HAL
open science

Transcriptome analysis during defense response in the brown alga Laminaria digitata

Audrey Cosse

To cite this version:

Audrey Cosse. Transcriptome analysis during defense response in the brown alga Laminaria digitata. Life Sciences [q-bio]. AgroParisTech, 2007. English. NNT : 2007AGPT0053 . pastel-00003673

HAL Id: pastel-00003673

https://pastel.hal.science/pastel-00003673v1

Submitted on 1 Dec 2008

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

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

N° / / / / / / / / / / /

THESE

Pour obtenir le grade de

Docteur

de

L'Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement - Agro Paris Tech -

Spécialité : Doctorat de l'Institut National Agronomique Paris-Grignon

Présentée et soutenue publiquement par

Audrey Cosse

Le 17 Décembre 2007

Analyse du transcriptome des réponses de défense de l'algue brune *Laminaria digitata*

Directeur de thèse : Philippe Potin

Travail réalisé au sein de l'UMR 7139 (CNRS), Végétaux marins et biomolécules,
Station biologique de Roscoff, Place Georges Teissier B.P. 74, F-29682 Roscoff

Devant le jury :

Présidente	
Mme Claire NEEMA	Professeur, **INA-PG**
Rapporteurs	
Mme Maria MANZANARES-DAULEUX	Maitre de Conférences, **Agrocampus Rennes**
M. Alain PUGIN	Professeur, **Université de Bourgogne**
Examinateurs	
M. Jean-Yves FLOC'H	Professeur émérite, **Université de Bretagne Occidentale**
M. David MAZURAIS	Cadre-Chercheur, **Ifremer**
M. Florian WEINBERGER	Professeur associé, **Leibniz-Institut für Meereswissenschaften**

Résumé
Alors que la base des interactions hôte-pathogène chez les plantes terrestres sont désormais très bien décrites, que ce soit au niveau physiologique, métabolique ou moléculaire, chez les macroalgues marines les investigations n'en sont qu'à leur début. Chez l'algue brune *L. digitata*, les études sur les réponses de défense suite à l'élicitation par les oligoguluronates, ont permis d'appréhender la transduction du signal conduisant à la production d'un burst oxydant, ainsi que la mise en place tardive de la résistance. Le métabolisme halogéné est particulièrement actif chez cette algue. Il semble être impliqué dans les réponses de défense comme en témoigne l'émission d'iode moléculaire et de composés organiques halogénés volatils, suite à l'élicitation par les oligoguluronates. Dans ce contexte, j'ai étudié la régulation du transcriptome de *L. digitata* en réponse à l'élicitation par les oligoguluronates, par hybridation soustractive suppressive, macroarray et PCR Quantitative. J'ai ainsi identifié dix gènes codant notamment des haloperoxydases, des thiorédoxines et des enzymes de la voie des pentoses phosphates. L'induction de ces gènes suite à l'élicitation suggère une gestion originale du stress oxydant chez *L. digitata*. L'implication du métabolisme halogéné dans les réponses de défense a été mise en avant par l'expression différentielle de certains gènes codant des haloperoxydases. La régulation spécifique de certains de ces gènes apporte la première preuve expérimentale que les différents membres d'haloperoxydases ont évolué vers des fonctions biologiques spécifiques. L'identification de ces gènes comme marqueurs moléculaires des réponses de défense a permis d'établir la première modélisation de la signalisation intracellulaire conduisant à l'activation de gènes de défense de *L. digitata* et de souligner le rôle du peroxyde d'hydrogène dans plusieurs voies distinctes. Les outils développés et les marqueurs moléculaires identifiés permettront d'approfondir la compréhension des réponses de défense des macroalgues dans le contexte des interactions biotiques et de la signalisation à distance.

Mots clés: algue, *Laminaria digitata*, défense, éliciteur, haloperoxydase dépendante du vanadium, *macroarray*, PCR quantitative.

Transcriptome analysis during defense response in the brown alga *Laminaria digitata*

Abstract
Host-pathogen interactions in terrestrial plants are well described at the physiological, metabolic or molecular levels. However, defense induction and regulation have hardly been studied in marine macroalgae. In the brown alga *Laminaria digitata*, studies have shown that oligoguluronates elicit defense responses. Significant progress has been made in understanding the signalling events which produce an oxidative burst and confer late resistance. The halogenated metabolism is particularly active in this species. It seems to be involved in defense responses as indicated by the emission of molecular iodine and volatile halogenated organic compounds after elicitation. In this context, this thesis investigated the transcriptome regulation in response to the perception of oligoluronates by substractive suppressive hybridization, macroarray and real time PCR. Differential expression was confirmed for ten genes encoding haloperoxidases, thioredoxins and pentose phosphate pathway enzymes. Theses results suggest that *L. digitata* has developed an original strategy to cope with oxidative stress. The importance of halogenated metabolism in defense responses was highlighted by differential expression of haloperoxidase members. The specific regulation of a few members of this multigenic family represents the first report confirming that some haloperoxidase members have evolved toward specialized functions. Identification of these defense molecular markers led to the first identification of the intracellular pathway involving defense genes activation in *L. digitata*. Hydrogen peroxide was found to be a key actor in different pathways of this signaling cascade. The tools developed and the molecular markers identified in this study should make possible to extend the understanding of defense responses in macroalgae in the context of biotic interactions and long-distance signaling.

Key Words: alga, *Laminaria digitata*, defense, elicitor, vanadium dependent haloperoxidase, *macroarray*, real time PCR

A mon grand père, Jean
Parce qu'il aurait aimé voir ce jour
Parce ce que son amour m'a accompagné chaque jour de cette thèse

La thèse, c'est un peu la première grande aventure d'un scientifique.
C'est aussi une grande et belle aventure humaine …
Elle mérite bien quelques lignes …
(Ou pages, car il est bien connu que je suis bavarde !)

J'aimerai tout d'abord remercier Bernard Kloareg de m'avoir ouvert les portes de son laboratoire, voilà bientôt 7 ans. Je lui dois aussi une mention 'très bien' en maîtrise …et un passage à l'INA P-G …Ses précieux conseils et sa force de persuasion hors du commun m'auront poussé à aller de l'avant tout au long de mon parcours.

J'associe à ces remerciements Philippe Potin, qui m'a par ailleurs toujours soutenue dans mes choix, en m'accordant une grande confiance (que j'ai souvent eu du mal à gérer !) et en assurant la direction de ma thèse. Je voudrai souligner son enthousiasme communicatif à travailler sur les algues, et plus particulièrement sur leurs mécanismes de défense, ainsi que sa générosité à faire partager ses nombreuses connaissances dans bien des domaines.

Du point de vue enthousiasme et optimisme, Catherine Leblanc n'est pas en reste, et elle m'aura bien des fois aidé à voir le côté positif des choses et à persévérer quand tout me poussait pourtant à arrêter. Je les remercie très sincèrement tous les deux pour la confiance et le soutien qu'ils m'ont accordé tout au long de cette thèse. Je voudrai aussi remercier plus particulièrement Catherine pour tous les conseils avisés qu'elle m'a prodigués au cours de la rédaction de mon manuscrit.

J'adresse toute ma reconnaissance à Mme Maria Manzanares, Mme Claire Neema, M. Alain Pugin, M. David Mazurais, M. Florian Weinberger et M. Jean-Yves Floc'h qui me font l'honneur de juger ce travail. Je remercie plus particulièrement Jean-Yves de m'avoir fait découvrir les algues et de m'avoir avertie que 'ce ne serait pas facile, mais que le jeu en valait la chandelle'. Je voudrai aussi remercier David, qui m'a très généreusement secourue et sans qui je serai peut être toujours en salle de radioactivité à tester tous les paramètres d'un protocole voué à l'échec !

J'exprime ici mes plus sincères remerciements à toutes les personnes de l'UMR 7139 et de la Station Biologique de Roscoff, qui au cours de ces années m'ont apporté leurs conseils, leurs aides, et qui ont contribué à une ambiance de travail tour à tour dynamique, enrichissante et joyeuse.

En particulier, Marion, notre histoire a commencé au coin de la porte 020. On en a fait du chemin depuis le début de notre DEA, de window color en cuisine, et de spectre RMN en concept de BM…Qui aurait pu dire que finalement ce serait toi, la chimiste, qui travaillerait sur les algues ! Merci pour cette bonne humeur qui ne te quitte jamais et surtout merci pour ton amitié.

Cécile, là aussi c'est une longue et belle histoire. Elle est trop longue à raconter. Enfin, je n'aurai jamais cru qu'un thésard pouvait passer 2 heures par semaine à brosser du Chondrus au pinceau…Faut dire qu'il en vaut la peine !

Manon, avec toi j'ai trouvé deux choses d'exception : une amie et une personne qui a encore moins confiance en elle que moi ! Tu es brillante, il n'y a aucun doute là-dessus et les p'tites algues n'ont plus qu'à bien se tenir.

Sabine, Merci, avec un grand M. Merci pour ton soutien sans faille, ta disponibilité exceptionnelle et merci pour toutes les petites attentions au quotidien (une tablette de

chocolat, un tube de Window color et bien d'autres !) En toi, j'ai trouvé bien plus qu'une amie.

Gurvan, je me demande ce qui a bien pu nous rapprocher à la base ? Encore un coup de Bernard ! Quelle heureuse idée. Merci pour tout, et ce tout est très vaste, mais tu le sais déjà. Je te promets un cours de cuisine (et un dîner !) à la hauteur de ce que tu m'as apporté au cours de ces quatre dernières années.

Ludo, à la fois si discret et si présent. Merci d'être là quelque soit les moments et d'avoir toujours su trouver les mots justes.

Jérôme, le roi d'Excel et de la macro, merci ! Je ne suis pas prête d'oublier notre congrès à Sorrento, ni un fameux chocolat qui aura fait tant d'envieux et vive les bus italiens !!! Heureusement, tu es maintenant en possession d'une information de la plus haute importance : il n'y a pas "L'algue, mais Les algues …"

François, quel talent, quelle patience et quelle humilité. Je suis heureuse que tu prennes la relève et je ne doute pas qu'avec toi, les laminaires livreront les secrets de leur communication.

Une mention spéciale pour Sylvie, Delphine, Bénédicte, Sabine et Ludo que j'ai harcelé de questions techniques en tout genre et qui m'ont toujours répondu avec le sourire.

Enfin, un grand merci à tous pour votre générosité et pour tous les bons moments passés ensemble, en particulier autour d'un café sur le muret …Ah quelle est belle cette île de Batz, quelle chance nous avons d'être ici !

J'ai une pensée toute particulière pour les personnes avec qui j'ai partagé des coins de bureaux et des coins de paillasses : Marion, Ludo, Akira, Estelle, Gurvan, Thierry, Florian et Cécile. Je vous remercie d'avoir eu la patience d'écouter mes lamentations en tout genre et surtout de m'avoir réconforté et encouragé à ne pas lâcher prise. Je crois que l'aboutissement de cette thèse vous doit beaucoup et je ne vous en remercierai jamais assez.

Je voudrai aussi remercier tous mes amis qui ne sont pas 'de la partie', mais qui de part leurs présences à mes côtés et leurs encouragements ont très largement contribué à mon équilibre psychologique durant ces quatre années, en particulier Aurel & Seb, Pat & Akli, Géraldine & Benoît, Carole & Seb, Estelle, Johanna…J'espère que je vous ai pas trop soûlé avec toutes mes histoires et après le rush de ces derniers mois, j'ai hâte de tous vous retrouver !

L'histoire de ma thèse a commencé quand j'avais 12 ans. Je récitais mes leçons de biologie à qui voulait bien m'écouter, j'affirmais haut et fort que je ferai de la biologie marine et que je serai chercheur. Voilà pourquoi je voudrai remercier mes parents et mes grands-parents de m'avoir conduit jusqu'ici avec tout leur amour, leur confiance, leur soutien, parce qu'ils ont tout fait pour qu'il en soit ainsi. Merci aussi, Valou, Dom et Patou de répondre toujours présents. Je voudrai particulièrement remercier Mutti qui se plie en quatre pour moi depuis toujours et plus encore ces derniers temps, qui m'a prêté son coin de table pour poser mon PC et qui s'est occupé de Titouan pour que je puisse continuer à travailler les week-ends.

Gonzague, pas facile d'être deux quand on crée une entreprise et qu'on est thésard… De la difficulté naît le bonheur …Finalement nous sommes trois…Titouan, merci d'être un enfant si calme, si patient et de rendre les choses si faciles. Tu es de très loin la plus belle et la plus prometteuse de toutes mes expériences !

Un grand merci à tous !

