entre individus. L'alginate n'est pas de composition uniforme chez *L. digitata*. En effet, sa composition varie entre la lame, le stipe, le crampon, la médula ainsi que le cortex de l'algue. Ces variations s'observent non seulement au niveau du ratio M/G, mais aussi au niveau de la proportion relative des trois blocs (MM, MG, GG) (Grasdalen et al., 1979). Ainsi, la proportion en blocs G est plus importante dans le crampon ou le stipe de l'algue, les rendant plus rigides par rapport à la lame, dont l'alginate est plus riche en bloc M (Haug et al., 1974 ; Kloareg et Quatrano, 1988). La présence de mannuronane-C5-épimérasés possédant des propriétés biochimiques différentes, telles que leur processivité, leur affinité au substrat, la nature même du substrat (enchaînement de MM ou présence d'un G avant un M) peuvent expliquer l'existence de ces différents alginates. Les études biochimiques menées sur les enzymes modulaires Alg E2, Alg E4 et Alg E6 d'*Azotobacter vinelandii* montrent qu'Alg E6 permet l'obtention de longs blocs G (Svanem et al, 1999), Alg E2 permet d'obtenir des blocs G de taille moindre (Skjak-Braek et al., 1982), tandis qu'Alg E4 permet d'obtenir l'alternance de blocs MG (Ertesvag et al., 1999). Les études menées sur le mode d'action d'Alg E4 laissent supposer que les mannuronane-C5-épimérasés agissent de façon corrélée (Campa et al., 2003), les produits obtenus par l'action d'une serviraient de substrats à une autre. Nous pouvons supposer que les différentes mannuronane-C5-épimérasés de *L. digitata* se comportent de façon analogue à celles d'*A. vinelandii* et permettent de moduler finement la composition de l'alginate.

Même si le protoplaste semble un outil biologique adapté pour l'étude de la réponse au stress, ce n'est pas le cas pour l'étude de l'implication des mannuronane-C5-épimérasés dans ces mécanismes. Les protoplastes étant des cellules dont la paroi a été digérée par voie enzymatique, il apparaît probable que ceux-ci en synthétisent une nouvelle. De plus, il semble qu'au moins un membre de la famille multigénique serait induit en cas d'élicitation par des

oligoguluronates, ceux-ci étant libérés lors de la digestion de la paroi. Cependant, parmi les mannuronane-C5-épipimérase identifiées chez le protoplaste, il n'est pas exclu que certaines soient induites en cas de stress. L'état de protoplaste étant propice à une induction denombreux membres de la famille multigénique, il apparaît difficile dans ce cas de différencier le rôle des différents membres (néo-synthèse de la paroi, réponse au stress, mécanismes de défense). Toutefois, l'hypothèse de variété de substrat pour les différentes C5-épipimérase identifiées chez *L. digitata* peut aussi expliquer l'expression préférentielle de certains membres de la famille multigénique chez le protoplaste. En effet, celles-ci pourraient être utilisées pour la synthèse d'un « alginate précoc », servant de substrat à d'autres mannuronane-C5-épipimérase, ce qui permettrait l'obtention d'un « alginate mature » tel qu'il est observé chez l'algue. Nous pouvons supposer que les ManC5-E de type ManC5-E6 ou ManC5-E7 seraient impliquées dans de tels phénomènes. Ces enzymes ont été classées dans la catégorie protoplaste lors de l'analyse des séquences de ManC5-E. De plus, les expériences de PCR quantitative indiquent que ces enzymes ne répondent pas à l'éllicitation par des oligoguluronates mais sont pourtant induites chez le protoplaste.

Il apparaît aussi que la transcription du gène *ManC5-E2* n'est pas sensible à l'éllicitation par des oligoguluronates et est réprimée chez le protoplaste. Si l'on considère toujours l'hypothèse d'une participation successive de différentes ManC5-E lors de la constitution de la paroi cellulaire, cette enzyme pourrait être responsable des dernières étapes de maturation de l'alginate chez les sporophytes. Le substrat de cette enzyme ne serait pas encore synthétisé chez les protoplastes au moment de la régénération, mais serait présent chez les sporophytes cultivés ou sauvages.

Si les résultats de PCR quantitative ne permettent pas de distinguer clairement une induction de la transcription de *ManC5-E1* en cas d'éllicitation par des oligoguluronates, l'hypothèse selon laquelle un membre de la famille multigénique serait induit en cas d'éllicitation n'est pas à négliger. Nous pouvons supposer qu'en cas d'attaque pathogène, le sporophyte durcit sa paroi en changeant la composition de l'alginate. Cette réaction se ferait grâce à l'épimérisation des M en G par l'action d'une mannuronane-C5-épipimérase. Nos résultats semblent indiquer que cette enzyme serait du type ManC5-E1, même si les mesures de PCR quantitative ne semblent pas indiquer que cette enzyme soit induite dans les conditions qui ont été testées.

7- Conclusion

Les mannuronanes-C5-épipimérase sont impliquées dans la biosynthèse de la paroi cellulaire. Ce processus métabolique reste très peu étudié chez les algues marines. Les travaux menés précédemment chez *L. digitata* ont permis de mettre à jour une famille multigénique dont le nombre de membres est très important. Les résultats présentés dans ce manuscrit ont permis de faire avancer ces connaissances en identifiant un nombre important de séquences des différents membres de cette famille multigénique. L'existence d'une telle diversité de membres impliqués dans la dernière étape de la biosynthèse de l'alginate, ainsi que l'intérêt de cette diversité pour l'algue reste difficile à étudier. Dans le cadre de mon étude sur la recherche et l'étude de marqueurs moléculaires de la réponse au stress, j'ai cherché à savoir si quelques uns des membres de cette famille pourraient être induits en cas de stress ou en réponse à une attaque pathogène. Les résultats obtenus, notamment par PCR quantitative, ne permettent malheureusement pas de distinguer clairement un membre induit lors de l'élicitation des sporophytes par des oligoguluronates. La paroi cellulaire étant le principal barrage face à une attaque pathogène ou certains stress, les enzymes impliquées dans la modification de celle-ci peuvent prendre part aux mécanismes de défense cellulaire. La modification du rapport M/G renforce la rigidité de la paroi, cette modification pourrait également freiner l'action d'enzymes de dégradation de l'alginate utilisées par le pathogène.

MATERIELS & METHODES

Tableau 7 : Composition des différents milieux utilisés pour la préparation des protoplastes de *L. digitata*

Milieu de Chélation (concentrations finales)

NaCl :	700 mM
MgCl ₂ :	30 mM
MgSO ₄ :	30 mM
KCl:	20 mM
EGTA:	20 mM

Milieu de digestion (concentrations finales)

eau de mer artificielle

NaCl:	400 mM
MgCl ₂ :	30 mM
MgSO ₄ :	22 mM
KCl:	10 mM
CaCl ₂ :	2 mM
MES:	10 mM

équilibre de l'osmolarité

MgCl ₂ :	100 mM
KCl:	150 mM

Enzymes (L'alginatase a été purifiée en suivant le protocole établi par Boyen et *al.*, 1990).

Alginatase (Haliotis):	3U / ml
Cellulase:	1% (w/v)

pH final ajusté à 6,5 à l'aide de NaOH (1M)

pression osmotique finale: 1500 mosmoles

Milieu de culture

Eau de mer filtrée et autoclavée à laquelle sont ajoutés :

nutriments

NaHCO ₃ :	4 mM
KNO ₃ :	2 mM
NaH ₂ PO ₄ :	0.1 mM

équilibre de l'osmolarité

MgCl ₂ :	100 mM
KCl:	150 mM

pH ajusté à 7,5 à l'aide de HCl (1M)

pression osmotique finale : 1500 mosmoles

Matériels et Méthodes

1- Construction d'une banque orientée d'ADNc de protoplastes de *Laminaria digitata*

1-1 Obtention de protoplastes de *Laminaria digitata*

Les protoplastes ont été obtenus en suivant le protocole mis au point au laboratoire (Boyen et al., 1988). Les laminaires utilisées pour cette expérience ont été récoltées sur l'île de Sieck entre septembre et octobre 2001, à marée basse de fort coefficient (environ 100). Des thalles relativement jeunes (entre 10 et 50 cm) ont aussi été récoltés, afin d'améliorer le rendement en protoplastes tout en limitant la concentration en polysaccharides pariétaux qui interfèrent au cours de l'extraction. Les thalles ont été conservés quelques jours en eau de mer dans des bacs de culture avant d'être utilisés.

La zone de croissance est découpée de façon à obtenir des fragments d'environ 5 cm et pesant 2,5 grammes. Ils sont nettoyés à l'aide d'une lame de rasoir afin de retirer le maximum d'épibiontes (organismes se développant sur la paroi) présents en surface. Les fragments sont ensuite découpés en morceaux de 5-8 mm et mis en présence d'eau de mer filtrée à laquelle on ajoute 1% (v/v) de bétadine afin d'éviter les contaminations. Les algues sont lavées par filtration sur papier Buchner puis placées dans de l'eau de mer 70% (v/v) pendant 45 min à 4°C. Elles sont relavées par filtration puis placées dans un milieu de chélation (tableau 7) pendant 20 minutes à 13°C, dans l'obscurité et sous agitation modérée. Les algues sont récupérées par filtration puis découpées en morceaux plus fins (2-3mm) avant d'être placées dans le milieu de digestion (tableau 7) pendant 3 à 5 heures à 13°C dans l'obscurité et sous agitation modérée.

Après examen au microscope, le mélange fragments d'algues-protoplastes est passé successivement à travers 2 filtres en nylon de 200 µm puis de 70 µm. Le filtrat est lavé 2 fois par centrifugation à 500g pendant 20 minutes et repris dans du milieu de culture (tableau 7). Une fois lavés, tous les culots de protoplastes sont resuspendus dans du milieu de culture, poolés, et le tout est dilué jusqu'à obtenir une concentration d'environ 2×10^6 cellules par ml. Afin d'éviter une contamination bactérienne, de la rifampicine (à une concentration finale de

0,4 µg/ml) et de la carbeniciline (à une concentration finale de 4,8 µg/ml) sont rajoutées au milieu de culture. L'ensemble des protoplastes est mis en culture dans des boîtes de Petri, à 12°C et à l'abri de la lumière. Différents prélèvements ont été effectués au cours de cette remise en culture : au début de l'incubation, puis après 12h, 24h, et 48h. Pour chaque prélèvement, le milieu est centrifugé (10 minutes à 100 g), puis le surnageant est éliminé et le culot stocké à -80°C jusqu'à l'extraction des ARN totaux.

1-2 Purification des ARNm

Les ARN totaux ont été extraits des culots de protoplastes après différents temps de culture en suivant la méthode de Apt et *al.* (1995). L'ensemble de ces ARN totaux a été regroupé avant la purification des ARNm. La purification des ARNm a été réalisée à l'aide du kit PolyAtract mRNA isolation system (Promega) en suivant les recommandations du fournisseur. Cette technique est basée sur l'hybridation de la queue poly-A des ARNm à un oligodT couplé à des billes magnétiques par un complexe biotine-streptavidine. Les billes sont ensuite récoltées par application d'un champ magnétique.

1-3 Synthèse des ADNc

La synthèse des ADNc a été réalisée à l'aide du kit Zap Express cDNA synthesis de Stratagene. La synthèse du premier brin d'ADNc à partir des ARNm purifiés se fait en utilisant la Stratascript reverse transcriptase (transcriptase inverse RNaseH- du virus de la leucémie de Moloney). Cinq µg d'ARNm ont été utilisés comme matrice et incubés en présence d'une amorce ayant la séquence suivante :



La séquence GAGA protège le site XhoI qui permet l'orientation de l'ADNc lors de l'insertion dans le vecteur. L'emploi de 5-méthyl dCTP dans le mélange réactionnel permet l'obtention

d'un brin d'ADNc méthylé sur l'ensemble de ses cytosines, le protégeant ainsi de l'action des enzymes de restriction utilisées lors du clonage.

Lors de la synthèse du second brin d'ADNc, la RNaseH digère les fragments d'ARN, permettant ainsi la formation d'amorces pour l'ADN polymérase I (aucun 5-méthyl dCTP n'est utilisé). L'utilisation de la Pfu DNA polymérase permet l'obtention de doubles brins d'ADNc aux bouts francs auxquels sont ajoutés des extrémités EcoRI (en gras et soulignées) :



Une fois cette extrémité EcoRI liée aux brins d'ADNc et la ligase inactivée par chauffage, les extrémités sont phosphorylées afin de permettre la ligation du brin d'ADNc dans le vecteur pBK-CMV. Avant insertion des ADNc doubles brins dans le vecteur de clonage, ceux-ci sont digérés par XhoI afin de permettre leur ligation au niveau des sites EcoRI/XhoI du vecteur. Les ADNc sont ainsi orientés avec l'extrémité 5' du côté du site EcoRI et l'extrémité 3' du côté du site XhoI.

1-4 Encapsidation

Les ADNc synthétisés sont séparés par une chromatographie sur colonne de Sépharose CL-2B en fonction de leur taille. Un aliquote de chaque fraction est déposé sur un gel d'agarose (1,5%) contenant du BET, afin d'avoir une estimation de la taille des ADNc élués. De plus, la quantité d'ADNc dans les fractions exploitables est estimée par visualisation de l'intensité en lumière UV des dépôts de chaque fraction sur ce gel et par comparaison avec une gamme de concentration d'ADN. Après précipitation, l'ADNc isolé est inséré dans le vecteur ZAP express (Stratagene) grâce à la T4 DNA ligase.

Les vecteurs recombinants (2 µl) sont mis en présence d'extraits d'encapsidation contenant les protéines virales (25 µl) et incubés pendant 2h à 22°C, ce qui permet l'auto-assemblage de la capside autour des vecteurs. Les virus formés sont ensuite stockés à 4°C jusqu'au titrage et l'amplification de la banque.

Tableau 8 : Composition des milieux de culture de bactéries

LB (quantités pour un litre de milieu)

10 g de NaCl
10 g de tryptone
5 g d'extraits de levure
qsp H₂O 1l
Ajuster pH à 7,0 à l'aide de NaOH (1M)

LB 2X (quantités pour un litre de milieu)

10 g de NaCl
20 g de tryptone
10 g d'extraits de levure
qsp H₂O 1l
Ajuster pH à 7,0 à l'aide de NaOH (1M)

Tableau 9 : Composition des milieux utilisés pour l'amplification de la banque

NZY (quantités pour un litre de milieu)

5 g de NaCl
2 g de MgSO₄ · 7H₂O
5 g d'extrait bactériens
10 g de NZ amine (caseine hydrolysate)
qsp H₂O 1l
Ajuster pH à 7,5 à l'aide de NaOH (1M)

NZY agar (quantités pour un litre de milieu)

15 g agar
qsp NZY liquid 1L

SM (quantités pour un litre de milieu)

5,8 g de NaCl
2,0 g de MgSO₄
50,0 ml de Tris-HCl pH 7,5
5,0 ml de gélatine 2 %
qsp H₂O 1l

1-5 Titrage de la banque

Le titre de la banque correspond au nombre de phages porteurs d'inserts dans la banque. Il est réalisé en utilisant la souche *E. coli* XL1-Blue-MRF' cultivée en milieu LB, (tableau 8) additionné de 10 mM MgSO₄ et 0,2% maltose (w/v). Ces bactéries expriment le transporteur du maltose en présence d'IPTG et d'X-Gal.

Les bactéries (200 µl, DO₆₀₀=0,5) sont mises en présence d'un µl de phage. L'ADNc étant inséré au milieu du gène codant la β-galactosidase d'*E. coli* et placé sous l'influence d'un promoteur inductible par l'IPTG, l'infection d'une bactérie par un phage ne portant pas d'insert permet l'expression de ce gène en présence d'X-Gal et d'IPTG, ce qui se visualise par la couleur bleue de la plaque de lyse (système pBluescript). Les plaques de lyse correspondant à des phages recombinants seront blanches (ou claires) sur milieu NZY (tableau 9).

1-6 Amplification de la banque

Afin d'obtenir une quantité de phages plus importante, la banque primaire a été amplifiée en déposant sur chacune des 20 boîtes de milieu NZY agar (tableau 9) utilisées 600 µl de bactéries XL1-blue-MRF' infectées par 5x10⁴ pfu de la banque primaire. Les boîtes sont incubées à 37°C jusqu'à obtention de plaques de lyse de 1-2 mm et légèrement confluentes (6 à 7 heures). Les boîtes sont ensuite recouvertes de SM (10ml, tableau 9) et incubées durant la nuit à 4°C sous agitation modérée afin de permettre aux phages de diffuser dans le milieu. Le SM est récupéré et conservé à 4°C dans l'obscurité. Le titre de la banque amplifiée se détermine de la même façon que celui de la banque primaire.

Ensuite, les plasmides contenant les inserts doivent être excisés à partir de l'ADN phagique afin d'obtenir des clones bactériens cultivables sur boîte de Pétri. L'ADN plasmidique doit être extrait à partir de ces clones afin de séquencer les fragments d'ADNc qu'ils contiennent. Pour se faire, 10⁶ pfu recombinants sont mis en présence de 107 bactéries XL1-blue-MRF' (25 µl, DO₆₀₀=1,0) et de 108 pfu de phage helper. L'ensemble est incubé 15 min à 37°C. Après l'ajout de 20 ml de NZY et une seconde incubation de 2h30 à 37°C, la réaction est arrêtée par un passage de 20 min à 72°C. Le surnageant est récupéré par une centrifugation de 10 minutes à 1000g. Un µl de ce surnageant est mis en présence de 200 µl

de bactéries XL0LR (DO600=1,0) et l'ensemble est incubé 15 min à 37°C. Après l'ajout de 50

μl de NZY concentré 5 fois, 100 μl de ce mélange sont étalés sur milieu LB supplémenté avec de la kanamycine (concentration finale de 50 μg/ml) et cultivés une nuit à 37°C.

1-7 Vérification de la taille des inserts

Les plasmides isolés sont digérés simultanément par les enzymes EcoRI et XhoI. Pour cela, 400 ng de vecteurs sont incubés en présence de 2 μl de tampon 10X correspondant à l'enzyme (dans notre cas, tampon II de Biolabs), de 0,2 μl d'EcoRI (15 U/μl), de 0,2 μl d'XhoI (20U/μl), de 0,2 μl de BSA (10mg/ml) et d'H₂O (quantité suffisante pour un volume final de 20 μl) pendant 2h à 37°C. Chaque digestion est déposée sur gel d'agarose (1,5%).

2- Séquençage

2-1 Mise en culture des clones recombinants

Les clones recombinants isolés lors de l'étape de l'excision de masse sont cultivés dans des boîtes "deep-well" qui permettent la mise en culture simultanée de 96 clones. Les colonies sont repiquées dans 1,1ml de LB 2X contenant de la kanamycine (50 μg/ml, concentration finale) et incubées pendant 24h à 37°C sous agitation constante de 320 rpm.

2-2 Isolement de l'ADN plasmidique

Le kit d'extraction plasmidique Plasmid Mini-prep96 (Millipore) permet d'effectuer ces extractions dans des plaques de 96 puits, afin d'augmenter le débit pour le séquençage. Après la lyse des bactéries, le liquide est passé au travers d'une membrane « Clearing » qui fixe les débris cellulaires. Puis le filtrat est passé au travers d'une autre membrane « Plasmids » qui ne retient que l'ADN plasmidique. Chaque étape de filtration est réalisée grâce à une pompe à vide. Après un lavage, l'ADN plasmidique est élué et conservé à -20°C.

Ce système permet de purifier environ 3-4 μg de plasmides à partir d'1,1 ml de culture bactérienne.

Tableau 10 : Conditions de séquençage

Mélange de réaction pour séquençage avec l'appareil ABI 3100 (Applied Biosystems)

200 ng ADN plasmidique
10 µM primer T3
0,5 µl Big Dye V3.0
0,5µl tampon de dilution (200mM Tris-HCl pH 9,0 ; 5mM MgCl₂)
qsp H₂O 5µl

Programme de la PCR pour le séquençage

96,6°C / 2 min

96°C / 30 s }
50°C / 30 s } = 50 cycles
60°C / 4 min }

4°C / 10 min

2-3 Réaction de séquençage

Le kit utilisé pour le séquençage haut-débit est le Big-Dye Version 3 (Applied Biosystems). Ce système consiste en un marquage de chaque acide nucléique situé en fin de brin par un fluorochrome différent, ce qui nécessite la préparation d'un seul mélange de réactifs par clone à séquencer. L'amorce utilisée est l'oligonucléotide T3, située 40 pb en amont du site EcoRI.

Environ 200 ng de plasmide et 4,5 µl de mélange de séquençage (tableau 10) sont combinés. Après l'étape de PCR, les produits obtenus sont purifiés à l'aide du kit Montage Seq 96 Sequencing Reaction Cleanup de Millipore. Ce système consiste en une filtration des produits de PCR au travers d'une membrane ne retenant que les brins d'ADN. Les produits de PCR, nettoyés de l'excès de sels et des fluorochromes non incorporés, sont resuspendus dans une solution d'injection et utilisés pour le séquençage.

L'utilisation du séquenceur automatique ABI 3100 permet d'obtenir 96 séquences lisibles sur environ 500 pb en 15h.