Sommaire

Liste des abréviations 13

Table des illustrations 14

Introduction bibliographique 19

I. Abrégé des concepts de phytopathologie et des réponses de défense des plantes 20

I.A Les différents types d'interaction et de résistance 20
I.B La reconnaissance du pathogène 21
I.C Transduction du signal et activation des réponses de défense 22
I.D La régulation incontournable du transcriptome 24

II. Interaction hôte-pathogène chez les algues marines 25

II.A Pathologie des algues marines 26
II.B Reconnaissance de l'agent pathogène 27
II.C Réponses de défense 31

III. Le métabolisme halogéné, un métabolisme de défense chez les algues marines ? 49

III.A Métabolisme halogéné et haloperoxydases 49
III.B Un rôle dans la protection cellulaire 55
III.C Un arsenal varié de la défense chimique 56

IV. Avancées transcriptomiques et génomiques chez les algues marines 63

IV.A Ascension des données génomiques et transcriptomes chez les algues 63
IV.B Des banques EST comme stratégie initiale pour rechercher des gènes de défense putatifs… 67
IV.C Développement d'outil d'expression différentielle chez les macroalgues : Identification de gènes de défense 74

Contexte & Problématique 77

I. Modèle d'étude : *Laminaria digitata* 77

I.A Position phylogénétique 77
I.B Cycle biologique 78
I.C Valorisation de la ressource algale de *L. digitata* 81

II. Vers une meilleure compréhension du transcriptome de la défense chez *L. digitata*. 81

II.A Les acquis sur les réponses de défense de *L. digitata* 82
II.B Un métabolisme halogéné actif, impliqué dans la défense ? 84
II.C Les données transcriptomiques disponibles chez *L. digitata* 85
II.D La problématique et les objectifs 85

Matériels & Methodes 89

I. Matériel végétal et traitement 89

I.A Matériel végétal 89
I.B Elicitation par les oligoguluronates 90
I.C Dosage du peroxyde d'hydrogène par chimioluminescence. 92

II. Analyse de biologie moléculaire 92

II.A Extraction des acides nucléiques 92
II.B Séquençage et analyse des séquences 94
II.C Analyses transcriptionnelles 95

Résultats & Discussion……..105

Chapitre I. Vers la construction en interne d'un filtre dédié stress 105

I. Hybridation des *macroarrays* 106

I.A Mise au point d'un protocole d'hybridation..... 106
I.B Expression différentielle : artefact ou réalité ? 106

II. Création d'un filtre orienté stress 108

II.A Analyse de la banque soustractive 109
II.B Finalisation du filtre..... 111
II.C Réflexions sur la qualité des filtres générés..... 115

Chapitre II. *Macroarray* : un outil de profilage d'expression génique des réponses de défense 118

I. Une stratégie payante pour l'identification de gènes de défense 118

I.A Régulation transcriptionnelle de la réponse aux oligoguluronates mise en évidence par *macroarray* 118
I.B Une régulation rapide et séquentielle du transcriptome : réponses précoces et tardives ?..... 124

II. La banque soustractive, un premier pas vers la caractérisation du transcriptome de la défense 125

II.A Expression des EST issues de la banque soustractive analysée par *macroarray*..... 126
II.B Intérêt et validation de la banque soustractive..... 127

III. Identification par *macroarray* de voie de signalisation et d'activation de voie métabolique suite à l'élicitation 128

III.A La S-adénosyl méthionine synthétase 129
III.B Les glutathion-S-transférases 130
III.C Les ABC transporteurs 131
III.D Les *Heat shock* Protéines 131
III.E Les pigments photosynthétiques 132
III.F La répression des gènes du métabolisme basal ? 132

Chapitre III. Identification de marqueurs moléculaires des réponses de défense……..... 135

I. Validation de l'approche *macroarray* par PCR Quantitative 136

I.A Comparaison des résultats d'expression obtenue par *macroarray* et PCR Quantitative . 136
I.B Biais intrinsèque aux deux méthodes 138
I.C Biais liés au matériel biologique 139

II. Algues cultivées versus algues sauvages : Phénomène de potentialisation 140

II.A Comparaison du *burst* oxydant et des réponses transcriptionnelles 141
II.B Phénomène de potentialisation 145

III. Ce qu'indique la régulation des gènes sur les voies métaboliques impliquées dans les réponses de défense 148

III.A Le métabolisme halogéné : originalité et particularité des algues marines 151
III.B La voie des pentoses phosphates : un rôle central dans la régulation redox cellulaire 155
III.C La mannitol-1-phosphate deshydrogénase : un nouveau gène de défense ? 160
III.D Les thiorédoxines : des enzymes à activité anti-oxydante 164

IV. Régulation transcriptionnelle liée au *burst* oxydant 172

IV.A Dissection de la signalisation du *burst* oxydant par une approche pharmacologique..... 172
IV.B Mise en évidence de trois voies de signalisation conduisant à l'activation de la transcription 174
IV.C Une voie de signalisation déterminée en fonction du type de gènes considéré ? 178

Conclusions & Perspectives 181

I. Approches transcriptomiques des défenses chez les macroalgues 183

II. La gestion du stress oxydant chez *L. digitata* 184

II.A Une gestion du stress oxydant originale 184
II.B Perspectives 186

III. Originalité d'un métabolisme halogéné actif impliqué dans les réponses de défense…. 188

III.A v-BPO3 et v-IPO3, mise en évidence du lien entre métabolisme de défense et métabolisme halogéné 188
III.B Perspectives 189

IV. Immunité innée 191

IV.A Conservation des mécanismes de défense et communication à distance 191
IV.B Perspectives 193

Bibliographie… 197

Annexes…… 219

Annexe 1 : Hybridation des macroarrays, marquage de la sonde au ^{32}P à l'aide du kit Megaprime Labelling (GE Healthcare) 220

Annexe 2 : Hybridation radioactive des macroarrays nylon, Hybridation vecteur 224

Annexe 3 : Hybridation radioactive des macroarrays nylon, Hybridation cible complexe.. . 227

Annexe 4 : Synthèse d'ADNc de *L. digitata* pour mener les expériences de PCR Quantitative… 231

Annexe 5 : Annotation des 49 ADNc identifiés dans la banque soustractive 235

Annexe 6 : Expression de l'ensemble des gènes étudiés par *macroarray*, regroupés par profils d'expression 236

Liste des abréviations

AdoMet	S-adénosylméthionine
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messager
AHL	Homosérine lactone acylée
APX	Ascorbate peroxydase
BTH	Benzothiadiazole
CAT	Catalase
COV	Composé organique halogéné
COHV	Composé organique halogéné volatil
CPO	Chloroperoxydase
DPI	Diphenylene iodonium
EAO	Espèces activées de l'oxygène
EST	Etiquette de séquence transcrite
EXAFS	*Extented X-ray absorption fine structure*
GG	Oligoguluronates
Grx	Glutarédoxine
GST	Glutathion-S-transférase
G6PDH	glucose-6-phosphate deshydrogénase
HPLC	*High performance liquid chromatography*
HR	Réponse hypersensible
HSP	*Heat shock protein*
ICP MS	*Inductively coupled plasma-mass spectrometer*
INA	acide dichloroisonicotinique
LC-MS	*Liquid chromatography-mass spectrometry*
LPS	Lipopolysaccharide
MAMP	*Microbe associated molecular pattern*
MIMP	*Microbe induced molecular pattern*
MeJA	Jasmonate de méthyle
NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
PAL	Phénylalanine ammonia-lyase
PAMP	*Pathogen associated molecular pattern*
PCR	*Polymerase chain reaction*
Prx	Peroxyrédoxine
Protéines PR	*Pathogenesis related protein*
RACE-PCR	*Rapid amplification of cDNA ends polymerase chain reaction*
SAMS	S-adénosyl-méthionine synthétase
SAR	*Systemic acquired resistance* (Réponse systémique acquise)
SDN	Stimulateur de défense naturel
SOD	Superoxyde dismutase
SSH	*Substractive and supressive hybridisation*
Trx	Thiorédoxine
v-BPO	Bromoperoxydase dépendante du vanadium
v-IPO	Iodoperoxydase dépendante du vanadium
v-HPO	Haloperoxydase dépendante du vanadium
6PGDH	6-phosphogluconate deshydrogénase

Table des illustrations

Liste des figures

Figure 1 : Représentation schématique des différents types d'interactions hôte-pathogène chez les plantes supérieures 21

Figure 2 : Complexité des événements de signalisation contrôlant l'activation des réponses de défense des plantes 23

Figure 3 : Exemples de réponses de défense actives chez les plantes 23

Figure 4 : Modèle de la nature quantitative de l'expression des gènes et des réponses de défense 25

Figure 5 : *L. digitata* saine et infectée par des endophytes et des bactéries 27

Figure 6 : Modèle de la signalisation et des réponses de défenses caractérisées chez les algues 32

Figure 7 : Modélisation des homologues de NAPH oxydases chez les algues rouges comparés à la sous unité $gp91^{phox}$ des cellules phagocytaires animales 35

Figure 8 : Interaction *C. crispus / A. operculata* 38

Figure 9 : La voie des phénylpropanoïdes, source de métabolites secondaires de défense 40

Figure 10 : Accumulation de composés aromatiques autour du site de pénétration d'*A. operculata* chez les gamétophytes de *C. crispus* 41

Figure 11 : Voies de biosynthèse des oxylipines identifiées chez les algues marines 43

Figure 12 : Dualité oxylipidique chez *C. crispus* au cours des réponses de défense 45

Figure 13 : Représentation spéculative de la distribution des acides gras polyinsaturés et de leurs dérivés cyclopentanones chez les eucaryotes 48

Figure 14 : Accumulation d'iode dans les sporophytes de *L. digitata* 50

Figure 15 : Les haloperoxydases : réaction enzymatique et classification 51

Figure 16 : Mécanisme putatif de l'entrée d'iode et de son stockage chez *L. digitata* proposé par Küpper *et coll.,* (1998) 53

Figure 17 : Modèle actuel de l'absorption d'iode et de son stockage chez *L. digitata* proposé par Verhaeghe *et coll.,* (non publié) 54

Figure 18 : Diversité de la nature chimique des composés halogénés produits par les algues marine 56

Figure 19 : Analogue structural des homosérines lactones produit par l'algue rouge *Delisea pulchra* 61

Figure 20 : Rôles biologiques putatifs des haloperoxydases dépendantes du vanadium et du métabolisme halogéné dans les défenses des macroalgues 62

Figure 21 : Arbre phylogénétique des eucaryotes d'après Baldauf *et coll.,* (2003) 78

Figure 22 : Peuplement dense de *L. digitata* formant des forêts dans les étages infralittoraux79
Figure 23 : Cycle digénétique hétéromorphe de *L. digitata* 80
Figure 24 : L'alginate est le principal constituant de la paroi de *L. digitata* 80
Figure 25 : *Burst* oxydant chez *L. digitata* consécutif à l'élicitation par les oligoguluronates 82
Figure 26 : Les oligoguluronates induisent une résistance à *L. tomentosoides* chez *L. digitata* 83
Figure 27: Positionnement de la problématique de thèse : De la perception à la résistance, l'absence de marqueurs moléculaires de défense chez l'algue brune *L. digitata* ... 86
Figure 28 : Culture de *L. digitata* au laboratoire 89
Figure 29 : Plan d'expérimentation des élicitation de plantules de *L. digitata* 91
Figure 30 : Intégrité et quantité des ARN extraits, élimination de la contamination ADN 98
Figure 31 : Essai d'amplification par PCR de RPL36 sur les ARN 99
Figure 32 : Hybridation de *macroarrays* par des ADNc marqués 107
Figure 33 : Hybridation vecteur des *macroarrays* 108
Figure 34 : Analyse des EST générées par la construction de la banque soustractive 109
Figure 35 : Hybridation vecteur des filtres "dédiés stress" 115
Figure 36 : Hybridation de *macroarrays* 119
Figure 37 : Profil général d'expression des gènes observé au cours du temps en réponse aux oligoguluronates 120
Figure 38 : Répartition au cours du temps des gènes surexprimés en réponse aux GG..... 120
Figure 39 : Validation de la banque soustractive, répartition des clones surexprimés et réprimés au cours du temps après analyse par *macroarray* 127
Figure 40 : Résumé de la démarche méthodologique mise en place pour identifier des marqueurs moléculaires de la défense chez *L. digitata* 141
Figure 41 : Discrimination de gènes surexprimés suite à l'élicitation par les oligoguluronates, en fonction de la provenance des plantules (culture ou sauvage) avec un pool commun de gènes surexprimés..... 142
Figure 42 : Comparaison de l'induction de réponses transcriptionnelles aux oligoguluronates chez des plantules sauvages et de culture de *L. digitata* 143
Figure 43 : Profil d'expression de certains transcripts surexprimés à la fois chez les algues sauvages et de culture étudiés par PCR Quantitative 144
Figure 44 : Induction d'un *burst* oxydant différent chez les plantules de *L. digitata* sauvages et de culture suite à l'élicitation par les oligoguluronates (150 µg/mL) 145
Figure 45 : Phénomène de potentialisation chez les plantes supérieures 146
Figure 46 : Profil d'expression des gènes candidats impliqués dans les réponses de défense suite à l'élicitation par les oligoguluronates (150 µg/mL) obtenu par PCR Quantitative 150

Figure 47: Augmentation de la production de composés volatiles iodés suite à l'élicitation par les oligoguluronates chez *L. digitata* 153

Figure 48 : Mise en évidence de la biosynthèse de composés iodés intracellulaire chez *L. digitata* 154

Figure 49 : La voie des pentoses phosphate, un rôle clé dans le métabolisme 158

Figure 50 : Rôle du mannitol et de la M1PDH dans les réponses de défense de *L. digitata* . 162

Figure 51: Régulation de la biosynthèse et catabolisme du mannitol chez l'algue rouge *Caloglossa* 163

Figure 52: Repliement caractéristique de type thiorédoxine 164

Figure 53: Mécanismes de réduction des ponts disulfures de protéines cibles par le système thiorédoxine et glutarédoxine 166

Figure 54: Schéma de la réaction de type peroxydase de la peroxyrédoxine 168

Figure 55: Rôle putatif des thiorédoxines et peroxyrédoxines dans les réponses de défense de *L. digitata* 169

Figure 56: Altération de l'expression des gènes de défense induits par les oligoguluronates (150 µg/mL) suite à l'application d'inhibiteurs affectant le *burst* oxydant 175

Figure 57 : Modélisation hypothétique de la signalisation intracellulaire, consécutive au *burst* oxydant, conduisant à l'activation des gènes de défense 177

Figure 58 : Positionnement des résultats acquis au cours de ma thèse dans la signalisation aboutissant à la résistance de *L. digitata* 182

Liste des tableaux

Tableau 1 : Eliciteurs de défense endogènes et exogènes identifiés chez les algues marines . 29

Tableau 2 : Liste des génomes d'algues disponibles en septembre 2007 64

Tableau 3 : Banques EST disponibles chez les macroalgues en septembre 2007..... 65

Tableau 4 : Recherche *in silico* de gènes putatifs représentatifs des voies de défenses dans les banques EST de macroalgues..... 66

Tableau 5 : Liste des amorces utilisées pour les expériences de PCR Quantitative 100

Tableau 6 : Gamme étalon réalisée pour les expériences de PCR Quantitative 101

Tableau 7 : Sélection des 96 ADNc déposés sur le filtre dédié stress 112

Tableau 8 : Expression de l'ensemble des gènes étudiés au cours de la cinétique d'élicitation par les oligoguluronates..... 122

Tableau 9 : Validation par PCR Quantitative des gènes identifiés comme marqueurs de défense par l'approche *macroarrays*..... 137

Tableau 10 : Identification de deux ADNc codant des 6PGDH différentiellement impliquées dans les réponses au stress..... 156

Tableau 11 : Effet d'inhibiteurs sur le *burst* oxydant de *L. digitata* induit par les oligoguluronates 173

INTRODUCTION

Introduction bibliographique

Tout comme les plantes terrestres, les macroalgues sont soumises à de nombreux stress biotiques et abiotiques. Pour survivre dans leur environnement hostile, les algues ont dû développer des réponses de défense. Au contraire de la densité de connaissance acquise sur les interactions hôte-pathogène des plantes, les investigations n'en sont qu'à leur début chez les macroalgues. Depuis quelques années, il est enfin possible de brosser un premier portrait des bases biochimiques des mécanismes de défense des algues marines (Potin *et coll.*, 1999, Potin *et coll.*, 2002).

Au cours de cette introduction je réviserai succintement les réponses de défense des plantes afin de replacer un certain nombre de concepts de phytopathologie et de mécanismes de défense clairement établis. Cette révision permettra avant tout d'effectuer un parallèle avec l'état d'avancement chez les algues. Je dresserai ainsi dans un second temps un état de l'art de la connaissance acquise sur les interactions hôte-pathogène des macroalgues, en excluant volontairement ce qui a trait à la défense chimique, qui n'est pas le propos de cette étude. J'aborderai ensuite plus particulièrement le métabolisme halogéné, qui constitue une voie métabolique importante et originale chez les macroalgues, en particulier pour les algues brunes. Concernant ce métabolisme halogéné, je mettrai l'accent sur les évidences de son implication dans les réponses de défense. Enfin, puisqu'il est question de transcriptome de la défense, je tenterai d'établir un bilan des données de transcriptome acquises chez les macroalgues, en ciblant les informations qu'elles ont pu apporter quant aux voies de défense.

Cette introduction fait l'objet de la publication d'un article de revue dans Advances in Botanical Research (Cosse *et coll.*, 2007).

I. Abrégé des concepts de phytopathologie et des réponses de défense des plantes

Dans la nature, les plantes doivent faire face à de multiples agressions. Ces agressions peuvent être d'origine climatique (froid, sécheresse), nutritionnelle (carence ou excès de nutriments) ou encore d'origine anthropique (métaux lourds, pesticides). On parle alors de **stress abiotique** par opposition au **stress biotique**, qui implique l'intervention d'un second être vivant. Il peut s'agir d'un herbivore (insecte) ou d'un agent infectieux (champignon, bactérie, virus). Au cours de l'évolution, les plantes ont su élaborer des systèmes de défense leur permettant de résister aux agents pathogènes. Ainsi le développement de la maladie est généralement plus une exception qu'une règle. Les interactions hôte-pathogène chez les plantes ont été très largement documentées ces dernières années et ce à tous les niveaux : physiologique, enzymatique, métabolique et moléculaire (pour revues Eulgem, 2005, Hammond-Kosack et Jones, 1996, Nurnberger *et coll.*, 2004, Somssich et Hahlbrock, 1998).

I.A Les différents types d'interaction et de résistance

On distingue deux formes de résistance des plantes aux agressions pathogènes : la résistance non-hôte qui est la plus fréquente, et la résistance race/cultivar (Figure 1) (Nurnberger *et coll.*, 2004).

La résistance non-hôte caractérise l'incompatibilité entre les deux protagonistes quelque soit la plante et quelque soit le pathogène. Deux phénomènes sont possibles : **la résistance passive** et la résistance active. Dans le premier cas, le microorganisme est incapable de franchir les barrières protectrices externes du végétal. Si ce dernier pénètre tout de même, il ne peut se développer dans les tissus de l'hôte en raison d'une inadéquation physiologique. Dans le second cas, **la résistance active**, l'agent pathogène commence à se développer dans la plante, mais l'infection est stoppée par la mise en place de dispositifs de défense non préexistants chez l'hôte. La résistance de la plante dépend alors essentiellement de la rapidité et de l'intensité avec lesquelles elle active ces réponses.

La résistance race/cultivar, qui est finalement assez rare, est une résistance de type hôte. Elle existe au sein d'une espèce végétale donnée pour un agent pathogène déterminé. Elle est définie génétiquement par l'interaction directe ou indirecte entre le produit d'un gène dit de

'résistance' (gène R) de la plante et le produit d'un gène dit d'avirulence (gène avr) du pathogène. On parle dans ce cas d'**interaction incompatible**. Si l'un des deux protagonistes ne possède pas le gène en question, **l'interaction est compatible** et la maladie se développe. Les réponses de défense induites lors de la résistance non-hôte de type active ne semblent pas se distinguer de celles induites au cours d'une interaction incompatible, elles seraient 'seulement' intensifiées et plus rapides.

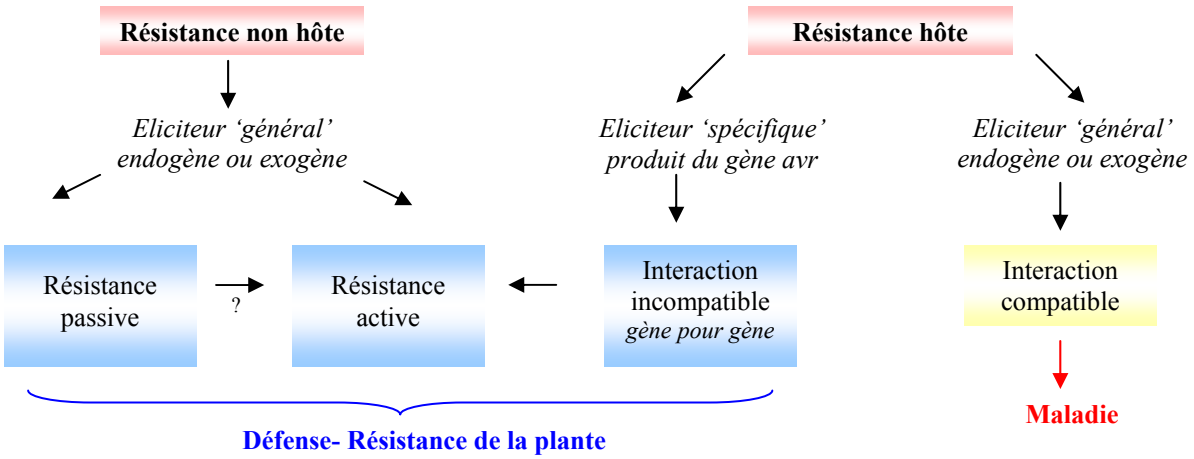


Figure 1 : Représentation schématique des différents types d'interactions hôte-pathogène chez les plantes supérieures

I.B La reconnaissance du pathogène

La perception rapide du pathogène est un prérequis indispensable à l'activation des réponses de défense. Elle s'établit par la reconnaissance spécifique du produit du gène avr dans le cas de la résistance gène pour gène ou par la reconnaissance plus générale d'une molécule provenant du pathogène, **éliciteur exogène**, ou de la plante elle-même, **éliciteur endogène** (entre autres, fragment de paroi issus de la dégradation par l'agresseur) (Ebel et Mithöfer, 1998, Zhao *et coll.*, 2005). La très grande diversité de structures chimiques de ces éliciteurs est en soit une source de complexité biologique importante. Par exemple, parmi les éliciteurs généraux, les oligosaccharides ont été abondamment décrits. Le degré de polymérisation et la décoration des sucres constituent une source importante de variations, génératrice de fortes spécificités. De nombreux éliciteurs exogènes appartiennent à la

catégorie des **PAMPs** (Pathogen Associated Molecular Pattern) ou de manière plus général aux **MAMP** (Microbe Associated Molecular Pattern) (Nurnberger *et coll.*, 2004). Ce sont des molécules, au sens large, de l'agent pathogène, souvent indispensables à son mode de vie et qui n'existent pas chez la plante. Il s'agit par exemple de composants de paroi de microorganismes tels que les lipopolysaccharides (LPS) (Dow *et coll.*, 2000) ou encore de fragments de structures cellulaires, tels que la flagelline (Gomez-Gomez et Boller, 2002). De même les éliciteurs endogènes ont été récemment regroupés sous la dénomination de **MIMP** (Microbe Induced Molecular Pattern). Par ailleurs, la reconnaissance des MAMP et des MIMP est une caractéristique commune de l'immunité animale et végétale (Mackey et Mc Fall, 2006, Zipfel et Felix, 2005)

Plusieurs composés naturels ou de synthèse peuvent se substituer totalement à ces éliciteurs biotiques, en induisant des réponses identiques ou similaires chez la plante. C'est par exemple le cas de la laminarine, un β-1,3 glucane extrait de l'algue brune *Laminaria digitata* (Klarzynski *et coll.*, 2000), ou du benzothiadiazole (BTH), un analogue structural de l'acide salicylique (Gorlach *et coll.*, 1996). Ces composés sont alors utilisés pour développer de nouvelles stratégies phytosanitaires plus respectueuses de l'environnement, sous la dénomination commune de SDN pour 'Stimulateur de Défense Naturels' (Iodus 40® pour la laminarine, BION®, pour le BTH) (Klarzynski et Fritig, 2001).

I.C Transduction du signal et activation des réponses de défense

La reconnaissance du pathogène ou de l'élicitation se traduit immédiatement par l'ouverture de canaux ioniques et l'émission massive d'espèces activées de l'oxygène (EAO) (***burst* oxydant**) (Lamb et Dixon, 1997, Wojtaszek, 1997). Ces réactions initiales sont nécessaires à la transduction du signal impliquant des **changements physiologiques majeurs** : polarité membranaire, acidification du pH intracellulaire, influx calcique, activation d'enzymes telles que des kinases, phosphatases, phospholipases. Ces changements très rapides peuvent avoir un effet immédiat sur l'activation de certaines voies métaboliques. La figure 2 illustre la complexité des événements de signalisation contrôlant l'activation des réponses de défense chez les plantes (Blumwald *et coll.*, 1998, Ebel et Mithöfer, 1998, Hammond-Kosack et Jones, 1996, Somssich et Hahlbrock, 1998).

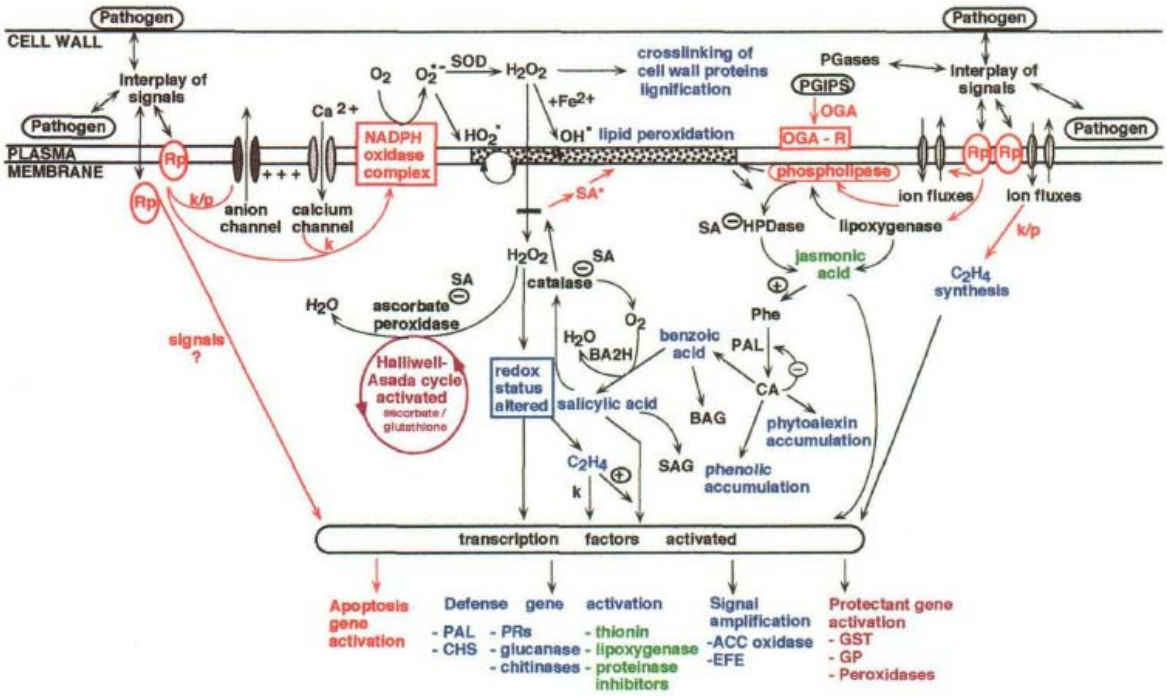


Figure 2 : Complexité des événements de signalisation contrôlant l'activation des réponses de défense des plantes

Extrait de Hammond-Kosack et Jones (1996).