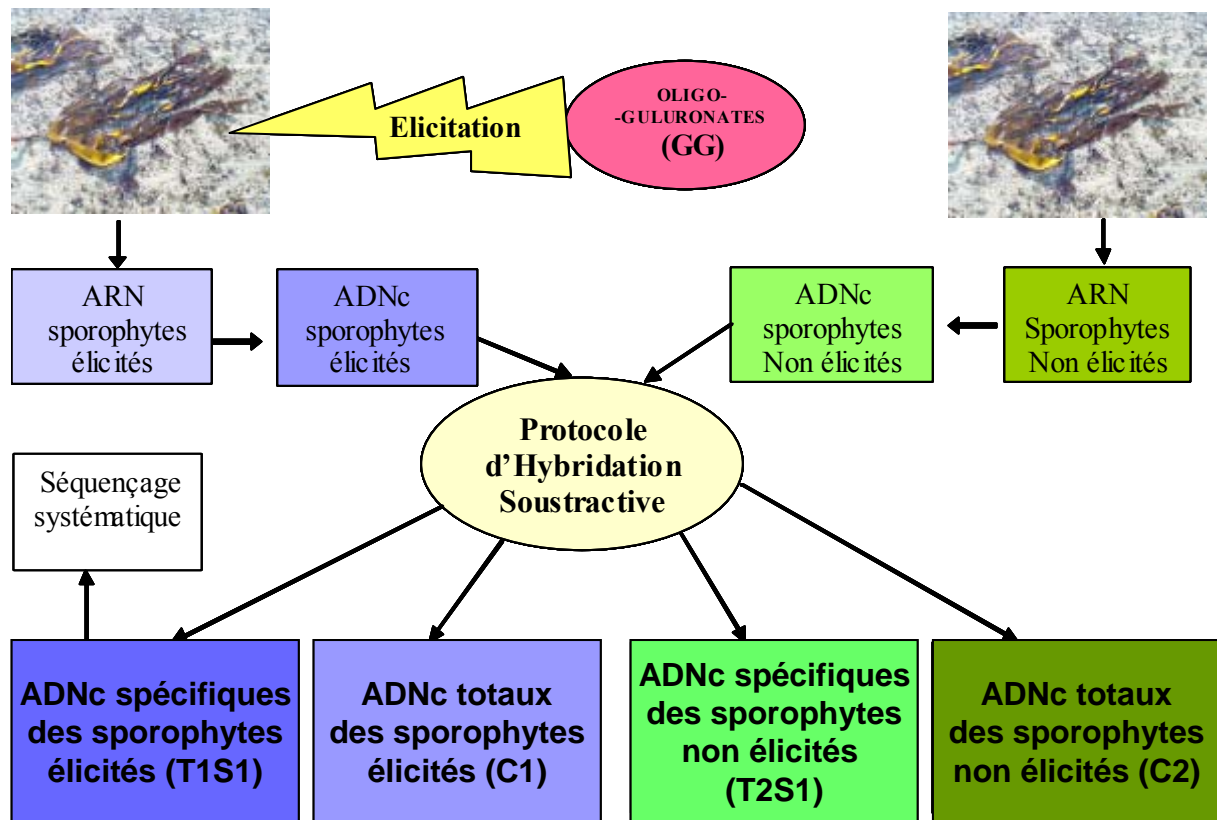
2-4 Traitements informatiques

Les séquences obtenues sont comparées aux banques de données non redondantes (GenBank) disponibles sur le site du NCBI. La recherche de similitudes de séquences a été réalisée à l'aide de 2 programmes : BlastX et tBlast X. Les comparaisons Blast X ont été effectuées par rapport aux banques de données protéiques non redondantes et les comparaisons T blast X par rapport à la base de données « EST_Others » sur le site du NCBI. Une similitude est considérée comme significative lorsque la E-value est inférieure à 1×10^{-5} . Cette E-value correspond à la probabilité que les similitudes observées entre 2 séquences soient dues au hasard.

3- Construction de la banque d'ADNc spécifique de sporophytes élicités

La construction de cette banque a été réalisée par la technique d'hybridation suppressive soustractive (ou SSH en anglais pour subtractive and suppressive hybridisation).

Figure 54 : Schéma récapitulant le protocole d'obtention des différents pools d'ADNc pour la construction de la banque d'ADNc spécifique de laminaires élicitées par hybridation soustractive.



A mon arrivée au laboratoire, les premières étapes de cette construction, c'est-à-dire l'élicitation des sporophytes, l'extraction des ARNm, la synthèse des ADNc et la première étape de l'hybridation soustractive, avaient été réalisées par Carole Colin et Catherine Leblanc. Par conséquent, ma participation à ces travaux a consisté à terminer les protocoles d'hybridation soustractive afin d'obtenir les 4 Pools T1S1, T2S1, C1, C2 (fig. 54), à procéder aux étapes de clonage et de séquençage, et enfin à valider la banque par hybridation sur membrane.

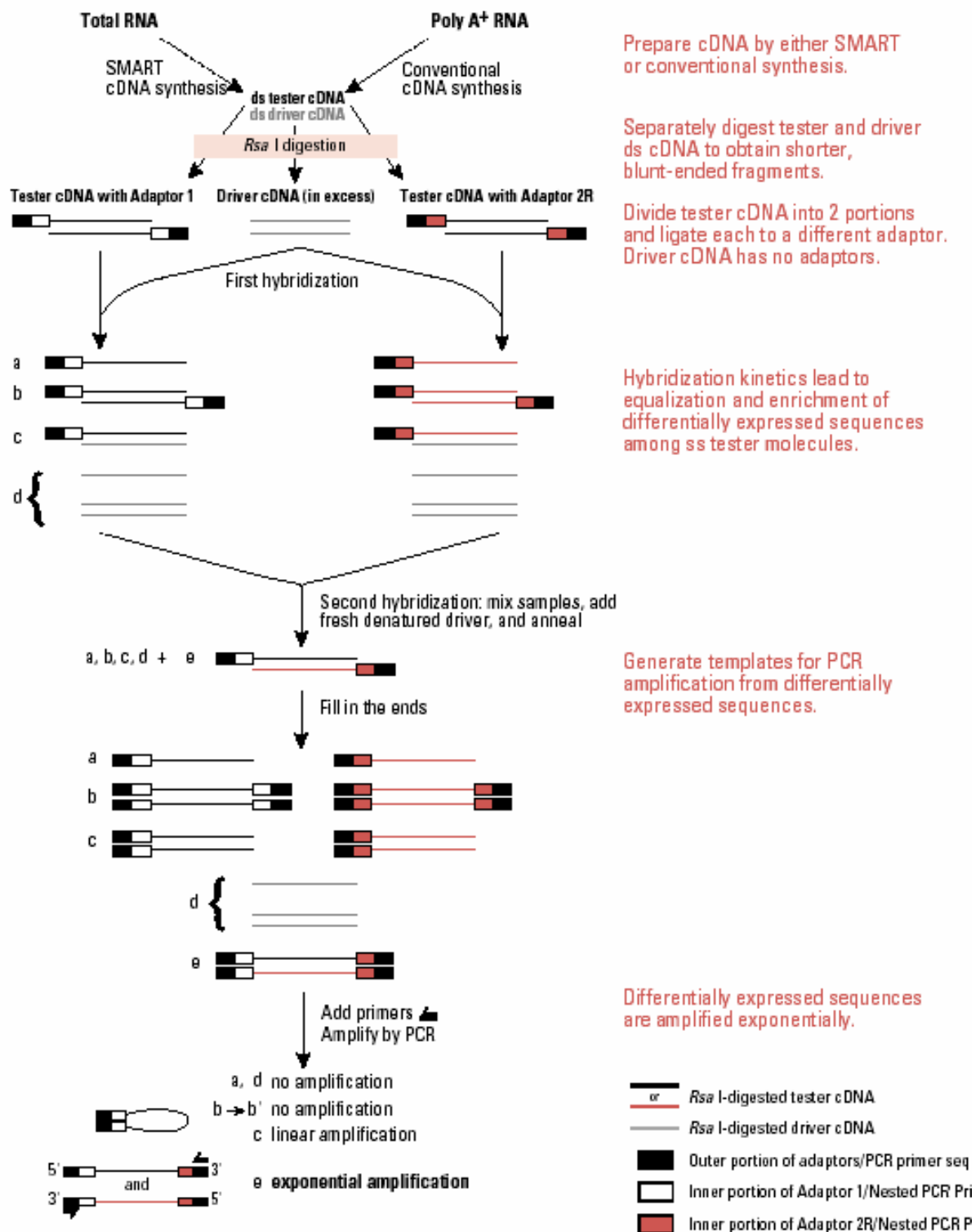
3-1 Matériel biologique

De jeunes sporophytes (environ 10 cm) ont été récoltés sur la côte de Roscoff et mis à incuber dans des bacs d'eau mer en renouvellement constant à 15°C pendant 2 jours. Les sporophytes ont ensuite été élicités par des oligoguluronates (GG) à une concentration finale de 150 µg/ml en suivant le protocole décrit par Kupper et *al.* (2002). Les sporophytes ont ensuite été élicités par des oligoguluronates (GG,) à une concentration finale de 150µg/ml en suivant le protocole décrit par Kupper et *al.* (2002). Les GG utilisés pour cette expérience ont été obtenus en suivant le protocole d'hydrolyse acide décrit par Heyraud et al (1996). Au cours de l'élicitation, des thalles ont été prélevés après 3h et 6h d'incubation, puis congelés dans de l'azote liquide. En parallèle, un lot de sporophytes non élicités a aussi été soumis au même traitement. De plus, la quantité de peroxyde d'hydrogène libérée par les sporophytes au cours de l'élicitation a été suivie par luminométrie d'après la technique décrite par Kupper et *al.* (2002).

3-2 Extraction des ARN et synthèse des ADNc

Les ARN totaux ont été extraits selon la technique de Apt et al (1995). La synthèse des ADNc a été réalisée à l'aide du kit Smart cDNA synthesis (Clontech) en suivant les recommandations du fournisseur.

Figure 55 : Principe de fonctionnement de l'hybridation soustractive, d'après le protocole du kit BD PCR-Select™ cDNA Subtraction (Clontech, 2003).



3-3 Hybridation soustractive

Cette étape a été réalisée à l'aide du kit BD PCR-Select™ cDNA Substraction (Clontech) en suivant les recommandations du fournisseur. Le principe de l'hybridation soustractive est présenté en figure 55. Cette technique repose sur l'hybridation entre deux pools d'ADNc synthétisés à partir d'ARN extraits de cellules d'un même organisme mais représentant 2 états physiologiques différents. Un premier pool d'ADNc est appelé « tester » et constitue le pool à étudier, c'est-à-dire celui dont on veut isoler des séquences spécifiques. Le second pool d'ADNc est appelé « driver » et constitue le pool d'ADNc de référence. Le pool d'ADNc « tester » est divisé en 2 lots. Des adaptateurs contenant des sites spécifiques pour chacun de ces lots sont collées aux extrémités des ADNc. Ils sont ensuite mis en présence du pool « driver » qui est ajouté en excès. Les ADNc du pool « driver » ne portent pas de sites spécifiques. Au cours de l'hybridation, ce mélange des deux pools d'ADNc « tester » et « driver » permet la formation de plusieurs types d'ADNc double brin par l'association des ADNc complémentaires. Ainsi, pour un transcrit présent en même quantité dans le pool « driver » et le pool « tester » on pourra observer la formation d'ADNc double brin « tester-tester », « driver-tester », « driver-driver ». Lorsque des transcrits sont exprimés préférentiellement dans l'état physiologique étudié, on aura un maximum d'hybrides « tester-tester ». Les lots d'ADNc « tester » possédant des sites spécifiques sur leurs extrémités, une étape de PCR permet l'amplification exponentielle seulement des hybrides « tester-tester ». Les transcrits majoritairement exprimés dans l'état physiologique testé seront donc amplifiés selon ce protocole.

Dans une première expérience, nous avons utilisé les ADNc issus de sporophytes élicités comme « tester » afin d'identifier des transcrits spécifiques de la réponse à l'élicitation par des oligogulonates. Après l'amplification par PCR, ces ADNc spécifiques sont regroupés dans le pool nommé T1S1. Dans une seconde expérience, nous avons utilisé les ADNc issus de sporophytes non élicités comme « tester » afin de vérifier s'il n'y avait pas de gènes réprimés lors de cette élicitation. Après amplification par PCR, ce pool d'ADNc a été appelé T2S1.

Tableau 11 : Composition des milieux utilisés lors de l'hybridation sur membrane.

Solution de dénaturation

1,5 M NaCl
0,5 M NaOH

Solution de neutralisation

1,5 M NaCl
0,5 M Tris HCl pH 7,5
1 mM EDTA

SSC 20X : (concentration finale)

NaCl 3M
Na₃citrate 0,3M
pH 7,0

Solution de préhybridation: pour 100 ml

6 SSC	30ml 20X SSC
0,1% SDS	5,5 ml 20%
5X Denhardt	10 ml 50X
1 ml de sperme de hareng / 100 ml sol	
H ₂ O	58,5 ml

Solutions de lavages

1^{ier} lavage : 2X SSC, 0,1% (v/v) SDS
2^{ième} lavage : 1X SSC, 0,1% (v/v) SDS
3^{ième} lavage : 0,5X SSC, 0,1% (v/v) SDS

3-4 Clonage

Les produits d'amplification obtenus par PCR pour les deux états (spécifiques de sporophytes élicités, T1S1 ; et spécifiques de sporophytes non élicités, T2S1) ainsi que les ADNc non spécifiques d'un état (C1 pour les sporophytes élicités et C2 pour les sporophytes non élicités) ont été clonés dans le vecteur pGEM®-T (Promega) en suivant les recommandations du fournisseur.

3-5 Séquençage et analyse des séquences

La purification des ADN plasmidique, le séquençage et d'analyse des séquences ont été réalisées selon les mêmes techniques que celles utilisées pour la construction et l'analyse de la banque d'ADNc, décrites dans la partie 2.

4- Validation de l'approche d'hybridation suppressive soustractive par hybridation sur membrane

Afin de vérifier la validité de la soustraction, nous avons procédé à une analyse par hybridation sur membrane de certains transcrits d'intérêt. Cette analyse a été effectuée en s'inspirant, pour la réalisation et l'interprétation des résultats, du kit PCR-Select Differential Screening (Clontech).

4-1 Dépôt des ADN sur membrane

Différents ADN plasmidiques ont été déposés sur membrane pour effectuer cette validation : 18 correspondent à des EST identifiées au cours de l'annotation, 2 ne portent pas d'inserts et utilisés comme témoin d'hybridation non spécifique. De plus un échantillon de chaque pool (T1S1, T2S1, C1, C2) ont été déposés et sont considérés comme témoins positifs.

Environ 100 ng d'ADN correspondant aux divers clones ont été déposés sur membrane Hybond N+ (Amersham) Les filtres sont ensuite imbibés de solution de dénaturation et de solution de neutralisation pendant 10 min (tableau 11). Les membranes sont

ensuite rincées pendant 30s dans du tampon 2X SSC (tableau 11), puis séchées sur papier Whatman, avant que l'ADN ne soit fixé par passage 2h à 80°C.

4-2 Marquage des sondes

Vingt µl de chaque pool d'ADNc (T1S1, T2S1, C1, C2) ont été marqués à l'aide du kit Random Priming (Amersham). Après dénaturation par la chaleur des ADNc double brin, le marquage repose sur l'incorporation de dCTP marqués au P32 au cours de la synthèse du second brin d'ADNc par la DNA polymerase. Les sondes marquées sont purifiées sur colonne microspin S-200 HR (Amersham) pour éliminer les résidus dCTP32 non incorporés. Après chaque centrifugation, la fraction est récupérée dans un tube indépendant. Cette partie de protocole est répétée jusqu'à l'obtention de 6 fractions. Un µl de chaque fraction est mélangé avec 2 ml de liquide de scintillation afin d'estimer l'intensité du marquage, par mesure au compteur à scintillation. La quantité de marquage est estimée par la formule : $CPMA / K = \text{cpm} / \mu\text{l}$.

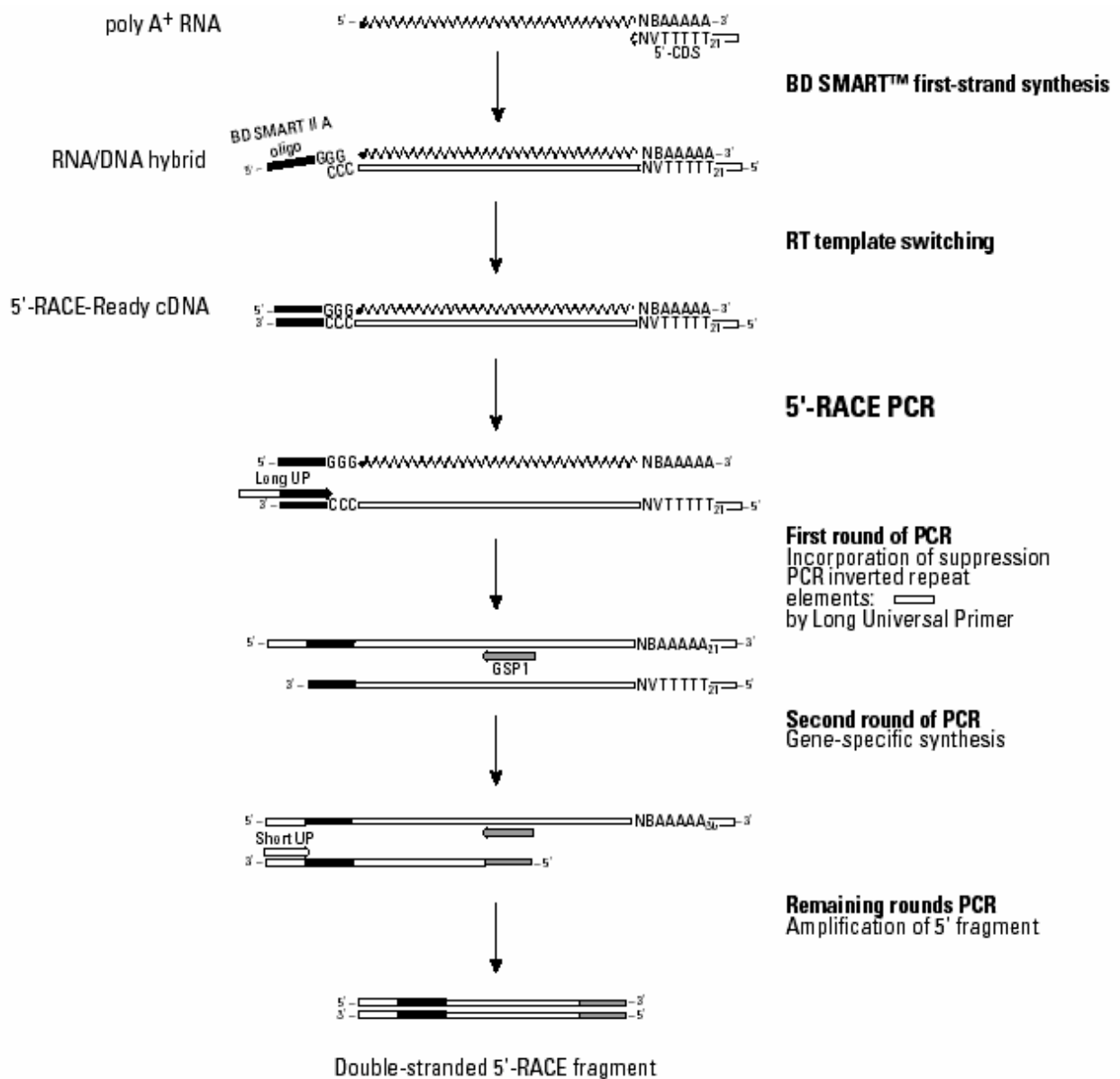
4-3 Hybridation des sondes

Les membranes sont préhybridées dans 30ml de tampon de préhybridation (tableau 11) durant 1 à 2 heures à 65°C. L'hybridation se fait pendant la nuit à 65°C dans 15 ml de milieu d'hybridation, constitué de milieu de préhybridation auquel est ajouté la sonde marquée (total de 107 cpm). Après chaque hybridation, les membranes sont lavées par 3 passages successifs dans des tampons SSC de concentration décroissante (5X, 1X et 0,5X) préparés à l'aide d'une solution mère de SSC 20X. Elles sont ensuite exposées pendant 2 jours sur des écrans sensibles. Le résultat de l'hybridation est visualisé grâce à un scanner de type STORM.

5- Obtention de séquences complètes pour les gènes de C5-épipimérase

Ces expériences ont été réalisées selon le principe de la Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE), complétées par des étapes de PCR. Seules des expériences de RACE visant à obtenir la séquence de l'extrémité 5' de certains gènes ont été entreprises.

Figure 56 : Principe de fonctionnement de la Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE)
d'après le kit BD SMART™ RACE cDNA Amplification (Clontech, 2002).



5-1 Matériel biologique utilisé

Les matrices considérées pour réaliser ce type d'expérience sont de 2 types. Nous avons d'abord utilisé des ARN totaux extraits de jeunes sporophytes de *Laminaria digitata* (environ 10 cm) cultivés au laboratoire. Les ARN ont été purifiés selon le protocole décrit paragraphe 1-2 Puis d'autres tentatives ont été menées en utilisant un aliquote de la banque d'ADNc de protoplastes.

5-2 Synthèse d'ADNc simple brin et amplification par PCR

Les réactions de RACE PCR ont été réalisées à l'aide du kit BD SMART™ RACE cDNA Amplification (Clontech) en suivant les recommandations du fournisseur. Le principe de fonctionnement de la RACE PCR est schématisé en figure 56. Les ADNc ont été synthétisés en utilisant un oligodT comme amorce pour la réaction de transcription inverse. Ce kit repose sur l'emploi d'une transcriptase inverse spécifique qui possède une activité terminal transférase permettant de rajouter de 3 à 5 résidus dC en 5' du 1er brin d'ADNc synthétisé. Cette activité ne se déclenche que lorsque l'enzyme arrive à l'extrémité 5' de l'ARN servant de matrice. La présence de cette queue polydC permet l'hybridation d'un oligonucléotide (SMART oligo) contenant un site polydG, ce qui aboutit à un 1er brin d'ADNc porteur d'un site spécifique dans sa région 5'. L'utilisation d'une amorce sens complémentaire de l'oligonucléotide SMART, et d'amorces anti-sens spécifiques du gène étudié, permet d'amplifier des fragments spécifiques des ADNc d'intérêt par PCR.

Les amorces spécifique aux gènes de manuronane-C5-épimérases utilisées sont présentées dans le tableau 12. La première amorce a été choisie car elle correspond à une partie très conservée au sein de la famille multigénique des mannuronane-C5-épimérases. J'espérais ainsi pouvoir obtenir des séquences correspondant à la partie 5' de certains de ces gènes. La seconde amorce contient une partie spécifique du gène de la ManC5-E2.

Plusieurs techniques de PCR ont été utilisées afin d'obtenir des bandes à la taille attendue : environ 1000 pb pour les réactions réalisées avec l'amorce du site catalytique et 1500 pb pour les réactions réalisées à l'aide de l'amorce spécifique de ManC5-E2. Ces techniques incluent les PCR dites « hot start » et « touch down ». La technique du « hot start » consiste en un préchauffage de l'ADN afin de favoriser la déshybridation de celui-ci et donc favoriser la

Tableau 12 : amorces utilisées lors des expériences de RACE PCR et de PCR quantitative.