Les modifications métaboliques associées à la résistance induite comprennent la synthèse de métabolites secondaires à activité antimicrobienne (**phytoalexines**), le **renforcement de la paroi** par dépôt de protéines, de lignine et pontage, ainsi que la production d'une large gamme de peptides et protéines de défense, entre autres les **protéines PR**, pour *Pathogenesis Related Protein*. Ces réponses de défense sont généralement accompagnées de lésions nécrotiques (**mort cellulaire**) au site d'infection (Figure 3).

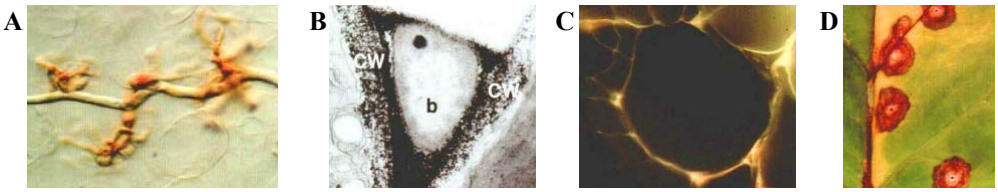


Figure 3 : Exemples de réponses de défense actives chez les plantes

A. Réponse hypersensible chez la laitue au contact d'un isolat incompatible de *Bremia lactucae*.
B. *Burst* oxydant chez la laitue, génération de peroxyde d'hydrogène (dépôt noir) dans la paroi (CW) à proximité de la bactérie incompatible inoculée (b).
C. Lignification et ré initiation de la division cellulaire chez *Brassica napus* suite à une agression fongique.
D. Formation de lésions chez le tabac au site de pénétration d'un virus.
Photos extraites de Hammond-Kosack et Jones (1996).

Ensemble, elles contribuent à réduire au minimum la pénétration de l'agresseur et constituent les mécanismes de résistance locale définie sous le terme général de **réaction d'hypersensibilité**, ou HR. La HR est généralement activée dans le cadre de la résistance gène pour gène (Hammond-Kosack et Jones, 1996). A cette résistance locale est souvent associée une résistance systémique, médiée par l'acide salicylique, nommée **Résistance Systémique Acquise** (SAR). Elle s'établit au niveau de la plante entière et assure une protection durable contre des agressions pathogènes ultérieures. Les signaux de transduction intercellulaire assurant la mise en place de la SAR sont **l'acide jasmonique, l'acide salicylique** ainsi que **l'éthylène** (Durrant et Dong, 2004, Nimchuk *et coll.*, 2003).

I.D La régulation incontournable du transcriptome

Le développement d'outils d'analyse transcriptomique tels que les microarrays ont montré que la reprogrammation du transcriptome est une étape clé dans la mise en place des réponses de défense, située bien au delà de la simple induction des gènes codant les protéines PR. Par exemple, l'expression de plus de 25 % des gènes d'*Arabidopsis thaliana* est modifiée suite à l'infection par un pathogène. Le niveau des transcrits est modulé en intensité, mais aussi de manière spatiale et temporelle (Eulgem, 2005).

La connaissance des réponses transcriptionnelles dans le cadre de la résistance gène pour gène et dans celui de la résistance systémique acquise a particulièrement progressé ces dernières années (Wise *et coll.*, 2007). En plus de la boucle de régulation 'peroxyde d'hydrogène / acide salicylique', plusieurs régulateurs ont été identifiés, parmi eux NPR1, NDR1, EDS1, RAR1...ainsi que de nombreux facteurs de transcription, entre autres WRKY, ERF et TGA. Ces facteurs de transcription ciblent des motifs spécifiques dans les régions promotrices des gènes impliqués dans les réponses de défense. Les séquences consensus de ces éléments en *cis* ont été caractérisées (Eulgem, 2005).

De nombreuses études établissent que le transcriptome de la défense est contrôlé par des mécanismes quantitatifs, dépendant de l'intensité du stimulus initial (Figure 4). Un modèle d'activation des gènes a été proposé par Tao *et coll.*, 2003. Les auteurs proposent que les événements de signalisation précoce des différents types d'interactions hôte-pathogène sont différents, mais conduisent à un mécanisme commun d'activation des gènes. La différence entre interactions compatibles et incompatibles au niveau de l'expression génique est d'ordre quantitative et temporelle. De plus, il est actuellement suggéré que le potentiel

redox de la cellule pourrait représenter le signal quantitatif de sortie conduisant à l'activation des gènes, comme en témoigne l'activation redox de plusieurs régulateurs et facteurs de transcription (Despres *et coll.*, 2003, Mou *et coll.*, 2003, Ndamukong *et coll.*, 2007).

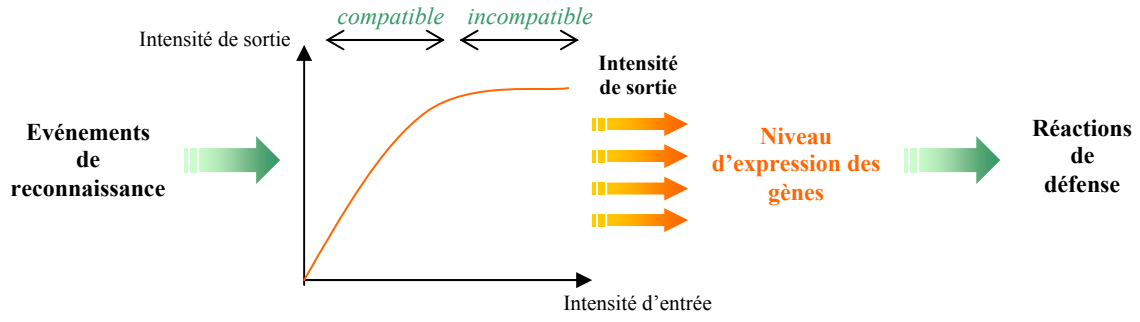


Figure 4 : Modèle de la nature quantitative de l'expression des gènes et des réponses de défense

La reconnaissance du pathogène génère un signal d'entrée pour un mécanisme de conversion du signal, commun aux différents types d'interactions hôte-pathogène. Ce mécanisme convertit le signal d'entrée en signal de sortie déterminant le niveau d'expression des gènes de manière quantitative. Les caractéristiques du signal sont représentées par la courbe. Au cours d'une interaction gène pour gène, l'expression des gènes est induite plus fortement et plus rapidement. D'après Tao *et coll.,* (2003).

II. Interaction hôte-pathogène chez les algues marines

Tout comme les plantes, les macroalgues sont continuellement confrontées à des agressions biotiques, que ce soit par des microorganismes, des algues épiphytes ou des herbivores. Un certain nombre de pathologies ont été décrites, dont certaines ont d'ailleurs des effets destructifs majeurs sur les cultures d'algues ou les populations naturelles (pour revue Andrews, 1976, Andrews, 1977, Correa et Sanchez, 1996).

Les algues ont développé un répertoire chimique très diversifié, constituant pour partie une barrière constitutive à de nombreux agresseurs (pour revue Paul *et coll.*, 2006c, Pohnert, 2004). Elles produisent une quantité importante de métabolites secondaires aux propriétés biocides et détergentes, pour lutter contre les microorganismes (de Nys et Steinberg, 2002, Kubanek *et coll.*, 2003) mais également aux propriétés astringentes pour se défendre des herbivores (pour revue Paul *et coll.*, 2006b, Paul et Puglisi, 2004). L'écologie chimique des interactions biotiques est ainsi abondamment décrite chez les algues marines.

Bien qu'il soit évident que les macroalgues aient aussi développé des mécanismes de défense actifs et inductibles, ces aspects des réponses de défense n'ont été explorés que récemment (Bouarab *et coll.*, 2001, Pohnert, 2004, Potin *et coll.*, 1999, Potin *et coll.*, 2002). Des avancées ont été faites en ce qui concerne la reconnaissance du pathogène, la transduction du signal et l'activation de voies métaboliques.

II.A Pathologie des algues marines

Les agents pathogènes rencontrés chez les algues sont les bactéries (Sawabe *et coll.*, 1998, Sawabe *et coll.*, 2000), les oomycètes et les champignons (Küpper et Müller, 1999), les virus (Müller *et coll.*, 1998) et les endophytes (Ellertsdottir et Peters, 1997).

De nombreuses interactions algues-bactéries ont été décrites, mais l'espèce bactérienne en cause a rarement été caractérisée. On peut tout de même citer *Pseudoalteromonas bacteriolytica*, qui est une bactérie pathogène de *Laminaria japonica*, dont l'infection se traduit entre autres par l'apparition de taches rouges sur le thalle (Sawabe *et coll.*, 2000). Les bactéries induisent des symptômes divers : galle, blanchiment, pourrissement des tissus, nécroses, taches… Des maladies causées par des oomycètes ont aussi été décrites, notamment dans les cultures de *Porphyra spp* au Japon. Les responsables de l'apparition des lésions appartiennent aux genres *Pythium sp* et *Olpidiopsis sp* (Correa, 1997).

Les interactions avec les endophytes sont probablement les plus étudiées. Les endophytes sont unicellulaires ou filamenteuses et peuvent être des gamétophytes de macroalgues ou des espèces différentes. Elles vivent en commensales ou en symbiontes hémiparasites, mais peuvent devenir pathogènes (Ellertsdottir et Peters, 1997). Dans les populations naturelles, les sporophytes des laminaires sont très fréquemment infectés par des endophytes. Ils sont alors responsables de diverses malformations, hyperplasie et/ou hypertrophie, torsion du stipe et de la lame et conduisent parfois à la mortalité (Figure 5). Ils inhibent également la formation des sores et de ce fait affectent directement le renouvellement des populations. Par ailleurs, la présence d'endophytes réduit de manière considérable la valeur économique des laminaires, en affectant entre autres leur valeur nutritive et l'extraction des polysaccharides (Ellertsdottir et Peters, 1997, Peters et Schaffelke, 1996).

Figure 5 : *L. digitata* saine et infectée par des endophytes et des bactéries

Le sporophyte de gauche est parfaitement sain, avec des tissus lisses et turgescents ne présentant aucun épiphyte. Le sporophyte de droite est profondément infecté par des endophytes et des bactéries. Les déformations au niveau de la lame et du stipe sont importantes, certaines zones tissulaires présentent un début de pourrissement. Ces sporophytes ont été récoltés dans une population sauvage de l'île de Sieck.

L'extension des cultures d'algues à travers le monde s'accompagne de l'augmentation de la pression pathogène et entraîne l'apparition de maladies causant parfois des diminutions de récolte importantes, comme cela a été le cas pour le kombu (*Laminaria sp*) (Ishikawa et Saga, 1989), le nori (*Porphyra sp*) (Fujita *et coll.*, 1972) ou encore pour *Kappaphycus* (Hurtado *et coll.*, 2006). Par ailleurs, le changement climatique global, l'introduction de nouvelles espèces et l'impact considérable de l'homme sur l'environnement marin ont conduit dans leur ensemble à l'augmentation de cette pression pathogène et à de nombreuses épidémies ces dernières décennies. Les espèces sessiles, telles que les algues et les invertébrés sont contraintes d'adapter leur stratégie de défense pour survivre dans cet environnement en transition (Harvell *et coll.*, 1999, Harvell *et coll.*, 2002, Mydlarz *et coll.*, 2006).

II.B <u>Reconnaissance de l'agent pathogène</u>

Chez les algues, l'étude des interactions avec les microorganismes à la manière des études plante-pathogène menées chez les plantes supérieures, est assez récente et remonte à une petite dizaine d'années seulement. Aussi, il existe pour l'instant assez peu de patho-systèmes permettant de comprendre les mécanismes de reconnaissance du pathogène et de transduction du signal. Toutefois un certain nombre d'éliciteurs ont été identifiés, entre autres

sur la base de l'induction d'un *burst* oxydant, mais également sur l'activation de réponses de défense diverses (Tableau 1).

II.B.1 Les éliciteurs endogènes

Les premiers exemples de perception d'une agression pathogène grâce à la reconnaissance d'un éliciteur endogène ont été reportés simultanément chez *L. digitata* et chez *Gracilaria conferta*.

Des oligosaccharides issus d'alginate, le principal composant de la paroi de *L. digitata,* induisent chez cette algue, un *burst* respiratoire et oxydant, rapide et transitoire. Les oligoalginates peuvent être produits naturellement au cours de l'agression pathogène, notamment par des bactéries alginolytiques. La capacité de ces oligosaccharides à déclencher l'émission de peroxyde d'hydrogène est complètement liée à leur structure. En effet, seuls les blocs homo-polymériques d'acide α 1-4 guluronique sont capables d'induire le *burst*, tandis que les fragments constitués d'acide mannuronique ou les fragments hétérogènes sont inefficaces (Küpper *et coll.*, 2001). La configuration de l'extrémité réductrice ne semble pas être impliquée dans la reconnaissance. Les oligoguluronates ont une conformation structurale similaire à celle des oligogalacturonides de pectine et peuvent ainsi représenter des analogues fonctionnels. Oligoguluronates et oligogalacturonides établissent tous deux des ponts intermoléculaires en présence d'ions calciques. Ces structures ordonnées, dites en forme de boîtes à œufs, '*egg –box*', représenteraient la forme d'oligogalacturonides possédant l'activité élicitrice (Spiro *et coll.*, 1998).

L'algue rouge *G. conferta* est également capable de reconnaître les fragments issus de la dégradation de sa paroi. Les oligoagars, de type néoagaro-oligosaccharides, dérivés de l'agar sont particulièrement efficaces dans le déclenchement d'un *burst* oxydant et respiratoire. Ils induisent également au bout de quelques heures des nécroses similaires à celles observées dans les cultures de *G. conferta*, infectées par la bactérie responsable de la maladie des taches blanches '*tip bleaching*' (Weinberger *et coll.*, 1999). Ces nécroses sont considérées comme le signe potentiel d'une réponse de type hypersensible. Les oligoagars qui présentent l'activité élicitrice optimale comprennent 6 à 8 unités disaccharidiques : hexadeca-tetradeca et dodecasaccharide. Des concentrations de l'ordre de 0,01 à 0,5 µM sont nécessaires pour obtenir 50 % de la réponse maximale, ce qui est tout à fait comparable aux concentrations d'oligogalacturonides nécessaires chez les plantes.

Tableau 1 : Eliciteurs de défense endogènes et exogènes identifiés chez les algues marines

	Source	Algues	Motif structural requis	Réponses de défense	Références
Eliciteur endogène					
Oligoguluronates	*L. digitata*	*L. digitata* (+certains membres des Laminariales, Desmaretiales, Ectocarpales et Fucales)	DP > 15	- burst oxydant et signalisation intracellulaire du burst - flux iodure - émission COHVs, I_2 . synthèse de phlorotannins - résistance contre des bactéries et endophytes - activation de gènes	Küpper *et coll.*, 2001, 2002 Palmer *et coll.*, 2005 Teissier *et coll.*, non publié Cosse *et coll.*, non publié
Oligoagar	*G. conferta*	*G. conferta* (et autres Gracilariacées)	DP >10	- burst oxydant et signalisation intracellulaire du burst -émission de COHVs - résistance contre des bactéries épiphytes - nécroses	Weinberger *et coll.*, 1999, Weinberger et Friedlander, 2000a, 2000b Weinberger *et coll.*, 2001 Weinberger *et coll.*, 2005 Weinberger *et coll.*, non publié
Eliciteur exogène					
Peptide non identifié	Bactérie type Cytophagale	*G. conferta*	nd	- nécroses	Weinberger et Friedlander, 2000a
Non identifié	*A. operculata*	*C. crispus*	nd	- burst oxydant et signalisation intracellulaire du burst - activation des voies du shikimate et des phénylpropanoïdes - synthèse de composés aromatiques - émission de COHVss - production d'oxylipines - activation de gènes	Bouarab *et coll.*, 1999, 2001 Bouarab *et coll.*, 2004, Bouarab *et coll.*, non publié Hervé *et coll.*, 2006
LPS	Bactérie pathogène de l'homme, bactérie marine	*L. digitata*	nd	- burst oxydant - production d'oxylipines	Küpper *et coll.*, 2006

Les oligoagars adoptent dans l'eau une structure hélicoïdale à plusieurs tours, dans la mesure où 3 unités di-saccharidiques sont nécessaires à la formation de l'hélice. Il est vraisemblable que cette structure en simple ou double hélice soit déterminante pour la reconnaissance par *G. conferta*, tout comme la structure en boîte à œufs des oligogalacturonides chez les plantes. De plus, de manière encore identique aux oligogalacturonides, les formes réduites de ces oligoagaroses ne sont pas actives (Weinberger *et coll.*, 2001). *G. conferta* est également capable de reconnaître les oligocelluloses d'une taille définie, comme en témoigne l'apparition de nécroses à la suite de leur application (Weinberger et Friedlander, 2000a).

La caractérisation bien que partielle de ces deux éliciteurs endogènes, oligoguluronates et oligoagars, indique une activité élicitrice clairement dépendante de la taille et de la structure des oligosaccharides. De plus, la spécificité de taille, ainsi que la mise en évidence d'une période réfractaire d'élicitation dans le cas des oligoguluronates, sont en faveur de l'existence de récepteurs spécifiques pour ces oligosaccharides. L'ensemble de ces observations est tout à fait comparable au mode de perception des oligosaccharides chez les plantes supérieures.

Toutefois, au contraire de la réponse relativement ubiquiste des plantes aux oligogalacturonides ou aux oligoglucanes, la reconnaissance des oligosaccharides chez les algues semblent être taxon spécifique. L'émission de peroxyde d'hydrogène en réponse aux oligoguluronates a été étudiée chez 45 espèces d'algues brunes appartenant à 11 ordres différents. Au final, seuls quelques membres sont capables de reconnaître ces oligosaccharides comme signal de défense. Ils représentent en général des espèces dont la paroi est relativement riche en alginate et chez lesquelles la morphologie du thalle est 'complexe'. Ils appartiennent ainsi essentiellement aux Laminariales, aux Desmaretiales et aux Fucales (Küpper *et coll.*, 2002). Une étude similaire a été menée concernant la reconnaissance des oligoagars chez des algues rouges agarophytes et carraghénophytes appartenant à des genres variés ainsi que quelques algues brunes et vertes. Il s'avère que la reconnaissance des oligoagars comme éliciteur de défense se restreint à quelques espèces de la famille des gracilaires (Weinberger *et coll.*, 1999).

II.B.2 Les éliciteurs exogènes

Des éliciteurs exogènes ont également été mentionnés chez les algues. En plus des oligosaccharides issus de la dégradation de sa paroi, *G. conferta* est sensible à des peptides bactériens, de faible poids moléculaire (4 à 20 acides aminés), qui entraînent l'apparition de nécroses (Weinberger et Friedlander, 2000a). Cependant, ces peptides n'ont pas été caractérisés et leurs effets sur des réponses précoces de défense, type *burst* oxydant, n'ont pas été étudiés. La reconnaissance et la caractérisation d'éliciteurs exogènes ont été décrites plus en avant, notamment chez *L. digitata* et l'algue rouge *Chondrus crispus*.

L'émission de peroxyde d'hydrogène en réponse à l'application de LPS d'origines diverses, bactéries pathogènes de mammifères ou bactéries marines, a été observée chez *L. digitata* (Küpper *et coll.*, 2006). Bien que ce *burst* soit considérablement retardé, il est d'amplitude similaire à celui déclenché par les oligoguluronates. Il est par ailleurs tout à fait notable que le LPS déclenchant le *burst* oxydant le plus important provient de *Salmonella arbotus*, connue pour induire chez les mammifères une réponse inflammatoire sévère accompagnée du *burst* oxydant.

Le couple *C. crispus* / *Acrochaete operculata* représente le premier modèle d'interaction directe algue-pathogène étudié (Bouarab *et coll.*, 1999). *A. operculata* est une algue filamenteuse endophyte du sporophyte de *C. crispus*, chez lequel elle colonise l'ensemble du thalle. Au contraire, les filaments d'*A. operculata* sont incapables de pénétrer au-delà de l'épiderme et du cortex externe du gamétophyte. Le gamétophyte est donc résistant et le sporophyte est sensible. De plus, l'application d'un extrait acellulaire d'*A. operculata* induit exclusivement chez le gamétophyte un *burst* oxydant. L'endophyte possède donc une molécule reconnue par *C. crispus*, un éliciteur exogène, qui permet au gamétophyte de le reconnaître en tant qu'agresseur et d'activer ses réponses de défense. Pour l'instant, les tentatives d'isolement de cet éliciteur n'ont pas abouti.

II.C Réponses de défense

Avec la recherche de ces éliciteurs chez les algues, l'une des premières réponses typiques de défense mise en évidence a donc été la mise en place d'un *burst* oxydant. La signalisation intracellulaire conduisant à la production des espèces activées de l'oxygène, ainsi que les enzymes impliquées dans leur génération sont désormais bien décrites.

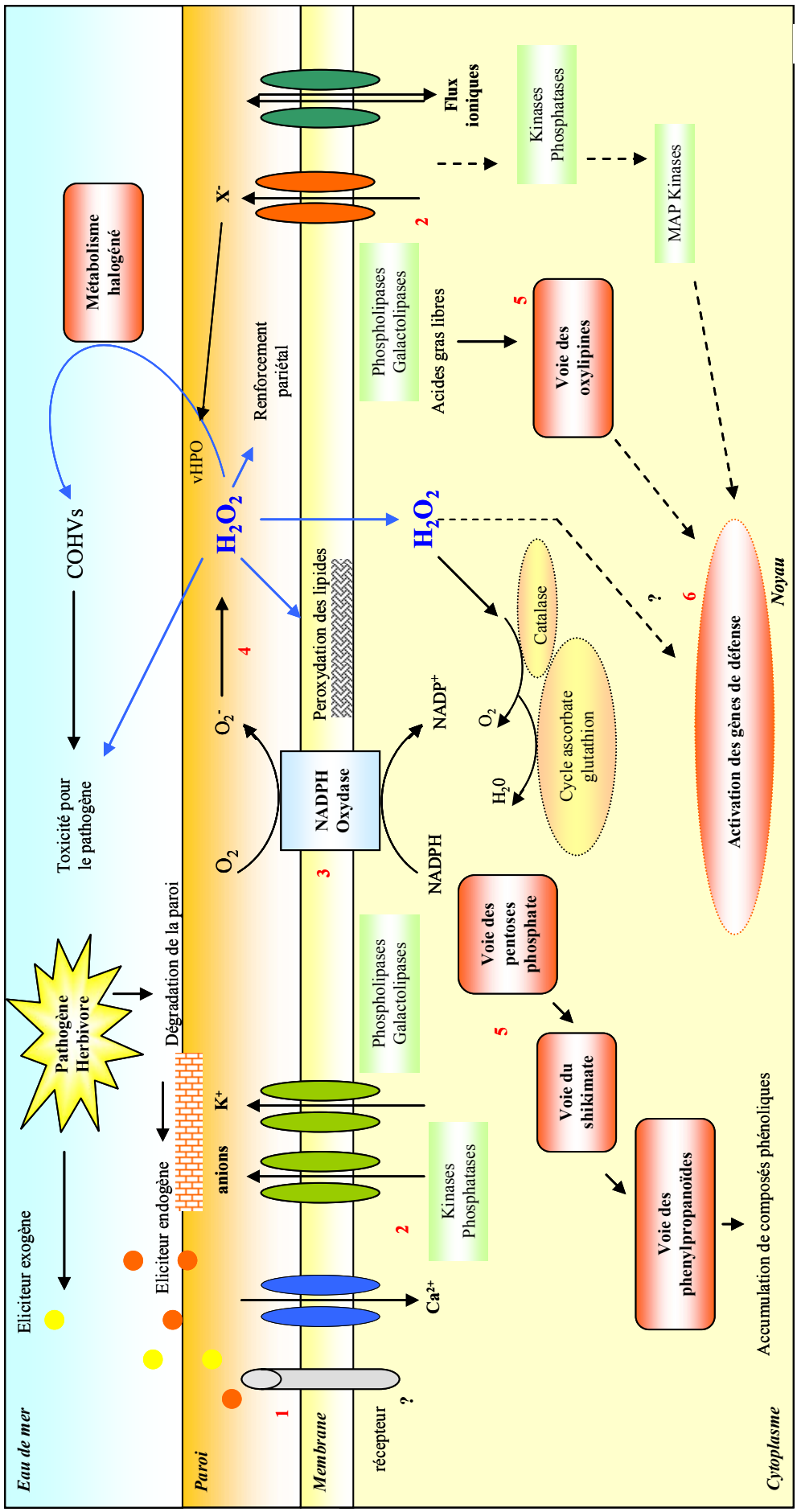


Figure 6 : Modèle de la signalisation et des réponses de défenses caractérisées chez les algues

1) perception de l'agression par reconnaissance d'un éliciteur dérivé du pathogène ou de la paroi de l'algue au niveau d'un récepteur membranaire putatif 2) influx calcique et autres flux ioniques, accompagnés d'activation de phospholipases et d'une cascade de phosphorylation conduisant à 3) l'activation d'une NADPH oxydase 4) dismutation spontanée de l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène 5) activation des voies métaboliques primaires et secondaires 6) induction de la transcription de gènes de défense par différentes voies de transduction.