Nom de l'amorce	Séquence (5' vers 3')	TM	Utilisation
T3	AATTAACCCTCACTAAAGGG	55°C	Séquençage, PCR sur banque
Site-Cat	ATGTCCATCCTTCGGTCCCCA	60°C	RACE PCR, PCR sur banque
ManC5-E2	CCGATCGGCATTCTTAGCCTG GA	61°C	RACE PCR, PCR sur banque
ManC5-E1 : Sens	TGGTGTATCTGGACTGGAGTG TT	61°C	PCR Quantitative
ManC5-E1 : Anti-sens	TTACCTTATGCCTGGTATCCC AT	61°C	PCR Quantitative
ManC5-E2 : Sens	CCTATGTCAGCTAGACGCAA AGAC	61°C	PCR Quantitative
ManC5-E2 : Anti-sens	CAGGGTGAACCGGCTATGA	61°C	PCR Quantitative
ManC5-E6 : Sens	ACCCTGCGATAGTTACGCAG A	61°C	PCR Quantitative
ManC5-E6 : Anti-sens	GCACCAATATCGCAATCGTG	61°C	PCR Quantitative
ManC5-E7 : Sens	GCGACGCTACAAAAACCTG	61°C	PCR Quantitative
ManC5-E7 : Anti-sens	CTTGCTGTTGCTAAGGCCAAT	61°C	PCR Quantitative
Rpl14 : Sens	CCTTAAACCTGTCGAAGTC	61°C	PCR Quantitative
Rpl14 : Anti-sens	GCTGGACCTGATCGCTAAGT G	61°C	PCR Quantitative

réaction de PCR sur lors des premiers cycles. La technique de « Touch-Down » PCR consiste à déterminer des paliers de température d'hybridation au cours de la réaction de PCR. Ainsi, pendant les cinq premiers cycles, celle-ci sera légèrement supérieure à la température d'hybridation de l'amorce (T_m) afin d'éviter des hybridations non spécifiques de l'amorce. Puis plusieurs cycles sont effectués à la température optimum et les derniers cycles à des températures légèrement plus basses. Ainsi, même si les premiers cycles d'amplifications ne sont pas très efficaces, ils seront spécifiques.

5-3 Essais d'amplification à partir de la banque d'ADNc de protoplastes

Considérant que certains ADNc de C5-épimérasas pouvaient être pleine longueur dans cette banque, un aliquote a été utilisé comme matrice pour des expériences de PCR. De plus, la banque étant orientée avec la partie 5' des ADNc du côté du site EcoRI, l'amorce sens T3 (tableau 12) a été considérée en combinaison avec des oligonucléotides antisens spécifiques des gènes étudiés (tableau 12). Ces amorces spécifiques étaient les mêmes que celles considérées lors des tentatives utilisant le kit de RACE PCR. Les PCR ont été réalisées dans des conditions standard (40 cycles avec un T_m de 62 °C).

5-4 Purification des bandes et clonage

Les bandes intéressantes obtenues à partir des ADNc de sporophytes ou après PCR sur la banque de protoplastes ont été purifiées du gel à l'aide du kit MinElute Gel extraction (Qiagen) en suivant les recommandations du fournisseur. Les amplicons ainsi purifiés ont été clonés dans le vecteur pGEM®-T (Promega).

5-5 Séquençage et analyse des séquences

Les étapes de clonages et de séquençage ont été réalisées suivant les méthodes décrites aux paragraphes 3-4 et 3-5 Les séquences générées ont été analysées à l'aide du logiciel Blast X et comparées aux EST issues des protoplastes. Le logiciel BioEdit : (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/page2.html>) a été utilisé pour l'alignement et l'analyse des séquences obtenues.

6 Mesure de l'accumulation de transcrits par PCR quantitative

6-1 Types d'échantillon utilisés

Trois types ont été considérés :

- des protoplastes : les ARN utilisés pour ces expériences sont les ARN totaux extraits pour la construction de la banque d'ADNc de protoplastes. Ces ARN m correspondent à des prélèvements effectués à trois temps de régénération (0h, 12h et 24h).
- des sporophytes de culture : ce sont de jeunes sporophytes cultivés au laboratoire d'une taille d'environ 10 cm.
- des sporophytes sauvages : ce sont de jeunes sporophytes sauvages (environ 10 cm) récoltés sur l'île de Sieck en Mars 2005.

6-2 Elicitation des sporophytes

Le protocole a été légèrement modifié par rapport à celui utilisé pour l'obtention de la banque soustractive. Environ 10 grammes de sporophytes de culture ont été mis en culture dans 500 ml d'eau de mer filtrée et autoclavée. Pour démarrer l'élicitation, 10,5 mg d'oligogulonates ont été ajoutés au milieu de culture (concentration finale de 21 mg/l). L'élicitation des sporophytes a été vérifiée en déterminant la quantité de peroxyde d'hydrogène libérée, mesurée par luminométrie en suivant le protocole décrit par Küpper et al (2000). Environ 2 grammes de sporophytes ont été prélevés juste au début de l'élicitation, puis après 6 h, 12 h, 24 h d'incubation, et congelés immédiatement dans l'azote liquide. Un protocole identique a été suivi pour les sporophytes sauvages. Ces expériences ont été réalisées simultanément sur deux lots de sporophytes afin de réaliser les expériences de PCR quantitatives sur des duplicats biologiques.

6-3 Préparation des ARN

Les ARN ont été extraits suivant le principe décrit au paragraphe 1-2 Les ARN ainsi obtenus ont été traités à la DNase afin d'éliminer toute contamination par de l'ADN génomique. Un µg d'ARN totaux a été mis en présence de 10 unités de DNase I de et de 9 µl de tampon (Stratagene). Après purification de ces ARN par précipitation au chlorure de

lithium, leur quantité et leur qualité ont été vérifiées en utilisant le bio-analyseur Agilent 2100, selon les recommandations du constructeur. Nous avons ainsi pu obtenir un rendement moyen de 10 µg d'ARN totaux pour 2 grammes d'algues utilisés.

6-4 Synthèse des ADNc

Les ADNc ont été synthétisés à partir de 5 µg d'ARN totaux au moyen de la transcriptase inverse IMPROM II commercialisée par Promega, en suivant les recommandations du fournisseur.

6-5 Détermination des couples amorces

Nous avons préféré utiliser la technologie SYBR Green (Applied Biosystems) plutôt que celle reposant sur l'utilisation de sondes de type Taqman (Applied Biosystems) pour ces expériences de PCR quantitatives. En effet, le système SYBR Green permettant un marquage direct lors de la phase d'élongation des cycles de PCR, il nous paraissait plus adapté pour quantifier des variations d'accumulation de transcrits.

Les amorces ont été déterminées grâce aux logiciels Blast-N et Primer Express (Applied Biosystems). Les séquences ADNc de ManC5-E1, ManC5-E2, ManC5-E6, ManC5-E7 et Rpl 14 ont été considérées par le logiciel Primer Express et les critères suivants ont été appliqués pour déterminer les séquences et l'emplacement des amorces: taille maximum de l'amplicon 100 pb, T_m des amorces compris entre 61°C et 62 °C. En parallèle, l'ensemble des séquences de mannuronane-C5-épimérase disponibles chez *L. digitata* a été regroupé de façon à former une banque de données interrogeable par le programme Blast-N. Les amorces sélectionnées par Primer Express ont ainsi été comparées à la banque de ManC5-E de *L. digitata* afin de vérifier leur spécificité pour une séquence de C5-épimérase donnée. Les séquences des différentes amorces sont données dans le tableau 12

6-6 Préparation des réactions de PCR quantitative et paramètres de l'amplification

Le mélange réactionnel a été préparé avec le kit SYBR Green d'Applied Biosystems et les amplifications réalisées par l'appareil GENEAMP 5700 Sequences detector du même fournisseur. Les réactions ont été réalisées dans des plaques de 96 puits, chaque puits contenant : une quantité estimée à 10 ng de matrice pour les différents échantillons d'ADNc, 0,5 µl de chaque amorce à 5µg/µl, et 12,5 µl de mix SYBR Green, pour un volume final de 25 µl. Les réactions de PCR ont été réalisées à une température d'hybridation et d'élongation de 62 °C, et ce pendant 40 cycles.

Pour chaque paire d'amorce, et donc pour chaque gène considéré, une gamme de dilution d'ADN génomique de *L. digitata* a été réalisée afin de pouvoir exprimer le nombre de transcrits en équivalents génomes. Les gammes d'ADN génomique contiennent de 3750 copies de gène / µl à 146 copies de gène / µl, en suivant des dilutions au 1/4. Les valeurs en nombre de copies ont été estimées en considérant la taille du génome de *L. digitata* égale à 120 Mpb (soit une masse molaire de 8,5 10¹¹ g/mole), et en faisant l'hypothèse que le génome ne contient qu'une seule copie du gène étudié. Chaque échantillon d'ADNc et chaque point de la gamme d'ADN génomique ont été préparé en triplicat dans les plaques 96 puits.

6-7 Analyse des Résultats

Les résultats ont été analysés à l'aide du logiciel GENEAMP 5700 SDS d'Applied Biosystems. Lors de la réaction de PCR, des mesures permettant d'établir la courbe de dissociation pour chaque produit d'amplification ont été effectuées. Ces mesures permettent de vérifier la spécificité de l'amplification. Les produits de PCR ont été clonés suivant la méthode décrite au paragraphe 3-4 et séquencés afin de vérifier la spécificité de l'amplification.

CONCLUSIONS & PERSPECTIVES

Coclusions et perspectives

Les mécanismes de la réponse aux stress, quels que soient les organismes considérés, font intervenir un certain nombre de réactions au sein des différentes étapes de ce processus physiologique. Chez les plantes, ces différentes étapes correspondent à la perception / reconnaissance du stress, la transduction du signal qui en résulte à l'intérieur de la cellule, l'amplification de ce signal, la modification de l'expression de certains gènes et la production de molécules impliquées dans le rétablissement de l'homéostasie cellulaire. Les enzymes impliquées dans cette cascade de réactions peuvent être considérées comme des marqueurs de la réponse au stress.

Mon travail de thèse a porté sur l'identification de ces marqueurs chez un organisme photosynthétique marin, *L. digitata*, pour lequel ces mécanismes étaient très peu connus. Pour mener à bien cette étude, nous avons choisi, dans un premier temps, de construire une banque d'ADNc à partir d'ARNm issus de protoplastes de *L. digitata*. En effet, les protoplastes, cellules en condition de stress intense, car sans paroi, sont soumis à de multiples contraintes et doivent donc exprimer un large panel d'enzymes impliquées dans le rétablissement de l'homéostasie cellulaire. Le protoplaste apparaissait se trouver dans des conditions favorisant l'isolement et l'identification de gènes impliqués dans divers types de stress. De plus, cet état particulier visait à faciliter l'identification de marqueurs moléculaires exprimés en réponse à des stress divers et non pas un seul type de stress. La stratégie employée pour cette étude est une stratégie EST. Il s'agit d'une approche généraliste, permettant l'étude de transcrits exprimés par une cellule dans un état physiologique particulier. Cette absence de ciblage nous a permis d'obtenir énormément d'informations sur la partie transcrite du génome de *L. digitata* en condition de stress multiples. Cette approche de type exploratoire a permis d'obtenir une grande quantité d'information sur le transcriptome de *L. digitata* lorsque cette algue est soumise à des conditions physiologiques affectant l'intégrité des cellules.

De plus, une telle stratégie a déjà été employée avec succès au laboratoire pour l'étude des 2 phases du cycle de vie de *L. digitata*. Nous avons donc un minimum d'informations sur la partie transcrite du génome de cet organisme avant cette étude ainsi qu'une expérience acquise sur ce type d'approche. La comparaison des banques EST obtenues pour les sporophytes et pour les protoplastes nous a permis de constater que le protoplaste exprimait un plus grand nombre de transcrits correspondant à des gènes identifiés comme intervenant

dans certaines étapes des mécanismes de la réponse au stress. Par conséquent, ces observations

valident le choix des protoplastes comme outil d'étude pour acquérir notamment de l'information génomique sur le stress chez *L. digitata*, et plus généralement chez les algues. Ainsi, plusieurs gènes ont pu être identifiés, comme une nouvelle forme de bromopéroxydase, des GST, HSP 70, HSP 90, thioredoxines...

Une raison supplémentaire justifiant l'emploi du protoplaste comme matériel biologique est l'étude de gènes impliqués dans la biosynthèse de la paroi cellulaire. Nous avons supposé que ces cellules, au cours de leur régénération, orienteraient leur métabolisme vers la synthèse d'une nouvelle paroi, afin, entre autre, de répondre aux conditions environnementales. Nous avons pu ainsi identifier un grand nombre de transcrits codant différents membres de la famille multigénique des mannuronane-C5-épimérase, enzyme catalysant la dernière étape de la biosynthèse de l'alginate.

Après l'analyse des EST issus de protoplastes, il s'est avéré que le principal stress auquel sont soumises ces cellules est un stress oxydatif. En effet, si les transcrits impliqués dans les mécanismes de la réponse au stress sont nombreux, leur diversité est assez restreinte. De plus les transcrits identifiés comme pouvant correspondre à des enzymes impliquées dans la régulation des AOS sont différents de ceux rencontrés dans les modèles couramment considérés. Nous pouvons faire plusieurs hypothèses pour expliquer ces observations. La première est que *L. digitata* n'utilise pas les mêmes mécanismes pour gérer les AOS que les organismes photosynthétiques terrestres, montrant ainsi une certaine originalité. La seconde est liée à la méthode employée. En effet, les transcrits codant des protéines intervenant dans la dégradation des EAO seraient présents parmi les EST séquencées mais ne seraient pas identifiées car les séquences obtenues dans la banque d'ADNc ne représenterait que la partie 3' non traduite de l'ARNm. Enfin, la dernière hypothèse serait liée à l'état physiologique du protoplaste. La digestion de la paroi cellulaire libère des oligogulonates qui ont pour effet d'induire les mécanismes de défense impliqués lors de l'attaque par un pathogène. L'une des conséquences de cette élicitation est la libération d'une quantité massive d'EAO vers l'extérieur de la cellule. Nous pouvons supposer que les protoplastes n'expriment pas de protéines connues pour leur efficacité à détoxifier le contenu intracellulaire, ceci afin d'augmenter et de maintenir une production élevée d'EAO.

Bien que la mise en place d'une stratégie EST pour des protoplastes n'ait pas permis d'identifier une grande variété de marqueurs de la réponse au stress, nous avons quand même identifié un grand nombre de transcrits différents impliqués dans de nombreux processus cellulaires et donc acquis des informations sur le génome transcrit dans des conditions physiologiques particulières.

Ainsi, cette étude sur des EST de protoplastes peut être considérée comme une approche généraliste visant à identifier un grand nombre de gènes impliqués dans la réponse au stress et ouvrir la voie vers des recherches plus spécifiques sur certains gènes et/ou famille de gènes. Ainsi, l'étude des 4 GST identifiées au cours de ce travail est actuellement réalisée dans le laboratoire dans le cadre de la thèse de Pierre Olivier de Franco. Les bromopéroxydases, dont la nouvelle forme pLd-vBPO identifiée dans la banque EST sont aussi étudiées par l'équipe Défense des Algues dirigée par Philippe Potin. Enfin, plusieurs des EST pleine longueur identifiées au cours de mon travail sont des candidates possibles à la surexpression, dans le cadre d'un axe transversal de surexpression de protéines d'algues à moyen débit mis en place au sein de l'équipe Glycobiologie Marine dont la responsable est Mirjam Czjzek.

D'autres études pourront encore être initiées à partir des données générées au cours de ce travail de thèse. En effet, un des principaux intérêts de l'emploi d'une stratégie EST réside dans l'obtention de résultats qui ont permis la mise en place d'une banque de données exploitable en fonction des orientations du laboratoire, mais aussi par la communauté internationale. Toutes les séquences ont été soumises à la banque dbEST du NCBI et sont donc accessibles. La comparaison de la séquence ADNc/ADN génomique permettra de déterminer la séquence et la localisation des introns de certains gènes d'intérêt. De plus, cette banque de séquences annotées peut être interrogée pour l'annotation de séquences provenant d'un organisme proche. Ainsi, les informations acquises dans le cadre de mon travail de thèse pourront être utilisées pour l'annotation des banques EST et du génome de l'algue brune *Ectocarpus siliculosus*, dont le séquençage est actuellement en cours au Génoscope. Ce catalogue d'EST annoté trouve également une autre application avec le développement actuel au laboratoire d'une approche de protéomique visant à étudier les protéines pariétales des algues brunes, dont *L. digitata*. Il sera éventuellement possible d'identifier des protéines pariétales dont la séquence aura été obtenue par spectrométrie de masse. La quantité d'informations contenues dans les différentes banques d'ADNc de laminaires peut donc constituer la base permettant la mise en place d'étude de transcriptomique et de protéomique.

Cependant, afin que la banque de données générée reste exploitable, il conviendra de la mettre à jour régulièrement par comparaison avec les bases de données protéiques et nucléiques généralistes. Avec le nombre sans cesse croissant de séquences déposées dans ces banques, il est possible d'envisager que ce processus devrait permettre d'identifier et d'annoter des EST pour lesquelles aucune fonction n'a pu être associée pour le moment.

L'emploi du protoplaste comme matériel biologique ayant induit une certaine restriction dans la diversité des transcrits exprimés, nous avons entrepris de distinguer des gènes exprimés en réponse au stress de ceux exprimés en condition de réponse à une attaque pathogène. Dans ce but, la construction d'une banque d'ADNc spécifique de sporophytes élicités par des oligogulonates a été réalisée. Cette banque a été obtenue grâce à l'emploi de la technique d'hybridation suppressive et soustractive. Ainsi, nous avons pu isoler certains gènes codant des protéines impliquées dans le contrôle des EAO. La présence de ces molécules dans les cellules est interprétée différemment selon qu'ils s'agisse de cellules subissant un stress biotique ou abiotique. Dans le premier cas, les EAO sont impliquées directement dans les mécanismes de lutte de l'organisme face à l'agent agresseur. Dans le second cas, ces molécules participent à la transduction du signal généré par le stress. Ces deux rôles différents nécessitent une régulation fine des voies métaboliques impliquées dans la synthèse et la dégradation des EAO intracellulaires. La comparaison de la nature des EST identifiées par les 2 techniques de génomique utilisées montrerait que les GST seraient plus impliquées dans le contrôle des EAO produites lors de conditions de stress abiotique tandis que les thioredoxines interviendraient dans la régulation des quantités de ces molécules en cas de stress biotique. L'analyse de ces résultats indique également que les bromopéroxydases dépendante du vanadate joueraient un rôle central dans le contrôle des niveaux d'EAO. Le ou les voies métaboliques dans lesquelles ces enzymes interviendraient sont encore inconnues, mais de par leurs propriétés biochimiques nous pouvons supposer qu'elles joueraient un rôle primordiale dans le contrôle des EAO, que celle-ci soient synthétisées en réponse à un stress biotique ou abiotique.

Bien que les résultats obtenus par la technique d'hybridation soustractive apportent des informations complémentaires à celles de la banque EST de protoplastes, ceux-ci sont à considérer avec précaution car la SSH peut générer de faux positifs. Afin de vérifier si les transcrits isolés par cette technique était bien spécifiques de sporophytes élicités, nous avons réalisé une expérience de dot blot, en déposant sur membrane plusieurs produits PCR correspondants à des transcrits isolés par SSH. L'utilisation conjointe d'une banque soustractive et d'une hybridation sur membrane permet d'isoler un certain nombre de gènes et de quantifier des différences d'accumulation des transcrits correspondants de façon rapide et économique. Nous aurions pu éventuellement utiliser la technologie des micro-arrays pour cette étude. Cependant, la mise en place d'une telle approche est particulièrement longue et n'a jamais été appliquée à notre connaissance sur des organismes du même phylum que

L. digitata. Il apparaissait donc risqué, dans le cadre de la seconde moitié de la thèse, de procéder à la mise au point de cette technologie au laboratoire.

Les ADNc clonés au cours de l'expérience de SSH sont actuellement utilisés dans le cadre de la thèse d'Audrey Cosse qui étudie les bases moléculaires des mécanismes de défense chez *L. digitata*. Pour ce faire, elle a entrepris la construction de membranes de macro-arrays à partir de clones correspondants aux ADNc spécifiques de la banque de sporophytes élicités. Plusieurs types d'hybridations sont prévues, dont des expériences devant permettre de mettre en évidence des variations d'accumulation de ces gènes au cours de cinétiques d'élicitation de sporophytes.

L'emploi du protoplaste comme matériel d'étude devait permettre, en plus de la recherche de marqueurs moléculaires de la réponse au stress, l'identification de gènes impliqués dans la néosynthèse de la paroi cellulaire. Dans cette catégorie fonctionnelle, nous avons identifié un grand nombre de transcrits codant des mannuronane-C5-épimérase. Cependant, aucun autre transcrit codant des protéines impliquées dans ce processus cellulaire n'a été identifié. Les études précédentes menées au laboratoire ont permis de déterminer que les C5-épimérase formaient une famille multigénique importante chez *L. digitata*. De plus il est apparu que certains membres de cette famille multigénique seraient induits lors de l'élicitation des sporophytes par des oligogulonates. Cependant, la forte conservation des séquences au niveau nucléotidique rend la distinction entre les gènes inductibles par l'élicitation et ceux non inductibles particulièrement difficile. En effet, cette forte conservation interdisait la détermination d'amorces spécifiques permettant de faire une distinction entre les membres de la famille multigénique lors d'expériences par Northern-blot, de distinguer une induction lors de manipulation de macro-arrays ou encore d'obtenir des amorces spécifiques d'un membre de la famille multigénique permettant d'effectuer des mesures par PCR quantitative. Afin de pouvoir lever ces obstacles, j'ai tenté d'obtenir un maximum de données sur la partie codante de ces enzymes en employant plusieurs techniques telles que la RACE PCR en utilisant différents types d'approches. En plus de permettre une étude plus approfondie de l'expression des différents membres de la famille multigénique, l'obtention d'ADNc pleine longueur devait permettre d'envisager la surexpression de certaines de ces protéines. Des expériences d'expression hétérologue concernant deux C5-épimérase de sporophytes isolées lors d'une étude précédente était en cours au laboratoire, sans succès jusqu'à présent. Suite à l'étude sur les protoplastes, nous avons isolé un ADNc pleine longueur pour une troisième mannuronane-C5-épimérase, Man-C5-E7, qui a été utilisé pour de nouvelles expériences de surexpression réalisées par l'équipe de Glycobiologie-

Marine. Malheureusement, aucune de ces expériences n'a encore permis d'obtenir une protéine soluble.