Concernant les voies métaboliques, au moins trois d'entre elles semblent être fortement activées suite à l'élicitation et impliquées dans la résistance aux pathogènes : la voie des phénylpropanoïdes, celle des oxylipines et celle du métabolisme halogéné (Figure 6).

II.C.1 *Burst* oxydant

Le *burst* oxydant, qui consiste en une émission rapide, massive et transitoire d'espèces activées de l'oxygène (peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), anion superoxyde (O_2^-), radical hydroxyl ($^{\cdot}OH$)…), est une des réponses de défense les plus précoces chez la très grande majorité des organismes. Initialement découvert chez les macrophages de mammifères (Baldrige et Gerard, 1933), il est désormais démontré que le *burst* oxydant est un évènement clé des réponses de défense des plantes (Wojtaszek, 1997) et des algues (Dring, 2005, Potin *et coll.*, 2002). Il met en jeu très généralement une NADPH oxydase membranaire, mais d'autres types d'oxydases peuvent également être impliquées dans la production des EAO.

II.C.1.a Une NADPH oxydase impliquée dans le burst oxydant des algues marines

Chez les algues marines, un *burst* oxydant a été décrit en réponse à des éliciteurs endogènes, dérivés de la paroi des algues ou suite à la perception directe d'un agent pathogène. Les différentes études menées ont montré que la mise en place du *burst* oxydant est essentielle, si ce n'est indispensable, à l'activation immédiate des réponses de défense et à la résistance sur le long terme. Comme chez les plantes, le *burst* oxydant chez les algues marines serait impliqué dans l'immunité naturelle et dans l'immunité induite. Ainsi, chez *L. digitata*, l'émission de peroxyde d'hydrogène contrôle la croissance de la flore épiphytique potentiellement pathogène, et pourrait être impliquée dans l'augmentation de la résistance à l'endophyte *Laminariocolax tomentosoides* (Küpper *et coll.*, 2001, Küpper *et coll.*, 2002). Les mêmes observations ont été faites chez *G. conferta*, où le *burst* consécutif à la perception des oligoagars conduit à l'élimination de la flore bactérienne épiphytique (Weinberger et Friedlander, 2000b). Chez *C. crispus*, l'inhibition du *burst* par le diphenylene iodonium (DPI) entraîne une diminution de la résistance à l'endophyte *A. operculata*. L'endophyte lui-même, lorsqu'il est cultivé en présence de γ-carraghénanes est capable de détoxifier le peroxyde d'hydrogène et devient virulent (Bouarab *et coll.*, 1999).

Dans ces trois pathosystèmes étudiés chez les algues, le *burst* oxydant est sensible au DPI, ce qui suggère qu'une oxydase de type NADPH oxydase pourrait être impliquée dans la génération du peroxide d'hydrogène (Bouarab, 2000, Küpper *et coll.*, 2001, Weinberger *et coll.*, 2005a). La signalisation cellulaire conduisant à l'activation de l'enzyme semble commune aux trois algues et conservée avec celle des plantes. Des approches pharmacologiques du *burst* oxydant montrent que l'activation de la NADPH oxydase nécessite l'ouverture de canaux ioniques (K^+, Na^+, H^+ , Br^- et Cl^-), un influx calcique, l'activation de phospholipases et d'une cascade de phosphorylations. De plus, le *burst* oxydant est dose-dépendant de l'éliciteur et il est conditionné par une période réfractaire de plusieurs heures pendant laquelle toute élicitation est totalement inefficace. Cette observation est corrélée aux données des approches pharmacologiques, indiquant des étapes de phosphorylation. Associé à la spécificité de reconnaissance des oligosaccharides (voir paragraphe II.B), l'ensemble de ces résultats suggère l'existence de récepteurs particuliers pour ces oligosaccharides (Figure 6).

Récemment, un gène codant un homologue de la sous unité gp91^{phox} de NADPH oxydase a été caractérisé chez *C. crispus* (Hervé *et coll.*, 2006). Ce gène, Cc*rboh*, pour '*Chondrus crispus respiratory burst oxydase homologue*', est induit fortement au cours des premières 24 heures de l'interaction avec *A. operculata*, dès que les filaments de l'endophyte commencent à pénétrer le cortex. Ce profil d'induction indique un rôle dans les réponses précoces de défense de l'algue rouge. A la suite d'une recherche *in silico* dans les banques EST et les génomes disponibles, Hervé *et coll.,* (2006) ont également identifié d'autres homologues de NADPH oxydase chez les algues, entre autres chez l'algue rouge unicellulaire *Cyanidioschyzon merolae*, et l'algue rouge *Porphyra yezoensis*, ainsi que chez les diatomées *Phaeodactylum tricornutum* et *Thalassiosira pseudonana*. Aucune séquence similaire n'a été identifiée chez *L. digitata*. La longueur des séquences protéiques déduites des rboh de diatomées est comparable à celle de celle de la gp91phox humaine, alors que les séquences des rboh d'algues rouges possèdent un insert d'au moins 200 acides aminés supplémentaires (Figure 7). De plus, elles ne possèdent pas de site de fixation pour le calcium, au contraire des NADPH oxydases de plantes, ce qui suggère qu'elles pourraient être régulées par des mécanismes communs à ceux des mammifères. Des études de phylogénies montrent que les homologues de NADPH oxydases d'algues rouges et de diatomées constituent un cluster indépendant, ayant émergé très tôt à partir d'un ancêtre commun aux réductases ferriques et aux NADPH oxydases (Hervé *et coll.*, 2006). Par ailleurs, il a été suggéré qu'en jouant un rôle

dans l'établissement d'un signal redox, les NADPH oxydases auraient permis l'acquisition de la multicellularité (Lalucque et Silar, 2003). L'identification d'homologues de NADPH oxydases chez les diatomées et chez l'algue rouge unicellulaire remet en cause cette hypothèse évolutive.

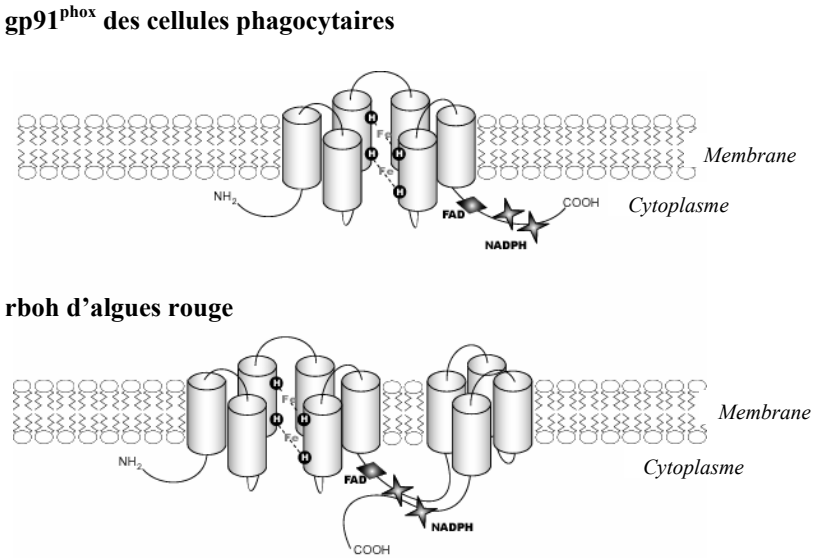


Figure 7 : Modélisation des homologues de NAPH oxydases chez les algues rouges comparés à la sous unité gp91^{phox} des cellules phagocytaires animales

La séquence rboh (*Respiratory Burst Oxydase Homologue)* des algues rouges possède un insert de plus de 200 acides aminés entre les deux sites de fixation du NADPH, formant 4 domaines transmembranaires supplémentaires. Les sites de fixation du FAD et du NADPH sont conservés. Chez l'algue rouge *C. crispus*, le gène codant l'homologue de NADPH oxydase a été complètement caractérisé. Il est fortement induit au cours de l'interaction avec l'endophyte *A. operculata*. D'après Hervé *et coll.,* (2006).

Chez les plantes, un *burst* oxydant est généré localement et dans toute la plante au cours des interactions avec les herbivores, probablement en raison du relargage d'oligogalacturonides. Ce *burst*, dépendant de l'activation d'une NADPH oxydase, joue un rôle important dans l'induction des réponses de défense (Orozco-Cardenas et Ryan, 1999, Orozco-Cardenas *et coll.*, 2001). Malgré l'existence d'une forte pression de broutage chez les algues, aucune étude ne mentionne la production d'un *burst* oxydant en réponse à l'agression directe par un herbivore. Toutefois, la première mise en évidence de la production d'EAO chez les algues correspond à la génération de blessures mécaniques chez l'algue rouge *Eucheuma platycladum* (Collèn *et coll.*, 1994b). Plus récemment, l'implication d'un *burst*

oxydant en réponse à la blessure a été étudiée chez l'algue verte *Dasycladus vermicularis* (Ross *et coll.*, 2005a). *D. vermicularis*, qui est une algue cénocytique, est capable de former rapidement des 'bouchons' pour colmater les brêches induites par les blessures et ainsi limiter la perte de son matériel cytoplasmique (Ross *et coll.*, 2005b). Chez cette algue, la production de peroxyde d'hydrogène semble dépendante d'une flavoenzyme de type NADPH oxydase, comme en témoigne l'inhibition par le DPI. Les auteurs proposent que le *burst* oxydant est impliqué, via l'activation de peroxydases, dans la consolidation de ces 'bouchons' par pontage oxydatif des composés phénoliques produits. Dernièrement, il a également été montré que cette algue produit de l'oxyde nitrique (NO) et que les voies de signalisation conduisant à la production des espèces activées de l'oxygène et de l'azote sont similaires à celles identifiées chez les plantes en réponse à l'agression par un pathogène ou un herbivore (Ross *et coll.*, 2006).

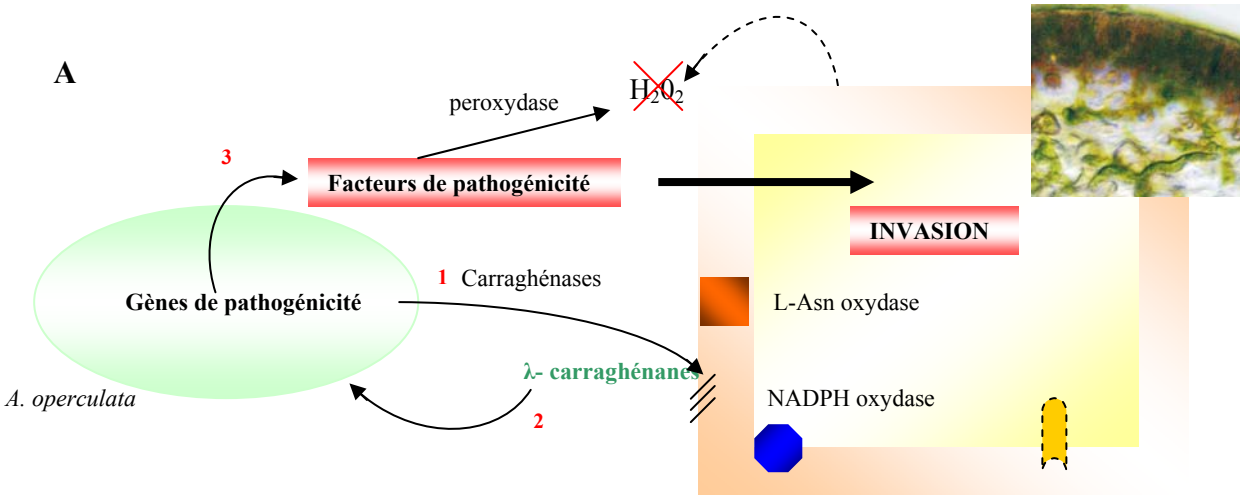
II.C.1.b *Génération du burst oxydant par d'autres systèmes enzymatiques.*

Chez les plantes, des systèmes enzymatiques alternatifs à la NADPH oxydase ont été mis en cause dans la génération d'espèces activées de l'oxygène. Il s'agit entre autres de peroxydases apoplastiques (Martinez *et coll.*, 1998), d'oxydases d'oxalate (Zhang *et coll.*, 1995), d'oxydases d'amines (Rea *et coll.*, 2002) et d'oxydases de carbohydrates (Custers *et coll.*, 2004). Chez les algues, il existe également des indications que de telles enzymes sont impliquées dans le *burst* oxydant. Une oxydase d'oligosaccharides et une oxydase d'acides aminés ont été identifiées.

L'étude de la réponse aux oligoagars chez deux espèces de gracilaires, *G. conferta* et *G. chilensis*, a montré que deux enzymes différentes étaient impliquées dans la génération du *burst* oxydant (Weinberger *et coll.*, 2005a). Chez *G. chilensis*, des applications successives d'éliciteurs induisent systématiquement le *burst*, il n'existe donc pas de période réfractaire comme pour *G. conferta*. Un motif de deux unités disaccharidiques est suffisant pour déclencher le *burst* au lieu de 8 chez sa consœur. Ce *burst* est sensible aux inhibiteurs de métallo-enzymes et de flavoenzymes, mais pas au DPI. Des observations en microscopie électronique à transmission montrent que le peroxyde d'hydrogène produit est localisé au niveau de la paroi médiane, et non au niveau de la membrane comme cela est le cas pour *G. conferta*. Ces deux observations semblent indiquer que la génération de peroxyde

d'hydrogène n'implique par une NADPH oxydase membranaire. Enfin, l'émission de peroxyde d'hydrogène est corrélée à la production d'aldéhydes dans le milieu d'incubation de l'algue. L'ensemble de ces résultats suggère la présence d'une oxydase pariétale, qui oxyde les oligoagars en générant du peroxyde d'hydrogène et des aldéhydes. Les oligoagars ne sont donc pas reconnus en tant que véritables éliciteurs chez *G. chilensis*, mais comme substrat de l'oligoagar-oxydase. De plus, la détection d'activité oxydase, capable d'oxyder les oligoagars, sur gel de polyacrylamide natif, montre l'expression constitutive de plusieurs isoformes de ces enzymes chez *G. chilensis* et *G. conferta*. Cependant, seule, *G. chilensis* montre l'induction de nouvelles isoformes suite à l'élicitation. Par ailleurs, la transduction du signal conduisant au *burst* oxydant ne sollicite pas les mêmes événements cellulaires. En effet, le *burst* chez *G. chilensis* n'est pas affecté par l'inhibition des kinases, des phosphatases, des canaux calciques et potassiques. Ainsi, malgré leur différence dans la reconnaissance de l'éliciteur et dans la transduction du signal, les deux espèces de gracilaires sont toutes deux capables de reconnaître les oligoagars et de mettre en place un *burst* oxydant. L'existence d'oligoagar oxydases constitutives chez ces deux espèces de gracilaires représente une défense passive qui pourrait jouer un rôle important dans le contrôle des bactéries épiphytes agarolytiques. L'étude de Weinberger *et coll.,* (2005) souligne par ailleurs que contre toute attente, les mécanismes de perception et de transduction du signal éliciteur ne sont pas conservés au sein d'espèces proches. De plus, bien que la quantité de peroxyde d'hydrogène émise chez les deux espèces en réponse aux oligoagars soit similaire, elle n'affecte pas chez *G. chilensis* la flore bactérienne associée, ce qui souligne la différence des réponses de défense de ces deux espèces.

Dans l'interaction *C. crispus* / *A. operculata* une amine oxydase a également été identifiée comme source de peroxyde d'hydrogène. Bouarab *et coll.,* (1999) ont montré que la nature des polysaccharides pariétaux de l'algue rouge contrôle la virulence de pathogène. En effet, bien que le gamétophyte haploïde et le sporophyte diploïde soient isomorphes, ils diffèrent par le degré de sulfatation de leurs carraghénanes. Les λ-carraghénanes, issus de sporophyte, entraînent chez *A. operculata* une émission de peroxyde d'hydrogène, stimulent la synthèse protéique, augmentent l'activité carraghénolytique et induisent des polypeptides spécifiques. Ces effets ne sont pas observés avec les κ-carraghénanes provenant de la paroi du gamétophyte. De plus, les spores d'*A. operculata* élicitées par des κ-carraghénanes deviennent incapables d'infecter le sporophyte (Bouarab *et coll.*, 1999).



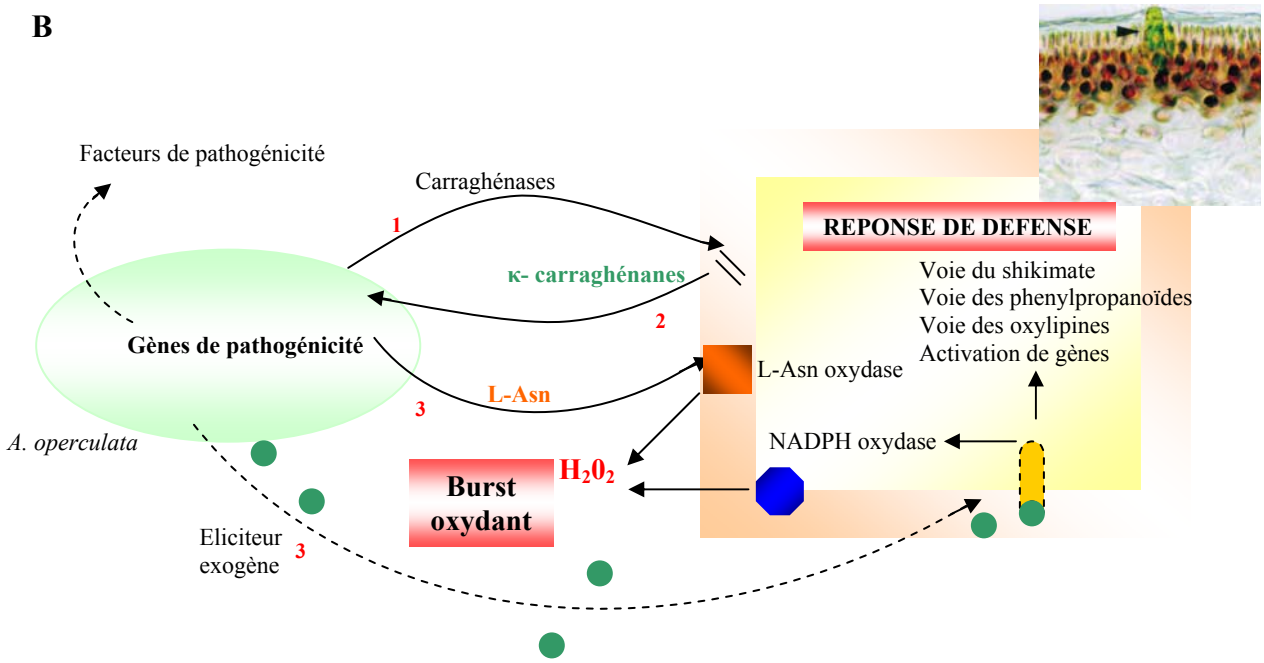


Figure 8 : Interaction *C. crispus / A. operculata*

La communication qui s'établit entre les deux partenaires de l'interaction aboutit à l'infection généralisée du sporophyte (A) et à la résistance du gamétophyte de l'algue rouge, qui contient l'endophyte dans le cortex externe (B). La nature des carraghénanes de *C. crispus* contrôle l'issue de l'interaction.
A. en activant la production de facteurs de pathogénicité chez l'endophyte, les λ-carraghénanes augmentent la virulence de l'endophyte
B. les κ-carraghénanes stimulent la libération de L-asparagine (L-Asn) chez l'endophyte, qui sert de substrat à une oxydase pariétale. Le peroxyde d'hydrogène produit est directement toxique pour l'endophyte. Les extraits d'*A. operculata* et l'infection directe activent la production d'un *burst* oxydant dépendant d'une NADPH oxydase, ainsi que de nombreuses réponses de défense. Un éliciteur exogène existe très probablement chez *A..operculata* ainsi qu'un récepteur spécifique à cet éliciteur chez l'algue rouge.

Par contre, suite à l'élicitation par les κ-carraghénanes, *A. operculata* secrète un acide aminé, la L-asparagine, qui en retour est capable à lui seul d'induire chez l'algue la production de peroxyde d'hydrogène et d'acide 2-oxosuccinamique. Les quantités de peroxyde d'hydrogène produites sont suffisamment importantes pour être létales vis à vis de l'endophyte (Weinberger *et coll.*, 2002). Cet 'échange' est l'un des premiers exemples de communication chimique chez les algues, où le signal produit par un agent pathogène sert directement de substrat à la production de métabolites de défense.

Il s'avère que la L-asparagine est le substrat d'une L-acide-aminé oxydase pariétale chez *C. crispus* (Weinberger et coll., 2005b). L'activité de cette enzyme est totalement indépendante du *burst* oxydant généré suite à la reconnaissance d'*A. operculata* et ne nécessite pas les mêmes évènement de transduction cellulaire. Elle est directement activée par la simple présence du substrat. L'adhésion des spores d'*A. operculata* sur des thalles de sporophyte peut être fortement diminuée par l'addition de L-asparagine et cet effet est aboli par l'ajout de catalase. La résistance nouvellement acquise du sporophyte est donc directement liée à la production de peroxyde d'hydrogène, grâce au rôle de substrat de la L-asparagine pour l'oxydase pariétale. De plus, chez le gamétophyte, l'addition de L-asparagine conduit à l'élimination de plus de la moitié de flore bactérienne épiphyte dans les 30 minutes qui suivent son application (Weinberger *et coll.*, 2005b). Les auteurs proposent que l'oxydation de la L-asparagine qui conduit à la formation de peroxyde d'hydrogène, contribue à la résistance des gamétophytes de *C. crispus*, d'une part en évitant l'adhésion des spores en étant directement toxique, d'autre part en contribuant au renforcement pariétal, confinant ainsi l'endophyte au site de pénétration des filaments.

Ainsi, la nature des carraghénanes de la paroi de *C. crispus* contrôle l'issue de l'interaction avec l'endophyte *A. operculata*, en affectant directement la virulence de l'endophyte (Bouarab *et coll.*, 1999) ou en stimulant la libération de composés causant directement sa perte (Weinberger *et coll.*, 2005b) (Figure 8).

II.C.2 Activation de la voie des phénylpropanoïdes

Chez les plantes, la voie des phénylpropanoïdes constitue la source de nombreux métabolites impliqués dans les réponses de défense (Zhao *et coll.*, 2005). Elle conduit entre autres à la synthèse de certaines phytoalexines, aux propriétés antimicrobiennes et antifongiques ainsi qu'à la synthèse de l'acide salicylique, jouant un rôle majeur dans la résistance locale et dans la résistance systémique. Cette voie amène également à la formation

des monomères de lignine, engagée dans le renforcement pariétal, ou encore de divers composés. Cette voie métabolique majeure est directement connectée à la voie du shikimate qui lui fournit le précurseur indispensable, la phénylalanine (Figure 9). De manière analogue aux plantes supérieures, il existe plusieurs indications de l'activation de la voie des phénylpropanoïdes ou du moins de l'accumulation de composés phénoliques chez les algues, suite à l'infection par un pathogène.

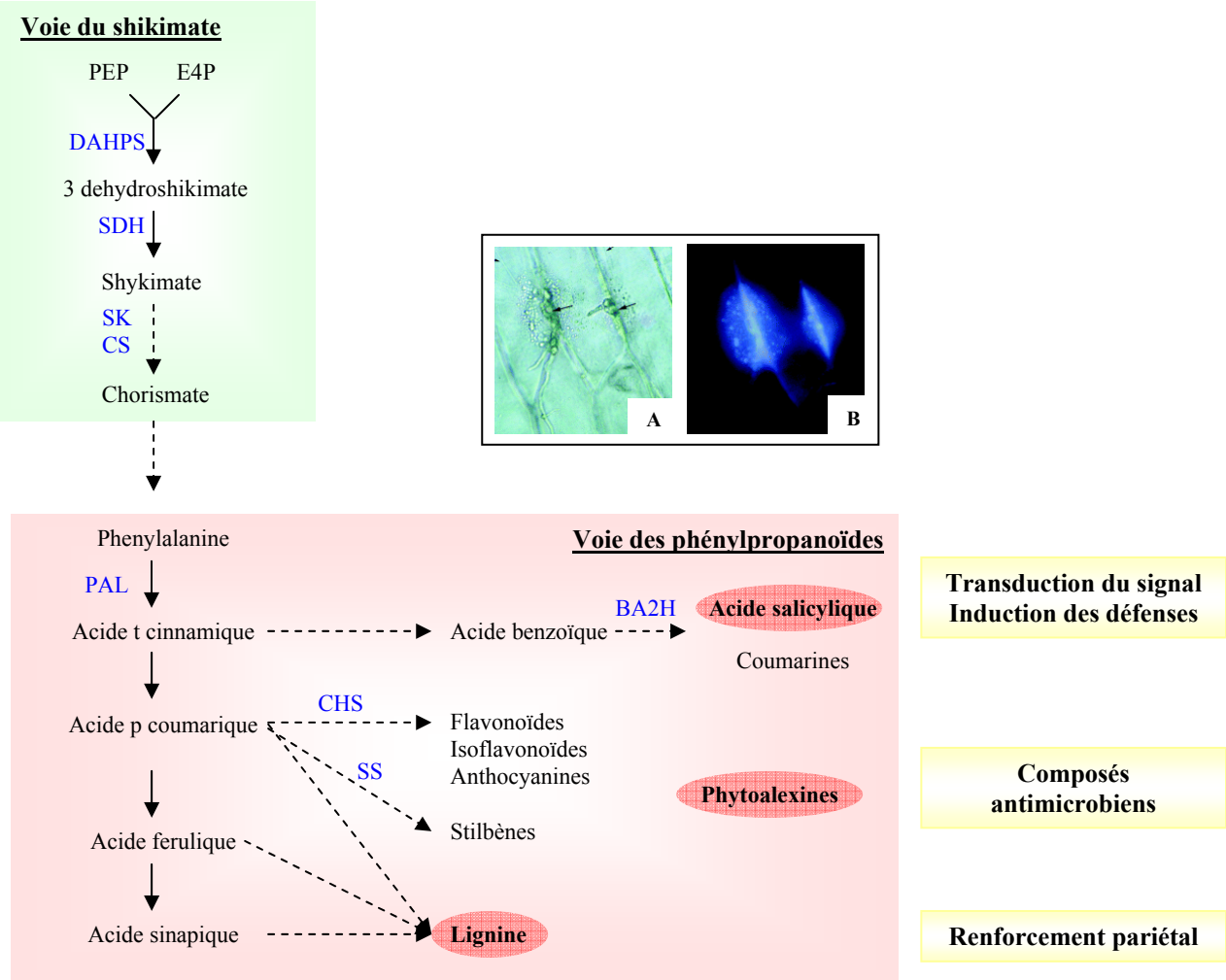


Figure 9 : La voie des phénylpropanoïdes, source de métabolites secondaires de défense

La phénylalanine est le précurseur indispensable à l'activation de cette voie de biosynthèse. Cet acide aminé est fourni par la voie du shikimate. La voie des phénylpropanoïdes fournit au moins 3 types de composés de défense : l'acide salicylique, les phytoalexines, de type flavonoïdes ou stilbènes, et la lignine. Les enzymes clés de ces deux voies de biosynthèse sont indiquées : 3-deoxy-arabino-heptulosonate-7-phosphate synthase (DAHPS), shikimate deshydrogénase (SDH), shikimate kinase (SK), chorismate synthase (CS), phénylalanine ammonia-lyase (PAL), acide benzoïque-2-hydroxylase (BA2H), chalcone synthase (CHS), stilbène synthase (SS).
La photographie illustre la formation de granules renfermant des composés phénoliques, dérivés de l'acide coumarique, au site de pénétration du pathogène *Botrytis allii* chez l'oignon. Observation au microscope (A), les flèches indiquent les sites de pénétration du champignon et sous UV (B), autoflorescence bleue pâle des composés phénoliques. Photographie d'après McLusky *et coll.,* (1999).