Si la forte conservation des séquences nucléotidiques rendait difficile le dessin d'amorces spécifiques d'un transcrit de mannuronane-C5-épimérase, l'augmentation importante du nombre de séquences de membres de cette famille, obtenues lors de l'analyse des EST de protoplastes ainsi que par des manipulations de RT PCR réalisées au laboratoire, ont permis de réaliser un dendrogramme où les différentes séquences obtenues se répartissent suivant les conditions physiologiques de l'algue. J'ai pu dessiner des amorces spécifiques de groupes de mannuronane-C5-épimérase afin de vérifier par PCR en temps réel si l'on pouvait observer une expression différentielle de différents membres de ces enzymes suivant les conditions physiologiques de l'algue. Nous avons pu ainsi mesurer des variations d'accumulation de transcrits pour 4 gènes de C5-épimérase suite à l'élicitation de sporophytes par des oligogulonates et au cours de la mise en culture de protoplastes. Des différences notables ont été observées selon ces différentes conditions pour les gènes considérés, même si les variations observées entre les duplicats biologiques sont assez importantes. Si ces résultats ne sont pas encore très clairs en ce qui concerne les modifications de transcription de certains gènes lors de l'élicitation des sporophytes par des oligogulonates, l'hypothèse selon laquelle certaines de ces enzymes seraient induites en cas d'attaque par un pathogène n'est pas infirmée et reste, à mon avis, tout à fait d'actualité.

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

Adams M. D. & al (1992) Sequence identification of 2375 human brain genes. *Nature* **355**, 632-34

Agarwal M., Katiyar-Agarwal S., Sahi C., Gallie D.R., Grover A. (2001) *Arabidopsis thaliana* Hsp100 proteins: kith and kin. *Cell Stress Chaperones* **6**, 219–24

Allen G.J., Chu S.P., Schumacher K., Shimazaki C.T., Vafeados D., Kemper A., Hawke S.D., Tallman G., Tsien R.Y., Harper J.F., Chory J., Schroeder J.I. (2000) Alteration of stimulus-specific guard cell calcium oscillations and stomatal closing in *Arabidopsis det3* mutant. *Science*. **29**;289(5488):2338-42.

Allen, R. (1995) Dissection of oxidative stress tolerance using transgenic plants. *Plant Physiol.* **107**, 1049–1054

Apel K., Hirt H. (2004) Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu Rev Plant Biol.* **55**, 373-99.

Archibald J.M., Cavalier-Smith T., Maier U., Douglas S. (2001) Molecular chaperones encoded by a reduced nucleus: The cryptomonad nucleomorph j. mole. Evol. **52**, 490-501

Armstrong R.N. (1996) Structure, catalytic mechanism, and evolution of the glutathione transferases. *Chem. Res. Toxicol.* **10**(1):2-18.

Asada, K. (1999) The water–water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygen and dissipation of excess photons. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **50**, 601–39

Audic S., Claverie J.M. (1997) The significance of digital gene expression profiles. *Genome Res.* **7**, 986-95

Baker S. S., Wilhelm K. S., Thomashow, M. F. (1994) The 5'-region of *Arabidopsis thaliana* cor15a has cis-acting elements that confer cold-, drought- and ABA-regulated gene expression. *Plant Mol. Biol.* **24**, 701–713.

Baker N.R. (1991) A possible role for photosystem II in environmental perturbations of photosynthesis. *Physiol. Plant.* **81**, 563-70

Baldauf S.L. (2003) The deep roots of eukaryotes *Science* **300** (5626): 1703-1706

Baniwal S.K., Bharti K., Chan K.Y., Fauth M., Ganguli A., Kotak S., Mishra S.K., Nover L., Port M., Scharf K.D., Tripp J., Weber C., Zielinski D., von Koskull-Doring P. (2004) Heat stress response in plants: a complex game with chaperones and more than twenty heat stress transcription factors. *J Biosci.* **29**:471-87

Batz O., Logemann E., Reinold S., Hahlbrock K. (1998) Extensive reprogramming of primary and secondary metabolism by fungal elicitor or infection in parsley cells. *Biol chem* **379**, 1127-35

Bauman J.W., Liu J., Klaassen C.D. (1993) Production of metallothionein and heat-shock proteins in response to metals. *Fundam Appl Toxicol.* **21**, 15-22.

Benet H., Gall E.A., Asensi A., Kloareg B. (1997) Protoplast regeneration from gametophytes and sporophytes of some species in the order Laminariales (Phaeophyceae). *Protoplasma.* **199**, 39-48

Berglin M., Delage L., Potin P., Vilter H., Elwing H. (2004) Enzymatic cross-linking of a phenolic polymer extracted from the marine alga *Fucus serratus*. *Biomacromolecules* **5**, 2376-83

Black W.A.P., (1948) : The seasonal variation in chemical constitution of some of the sub-littoral seaweeds common in Scotland, *Laminaria cloustonii*, *L. digitata*, *L. saccharina*, and *Saccorhiza bulbosa*. : J. Soc. Chem. Ind. (London) **67**: 165-176

Black W.A.P., (1954) Concentrations gradients and their significance in *Laminaria saccharina*. J. marine Biol. Assoc. United Kingdom. **33**, 49-60.

Bolwell G.P., Bindschedler L.V., Blee K.A., Butt V.S., Davies D.R., Gardner S.L., Gerrish C., Minibayeva F. (2002) The apoplastic oxidative burst in response to biotic stress in plants: a three-component system. *J. Exp. Bot.* **53**, 1367-76.

Boston, R.S. et al (1996) Molecular chaperones and protein folding in plants. *Plant Mol. Biol.* **32**, 191–222

Bowler C., Van Montague M., Inze D. (1992) Superoxide dismutases and stress tolerance. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **43**, 83–116

Bray E.A., Bailey-Serres J., Weretilnyk E. (2000) Responses to abiotic stresses. In: Gruissem W, Buchannan B, Jones R (eds) *Biochemistry and molecular biology of plants*. American Society of Plant Physiologists, Rockville, MD, pp 1158–1249

Broin M., Cuiné S., Eymery F., Rey P. (2002) The plastidic 2-cysteine peroxiredoxin is a target for a thioredoxin involved in the protection of the photosynthetic apparatus against oxidative damage. *The Plant Cell* **14**, 1417-32

Brouquisse R., Weigel P., Rhodes D., Yocum C.F., Hanson A.D. (1989) Evidence for a ferredoxin-dependent choline monooxygenase from spinach chloroplast stroma. *Plant Physiol.* **90**, 322-29.

Browne, J., Tunnacliffe, A. and Burnell, A. (2002) Plant desiccation gene found in a nematode. *Nature (London)* **416**, 38

Buchaille R., Couble M.L., Magloire H., Bleicher F. (2000) A subtractive PCR-based cDNA library from human odontoblast cells: identification of novel genes expressed in tooth forming cells. *Matrix Biol.* **19**, 421-30.

Buchner, J. (1999) Hsp90 & Co. – a holding for folding. *Trends Biochem. Sci.* **24**, 136–41

- Burritt D.J., Larkindale J., Hurd C.L.** (2002) Antioxidant metabolism in the intertidal red seaweed *Stictosiphonia arbuscula* following desiccation. *Planta* **215**, 829-38
- Campa C., Holtan S., Nilsen N., Bjerkas T.M., Stokke B.T., Skjak-Braek G.** (2004) Biochemical analysis of the processive mechanism for epimerization of alginate by mannuronan C-5 epimerase AlgE4. *Biochem. J.* **381**, 155-64
- Chen Z.Z., Hong X.H., Zhang H.R., Wang Y.Q., Li X., Zhu J.K., Gong Z.Z.** (2005) Disruption of the cellulose synthase gene, *AtCesA8/IRX1*, enhances drought and osmotic stress tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Journal* **43**, 273-283
- Cheng S.H., Willmann M.R., Chen H.C., Sheen J.** (2002). Calcium signalling through protein kinases. The *Arabidopsis* calcium-dependent protein kinase gene family. *Plant Physiol.* **129**, 469-85.
- Cheong Y.H., Moon B.C., Kim J.K., Kim C.Y., Kim M.C., Kim I.H., Park C.Y., Kim J.C., Park B.O., Koo S.C., Yoon H.W., Chung W.S., Lim C.O., Lee S.Y., Cho M.J.** (2003) BWMK1, a rice mitogen-activated protein kinase, locates in the nucleus and mediates pathogenesis-related gene expression by activation of a transcription factor. *Plant Physiol.* **132**, 1961-72
- Chinnusamy V., Schumaker K., Zhu J.K.** (2004) Molecular genetic perspectives on cross-talk and specificity in abiotic stress signalling in plants. *J. Exp. Bot.* **55** (395):225-36.
- Cicero M.P., Hubl S.T., Harrison C.J., Littlefield O., Hardy J.A. and Nelson H.C.M.** (2001) The wing in yeast heat shock transcription factor (HSF) DNA-binding domain is required for full activity; *Nucleic Acids Res.* **29** 1715-23
- Close, T. J., Kortt, A. A. and Chandler, P. M.** (1989) A cDNA-based comparison of dehydration-induced proteins (dehydrins) in barley and corn. *Plant Mol. Biol.* **13**, 95-108
- Coelho S.M., Taylor A.R., Ryan K.P., Sousa-Pinto I., Brown M.T., Brownlee C.** (2002) Spatiotemporal patterning of reactive oxygen production and Ca²⁺ wave propagation in *fucus* rhizoid cells. *Plant cell* **14**, 2369-81
- Colin C., Leblanc C., Wagner E., Delage L., Leize-Wagner E., Van Dorsselaer A., Kloareg B., Potin P.** (2003) The brown algal kelp *Laminaria digitata* features distinct bromoperoxidase and iodoperoxidase activities. *J. biol. Chem.* **278**, 23545-52
- Collén J., Davison I.R.** (2001) Seasonality and thermal acclimation of reactive oxygen metabolism in *Fucus vesiculosus* (Phaeophyceae). *J. phycol.* **37**, 474-81
- Collén J., Pinto E., Pedersen M., Colepiccolo P.** (2003) Induction of oxidative stress in the red macroalga *Gracilaria tenuistipitata* by pollutant metals. *Arch. Env. Cont. Tox.* **45**, 337-42
- 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* (sous presse)

Conklin PL, Williams EH, Last RL. (1996). Environmental stress sensitivity of an ascorbic acid-deficient *Arabidopsis* mutant. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **93**, 9970–74

Cornels H., Ichinose Y., Barz W. (2000) Characterization of cDNAs encoding two glycine-rich proteins in chickpea (*Cicer arietinum* L.): accumulation in response to fungal infection and other stress factors. *Plant Science* **154**, 83-8

Creissen G., Firmin J., Fryer M., Kular B., Leyland N., et al. (1999). Elevated glutathione biosynthetic capacity in the chloroplasts of transgenic tobacco plants paradoxically causes increased oxidative stress. *Plant Cell* **11**, 1277–92

Crépineau F., Roscoe, Kaas, 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**, 503-13

Dat J., Vandenabeele S., Vranova E., Van Montagu M., Inze D., Van Breusegem F. (2000) Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cell. Mol. Life Sci.* **57**, 779–95

Dat J.F., Lopez-Delgado H., Foyer C.H., Scott I.M. (1998) Parallel changes in H₂O₂ and catalase during thermotolerance induced by salicylic acid or heat acclimation in mustard seedlings *Plant Physiol.* **116**, 1351-7.

Degenhardt J., Al-Masri A.N., Kurkcuoglu S., Szankowski I., Gau A.E. (2005) Characterization by suppression subtractive hybridization of transcripts that are differentially expressed in leaves of apple scab-resistant and susceptible cultivars of *Malus domestica* *Mol. Genet. Genom.* **273**, 326-35

Delaroque N., Muller D.G., Bothe G., Pohl T., Knippers R., Boland W. (2001) The complete DNA sequence of the *Ectocarpus siliculosus* Virus EsV-1 genome. *Virology* **287**: 112-32

Desikan R., A-H Mackerness S., Hancock J.T., Neill S.J. (2001). Regulation of the *Arabidopsis* transcriptome by oxidative stress. *Plant Physiol.* **127**, 159–72

Desikan R., A-H-Mackerness S., Hancock J.T., Neill S.J. (2001) Regulation of the *Arabidopsis* transcriptome by oxidative stress. *Plant Physiol.* **127**, 159–172

Desikan R., Hancock J.T., Coffey M.J., Neill S.J. (1996). Generation of active oxygen in elicited cells of *Arabidopsis thaliana* is mediated by a NADPH oxidase-like enzyme. *F.E.B.S. Lett.* **382**, 213–17

Diamant S., Eliahu N., Rosenthal D., Goloubinoff P. (2001) Chemical chaperones regulate molecular chaperones in vitro and in cells under combined salt and heat stresses. *J. Biol. Chem.* **276**, 39586–91

Draget K.I., Smidsrod O., Skjak-Braek G. (2005) Alginates from Algae. Polysaccharides and Polyamines in the Food Industry. Properties, Production, and Patens. Edited by A. Steinbüchel and S. K. Rhee. WILEY-VCH Verlag GmbH and Co. KGaA, Weinheim.

Dure, III, L. (2001) Occurrence of a repeating 11-mer amino acid sequence motif in diverse organisms. *Protein Pept. Lett.* **8**, 115–22

Edwards R., Dixon D.P., Walbot V. (2000) Plant glutathione S-transferases: enzymes with multiple functions in sickness and in health. *Trends Plant. Sci.* **5**, 193-8.

Ehrnsperger M., Graber S., Gaestel M., Buchner J. (1997) Binding of non-native protein to Hsp25 during heat shock creates a reservoir of folding intermediates for reactivation. *EMBO J.* **16**, 221–29

Elbein A.D., Pan Y.T., Pastuszak I., Carroll D. (2003) New insights on trehalose: a multifunctional molecule. *Glycobiology.* **13** (4):17R-27R.

Ellen A. A. Nollen and Richard I. Morimoto (2002) Chaperoning signaling pathways: molecular chaperones as stress-sensing ‘heat shock’ proteins. *J. Cell Sci.* **115**, 2809–16

Eltisner E.F. and Osswald W. (1994) Mechanisms of oxygen activation during plant stress. *Proc. R. Soc. Edinb. B* **102**, 131-54

Ertesvåg H. and Skjåk-Bræk G. (1999): C. Bucke, Editor, *Methods in Biotechnology* vol. **10**, Humana Press, Totowa, NJ, pp. 71–78.

Feilner T., Hultschig C., Lee J., Meyer S., Immink R.G., Koenig A., Possling A., Seitz H., Beveridge A., Scheel D., Cahill D.J., Lehrach H., Kreutzberger J., Kersten B. (2005) High Throughput Identification of Potential Arabidopsis Mitogen-activated Protein Kinases Substrates. *Mol. Cell Proteomics* **4** (10):1558-68.

Frank W., Munnik T., Kerkmann K., Salamini F., Bartels D., (2000) Water deficit triggers phospholipase D activity in the resurrection plant *Craterostigma plantagineum*, *Plant Cell* **12** 111 –24.

Franklin M.J., Chitnis C.E., Gacesa P., Sonesson A., White D.C., and Ohman D.E. (1994) *Pseudomonas aeruginosa* AlgG is a polymer level alginate C5-mannuronan epimerase. *J Bacteriol* **176**: 1821–1830.

Friedman R., Altman A., Levin N. (1989): The effect of salt stress on polyamine biosynthesis and content in mung bean plants and in halophytes. *Physiol Plant* **76**:295-302.

Frydman, J. (2001) Folding of newly translated proteins in vivo: the role of molecular chaperones. *Annu. Rev. Biochem.* **70**, 603–47

Gacesa P. (1998) Bacterial alginate biosynthesis--recent progress and future prospects. *Microbiology.* **44** (Pt 5):1133-43

Gimmestad M., Sletta H., Ertesvag H., Bakkevig K., Jain S., Suh S.-J., et al. (2003) The *Pseudomonas fluorescens* AlgG protein, but not its mannuronan C-5-epimerase activity,

Goff S. A., Ricke D., Lan T. H., Presting G., Wang R., Dunn M., Glazebrook J., Sessions A., Oeller P., Varma H., Hadley D., Hutchison D., Martin C., Katagiri F., Lange B. M., Moughamer T., Xia Y., Budworth P., Zhong J., Miguel T., Paszkowski U., Zhang S., Colbert M., Sun W. L., Chen L., Cooper B., Park S., Wood T. C., Mao L., Quail P., Wing R., Dean R., Yu Y., Zharkikh A., Shen R., Sahasrabudhe S., Thomas A., Cannings R., Gutin A., Pruss D., Reid J., Tavtigian S., Mitchell J., Eldredge G., Scholl T., Miller R. M., Bhatnagar S., Adey N., Rubano T., Tusneem N., Robinson R., Feldhaus J., Macalima T., Oliphant A. and Briggs S. (2002) A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. *japonica*); Science **296** 92–100

Goyal K, Walton LJ, Tunnacliffe A. (2005) LEA proteins prevent protein aggregation due to water stress. Biochem J. **388**, 151-7.

Grant, J.J. and Loake, G.J. (2000) Role of reactive oxygen intermediates and cognate redox signalling in disease resistance. Plant Physiol. **124**, 21–9

Grasdalen H., Larsen B. and Smidsrød O. (1979) A p.m.r. study of the composition and sequence of uronate residues in alginates Carbohydr. Res. **68**, pp. 23–31.

Gross P.S., Bartlett T.C., Browdy C.L., Chapman R.W., Warr G.W. (2001) : Immune gene discovery by expressed sequence tag analysis of hemocytes and hepatopancreas in the pacific white shrimp, *litopenaeus vannamei*, and the atlantic white shrimp, *L.setierus*. dev and comp immu **25**, 565-77

Guillou L., Moon-Van Der Staay S.Y., Claustre H., Partensky F., Vaultot D. (1999) : Diversity and abundance of Bolidophyceae (Heterokonta) in two oceanic regions: Applied and Environmental Microbiology; vol. 65; pp. -4528-4536

Guo Y., Halfter U., Ishitani M., Zhu J-K. (2001). Molecular characterization of functional domains in the protein kinase SOS2 that is required for plant salt tolerance. The Plant Cell **13**, 1383-00.

Guo Y., Xiong L., Song C.P., Gong D., Halfter U., Zhu J-K. (2002). A calcium sensor and its interacting protein kinase are global regulators of abscisic acid signalling in Arabidopsis. Development Cell **3**, 233-44.

Halfter U., Ishitani M., Zhu J-K. (2000). The Arabidopsis SOS2 protein kinase physically interacts with and is activated by the calcium-binding protein SOS3. Proc. Natl. Acad. Sci, USA **97**, 3735-40.

Hammond-Kosack, K.E. and Jones, J.D.G. (1996) Resistance gene-dependent plant defense responses. *Plant Cell* **8**, 1773–91

Harmer S.L., Kay S.A. (2005) Positive and negative factors confer phase-specific circadian regulation of transcription in Arabidopsis. Plant Cell. **17** (7):1926-40.

Harmon A.C., Gribskov M., Gubrium E., Harper J.F. (2001). The CDPK superfamily of protein kinases. New Phytologist **151**, 175-83.

Harmon AC, Yoo BC, McCaffery C. (1994). Pseudosubstrate inhibition of CDPK, a protein kinase with a calmodulin-like domain. *Biochemistry* **33**, 7278-87.

Hartl, F.U. (1996) Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature* **381**, 571–80

Haug A., Jensen A. (1956) Seasonal variation in chemical composition of *Laminaria digitata* from different parts of the norwegian coast. *Proceedings of the International Seaweed Symposium 2*: 10-15.

Haug A., Larsen B. and Smidsrod O. (1974) Uronic acid sequence in alginate from different sources. *Carbohydr. Res.* **32**, p. 217.

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.

He C., Fong S.H., Yang D., Wang G.L. (1999) BWMK1, a novel MAP kinase induced by fungal infection and mechanical wounding in rice. *Mol. Plant Microbe Interact.* **12**, 1064–73

Hellebust J.A., Haug A. (1969) Alginic acid synthesis in *Laminaria digitata* (L.) Lamour. In R Magalef, ed, *Proceedings of the International Seaweed Symposium 6*. Subsecretaria de la Marina Mercante, Direccion General de Pesca Maritima, Madrid, pp 463-471

Heyraud A., Gey C., Leonard C., Rochas C., Girond S., Kloareg B. (1996) NMR spectroscopy analysis of oligoguluronates and oligomannuronates prepared by acid or enzymatic hydrolysis of homopolymeric blocks of alginic acid: application to the determination of the substrate specificity of *Halietis tuberculata* alginate lyase. *Carbohydrate Res* **289**: 11–23

Holmgren A. (1989) Thioredoxin and Glutaredoxin Systems. *J Biol. Chem.* **264**, 13963-6

Hrabak E. (2000). Calcium-dependent protein kinases and their relatives. *Advances in Botanical Research Incorporating Advances in Plant Pathology* **32**, 185-223.

Huang J., Zhang H., Wang J., Yang J.. (2003) Molecular cloning and characterization of rice 6-phosphogluconate dehydrogenase gene that is up-regulated by salt stress. *Mol Biol Rep.* **30**, 223-7.

Hummel I., El-Amrani A., Gouesbet G., Hennion F., Couee I. (2004) Involvement of polyamines in the interacting effects of low temperature and mineral supply on *Pringlea antiscorbutica* (Kerguelen cabbage) seedlings. *J Exp Bot.* **55** (399):1125-34.

Hwang I., Chen H-C., Sheen J. (2002). Two-component signal transduction pathways in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **129**, 500–15
is needed for alginate polymer formation. *J Bacteriol* **185**: 3515–3523.

Ishitani M., Liu J., Halfter U., Kim C-S., Shi W., Zhu J-K.(2000). SOS3 function in plant salt tolerance requires N-myristoylation and calcium-binding. *The Plant Cell* **12**, 1667-77.

Johnston C.S., Jones R.G. Hunt R.D. (1977) A seasonal carbon budget for a laminarian population in Scottish sea loch. *Helgol Wiss Meeresunters* **30**, 527-45

Katagiri T., Takahashi S., Shinozaki K., (2001) Involvement of a novel arabidopsis phospholipase D, AtPLDdelta, in dehydration-inducible accumulation of phosphatidic acid in stress signalling, *Plant J.* **26** 595– 605.

Kathleen A. Marrs (1996) The functions and regulation of glutathione S-transferases in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **47**, 127-58

Kiegerl S., Cardinale F., Siligan C, Gross A., Baudouin E., Liwosz A., Eklof S., Till S., Bogre L., Hirt H., Meskiene I. (2000) SIMKK, a mitogen-activated protein kinase (MAPK) kinase, is a specific activator of the salt stress-induced MAPK, SIMK. *Plant Cell* **12**, 2247–2258

Kiegle E., Moore C.A., Haseloff J., Tester M.A., Knight M.R. (2000) Cell-type-specific calcium responses to drought, salt and cold in the *Arabidopsis* root. *Plant J.* **23**(2):267-78.

Kim J.A., Agrawal G.K., Rakwal R., Han K.S., Kim K.N., Yun C.H., Heu S., Park S.Y., Lee Y.H., Jwa N.S. (2003) Molecular cloning and mRNA expression analysis of a novel rice (*Oryza sativa* L.) MAPK kinase kinase, OsEDR1, an ortholog of *Arabidopsis* AtEDR1, reveal its role in defense/stress signalling pathways and development. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **300**, 868–76

Kirch H.H., Schlingensiepen S., Kotchoni S., Sunkar R., Bartels D. (2005) Detailed expression analysis of selected genes of the aldehyde dehydrogenase (ALDH) gene superfamily in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol* **57**, 315-32

Kirst G.O. (1989) Salinity tolerance of eukaryotic marine algae. *Annu Rev Plant Physiol. Plant Mol Biol.* **40**, 21-53

Klarzynski O., Descamps V., Plesse B., Yvin J.C., Kloareg B., Fritig B. (2003) Sulfated fucan oligosaccharides elicit defense responses in tobacco and local and systemic resistance against tobacco mosaic virus. *Mol Plant Microbe Interact.* Feb;**16**(2):115-22.

Klarzynski O., Plesse B., Joubert J.M., Yvin J.C., Kopp M., Kloareg B., Fritig B. (2000) Linear beta-1,3 glucans are elicitors of defense responses in tobacco. *Plant Physiol.* Nov;**124**(3):1027-38.

Kloareg B., Quatrano R.S. (1988) : Structure of the cell walls of marine algae and ecophysiological functions of the matrix polysaccharides : *Océanogr. Mar. Biol. Annu. Rev* : **26**, 259-315

Knight H., Trewavas A.J., Knight M.R. (1997). Calcium signalling in *Arabidopsis thaliana* responding to drought and salinity. *The Plant Journal* **12** : 1067-78.

Knight, H. (2000). Calcium signaling during abiotic stress in plants. *Int. Rev. Cytol.* **195**, 269–325.

Konstantinova T., Parvanova D., Atanasov A., Djilianov D. (2002) Freezing tolerant tobacco, transformed to accumulate osmoprotectants. *Plant Sci.* **163**, 157–164

Kosmas S.A., Argyrokastritis A., Loukas M.G., Eliopoulos E., Tsakas S., Kaltsikes P.J. (2005) Isolation and characterization of drought-related trehalose 6-phosphate-synthase gene from cultivated cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Planta* **6**, 1-11

Kovtun Y., Chiu W-L., Tena G., Sheen J. (2000). Functional analysis of oxidative stress-activated mitogen-activated protein kinase cascade in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 2940–45

Krishna, P. and Gloor, G. (2001) The Hsp90 family of proteins in *Arabidopsis thaliana*. *Cell Stress Chaperones* **6**, 238–46

Kupper F.C., Kloareg B., Guern J., Potin P. (2001) Oligoguluronates elicit an oxidative burst in the brown algal kelp *Laminaria digitata* plant *physiol* **125**, 278-91

Kupper F.C., Schweigert N., Gall E.A., Legendre J.M., Vilter H., Kloareg B. (1998) Iodine uptake in Laminariales involves extracellular, haloperoxidase-mediated oxidation of iodide. *Planta* **207**, 163-71

Kwak J.M., Kim S.A., Hong S.W., Nam H.G. (1997) Evaluation of 515 expressed sequence tags obtained from guard cells of *Brassica campestris*. *Planta* **202**, 9-17

Le Gall Y., Brown S., Marie D., Mejjad M., Kloareg N.(1993). Quantification of nuclear cDNA and G-C content in marine macroalgae by flow cytometry of isolated nuclei : *Protoplasma* **173**, 123-132

Lee G.J., Pokala N., Vierling E. (1995) Structure and in vitro molecular chaperone activity of cytosolic small heat shock proteins from pea. *J Biol Chem.* **5**, 10432-8.

Lee Y.H., Huang G.M., Cameron R.A., Graham G., Davidson E.H., Hood L., Britten R.J. (1999) EST analysis of gene expression in early cleavage-stage sea urchin embryos. *Development* **126**, 3857-67.

Lee, J.H. and Schöffl, F. (1996) An Hsp70 antisense gene affects the expression of HSP70/HSC70, the regulation of HSF and the acquisition of thermotolerance in transgenic *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Gen. Genet.* **252**, 11–9

Lewis R.J. (1996) : Chromosomes of the brown algae : *Phycologia* **35**, 19-40

Li R., Brawley S.H. (2003) Improved survival under heat stress in intertidal embryos (*Fucus* spp.) simultaneously exposed to hypersalinity and the effect of parental thermal history. *Marine Biology* **144**, 205-13

Li W., Li M., Zhang W., Welti R., X. (2004) The plasma membrane bound phospholipase Ddelta enhances freezing tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Nat Biotechnol* **22**: 427–433

Lin T-Y, Hassid WZ (1966) Pathway of alginic acid synthesis in the marine brown alga. *J. Biol. Chem.* **241**: 5284-5297

A. Linker, R. S. Jones (1966) A New Polysaccharide Resembling Alginic Acid Isolated from Pseudomonads. *J. Biol. Chem.* **241**, No. **16**,. 3845-3851

Liu J., Ishitani M., Halfter U., Kim C-S., Zhu J-K. (2000). The *Arabidopsis thaliana* SOS2 gene encodes a protein kinase that is required for salt tolerance. *Proc. Natl. Acad. Sci, USA* **97**, 3730-34.

Lohrmann N.L., Logan B.A., Johnson A.S. (2004) Seasonal acclimatization of antioxidants and photosynthesis in *Chondrus crispus* and *Mastocarpus stellatus*, two co-occurring red algae with differing stress tolerances. *Biol Bulletin* **207**, 225-32

Lüning K. (1980) Critical level of light and temperature regulating the gametogenesis of three *Laminaria* spp (Phaeophyceae). *J. Phycol.* **16**, 1-15

Madgwick J, Haug A, Larsen B (1973) Polymannuronic acid C5 epimerase from the marine alga *Pelvetia canaliculata* (L.) Done et Thur. *Actua Chem Scand* **27**: 3592-4

Madgwick J., Haug A., Larsen B. (1973) Polymannuronic acid C5 epimerase from the marine alga *Pelvetia canaliculata* (L.) Done et Thur. *Actua Chem Scand* **27**: 3592-3594

Maggio A., Miyazaki S., Veronese P., Fujita T., Ibeas J.I., Damsz B., Narasimhan M.L., Hasegawa P.M., Joly R.J., Bressan R.A. (2002) Does proline accumulation play an active role in stress-induced growth reduction? *Plant J*, **31**:699-712.

Malin G., Küpper F. C., Carpenter L., Baker A., Broadgate W., Kloareg B.& Liss P. S. (2001) trace gas production by seaweeds : defenses, oxydative stress, signalling and atmospheric significance. *J Phycol* **37** (3), 32-3.

Mani S., van de Cotte B., van Montagu M., Verbruggen N. (2002). Altered levels of proline dehydrogenase cause hypersensitivity to proline and its analogs in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, **128**:73-83.

Manners D.J., Sturgeon R.J. (1982) Reserve carbohydrate of algae, fungi, and lichens, in *Encyclopedia of Plant Physiology New Series Vol. 13 A, Plant Carbohydrates I, Intracellular Carbohydrates*, Chap 12, Ed.F.A. Loewus and W. Tanner.

Manley S.L., Barbero P.E. (2001) Physiological constraints on bromoform (CHBr₃) production by *Ulva lactuca* (Chlorophyta). *Limnol. Oceanogr.* **46**, 1392-1399

MAPK Group. (2002) Mitogen-activated protein kinase cascades in plants: a new nomenclature. *Trends Plant Sci.* **7**, 301–308

May T.B., Shinabarger D., Maharaj R., Kato J., Chu L., DeVault J. D., Roychoudhury S., Zielinski N.A., Berry A., Rothmel R.K., et al. (1991) Alginate synthesis by *Pseudomonas aeruginosa*: a key pathogenic factor in chronic pulmonary infections of cystic fibrosis patients. *Clin Microbiol Rev.* **4**, 191–206.

McConnell OJ, Fenical W (1980) Halogen chemistry of the red alga *Bonnemaisonia* . *Phytochem.* **19**, 233-47

Mishra S.K., Tripp J., Winkelhaus S., Tschiersch B., Theres K., Nover L. and Scharf K.D. (2002) In the complex family of heat stress transcription factors, HsfA1 has a unique role as master regulator of thermotolerance in tomato; *Genes Dev.* **16** 1555-67

Mogk A., Schlieker C., Friedrich K.L., Schonfeld H.J., Vierling E., Bukau B. (2003) Refolding of substrates bound to small Hsps relies on a disaggregation reaction mediated most efficiently by ClpB/ DnaK. *J. Biol. Chem.* **278**, 31033–42

Muller EG (1991) Thioredoxin deficiency in yeast prolongs S phase and shortens the G1 interval of the cell cycle. *J Biol Chem* **266**, 9194-202

Nakagami H., Pitzschke A., Hirt H.(2005) Emerging MAP kinase pathways in plant stress signalling. *Trends Plant Sci.* **10**, 339-46.

Nakashima K., Satoh R., Kiyosue T., Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K. (1998) A gene encoding proline dehydrogenase is not only induced by proline and hypoosmolarity, but is also developmentally regulated in the reproductive organs of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **118**, 1233-41.

Neidleman S.L. & Geigert J. (1986) Biohalogenation, principles, basic role and application. Chichester.

Neidleman SL, Geigert J (1986) Biohalogenation : Principles, Basic Roles and Applications. Ellis Horwood Ltd., Chichester.

Nelson P.S., Ng W.L., Schummer M., True L.D., Liu A.Y., Bumgarner R.E., Ferguson C., Dimak A., Hood L. (1997) An expressed sequence tag database of the human prostate: sequence analysis of 1168 cDNA clones. *Genomics* **47**, 12-25

Nepple B.B., Bachofen R. (1997) Induction of stress proteins in the phototrophic bacterium *Rhodobacter sphaeroides* *FEMS Microbiol. Lett.* **153**, 173-80

Nielsen H.D., Brownlee C., Coelho S.M., Brown M.T. (2003) Inter-population differences in inherited copper tolerance involve photosynthetic adaptation and exclusion mechanisms in *Fucus serratus*. *New Phytologist* **160**, 157-65

Noctor G., Gomez L., Vanacker H., Foyer C.H. (2002). Interactions between biosynthesis, compartmentation and transport in the control of glutathione homeostasis and signaling. *J. Exp. Bot.* **53**, 1283–304

Noctor, G. and Foyer, C. (1998) Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **49**, 249–79

Nollen E.A., Morimoto R.I. (2002) Chaperoning signaling pathways: molecular chaperones as stress-sensing 'heat shock' proteins. *J Cell Sci* **15**, 2809-16.

Novillo F., Alonso J.M., Ecker J.R., Salinas J. (2004) CBF2/DREB1C is a negative regulator of CBF1/DREB1B and CBF3/DREB1A expression and plays a central role in stress tolerance in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci, USA*. **16;101**, 3985-90

Nyvall P., Corre E., Boisset C., Barbeyron T., Rousvoal S., Scornet D., Kloareg B., Boyen C. (2003) Characterization of mannuronan C-5-epimerase genes from the brown alga *Laminaria digitata*. *Plant Physiol* **133**, 726-735

Ogawa T., Bao D.H., Katoh H., Shibata M., Pakrasi H.B., Bhattacharyya-Pakrasi M. (2002) A two-component signal transduction pathway regulates manganese homeostasis in *Synechocystis* 6803, a photosynthetic organism *J BIOL CHEM* **277**, 28981-6

Ohlrogge J., Benning C. (2000) Unraveling plant metabolism by EST analysis. *Curr Opin Plant Biol.* **3**, 224-8.

Orozco-Cardenas M.L., Narvaez-Vasquez J., Ryan C.A. (2001) Hydrogen peroxide acts as a second messenger for the induction of defense genes in tomato plants in response to wounding, systemin, and methyl jasmonate. *Plant Cell*.**13** :179-91.

Orvar, B.L., Sangwan, V., Omann, F., and Dhindsa, R. (2000). Early steps in cold sensing by plant cells: The role of actin cytoskeleton and membrane fluidity. *Plant J.* **23**, 785–794.

Patel, S. and Latterich, M. (1998) The AAA team: related ATPases with diverse functions. *Trends Cell Biol.* **8**, 65–71

Pearson G., Serrao E.A., Cancela M.L. (2001) Suppression subtractive hybridization for studying gene expression during aerial exposure and desiccation in fucoid algae. *Eur J. Phycol.* **36**, 359-66

Pertea G., Huang X., Liang F., Antonescu V., Sultana R., Karamycheva S., Lee Y., White J., Cheung F., Parvizi B., Tsai J. and Quackenbush J. (2003) TIGR Gene Indices clustering tools (TGICL): a software system for fast clustering of large EST datasets. *Bioinfo Appl. Note.* **19**, 651–2

Peteranderl R., Rabenstein M., Shin Y., Liu C.W., Wemmer D.E., King D.S. and Nelson H.C.M. (1999) Biochemical and Biophysical characterization of the trimerization domain from the heat shock transcription factor. *Biochemistry* **38** 3559–69

Plieth C. (1999) Temperature Sensing by Plants: Calcium-Permeable Channels as Primary Sensors. A Model. *J. Membrane Biol.* **172**, 121–127

Polle, A. (2001) Dissecting the superoxide dismutase–ascorbate peroxidase–glutathione pathway in chloroplasts by metabolic modeling. Computer simulations as a step towards flux analysis. *Plant Physiol.* **126**, 445–62

Prasad T.K., Anderson M.D., Stewart C.R. (1995) Localization and Characterization of Peroxidases in the Mitochondria of Chilling-Acclimated Maize Seedlings. *Plant Physiol.* **108** :1597-1605.

Pratt W.B., Krishna P., Olsen L.J. (2001) Hsp90-binding immunophilins in plants: the protein movers. *Trends Plant Sci.* **6**, 54–8

Queitsch C., Sangster T.A., Lindquist S. (2002) Hsp90 as a capacitor for phenotypic variation. *Nature* **417**, 618–24

Quillet, M. (1958) Sur le métabolisme glucidique des algues brunes. Présence de petite quantités de laminarines chez de nombreuses nouvelles espèces réparties

Quinn J., Findlay V.J., Dawson K., Millar J.B., Jones N., et al. (2002). Distinct regulatory proteins control the graded transcriptional response to increasing H₂O₂ levels in fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol. Biol. Cell.* **13**, 805– 16

Quintero F.J., Ohta M., Shi H., Zhu J-K., Pardo J.M. (2002). Reconstitution in yeast of the Arabidopsis SOS signalling pathway for Na⁺ homeostasis. *Proc. Natl. Acad. Sci, USA* **99**, 906-66.

Ramsey D.M., Wozniack D.J. (2005) Understanding the control of *Pseudomonas aeruginosa* alginate synthesis and the prospects for management of chronic infections in cystic fibrosis. *Mol Microbiol* ;56(2):309-22

Rhodes D. Hanson A.D. (1993) Quaternary ammonium and tertiary sulphonium compounds in higher plants. An Review *Plant Physiol Plant Mol Biol.* **44**, 357-84

Richter C. and Schweizer M. (1997) Oxidative stress in mitochondria, In : Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defenses , pp. 169-200 Scandalios J.G. (ed), Cold spring harbor laboratory press, Cold spring harbour, N.Y.

Richter, K. and Buchner, J. (2001) Hsp90: chaperoning signal transduction. *J. Cell. Physiol.* **188**, 281–90

Riechmann J.L., Heard J., Martin G., Reuber L., Jiang C., Keddie J., Adam L., Pineda O., Ratcliffe O.J., Samaha R.R., Creelman R., Pilgrim M., Broun P., Zhang J.Z., Ghandehari D., Sherman B.K., Yu G. (2000) Arabidopsis transcription factors: genome-wide comparative analysis among eukaryotes. *Science* **290**(5499):2105-10.

Ritz D., Patel H., Doan B., Zheng M., Aslund F., Storz G., Beckwith J. (2000) Thioredoxin 2 is involved in the oxidative stress response in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **275**, 2505-12

Rizhsky L., Hallak-Herr E., Van Breusegem F., Rachmilevitch S., Barr J.E., Rodermeil S., Inze D. and Mittler R. (2002) Double antisense plants lacking ascorbate peroxidase and catalase are less sensitive to oxidative stress than single antisense plants lacking ascorbate peroxidase or catalase *Plant Journal* **32**, 329–42

Roberts, J. K., DeSimone, N. A., Lingle, W. L. and Dure, III, L. (1993) Cellular concentrations and uniformity of cell-type accumulation of two LEA proteins in cotton embryos. *Plant Cell* **5**, 769–80

Robles-Price A., Wong T.Y., Sletta H., Valla S., and Schiller N.L. (2004) AlgX is a periplasmic protein required for alginate biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol* **186**: 7369–7377.

Roxas V.P., Lodhi S.A., Garrett D.K., Mahan J.R., Allen RD. (2000) Stress tolerance in transgenic tobacco seedlings that overexpress glutathione S-transferase/glutathione peroxidase. *Plant Cell Physiol.* **41**, 1229-34.

Saenko G.N., Kravtsova Y.Y., Ivanenko V.V., Sheludko S.I. (1978) : Concentration of iodine and bromine by plants in the seas of Japan and Okhotsk. *Mar Biol* **47** : 243-250

Saijo Y., Hata S., Kyojuka J., Shimamoto K., Izui K. (2000). Overexpression of a single Ca²⁺-dependent protein kinase confers both cold and salt/drought tolerance on rice plants. *The Plant Journal* **23**, 319-27.

Sanders B. (1990) Stress proteins: potential as multitiered biomarkers. In : McCarthy JF, Shuggart LR (Eds.), *Biomarkers of Environmental Contamination*. Lewis, Boca, Raton FL.

Sanders B.M., Martin L.S., Nelson W.G., Phelps D.K. (1991) Relationships between accumulation of a 60 kDa stress protein and scope-for-growth in *Mytilus edulis* exposed to a range of copper concentrations. *Mar. Environ. Res.* **31**, 81-97.

Sanders B.M., Pascoe V.M., Nakagawa P.A., Martin L.S. (1992) Persistence of the Heat-shock response over time in a common *Mytilus* mussel. *Mol. Mar. Biol. Biotech* **1**, 147-54.

Sanders, D., Brownlee, C., and Harper, J.F. (1999). Communicating with calcium. *Plant Cell* **11**, 691–706.

Sangwan, V., Foulds, I., Singh, J., and Dhindsa, R.J. (2001). Coldactivation of *Brassica napus* BN115 promoter is mediated by structural changes in membranes and cytoskeleton, and requires Ca²⁺ influx. *Plant J.* **27**, 1–12.

Schroeder, J.I., Allen, G.J., Hugouvieux, V., Kwak, J.M., and Waner, D. (2001). Guard cell signal transduction. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **52**, 627–658.

Sindelar L., Sindelarova M. (2002) Glucose-6-phosphate dehydrogenase/6-phosphogluconate dehydrogenase ratio and the glucose-6-phosphate, 6-phosphogluconate and fructose-6-phosphate contents in tobacco plants infected with potato virus Y *Biologia Plantarum* **45**, 575-580

Sindelar L., Sindelarova M., Burketova L. (1999) Changes in activity of glucose-6-phosphate and 6-phosphogluconate dehydrogenase isozymes upon potato virus Y infection in tobacco leaf tissues and protoplasts. *Plant Physiol and Biochem* **37**, 195-201

Sivamani, E., Bahieldrin, A., Wraith, J. M., Al-Niemi, T., Dyer, W. E., Ho, T.-H. D. and Qu, R. (2000) Improved biomass productivity and water use efficiency under water deficit conditions in transgenic wheat constitutively expressing the barley HVA1 gene. *Plant Sci.* **155**, 1–9

Skjåk-Bræk G. and Larsen B. (1982) *Carbohydr. Res.* **103**, 133–136.

Smidsrod et al. (1996) Chemistry and Physical Properties of Alginates. *Carbohydrates in Europe*, May 1996, pp. 6-13, Jul. 1996.

Solomon, A., Salomon, R., Paperna, I. and Glazer, I. (2000) Desiccation stress of entomopathogenic nematodes induces the accumulation of a novel heat stable product. *Parasitology* **121**, 409–16

Sung DY, Vierling E, Guy CL. (2001) Comprehensive expression profile analysis of the Arabidopsis Hsp70 gene family. *Plant Physiol.* **126**, 789-800.

Sung, D.Y. and Guy, C.L. (2003) Physiological and molecular assessment of altered expression of Hsc70-1 in Arabidopsis. Evidence for pleiotropic consequences. *Plant Physiol.* **132**, 979–87

Svanem B.I.G., Skjåk-Bræk G., Ertesvåg H. and Valla S. (1999) Cloning and expression of three new *Azotobacter vinelandii* genes evolutionary related to a previously described gene family encoding mannuronan C-5-epimerases. *J Bacteriol* **181**, 68–77.

Teige M., Scheikl E., Eulgem T., Doczi R., Ichimura K., Shinozaki K., Dangl J.L., Hirt H. (2004) The MKK2 pathway mediates cold and salt stress signaling in Arabidopsis. *Mol. Cell* **15**, 141–52

The Arabidopsis Genome Initiative (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*; *Nature (London)* **408** 796–815

Thomashow M.F. (1999) PLANT COLD ACCLIMATION: Freezing Tolerance Genes and Regulatory Mechanisms. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* **50**:571-99.

Tsugane K., Kobayashi K., Niwa Y., Ohba Y., Wada K., Kobayashi H. (1999). A recessive *Arabidopsis* mutant that grows enhanced active oxygen detoxification. *Plant Cell.* **11**,1195–206

Urao T., Yakubov B., Satoh R., Yamaguchi-Shinozaki K., Seki M., Hirayama T., Shinozaki K. (1999) A transmembrane hybrid-type histidine kinase in Arabidopsis functions as an osmosensor. *Plant Cell.* **11**(9):1743-54.

Urao T., Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K. (2000) Two-component systems in plant signal transduction. *Trends Plant Sci.* **5**(2):67-74.

Urao T., Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K. (2001) Plant histidine kinases: an emerging picture of two-component signal transduction in hormone and environmental responses. *Sci STKE.* **20**;2001(109):RE18.

Van den Hoeck C. (1982) Phylogeographic distribution groups of benthic marine algae in the north atlantic ocean. A review of experimental evidence from life history studies. *Helgol. Meeresunters.* **37**, 227-57

Vanlerberghe G.C., Vanlerberghe A.E., McIntosh L. (1997) Molecular Genetic Evidence of the Ability of Alternative Oxidase to Support Respiratory Carbon Metabolism. *Plant Physiol.* **113**, 657-61.

Vierling, E. (1991) The roles of heat shock proteins in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **42**, 579–620

Viner, R.I. and Clegg, J.S. (2001) Influence of trehalose on the molecular chaperone activity of p26, a small heat shock/a-crystallin protein. *Cell Stress Chaperones* **6**, 126–35

Vreeland V., Waite J.H., Epstein L. (1998) Polyphenols and oxidases in substratum adhesion by marine algae and mussels. *J Phycol* **34**, 1-8

Walters D.R. (2003) Polyamines and plant disease. *Phytochemistry.* **64** (1):97-107.

Wang W., Vinocur B., Shoseyov O., Altman A. (2004) Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. *Trends Plant Sci.* **9**, 244-52.

Wang W.X., Vinocur B., Altman A. (2003) Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta* **218**: 1–14

Wang W.X., Vinocur B., Shoseyov O., Altman A. (2001) Biotechnology of plant osmotic stress tolerance: physiological and molecular considerations. *Acta Hort* **560**:285–292

Wang X. (2002) Phospholipase D in hormonal and stress signaling. *Curr Opin Plant Biol* **5**: 408–14

Wang X. (2004) Lipid signalling. *Curr. Opin. Plant Biol.* **7**: 329–36

Wang X. (2005) Regulatory Functions of Phospholipase D and Phosphatidic Acid in Plant Growth, Development, and Stress Responses *Plant Physiol*, **139**, 566–73

Wang X., Wu P., Xia M., Wu Z., Chen Q., Liu F. (2002) Identification of genes enriched in rice roots of the local nitrate treatment and their expression patterns in split-root treatment. *Gene.* **297**, 93-102.

Wang, X.Q., Ullah, H., Jones, A.M., and Assmann, S.M. (2001). G protein regulation of ion channels and abscisic acid signaling in *Arabidopsis* guard cells. *Science* **292**, 2070–2072.

Watson M.B., Emory K.K., Piatak R.M., Malmberg R.L. (1998) Arginine decarboxylase (polyamine synthesis) mutants of *Arabidopsis thaliana* exhibit altered root growth. *Plant J.* **13** (2):231-9.

Weigel P., Weretylnyk E. et Hanson A.D. (1986) Betaine aldehyde oxidation by spinach chloroplast. *Plant Physiol.*, **82**, 753-759.

Welin, B. V., Olson, A., Nylander, M. and Palva, E. T. (1994) Characterisation and differential expression of DHN/LEA/RAB-like genes during cold-acclimation and drought stress in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.* **26**, 131–44

Welti R., Li W., Li M., Sang Y., Biesiada H., Zhou H.E., Rajashekar C.B., Williams T.D., Wang X. (2002) Profiling membrane lipids in plant stress responses: role of phospholipase D alpha in freezing-induced lipid changes in *Arabidopsis*. *J. Biol. Chem.* **277**: 31994–2002

Wever R., Tromp M.G.M., Krenn B.E., Marjani A., Tol M.V. (1991) Broinating activity of the seaweed, *Ascophyllum nodosum* : impact on the biosphere. *Environ. Sci. and Technol.* **25**, 446-449

Williams C.H. Jr. (1995) Mechanism and structure of thioredoxin reductase from *Escherichia coli*. *F.A.S.E.B. J.* **9**, 1267-76

Williams J.H., Farag A.M., Stansbury M.A., Young P.A., Bergman H.L., Petersen N.S., (1996) Accumulation hsp70 in juvenile and adult rainbow trout gill exposed to meta-contaminated water and/or diet. *Environ. Toxicol. Chem.* **15**, 1324-28.

Wise, M. J. (2003) LEAping to conclusions: a computational reanalysis of late embryogenesis abundant proteins and their possible roles. *B.M.C. Bioinform.* **4**, 52

Wong C.E., Li Y., Whitty B.R., Diaz-Camino C., Akhter S.R., Brandle J.E., Golding G.B., Weretilnyk E.A., Moffatt B.A., Griffith M. (2005) Expressed sequence tags from the Yukon ecotype of *Thellungiella* reveal that gene expression in response to cold, drought and salinity shows little overlap. *Plant Mol. Biol.* **58**, 561-74

Wu C.Y., Lin G.H. (1987). Progress in the genetics and breeding of economic seaweeds in China. *Hydrobiologia* **151/152**: 57–61.

Xing T., Wang X.J., Malik K., Miki B.L. (2001). Ectopic expression of an *Arabidopsis* calmodulin-like domain protein kinase-enhanced NADPH oxidase activity and oxidative burst in tomato protoplasts. *Molecular Plant Microbe Interactions* **14**, 1261-4.

Xiong L., Schumaker K.S., Zhu J.K. (2002) Cell signaling during cold, drought, and salt stress. *Plant Cell.* **14** Suppl:S165-83.

Xu, D., Duan, X., Wang, B., Hong, B., Ho, T.-H. D. and Wu, R. (1996) Expression of a late embryogenesis abundant protein gene, HVA1, from barley confers tolerance to water deficit and salt stress in transgenic rice. *Plant Physiol.* **110**, 249–257

Yoshida Y., Aoki C., Iuchi S., Nanjo T., Seki M., Sekiguchi F., Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K. (2001) Characterization of four extensin genes in *Arabidopsis thaliana* by differential gene expression under stress and non-stress conditions. *DNA Res.* **8**, 115-22

Young E.G. and Langille W.M., (1958) : The occurrence of inorganic elements in marine algae of the Atlantique province of Canada. *Can. J. Bot.* 301-310

Young J.C., Moarefi I., Hartl F.U. (2001) Hsp90: a specialized but essential protein folding tool. *J. Cell Biol.* **154**, 267–73

Yu J., Hu S., Wang J., Wong G. K., Li S., Liu B., Deng Y., Dai L., Zhou Y., Zhang X., Cao M., Liu J., Sun J., Tang J., Chen Y., Huang X., Lin W., Ye C., Tong W., Cong L., Geng J., Han Y., Li L., Li W., Hu G., Li J., Liu Z., Qi Q., Li T., Wang X., Lu H., Wu T., Zhu M., Ni P., Han H., Dong W., Ren X., Feng X., Cui P., Li X., Wang H., Xu X., Zhai W., Xu Z., Zhang J., He S., Xu J., Zhang K., Zheng X., Dong J., Zeng W., Tao L., Ye J., Tan J., Chen X., He J., Liu D., Tian W., Tian C., Xia H., Bao Q., Li G., Gao H., Cao T., Zhao W., Li P., Chen W., Zhang Y., Hu J., Liu S., Yang J., Zhang G., Xiong Y., Li Z., Mao L., Zhou C., Zhu Z., Chen R., Hao B., Zheng W., Chen S., Guo W., Tao M., Zhu L., Yuan L. and Yang H. (2002) A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. *indica*); *Science* **296** 79–92

Zhu J-K. (2002). Salt and drought stress signal transduction in plants. *An. Rev. of Plant Biol.* **53**, 247-73.

ANNEXES

Liste des publications :

V.Roeder, J. Collén, , S. Rousvoal, E. Corre, C. Leblanc, C. Boyen (2005) Identification of stress gene transcripts in *laminaria digitata* (phaeophyceae) protoplast cultures by expressed sequence tag analysis. J. Phycol (sous presse)

J. Collén, V. Roeder, S. Rousvoal, O. Collin, B. Kloareg, C. Boyen (2005) An expressed sequence tag analysis of thallus and regenerating protoplasts of *Chondrus crispus* (gigartinales, rhodophyceae). J. Phycol (sous presse)

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

IDENTIFICATION OF STRESS GENE TRANSCRIPTS IN *LAMINARIA DIGITATA* (PHAEOPHYCEAE) PROTOPLAST CULTURES BY EXPRESSED SEQUENCE TAG ANALYSIS¹

Vincent Roeder, Jonas Collén, Sylvie Rousvoal, Erwan Corre, Catherine Leblanc, and Catherine Boyen²

Centre National de la Recherche Scientifique and Université Pierre et Marie Curie, Station Biologique, BP 74,
29682 Roscoff cedex, France

To characterize stress and defense-induced genes in the brown alga *Laminaria digitata* (Hudson) J.V. Lamouroux, 1985 expressed sequence tags (ESTs) were generated from *L. digitata* protoplasts. Comparison of the ESTs with public databases allowed putative functions to be assigned to 45% of the sequences. Comparison with ESTs from *L. digitata* sporophytes showed that protoplasts expressed more stress genes than intact thalli. Several transcripts in the stress gene class coded for proteins involved in cell protection against oxygen radicals, including thioredoxins (six ESTs), thioredoxin peroxidases (two ESTs), and glutathione-S-transferase (GST) (41 ESTs). The GSTs appear to be part of the sigma class, making them the first GST sigma identified in a photosynthetic organism. Other stress genes included a new type of vanadium-dependent bromoperoxidases (vBPO) showing 71% similarity with vBPOs previously identified in the sporophytic-thalli phase of *L. digitata*. The ESTs coding for 22 different mannuronan-C5-epimerases were identified among the cell wall biosynthesis genes, and several ESTs showed similarity with the genome of the *Ectocarpus siliculosus* virus.

Key index words: defense; expressed sequences tags; glutathione-S-transferase; *Laminaria digitata*; mannuronan-C5-epimerase; protoplast; stress; vanadium-dependent bromoperoxidase

Abbreviations: EST, expressed sequence tag; EsV, *Ectocarpus siliculosus* virus; GST, glutathione-S-transferase; HSP, heat shock protein; Man-C5-E, mannuronan-C5-epimerase; ROS, reactive oxygen species; vBPO, vanadium-dependent bromoperoxidase

Laminaria digitata (Hudson) J.V. Lamouroux is a brown alga, and as such it belongs to the phylum Heterokonta, a eukaryotic lineage that also includes diatoms and oomycetes (Baldauf et al. 2003). The life cycle is heteromorphic and consists of a microscopic haploid filamentous phase, the gametophyte, and a macroscopic diploid phase, the sporophyte, which can

attain a length of up to 2 m. The family Laminariales includes several economically important species and is thus an important marine resource. Some of its members can concentrate iodine to 30,000 times the concentration in the surrounding seawater and are used as an iodine source in China (Saenko et al. 1978). *Laminaria digitata* has therefore been used as a model organism to investigate halogen metabolism (Küpper et al. 1998). The Laminariales are also the primary source of alginates, anionic polysaccharides, which are the main component of the cell wall (30%–45% of dry weight), consisting of heteropolysaccharidic chains of mannuronic and guluronic acid (Kloareg and Quatrano 1988).

Despite their ecological, economic, and evolutionary importance, few studies have focused on brown algal genomes or genes. The haploid genome of *L. digitata* has been estimated at 640 Mbp (Le Gall et al. 1993) divided into 31 chromosomes (Lewis 1996). In particular, the molecular biology of the metabolic pathways of iodine and alginate remains poorly understood. Similarly, the molecular bases of innate immunity have been barely explored. In a previous study, we described the generation of two expressed sequence tag (EST) catalogs from gametophytes and sporophytes of *L. digitata* (Crépineau et al. 2000). Other studies have focused on genes and groups of genes, such as the light-harvesting complex multigenic family (De Martino et al. 2000), the mannuronan-C5-epimerases (Man-C5-Es; Nyvall et al. 2003), and the vanadium-dependent haloperoxidases (Colin et al. 2003, 2005). More recently, over 12,000 ESTs have been generated from another heterokont, the diatom *Phaeodactylum tricornutum* (Scala et al. 2002, Maheswari et al. 2005).

Our previous EST work on *L. digitata* (Crépineau et al. 2000) revealed several genes of interest, such as vanadium-dependent bromoperoxidases (vBPOs), and genes involved in carbon metabolism (Moulin et al. 1999). However, one limitation of the approach used, which analyzed ESTs from plants growing under normal conditions, was that most of the ESTs identified corresponded to house-keeping proteins, especially ribosomal proteins. The present study identified genes involved in stress responses and cell wall biosynthesis. Protoplasts were considered as a favorable experimental tool for this type of molecular investigation.

¹Received 21 January 2005. Accepted 29 August 2005.

²Author for correspondence: boyen@sb-roscoff.fr.

Protoplasts are plant or algal cells from which the cell wall has been removed. Cell wall digestion leads to loss of physical support, considerable cell death, and loss of cell to cell communication, thus resulting in multiple types of stress, including mechanical and osmotic stress. An EST approach has been applied to guard cell protoplasts of *Brassica campestris* L. and a significant portion of the clones coded for proteins involved in stress and defense proteins (Kwak et al. 1997). In the same way, analysis of a cDNA catalog obtained from petunia petal protoplast cultures during the first cell division allowed the identification of several genes associated with stress or defense mechanisms (Yu et al. 1999). In *L. digitata*, protoplast isolation has been shown to result in the production of reactive oxygen species (ROS) (Benet et al. 1997); up to 120 μM H_2O_2 was found in the macerating medium. Digestion of the cell wall liberates large amounts of oligoguluronates, which are known to elicit an oxidative burst in *L. digitata* sporophytes (Küpper et al. 2001, 2002), a potentially ubiquitous stress response in higher plants (Baker and Orlandi 1995, Wojtaszek 1997). The protoplasts are thereby exposed to an oxidative stress that should also induce molecular defense responses. Protoplasts of *L. digitata* have been shown to synthesize a new cell wall after 36 h in culture (Benet et al. 1994).

In this study we carried out systematic sequencing of a cDNA library from *L. digitata* protoplasts and generated 1985 ESTs. The data collected from this approach were correlated and compared with the results obtained from a previous EST project on unstressed *L. digitata* sporophytes (Crépeau et al. 2000). The comparison indicated that protoplasts are a suitable tool to study stress and cell wall pathways and allowed us to identify a sizable new set of genes of interest, including vBPOs, glutathione-S-transferases (GSTs), and Man-C5-Es.

MATERIALS AND METHODS

Algal material, protoplast isolation, and culture. *Laminaria digitata* (Hudson) J.V. Lamouroux (Phaeophyceae, Heterokonta) sporophytes were collected near the Ile de Sieck (Brittany, France) in September 2001 and were immediately frozen in liquid nitrogen for RNA extraction or kept in seawater tanks until used (1–7 days). Meristematic tissue (123 g) was used for protoplast isolation using cell wall degrading enzymes (Butler et al. 1989). The final yield was 3×10^7 protoplasts $\cdot \text{g}^{-1}$. The purified protoplasts were incubated in seawater supplemented with nutrients (4 mM NaHCO_3 , 2 mM KNO_3 , 0.1 mM NaH_2PO_4) in darkness at 12° C. Protoplasts were harvested after 0, 12, and 24 h, flash frozen in liquid nitrogen, and stored at –80° C.

RNA extraction and library construction. Total RNA was extracted from the frozen sporophytes or protoplasts according to Apt et al. (1995). For cDNA library construction, protoplast total RNA fractions from all time points were pooled with a total yield of 1.08 mg. The mRNA was purified with poly-T attached to magnetic beads (Poly-A-Tract Kit, Amersham, Munzing, Germany) with a yield of 8.6 μg . The cDNA was synthesized using 5 μg of mRNA and the cDNA Gold Cloning Kit (Stratagene, La Jolla, CA, USA) according to the

manufacturer's instructions. The cDNA was size-fractionated on a Sepharose column; 160 ng of cDNA with a size ranging from 800 to 2500 bp was used for construction of the library. The cDNAs were directionally inserted into the ZAP express vector and then packaged using Gigapack III Gold Kit (Stratagene). The titer of the primary library was 1×10^6 pfu and 4×10^{11} pfu after amplification. The average insert size was 1000 bp.

EST sequencing. After excision, Pbk-CMV Phagemids vectors were used to infect XL0LR *Escherichia coli*. Positives clones were picked randomly from LB agar plates and grown in $2 \times \text{LB}$ for 24 h in 96-well plates. After centrifugation, plasmid purification was performed with the Montage system (Millipore, Billerica, MA, USA) using a TECAN (Tecan Group Ltd., Männedorf, Switzerland) Genesis robot, following the manufacturer's instructions. The PCR reactions were performed from the 5' end with T3 primers and Big-Dye v3.0 labeling (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA), with some modifications of the manufacturer's instruction: 100 ng of template DNA was mixed with 0.5 μL of Big-Dye v3.0, 1.5 μL of dilution buffer (200 mM Tris-HCl pH 9.0, 5 mM MgCl_2), 5 pmol primer in a total volume of 5 μL . The PCR products were purified using the Montage sequencing reaction clean-up kit (Millipore), following the manufacturer's instructions, except for an extra washing step. Capillary electrophoresis was performed on an ABI prism 3100 sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) with 50-cm capillaries.

Data analysis and functional annotation. Chromatograms obtained after sequencing were treated with PHRED (Ewing et al. 1998) and Seqclean software (TGIR, the Institute for Genomic Research, Rockville, MD, USA) to remove vector sequences, nonreadable sequences, ribosomal RNA sequences, and mitochondrial sequences. No sequences identical to mitochondrial genes and no sequences from *E. coli* or other possible contaminants were found during a preliminary analysis without Seqclean. Clustering was performed using two TGICL programs, Megablast and CAP3 (Pertea et al. 2003). The setting for Megablast was 94% similarity on a minimum of 30 bps. The CAP3 setting was 93% similarity. Sequences were compared with the NIH nonredundant database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) using the BlastX program (Altschul et al. 1997) with default parameters. Alignments with an E-value of $< 10^{-4}$ were retained as significant matches. Sequences from both libraries were compared to the Munich Information Center for Protein Sequences *Arabidopsis thaliana* database (<http://mips.gsf.de/proj/plant/jsf/athal/tablejsp/index.jsp>) for a preliminary functional classification. Sequences identified in the GenBank database that did not present acceptable similarity (E-value $< 10^{-4}$) were annotated manually. Protein sequence alignments were obtained using DNAMAN program version 4.15 (Lynnon Corp., Quebec, Canada) and displayed using GENEDOC software (www.psc.edu/biomed/genedoc).

Differentially expressed transcripts in protoplasts and sporophytes were detected by using the significance test established by Audic and Claverie (1997). Given the number of available ESTs in each data set (1985 for protoplasts and 513 for sporophytes), a transcript must be present at more than 15 copies in the protoplast EST library to be statistically differentially expressed ($P > 0.95$) when no counterpart is present in the sporophyte library. Thus, all protoplast ESTs present in more than 15 copies were compared with the sporophyte EST library using the BlastN program (Altschul et al. 1997). An E-value $< 10^{-80}$ was selected to determine whether sequences were identical or not to distinguish transcripts from different members of a multigenic family.

Northern blotting analyses. Total RNA was separated (10 μg per lane) by agarose gel electrophoresis, blotted onto nylon

filters, and hybridized with ^{32}P -labeled random-primed probes prepared according to the manufacturer's recommendations (Amersham). Specific DNA probes were prepared by PCR on plasmid DNA using the following primers: AAATGGTTGAGACGCCCTTGG (forward) and GCCTTACGC-CACGCTTATAA (reverse) for a 531-bp vBPO-I subfamily 3' end probe (from the sporophyte vBPO1 clone; Colin et al. 2003); AGCGCACTCGCCTTCTGTA (forward) and CGTCTCTGCCGGCTGATTA (reverse) for a 687-bp vBPO-II subfamily 3' end probe (from the pLd006-F7 clone; this study); and TGGGTTTCACTCGCTTTGTG (forward) and GATGATCGCGCTCTTCTGC (reverse) for a 368-bp *RPL14* intragenic probe (from the pLd005-D10 clone; this study). Northern hybridizations were performed at 42° C overnight with 50% formamide, 7% SDS, 250 mM NaCl, 120 mM $\text{Na}(\text{PO}_4)$ pH 7.2. Membranes were washed for 10 min at 42° C successively in $2 \times \text{SSC}$, 0.1% SDS and in $1 \times \text{SSC}$, 0.1% SDS.

RESULTS

General features of Laminaria digitata protoplast ESTs. A total of 2270 single-pass nucleotide sequences were generated from the 5' ends of randomly chosen cDNA clones. After treatment of the data to remove vector and low quality sequences, 1985 (87%) sequences, with an average trimmed length of 500 bp, were retained for the assembly of contigs. A redundancy of 56% was found in this catalog of sequences. The redundancy reached a plateau (Fig. 1), and the sequencing effort required to get new data was observed to be high. The sequencing was thus brought to an end. Clustering of the ESTs resulted in 230 contigs and 854 singletons that were compared with the GenBank (NIH) nonredundant protein database (February 2004) using the BlastX program. Because of the few brown algal sequences available, an E-value $< 10^{-4}$ was considered a positive match. Using this criterion, 45% of the *Laminaria* ESTs showed significant amino acid sequence similarity to sequences in the database. The remaining sequences are referred to as "unidentified sequences." A complete list of all the ESTs with a match in the database, organized according to their putative cellular roles, and the contigs are provided at www.sb-roscoff.fr/laminaria.html. Of the 1985 ESTs analyzed in this

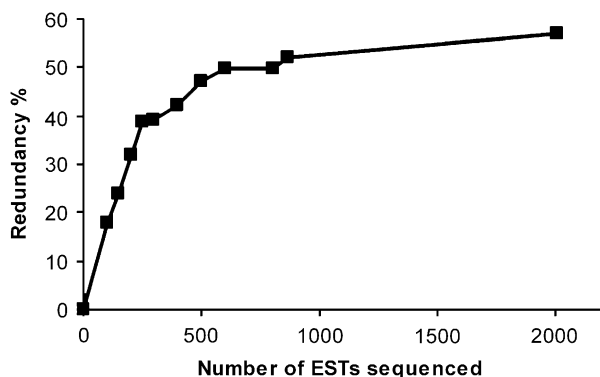


FIG. 1. Evolution of redundancy as a function of the number of ESTs sequenced from *Laminaria digitata* protoplasts.

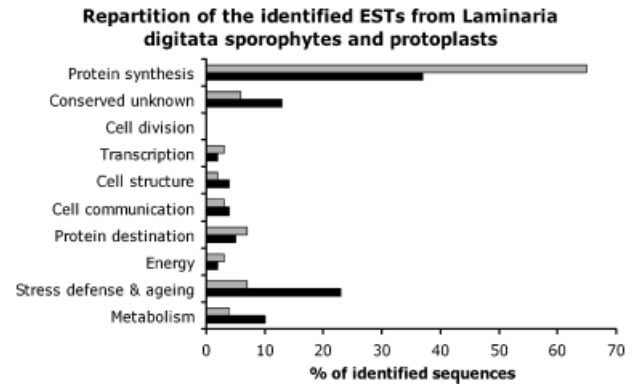


FIG. 2. Repartition of the identified ESTs from *Laminaria digitata* sporophytes (in gray) and protoplasts (in black).

study, 547 were identical using a BlastN search (i.e. with an E-value $< 10^{-60}$) to sequences generated in a previous project (Crépineau et al. 2000). The EST sequences have been deposited in GenBank (accession numbers CN466518 to CN468502).

Because the number of available sequences in the databank has increased exponentially since our previous *L. digitata* EST project (Crépineau et al. 2000), a new analysis of the sporophyte sequences was carried out using the same programs and the same identification criteria as those used in this study. Identical results to those previously published were obtained. This updated analysis allowed us to use the same functional classification for both sets of ESTs and thus to compare gene expression in the two physiological conditions.

Levels of gene expression in protoplast and sporophytes. Both set of sequences, from protoplasts and from sporophytes, were annotated manually and organized into 10 putative functional classes based on the classification used in the Munich Information Center for Protein Sequences *Arabidopsis thaliana* database. An additional class comprised all unidentified sequences (Fig. 2). The significance of the class comparison was correlated statistically according to Audic and Claverie (1997) with a confidence level of 0.95. In both data sets a large proportion of the ESTs belonged to the "protein synthesis" class, although this class was markedly less represented (37%) in protoplasts than in sporophytes (65%). In contrast, the ESTs involved in stress were much more abundant (23%) in protoplasts than in sporophytes (3%). For the other classes, the partition of the ESTs was similar for sporophytes and protoplasts.

The 10 major contigs from each catalog, which can be considered to correspond to the most abundant transcripts, are listed in Table 1. Interestingly, the most frequently occurring ESTs in the sporophyte database encoded vBPOs, and these genes were also highly expressed in protoplasts (ctg P1A and ctg P1B, Table 1). As already noted by Crépineau et al. (2000), other abundant transcripts in the sporophyte included cDNAs encoding ribosomal proteins and the elonga-

TABLE 1. The 10 largest *Laminaria digitata* protoplast and sporophyte EST clusters.

Origin	Sequence name	Number of ESTs	Length (bp)	Putative identification	Functional class	E-value
Protoplasts	ctg P 2	50	2670	Heat shock protein 70	Stress	0
	ctg P 1A	37	2047	Bromoperoxidase	Stress	8.00×10^{-85}
	ctg P 1B	35	2678	Bromoperoxidase	Stress	1.00×10^{-84}
	ctg P 3	38	1997	Unknown	Unknown	2.00×10^{-3}
	ctg P 4	27	2175	Hypothetical protein	Conserved unknown	7.00×10^{-15}
	ctg P 5	24	2350	Single tandem repeat	Conserved unknown	5.00×10^{-56}
	ctg P 6	22	953	Guanine nucleotide binding protein	Cell communication	1.00×10^{-123}
	ctg P 8	21	1579	Glutathione-S-transferase	Stress	3.00×10^{-20}
	ctg P 9	20	1598	Elongation factor 1 alpha	Protein synthesis	1.00×10^{-172}
	ctg P 10	17	1841	6-Phospho-gluconate-dehydrogenase	Metabolism	0
	ctg P 11	15	1037	Ribosomal protein S9	Protein synthesis	1.00×10^{-62}
Sporophytes	ctg S 2	10	749	Ribosomal protein S8	Protein synthesis	4.00×10^{-45}
	ctg S 3	8	646	Ubiquitin ribosomal protein L32 fusion protein	Protein destination	2.00×10^{-5}
	ctg S 5	7	576 bp	Ribosomal protein L19	Protein synthesis	4.00×10^{-47}
	ctg S 6	7	438 bp	Ribosomal protein L26	Protein synthesis	4.00×10^{-24}
	ctg S 7	7	683 bp	Unknown protein	Unknown	4.80×10^{-2}
	ctg S 8	6	549 bp	Ribosomal protein L13a	Protein synthesis	2.00×10^{-63}
	ctg S 9	6	413 bp	Ribosomal protein L14	Protein synthesis	2.00×10^{-25}
	ctg S 10	6	705 bp	Elongation factor 1 alpha	Protein synthesis	1.00×10^{-102}
	ctg S 12	5	410 bp	Ribosomal protein L10	Protein synthesis	6.00×10^{-25}
	ctg S 13	4	437 bp	Ribosomal protein L17	Protein synthesis	2.00×10^{-63}

Sporophyte sequences (Crépineau et al. 2000) were analyzed using the same annotation process as protoplast. "Stress" represents the stress defense and aging class.

tion factor EF-1 α (i.e. ESTs falling into the "protein synthesis" class). In protoplasts, several highly abundant ESTs were identified as stress genes encoding, for example, heat shock protein 70 (HSP-70), vBPOs, and GST.

Using a statistical comparison (Audic and Claverie 1997), we determined which transcripts were differentially expressed in protoplasts and sporophytes. This analysis (Table 2) clearly showed that five transcripts were significantly more abundant in protoplasts compared with sporophyte. They included cDNAs encoding an HSP-70, a vBPO (ctg P1A), and a GST. Two transcripts with unknown functions were also expressed at a significantly higher level in protoplasts.

Expression of stress genes in protoplasts. A complete list of the protoplast ESTs putatively identified as "stress and defense" genes is given in Table 3. Note that in addition to the highly expressed transcripts already detailed above (HSP-70, vBPO, and GST),

three other contigs (Ctg P19, P54, and P78), containing 10, 6, and 4 ESTs, also encoded GSTs. Alignments of the deduced amino acid sequences confirmed that these corresponded to four different proteins all showing similarity to the sigma class of GST (data not shown). Another interesting contig made of six ESTs encoded a thioredoxin (Ctg P50). Analysis of the deduced amino acid sequence indicated that Ctg P50 consists of a complete open reading frame including a typical plastidial signal sequence (Y. Meyer, personal communication). Another well-represented family of proteins in the stress class was the HSP-90s, consisting of two different contigs (Ctg P40 and P158).

In total, 8.5% of the identified sequences (i.e. 76 transcripts) exhibited similarity to vBPOs, making it the most abundant group of ESTs in the protoplasts data set. The vBPOs were also well represented in the sporophyte EST library with 12 transcripts, represent-

TABLE 2. Expression level of the 10 largest clusters from the protoplasts ESTs compared with the sporophyte ESTs.

Sequence name	Number of ESTs	Length (bp)	Identification	Differential expression ^a	Confidence value ^a
ctg P 2	50	2670	Heat shock protein 70	Protoplasts > sporophyte	0.99
ctg P 1 A	37	2047	Bromoperoxidase	Protoplasts > sporophyte	0.99
ctg P 1 B	35	2678	Bromoperoxidase	No	0.85
ctg P 3	38	1997	Unknown	Protoplasts > sporophyte	0.99
ctg P 4	27	2175	Hypothetical protein	Protoplasts > sporophyte	0.98
ctg P 5	24	2350	Single tandem repeat	No	0.85
ctg P 6	22	953	Guanine nucleotide binding protein	No	0.55
ctg P 8	21	1579	Glutathione-S-transferase	Protoplasts > sporophyte	0.99
ctg P 9	20	1598	Elongation factor 1 alpha	No	0.10
ctg P 10	17	1841	6-Phospho-gluconate-dehydrogenase	No	0.85
ctg P 11	15	1037	Ribosomal protein S9	Sporophyte > protoplasts	0.99

"No" refers to no difference in the expression level in protoplasts compared with sporophytes.

^aFor details see Materials and Methods.

TABLE 3. Sequences identified as stress related in the *Laminaria digitata* protoplast EST library.

Sequence name	E-value	Putative identification	Id access	Number of sequences
Ctg P 2	0.0	Heat shock protein 70 [<i>A. thaliana</i>]	GI:15230534	50
Ctg P 1A	1.0×10^{-176}	Vanadium-dependent bromoperoxidase 2 [<i>L. digitata</i>]	GI:32329414	37
Ctg P 1B	0.0	Vanadium-dependent bromoperoxidase 2 [<i>L. digitata</i>]	GI:32329414	35
Ctg P 8	3.0×10^{-20}	Glutathione-S-transferase [<i>Solenopsis invicta</i>]	GI:32330663	21
Ctg P 19	7.0×10^{-10}	Glutathione-S-transferase (gst-19) [<i>Caenorhabditis elegans</i>]	GI:17533789	10
Ctg P 40	1.0×10^{-18}	Heat shock protein 90 [<i>Achlya ambisexualis</i>]	GI:22086550	7
Ctg P 50	4.0×10^{-09}	Thioredoxin like 5 [<i>A. thaliana</i>]	GI:4973264	6
Ctg P 54	3.0×10^{-21}	Glutathione-S-transferase (GST sigma)	GI:6225491	6
Ctg P 75	2.0×10^{-27}	Vanadium-dependent bromoperoxidase 2 [<i>L. digitata</i>]	GI:32329414	4
Ctg P 78	3.0×10^{-18}	Glutathione-S-transferase [<i>Solenopsis invicta</i>]	GI:32330663	4
Ctg P 145	2.0×10^{-35}	Chaperonin subunit CCTV gamma [<i>Oxytricha granulifera</i>]	GI:1906364	2
Ctg P 158	7.0×10^{-69}	Heat shock protein 90 [<i>Achlya ambisexualis</i>]	GI:22086550	2
Ctg P 161	2.0×10^{-51}	Thioredoxin family protein [<i>A. thaliana</i>]	GI:15234516	2
Ctg P 207	7.0×10^{-34}	Antioxidant, ahpc/Tsa family [<i>Shewanella oneidensis</i>]	GI:24376113	2
PLd 013F06	1.0×10^{-22}	Mercuric reductase [<i>Nostoc</i> sp.]	GP:BAF76884	1
PLd 022E08	3.0×10^{-30}	Mercuric reductase [<i>Nostoc</i> sp.]	GP:BAF76884	1
PLd 001E10	1.0×10^{-19}	Peroxiredoxin Q [<i>Sedum lineare</i>]	GP:BAA90524	1
PLd 001E11	2.0×10^{-19}	Tcst1 [<i>Trypanosoma cruzi</i>]	GP:AAC97378	1
PLd 003H06	8.0×10^{-23}	Stress-induced protein sti1 like protein [<i>A. thaliana</i>]	GP:CAB78283	1
PLd 014A11	5.0×10^{-12}	Cell death suppressor protein [<i>Nostoc</i> sp.]	GP:BAF73796	1
PLd 022D12	4.0×10^{-24}	Methionine sulfoxide reductase [<i>Lactuca sativa</i>]	GP:AAF19789	1

ing 4.7% of the identified sequences. These genes have been shown to form a large multigenic family in *L. digitata*, and two of the previously identified cDNAs in the sporophyte, vBPO1 and vBPO2, share 99.2%

and 99.5% identity at the nucleotide and protein levels, respectively (Colin et al. 2003). The detailed sequence analysis of the three protoplast contigs in comparison with vBPO1 protein sequence showed that they are

vBPO1	MKSSISGLTALLAAAPCLGYEEPP...P...TQPLLSGVNCRVRDSDLDFLDVPRAKVTILKRLAIKAEISVGPTCHINNGDEENVPLFAGQYHKTLPHDKFGQVDEDAV	107
CtgP1B	-
CtgP75	MKSFVGLTALLAAAPCFAGGDHDEVRATILPLLSGVNCRVRDSDLDFLDVPRATVTLKRLAIKAEISVGPTCHINNGDEENVPLFAGQYHKSLPHDKFGQVDAADV	108
CtgP1A	-
vBPO1	KKLLKCVFTSDINMDKVPSCAGRRGGAKLINELGGTAHQVTGADSDNVFITTPDSLLSERLAAQQAEEVYWMALTRDVFEGEFAKNDYVRLAAENLQGLPAFKGLNIPR	216
CtgP1B	18
CtgP75	QKLLKCVFTSDINMDKVPSCAGRRGGAKLINELGGTAHQVTGADSDNVFITTPDALLSERLAAQQAEEVYWMALTRDVFEGEFAKNDYVRLAAENLQGLPAFKGLNIPR	217
CtgP1A	-
vBPO1	SEGGKIDPVTDLFRFTTWPGVTTGPVVSQFMLSDFLIDSIVKTPKADPLTPGVDMYTAFOQWLDVQNGASKLETTEDEENPRFIRNGRDLATIALRDQLYTEAFRAALI	324
CtgP1B	SEGGKIDPVTDLFRFTTWPGVTTGPVVSQFMLSDFLIDSIVKTPKADPLTPGVDMYTAFOQWLDVQNGASKLETTEDEENPRFIRNGRDLATIALRDQLYTEAFRAALI	126
CtgP75	NADG.....	221
CtgP1A	NADGIDPVTDLFRFTTWPGVTTGPVVSQFMLSDFLIDSIVKTPKADPLTPGVDMYTAFOQWLDVQNGASKLETTEDEENPRFIRNGRDLATIALRDQLYTEAFRAALI	109
vBPO1	LFTEGALGGEVGPYAEARQQGFATFCEPHILTAMASASSVTRHAWYAKQVHRMLRPEAYGALVHNTLMRDVITPLPDSILRNTELLNRVEVHNQRMNPDGEKTFLLP	433
CtgP1B	LFTEGALGGEVGPYAEARQQGFATFCEPHILTAMASASSVTRHAWYAKQVHRMLRPEAYGALVHNTLMRDVITPLPDSILRNTELLNRVEVHNQRMNPDGEKTFLLP	235
CtgP75	-
CtgP1A	LFSESVLGGSGPYAESIRQQGFATFCEPHILTAMASASSVTRHAWYAKQVHRMLRPEAYGALVHNTLMRDVITPLPDSILRNTELLNRVEVHNQRMNPDGEKTFLLP	218
vBPO1	MAAAQGSPTHPAYPSGHAINNGAYITALKAFGLYEAGQKCFNPVVSNDGTRKRIKYKPSGREIVGECVNEKGKLEGLTYEGELNKSANVLLGRSHIGVHWRMDGVY	542
CtgP1B	MAAAQGSPTHPAYPSGHAINNGAYITALKAFGLYEAGQKCFNPVVSNDGTRKRIKYKPSGREIVGECVNEKGKLEGLTYEGELNKSANVLLGRSHIGVHWRMDGVY	344
CtgP75	-
CtgP1A	MAAAQGSPTHPAYPSGHAINNGAYITALKAFGLYEAGQKCFNPVVSNDGTRKRIKYKPSGREIVGECVNEKGKLEGLTYEGELNKSANVLLGRSHIGVHWRMDGVY	327
vBPO1	GALMGETSCVRLQOELPGLPEAREVEGKKRRGDIIPATYKFRLYSGKILELYGRNLYKLDGKLCGAFGTGDDFCDDPDEDDYSSFDIVVEHAQFSIHGHTEL	646
CtgP1B	GALMGETSCVRLQOELPGLPEAREVEGKKRRGDIIPATYKFRLYSGKILELYGRNLYKLDGKLCGAFGTGDDFCDDPDEDDYSSFDIVVEHAQFSIHGHTEL	448
CtgP75	-
CtgP1A	GALMGETSCVRLQOELPGLPEAREVEGKKRRGDIIPATYKFRLYSGKILELYGRNLYKLDGKLCGAFGTGDDFCDDPDEDDYSSFDIVVEHAQFSIHGHTEL	428

FIG. 3. Amino acid sequence alignment of vanadium-dependent bromoperoxidases from *Laminaria digitata*. vBPO1, vanadium-dependent bromoperoxidase 1 protein characterized from the sporophyte (EMBL accession number AJ491786); CtgP75, CtgP1A, CtgP1B, translated sequences of the Ctg P75, Ctg P1A, and Ctg P1B sequences, respectively, obtained from protoplast EST analysis. Conserved residues with vBPO1 are indicated by white capitals on a black background. The amino acid residues associated with the active site vanadium cofactor are indicated by the number (#) symbol.

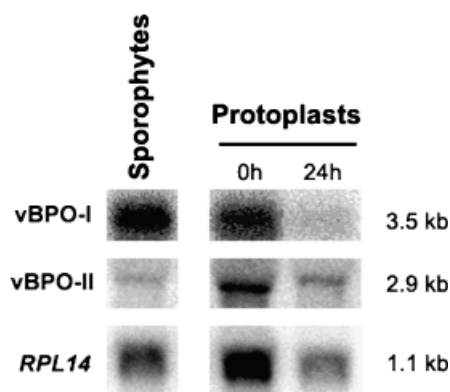


FIG. 4. Expression of bromoperoxidases in *Laminaria digitata* sporophytes and during protoplast culture. Northern blot analyses were performed using 3' end specific probes of vBPO-I and vBPO-II subfamilies identified from *L. digitata* protoplasts EST analysis. The same blot was hybridized using a ribosomal protein probe (*RPL14*) as a standard, and the sizes of the transcripts are indicated on the right.

organized in two subfamilies (Fig. 3). One subfamily, designated vBPO-I, includes Ctg P1B (35 ESTs) together with vBPO1 and vBPO2, whereas a new subfamily, vBPO-II, contains Ctg P1A (37 ESTs) and Ctg P75 (4 ESTs). The two subfamilies share around 71% sequence identity at the protein level, and they both featured the eight residues known to be essential for the catalytic activity and for the fixation of the vanadium cofactor in algal bromoperoxidases (Weyand et al. 1999). To further investigate the expression pattern of these genes, transcript levels were monitored in sporophytes and at 0 and 24 h after isolation of protoplasts, using specific 3' end-probes corresponding to each vBPO subfamily. The vBPO-I transcripts were much more abundant than vBPO-II transcripts in sporophytes (Fig. 4). The two classes of transcripts were detected at 0 h in protoplasts (i.e. immediately after the removal of the cell wall). Even though, as revealed by the level of *RPL14* mRNA, the total amount of transcript was low, we were able to detect vBPO-II transcripts after 24 h, whereas vBPO-I transcripts had almost disappeared at this stage.

Other remarkable ESTs in the protoplast library. A well-represented group of sequences in the protoplast library, consisting of 22 ESTs, is predicted to encode Man-C5-E, an enzyme involved in cell-wall synthesis (Nyvall et al. 2003). Six different cDNAs from *L. digitata* (Man-C5-[E1–E6]), coding for this enzyme, have already been characterized in *L. digitata*, forming a multigenic family (Nyvall et al. 2003). Two ESTs were identical to Man-C5-E1, 1 EST was identical to Man-C5-E5, and the remaining 19 ESTs were found to be nonredundant and can thus be considered to correspond to novel Man-C5-E genes.

It is also worth noting that 10 protoplast ESTs presented significant amino acid sequence similarity to putative open reading frames from the sequenced genome of the *Ectocarpus siliculosus* virus EsV-1 (Dela-

roque et al. 2001). Among these 10 sequences, 2 matched with EsV-1–7, 5 ESTs matched EsV-1–164, 2 ESTs matched EsV-1–2, and 1 EST matched EsV-1–163. So far, the functions of the corresponding proteins have not been established.

DISCUSSION

Stress-related genes are up-regulated in protoplasts. The numerous stresses that protoplasts undergo during enzymatic maceration lead to disruption of the cellular homeostasis and enhance the generation of ROS. Oxidative stress is thus probably the major stress during and after the isolation phase. Given the high primary titer (1×10^6 pfu), the protoplast library is expected to be representative of the cellular transcript pool. One can therefore anticipate a correlation between the type and number of cDNAs in the library and the pattern of expressed genes in protoplast cells (Ohlrogge and Benning 2000). As shown in Figure 2, stress genes were strongly expressed in protoplasts compared with the unstressed sporophyte stage. More than 23% of the identified ESTs belonged to the “stress defense and aging” class, which was three times larger than in the sporophyte database. It is, however, noteworthy that most of these stress ESTs, particularly the most highly expressed sequences, are related to only a small number of genes (Table 4) (i.e. HSP-70, vBPO, GST, HSP-90, and thioredoxin), which thus appear to have a key role in the stress physiology of *L. digitata*. Their expression levels could be valuable biomarkers for monitoring stress in natural and cultivated kelps.

Comparison of the two *L. digitata* EST catalogs unraveled transcripts that showed a significant increase in abundance in protoplasts. The largest cluster is predicted to encode an HSP-70. In addition, two other contigs, Ctg P40 and Ctg P158, were predicted to encode HSP-90s. HSP-70 and HSP-90 are known to play a crucial role in the recovery of cells from stress (Nollen and Morimoto 2002) and are usually encoded in eukaryotes by highly conserved multigene families. In normal conditions, HSP-70 has chaperone activities and assists the folding of newly synthesized proteins. Under stress conditions, including oxidative stress, HSP-70 prevents protein aggregation (Sheffield et al. 1990) and allows the refolding of denatured proteins (Lee et al. 1995). HSP-70 has also been shown to protect mammalian cells from stress-induced apoptosis (Gurbuxani et al. 2001). The higher number of HSP-coding ESTs in the protoplast library, when compared with the sporophyte EST library, could thus reveal the necessity for the cell to protect proteins from oxidation damage and to prevent the initiation of cell death.

The expression of genes encoding antioxidant enzymes displayed an unexpected pattern. The second major class of strongly expressed transcripts in protoplasts is predicted to encode vBPOs. In marine algae, the vBPO enzymes through the production of halo-ganic

compounds are thought to be part of a protection system against pathogen attack (Potin et al. 2002) and to be involved in the scavenging of harmful H_2O_2 (Manley 2002). Transcripts coding for vBPO-I and vBPO-II subfamily genes were among the most abundant transcripts within the stress class. A previously unidentified gene subfamily, vBPO-II, was the most represented among them, thus suggesting that these genes are specifically induced in protoplast cells. This was confirmed by Northern blot experiments showing that vBPO-II genes are not expressed in sporophytes under normal conditions but are highly induced after protoplast isolation. These results are in agreement with previous studies which indicate that specific bromoperoxidase isoforms are up-regulated in *L. saccharina* 14 h after protoplast isolation (Jordan et al. 1991). Protoplasts must cope with the high level of toxic ROS generated during isolation, and thus in *L. digitata*, vBPO-II proteins could have an active role as ROS-scavenging enzymes.

Also induced in the protoplasts, putative chloroplastic thioredoxin and thioredoxin reductases are components of the thioredoxin system, which is essential for redox regulation (Arner and Holmgren 2000). Usually, thioredoxins are induced during the oxidative stress response in bacteria, yeast, and mammals (Muller 1991, Ritz et al. 2000). In addition, 19 ESTs encoding 6-phospho-gluconate-dehydrogenase were listed in the metabolism class. This enzyme is a component of the oxidative pentose phosphate pathway, a major source of reducing power (NADPH) for protecting cells from oxidative stress (Kruger and von Schaeuwen 2003). We assume that the up-regulation of the 6-phospho-gluconate-dehydrogenase in protoplasts is due to its ability to produce NADPH that can be used to maintain the redox equilibrium of the cell. Interestingly, no ESTs coding for other key enzymes of ROS scavenging, such as catalase, superoxide dismutase, glutathione peroxidase, or ascorbate peroxidase, which are typically strongly expressed by cells under oxidative stress conditions (Mittler 2002), were identified in *L. digitata* protoplasts. These proteins are usually well conserved at the amino acid level among eukaryotes, and if present, their transcripts would probably have been identified.

Glutathione-S-transferases showing significant similarity to the sigma class were strongly expressed in *L. digitata* protoplasts. These GSTs have been found in almost all organisms, including prokaryotes (Edwards et al. 2000), and are generally considered to be detoxifying enzymes (Marrs 1996, Armstrong 1997, Hayes and McLellan 1999). They catalyze the conjugation of the tripeptide glutathione to a variety of hydrophobic, electrophilic, and usually cytotoxic substrates. The conjugates are then targeted to the appropriate cellular compartment, usually the vacuole in plants. The role of GSTs in oxidative stress and in defense has been well documented (Marrs 1996, Hayes and McLellan 1999). So far, sigma type GSTs have been found only in mammals, and this is the first report of such a GST in a photosynthetic organism. Sigma class GSTs have been

shown to detoxify exogenous toxic products, to metabolize lipid peroxidation products, and to display a prostaglandin synthase activity in mammals (Hayes and McLellan 1999). Interestingly four ESTs encoding an ATP-binding cassette transport protein were found, whereas none was found in the sporophyte. It is tempting to postulate here that GSTs and ATP-binding cassette transport protein are here involved in the same detoxifying pathway.

Cell wall modifications and assembly. Another putative role of vBPOs is related to the oxidative cross-linking of alginates and polyphenols, leading to algal adhesion and/or cell wall strengthening (Berglin et al. 2004). These enzymes should also take part in cell wall assembly, as suggested by the enhancement of vBPO activities in cell-wall regenerating protoplasts of *L. saccharina* (Jordan et al. 1991). Although the localization of the different *L. digitata* vBPOs is not known yet, some isoforms of vBPO enzymes were reported to be extracellular in Fucales (Krenn et al. 1989) and in giant kelps (Butler et al. 1990, Jordan et al. 1991). In protoplasts, cell wall removal could deprive the algal cells from essential apoplast-localized enzymes and thus induce transcriptional activation of vBPOs.

Only transcripts coding for Man-C5-E were unambiguously identified and recognized as proteins implicated in cell wall synthesis. This enzyme catalyzes the epimerization of β -1,4-D-mannuronic acid to α -1,4-L-guluronic acid, the final step in alginate biosynthesis (Madgwick et al. 1973). *Laminaria digitata* harbors a variety of Man-C5-E genes, and this study allowed the isolation of several new ones. Identification of these transcripts was expected because specific Man-C5-E had already been demonstrated in *L. digitata* protoplasts cultures (Nyvall et al. 2003). It additionally provides evidence that genes involved in cell-wall synthesis are truly expressed in protoplasts. Man-C5-E genes were shown to exhibit significant similarity with the coat protein GP1 from a virus (EsV-1) that infects the filamentous brown alga *Ectocarpus siliculosus* (Dillwyn) (Delaroque et al. 2001). In addition, phylogenetic analyses have shown that *L. digitata* Man-C5-E proteins constitute a monophyletic group that includes the EsV-1 protein GP1 (Nyvall et al. 2003). As mentioned before, many other interesting similarities with *L. digitata* genes can be found within the EsV-1 genome, although no putative function could be assigned to these proteins. Yet, this raises the question of the origin and biological function of those genes. It has been suggested that Man-C5-Es are encoded by genuine brown algal genes rather than by recently imported genes of viral origin (Nyvall et al. 2003). One can propose that the viral homologues have arisen by lateral transfer to EsV-1 virus, where they could take part in the infection process, which could involve cell-wall modifying enzymes.

Comparison of ESTs from protoplasts. In a similar project, we studied ESTs from protoplasts and thallus of the red alga *Chondrus crispus* (Stackhouse) (Collén

et al. 2006). This allowed for a comparison between two nonrelated photosynthetic organisms from the same environment during similar treatments. We can therefore, together with literature data, draw some more general conclusions about protoplast physiology and gene expression during cell wall regeneration. Homologues to genes statistically over-represented in *L. digitata* protoplasts, such as HSP-70, vBPO, Ctg P4, and GST, were also over-represented in *C. crispus*. Over-expressed genes in *C. crispus* protoplasts with match against ESTs from *L. digitata* protoplasts also included polyubiquitin (three ESTs from protoplasts, none in thallus). Similarly, protoplast from *Brassica campestris* showed several ESTs for GST, ubiquitin, and peroxidases, out of 515 ESTs (Kwak et al. 1997), and in *Petunia hybrida* protoplast ESTs, GST, polyubiquitin, peroxidase, and HSP were found (Yu et al. 1999). This suggests that HSP-70, peroxidases, polyubiquitin, contig 4, and GST represent important genes for protoplast physiology common to the two nongreen photosynthetic lineages, and all but ctgP4 are also important for higher plants. From these experiments, however, it is difficult to separate stress genes from genes important for cell wall regeneration because the processes occur simultaneously. Because the cell walls of *C. crispus* and *L. digitata* are not closely related (the principal component of *C. crispus* cell wall is carrageenan and in *L. digitata* it is alginates) we did not expect to find genes important for cell wall synthesis being similar in the two species.

When the functional annotation is compared, one finds that both *C. crispus* and *L. digitata* protoplasts increased stress-related genes, genes important for cell organization, and conserved hypothetical proteins; and both had decreased number of ESTs involved in protein synthesis. After removal of the cell wall, both algal species try to reduce stress and effects of stress damage through induction of genes such as HSP, vBPO, polyubiquitin, and GST. Genes important for cellular organization such as the integrin-like gene in *C. crispus* and actin in *L. digitata* are induced in an effort to regain homeostasis and possibly induced for reprogramming of the protoplasts to achieve total regeneration.

Conclusion. Keeping in mind that an approach based on a small-scale study of ESTs from protoplast cells is rather descriptive, one can infer some major trends relating to the way the brown alga *L. digitata* acts in response to a severe oxidative stress. One major original trait is expression of vBPOs, and more specifically vBPO-II subfamily genes, probably as a ROS scavenging pathway. It is therefore reasonable to assume that *L. digitata* makes use of this diversity of enzyme isoforms, to dedicate specific bromoperoxidases to the ROS scavenging. The other major trend that can be inferred from these data is that a second line of defense against ROS, required to detoxify intracellular secondary oxidation products, is provided by sigma GSTs.

As mentioned earlier, *L. digitata* protoplasts are confronted with major stresses, oxidative stress being the most severe. Alteration of redox homeostasis is thought to affect the regeneration potential of plant protoplasts as well as the protoplast fate and is decisive for allowing cells to reenter cell cycle and regenerate a whole plant (Papadakis et al. 2001). Protoplasts isolated from *L. digitata* are recalcitrant in culture except when the donor plants are young undifferentiated seedlings (Benet et al. 1997). The data presented in this report thus provide some molecular information that may help to understand the mechanisms underlying the switch from totipotent cells to dedifferentiated cells. More generally, this study now allows us to further investigate the regulation of the *L. digitata* transcriptome under various physiological conditions. For example, using cDNA microarray technology, we can now envisage a more precise description of the networks of genes that are involved in defense response, osmotic stress, and cell-wall regeneration.

We thank Yves Meyer for help with the thioredoxin genes analysis and Philippe Potin and Mark Cock for critical reading of the manuscript. V. R was supported by a Ph.D. fellowship from Région Bretagne (N°A2CA27). This research was supported by a grant from the Programme de Séquençage à Grande Echelle Program of the Ministry of Education and Research and was made possible by the financial support of Région Bretagne through the GENOMER CPER 2000–2004 Program and Ouest-Genopole®.

- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. & Lipman, D. J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25:3389–3402.
- Apt, K. E., Clendennen, S. K., Powers, D. A. & Grossman, A. R. 1995. The gene family encoding the fucoxanthin chlorophyll proteins from the brown alga *Macrocystis pyrifera*. *Mol. Gen. Genet.* 20:455–64.
- Armstrong, R. N. 1997. Structure, catalytic mechanism, and evolution of the glutathione transferases. *Chem. Res. Toxicol.* 10: 2–18.
- Arner, E. S. & Holmgren, A. 2000. Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. *Eur. J. Biochem.* 267:6102–9.
- Audic, S. & Claverie, J. M. 1997. The significance of digital gene expression profiles. *Genome Res.* 7:986–95.
- Baker, C. J. & Orlandi, E. W. 1995. Active oxygen in plant pathogenesis. *Annu. Rev. Phytopathol.* 33:299–321.
- Baldauf, S. L. 2003. The deep roots of eukaryotes. *Science* 300:1703–6.
- Benet, H., Ar Gall, E., Asensi, A. & Kloareg, B. 1997. Protoplast regeneration from gametophytes and sporophytes of some species in the order Laminariales (Phaeophyceae). *Protoplasma* 199:39–48.
- Benet, H., Bruss, U., Duval, J. C. & Kloareg, B. 1994. Photosynthesis and photoinhibition in protoplasts of the marine brown alga *Laminaria saccharina*. *J. Exp. Bot.* 45:211–20.
- Berglin, M., Delage, L., Potin, P., Vilter, H. & Elwing, H. 2004. The enzymatic cross-linking of a phenolic polymer extracted from the marine alga *Fucus serratus*. *Biomacromolecules* 5:2376–83.
- Butler, A., Soedjak, H. S., Polne-Fuller, M., Gibor, A., Boyen, C. & Kloareg, B. 1990. Studies of vanadium-bromoperoxidase using surface and cortical protoplasts of *Macrocystis pyrifera* (Phaeophyta). *J. Phycol.* 26:589–92.
- Butler, D. M., Ostgaard, K., Boyen, C., Evans, L. V., Jensen, A. & Kloareg, B. 1989. Isolation conditions for high yields of

- protoplasts from *Laminaria saccharina* and *L. digitata* (Phaeophyceae). *J. Exp. Bot.* 40:1237–46.
- Colin, C., Leblanc, C., Michel, G., Wagner, E., Leize-Wagner, E., Van Dorselaer, A. & Potin, P. 2005. Vanadium-dependent iodoperoxidases in *Laminaria digitata*, a novel biochemical function diverging from brown algal bromoperoxidases. *J. Biol. Inorg. Chem.* 10:156–66.
- 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 bromoperoxidase and iodoperoxidase activities. *J. Biol. Chem.* 278:23545–52.
- 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).
- Crépineau, 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.* 43:503–13.
- De Martino, A., Douady, D., Quinet-Szely, M., Rousseau, B., Crépineau, F., Apt, K. & Caron, L. 2000. The light-harvesting antenna of brown algae: highly homologous proteins encoded by a multigene family. *Eur. J. Biochem.* 267:5540–9.
- Delaroque, N., Muller, D. G., Bothe, G., Pohl, T., Knippers, R. & Boland, W. 2001. The complete DNA sequence of the *Ectocarpus siliculosus* Virus EsV-1 genome. *Virology* 287:112–32.
- Edwards, R., Dixon, D. P. & Walbot, V. 2000. Plant glutathione S-transferases: enzymes with multiple functions in sickness and in health. *Trends. Plant Sci.* 5:193–8.
- Ewing, B., Hillier, L., Wendl, M. & Green, P. 1998. Base calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. *Genome Research* 8:175–85.
- Gurbuxani, S., Bruey, J. M., Fromentin, A., Larmonier, N., Parcelier, A., Jaattela, M., Martin, F., Solary, E. & Garrido, C. 2001. Selective depletion of inducible HSP70 enhances immunogenicity of rat colon cancer cells. *Oncogene* 20:7478–85.
- Hayes, J. D. & McLellan, L. I. 1999. Glutathione and glutathione-dependent enzymes represent a coordinately regulated defence against oxidative stress. *Free. Radic. Res.* 31:273–300.
- Jordan, P., Kloareg, B. & Vilter, H. 1991. Detection of vanadate-dependent bromoperoxidases in protoplasts from the brown algae *Laminaria digitata* and *L. saccharina*. *J. Plant Physiol.* 137:520–4.
- Kloareg, B. & Quatrano, R. S. 1988. Structure of the cell walls of marine algae and ecophysiological functions of the matrix polysaccharides. *Oceanogr. Mar. Biol. Annu. Rev.* 20:259–315.
- Krenn, B. E., Tromp, M. G. M. & Wever, R. 1989. The brown alga *Ascophyllum nodosum* contains two different vanadium bromoperoxidases. *J. Biol. Chem.* 32:19287–92.
- Kruger, N. J. & Von Schaewen, A. 2003. The oxidative pentose phosphate pathway: structure and organisation. *Curr. Opin. Plant Biol.* 6:236–46.
- Küpper, F. C., Kloareg, B., Guern, J. & Potin, P. 2001. Oligoguluronates elicit an oxidative burst in the brown algal kelp *Laminaria digitata*. *Plant Physiol.* 125:278–91.
- Küpper, F. C., Müller, D. G., Peters, A. F., Kloareg, B. & Potin, P. 2002. Oligoalginat recognition and oxidative burst play a key role in natural and induced resistance of sporophytes of Laminariales. *J. Chem. Ecol.* 28:2057–81.
- Küpper, F. C., Schweigert, N., Ar Gall, E., Legendre, J. M., Vilter, H. & Kloareg, B. 1998. Iodine uptake in laminariales involves extracellular, haloperoxidase mediated oxidation of iodide. *Planta* 207:163–71.
- Kwak, J. M., Kim, S. A., Hong, S. W. & Nam, H. G. 1997. Evaluation of 515 expressed sequence tags obtained from guard cells of *Brassica campestris*. *Planta* 202:9–17.
- Le Gall, Y., Brown, S., Marie, D., Mejjad, M. & Kloareg, B. 1993. Quantification of nuclear cDNA and G-C content in marine macroalgae by flow cytometry of isolated nuclei. *Protoplasma* 173:123–32.
- Lee, G. J., Pokala, N. & Vierling, E. 1995. Structure and *in vitro* molecular chaperone activity of cytosolic small heat shock proteins from pea. *J. Biol. Chem.* 270:10432–8.
- Lewis, R. J. 1996. Chromosomes of the brown algae. *Phycologia* 35:19–40.
- Madgwick, J., Haug, A. & Larsen, B. 1973. Polymannuronic acid 5-epimerase from the marine alga *Pelvetia canaliculata* (L.) Dcne. et Thur. *Acta Chem. Scand.* 27:3592–4.
- Maheswari, U., Montsant, A., Goll, J., Krishnasamy, S., Rajyashri, K. R., Morawala Patell, V. & Bowler, C. 2005. The diatom EST data base. *Nucleic Acids Res.* 33:D344–7.
- Manley, S. L. 2002. Phytochemistry of halomethanes: a product of selection or a metabolic accident? *Biogeochemistry* 60:163–80.
- Marrs, K. A. 1996. The functions and regulation of glutathione S-transferases in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47:127–58.
- Mittler, R. 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends. Plant Sci.* 7:405–10.
- Moulin, P., Crépineau, F., Kloareg, B. & Boyen, C. 1999. Isolation and characterization of six cDNAs involved in carbon metabolism in *Laminaria digitata* (Phaeophyceae). *J. Phycol.* 35:1237–45.
- Muller, E. G. 1991. Thioredoxin deficiency in yeast prolongs S phase and shortens the G1 interval of the cell cycle. *J. Biol. Chem.* 266:9194–202.
- Nollen, E. A. & Morimoto, R. I. 2002. Chaperoning signaling pathways: molecular chaperones as stress-sensing “heat shock” proteins. *J. Cell Sci.* 115:2809–16.
- Nyval, P., Corre, E., Boisset, C., Barbeyron, T., Rousvoal, S., Scornet, D., Kloareg, B. & Boyen, C. 2003. Characterization of mannuronan C-5-epimerase genes from the brown alga *Laminaria digitata*. *Plant Physiol.* 133:726–35.
- Ohlrogge, J. & Benning, C. 2000. Unraveling plant metabolism by EST analysis. *Curr. Opin. Plant Biol.* 3:224–8.
- Papadakis, A. K., Siminis, C. I. & Roubelakis-Angelakis, K. A. 2001. Reduced activity of antioxidant machinery is correlated with suppression of totipotency in plant protoplasts. *Plant Physiol.* 126:434–44.
- Pertea, G., Huang, X., Liang, F., Antonescu, V., Sultana, R., Karamycheva, S., Lee, Y., White, J., Cheung, F., Parvizi, B., Jennifer, J. & Quackenbush, J. 2003. TIGR Gene Indices clustering tools (TGICL): a software system for fast clustering of large EST data sets. *Bioinformatics* 19:651–2.
- Potin, P., Bouarab, K., Salaün, J. P., Pohnert, G. & Kloareg, B. 2002. Biotic interactions of marine algae. *Curr. Opin. Plant Biol.* 5:308–17.
- Ritz, D., Patel, H., Doan, B., Zheng, M., Aslund, F., Storz, G. & Beckwith, J. 2000. Thioredoxin 2 is involved in the oxidative stress response in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 275:2505–12.
- Saenko, G. N., Kravtsova, Y. Y., Ivanenko, V. V. & Sheludko, S. I. 1978. Concentration of iodine and bromine by plants in the seas of Japan and Okhotsk. *Mar. Biol.* 47:243–50.
- Scala, S., Carels, N., Falcatore, A., Chiusano, M. L. & Bowler, C. 2002. Genome properties of the diatom *Phaeodactylum tricorutum*. *Plant Physiol.* 129:993–1002.
- Sheffield, W. P., Shore, G. C. & Randall, S. K. 1990. Mitochondrial precursor protein. Effects of 70-kilodalton heat shock protein on polypeptide folding, aggregation, and import competence. *J. Biol. Chem.* 265:11069–76.
- Weyand, M., Hecht, H.-J., Kiess, M., Liaud, M.-F., 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.* 322:681–92.
- Yu, H. J., Moon, M. S., Lee, H. S., Mun, J. H., Kwon, Y. M. & Kim, S. G. 1999. Analysis of cDNAs expressed during first cell division of petunia petal protoplast cultures using expressed sequence tags. *Mol. Cells* 9:258–64.

Résumé

Afin d'identifier des marqueurs moléculaires de la réponse au stress et des gènes impliqués dans la synthèse de la paroi cellulaire chez l'algue brune *Laminaria digitata*, 1985 EST issus de protoplastes (cellules isolées et stressées) ont été générées. Un quart de ces EST codent pour des protéines intervenant dans la réponse au stress et 22 séquences, dont des mannuronane-C5-épipimérase (ManC5), seraient impliquées dans la synthèse de la paroi. La production de protoplastes entraînant la libération d'oligogulonates et mimant ainsi l'attaque par un pathogène, la technique d'hybridation soustractive sur des sporophytes élicités a permis d'identifier des gènes plus spécifiques au stress (heat shock proteins, glutathion S-transférases) ou à la défense (thiorédoxine peroxydases, 6-phosphogluconate déshydrogénase, glucose 6-phosphate déshydrogénase). De plus, nous avons mesuré des variations d'expression pour quatre ManC5 par PCR quantitative chez les protoplastes et des sporophytes élicités.

Research and analysis of molecular markers of stress response in the brown alga *Laminaria digitata*.

Summary

To identify molecular markers of stress response and genes involved in cell wall synthesis in the brown algae *Laminaria digitata*, 1985 ESTs were obtained from protoplasts (isolated and stressed cells). Twenty five percent of these ESTs encoded proteins implicated in stress response and 22 sequences, including mannuronan-C5-epimerases (ManC5), were related to cell wall synthesis. Since oligogulonates released during protoplasts preparation mimic infection of sporophyte by a pathogen, we made a distinction between stress and defense related genes by using the subtractive hybridization technique on elicited sporophytes. Thus, thioredoxine peroxidases, 6-phosphogluconate dehydrogenase, and glucose 6-phosphate dehydrogenase were involved in defense mechanisms, whereas heat shock proteins and glutathione S-transferases were implicated in stress response. We have also monitored variation of expression of four ManC5 genes by quantitative PCR in protoplasts and in elicited sporophytes.