Les plantules de *L. digitata* synthétisent des composés autofluorescents sous UV dans l'environnement cortical au contact des filaments de l'endophyte *Laminariocolax tomentosoides*. Lorsque les plantules sont incubées en présence d'oligoguluronates avant d'être inoculées, elles affichent une nette résistance à l'infection. Les composés autofluorescents ont une distribution générale dans tout le cortex tout en étant moins dense. Leur production pourrait donc être directement liée au *burst* oxydant, consécutif à la perception des oligoguluronates comme signal d'agression (Küpper *et coll.*, 2002). Ces composés phénoliques pourraient être des métabolites secondaires aromatiques tels que des phlorotannins. Il a d'ailleurs été montré que les phlorotannins peuvent être considérés comme des métabolites de défense dans la mesure où leur production est induite suite au contact avec un herbivore. Ils augmentent par la suite la résistance aux brouteurs en rendant l'algue impropre à la consommation (Toth et Pavia, 2000) .

Les gamétophytes de *C. crispus*, qui constituent la génération résistante de l'algue rouge, accumulent également des composés absorbant dans l'UV autour des sites de pénétration des spores d'*A. operculata*. Cette accumulation n'est pas observée chez le sporophyte sensible (Figure 10).

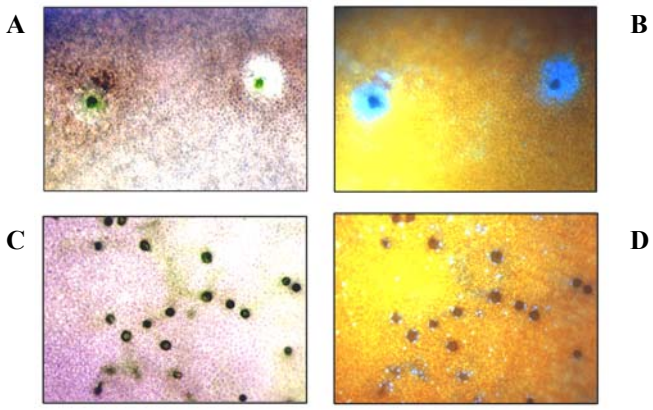


Figure 10 : Accumulation de composés aromatiques autour du site de pénétration d'*A. operculata* chez les gamétophytes de *C. crispus*

A-B, zone de pénétration des spores d'*A. operculata* chez le gamétophyte résistant, en lumière blanche et sous UV respectivement.
C-D zone de pénétration des spores d'*A. operculata* chez le sporophyte sensible, en lumière blanche et sous UV respectivement.
Vue de surface au microscope. D'après Bouarab, (2000).

La nature aromatique de ces composés a été confirmée par HPLC. De plus, les extraits d'*A. operculata* activent chez *C. crispus* deux enzymes clés de la biosynthèse des phénylpropanoïdes : la shikimate deshydrogenase et la phénylalanine ammonia-lyase. L'application d'inhibiteurs de ces voies métaboliques (voie du shikimate et voie des phénylpropanoïdes), le glyphosate et l'acide L-α-aminooxy-β-phenylpropionique (AOPP), empêche l'activation de ces enzymes, bloque l'accumulation des composés et abolit la résistance du gamétophyte de *C. crispus* (Bouarab, 2000, Bouarab *et coll.*, 2004). L'activation des ces deux voies métaboliques pourrait être déclenchée par une signalisation oxilipidique (voir paragraphe II.C.3). Les composés phénoliques produits au cours de cette interaction pourraient être directement toxiques pour l'endophyte et participer à la densification pariétale par pontage oxydatif, conduisant au confinement du pathogène au site de pénétration.

Chez les algues, la synthèse de composés aromatiques, issus ou non de la voie des phénylpropanoïdes, est donc activée suite à la perception d'un agent pathogène. Les composés phénoliques produits sont directement impliqués dans la résistance de l'algue à son agresseur.

II.C.3 Activation de la voie des oxylipines

Chez les animaux et chez les plantes, l'oxydation enzymatique ou non d'acides gras polyinsaturés conduit à la génération d'une très grande diversité de dérivés oxydés, référencés sous le terme général d'oxylipines. Ces oxylipines sont synthétisées *de novo* en réponse à des stress biotiques ou abiotiques par l'action coordonnée de lipases, lipoxygénases, cyclooxygénases et de certaines enzymes à cytochrome P450, selon les oxilipines et les êtres vivants concernés. Chez les mammifères, les oxylipines de type eicosanoïdes sont synthétisées entre autres à partir de l'acide arachidonique (C20:4). Ils régulent la différenciation cellulaire, l'homéostasie et la réponse immunitaire (Funk, 2001). Prostaglandines, thromboxanes et leucotriènes jouent un rôle majeur dans les processus inflammatoires et globalement dans la réponse aux infections et allergies.

Chez les plantes, les oxylipines sont synthétisées à partir d'acides gras en C18 ou en C16, notamment l'acide linoéique (C18:2) et l'acide linolénique (C18:3) et constituent des hormones de développement et de défense. Du point de vue du développement, l'acide jasmonique et son ester de méthyle, le jasmonate de méthyle (MeJA), jouent un rôle important dans la fertilité, la germination, la croissance, la maturation des fruits … (Cheong et Choi, 2003). Leur implication dans la résistance à de nombreux stress abiotiques a également été

largement décrite. Ils ont par ailleurs un rôle essentiel dans la défense biotique des plantes, notamment dans la réponse aux agressions herbivores et en tant que molécule signal dans la résistance systémique (Schilmiller et Howe, 2005).

La présence d'oxylipines de type eicosanoïdes et octadecanoïdes est bien documentée chez les algues, mais leur fonction biologique reste globalement une énigme (Gerwick *et coll.*, 1999) (Figure 11). Quelques études récentes montrent que ces composés sont impliqués dans l'immunité des algues brunes comme rouges.

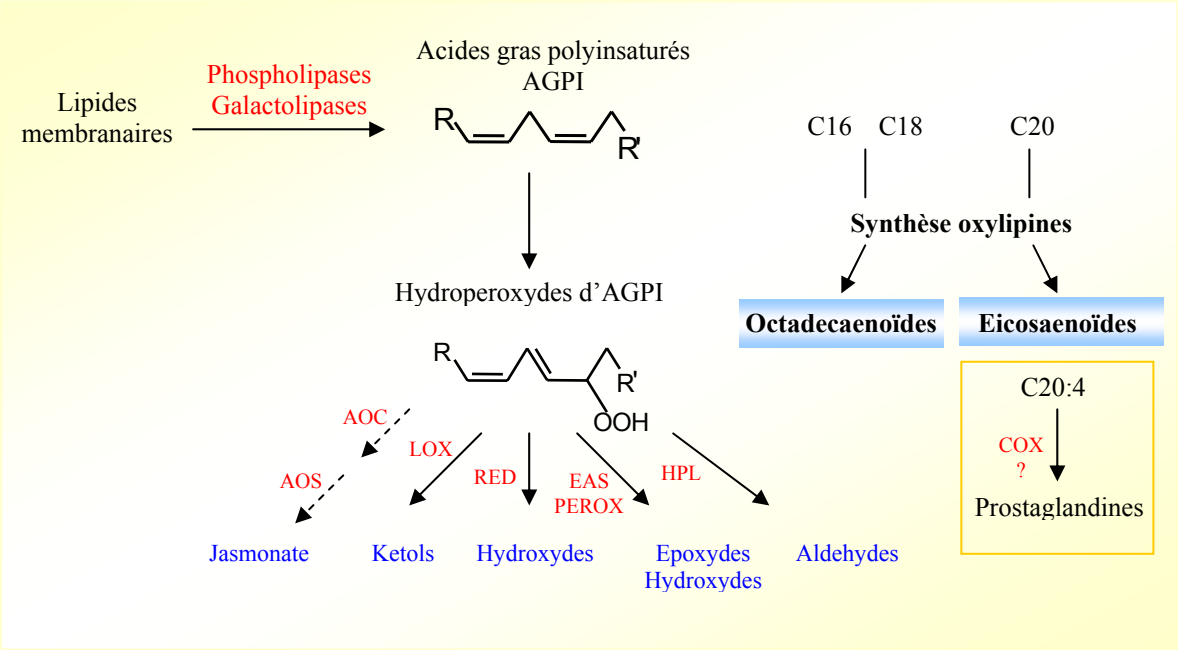


Figure 11 : Voies de biosynthèse des oxylipines identifiées chez les algues marines

Les acides gras polyinsaturés (AGPI) sont libérés à partir de la membrane par activation de phospholipases ou de galactolipases. Ils permettent la biosynthèse d'oxylipines de type octadécanoïdes (C18) et eicosanoïdes (C20). De nombreuses enzymes sont impliquées dans la biosynthèse de ces oxylipines AOS : allène oxyde synthase, AOC : allène oxyde cyclase, LOX : lipoxygénase, RED : réductase, EAS :epoxy-alcool synthase, PEROX : peroxygénase, HPL hydroperoxyde lyase, COX : cyclooxygénase. L'activation d'une cyclooxygénase pourrait permettre la biosynthèse de prostaglandine à partir de l'acide arachidonique.

Chez *L. digitata*, l'application de LPS d'origines diverses entraîne la libération d'acides gras libres et la synthèse de dérivés oxydés de l'acide linoéique, tel que l'acide-13-hydroxyoctadecatrienoïque (13-HOTrE) et de l'acide eicosapentaenoïque (C20:5), tel que l'acide15-hydroxyeicosapentaenoïque (15-HEPE). Ces réponses ne sont pas observées suite

au traitement par des oligoguluronates (Küpper *et coll.*, 2006). Cette différence indique qu'à la suite du *burst* oxydant, qui est observé dans les deux cas, des voies de signalisation et des réponses de défense distinctes sont activées. L'application exogène d'acide arachidonique, d'acide linolénique et de MeJA déclenche également un *burst* oxydant sensible au DPI chez *L. digitata*. Le traitement avec l'acide arachidonique entraîne une forte libération d'acides gras et de leurs dérivés hydroxylés et confère à *L. digitata*, tout comme avec le MeJA une résistance accrue à l'endophyte *L. tomentosoïdes* (Küpper *et coll.*, non publié).

L'application de MeJa entraîne aussi l'accumulation de phlorotannins chez l'algue brune *Fucus vesiculosus* à marée basse. La cinétique et l'amplitude de cette accumulation sont comparables à celles observées en réponse à des agressions herbivores chez d'autres algues brunes. Ces résultats suggèrent que des molécules de structures similaires aux cyclopentenones pourraient jouer un rôle dans les réponses anti-herbivores (Arnold *et coll.*, 2001).

Chez l'algue rouge *G. chilensis*, un relargage d'acides gras ainsi que la synthèse de certains hydroperoxydes d'acides gras en C20 sont également provoqués suite à la blessure. Plusieurs voies de signalisation semblent impliquées dans ces réactions, dans la mesure où la libération de l'acide arachidonique et la synthèse du 8-HETE (acide 8R-hydroxy eicosatétraenoïque) sont dépendants de l'activité de la phospholipase A, alors que la production du 7,8-di-HETE (acide 7S,8R-dihydroxy eicosatétraenoïque) n'implique pas cette lipase. Cet acide gras dihydroxylé pourrait être libéré à partir de galactolipides contenant du 8-HETE ou du 7,8-di-HETE. La mise en place de bio essais comprenant des matrices artificielles imbibées de ces acides gras hydroxylés ont montré que les concentrations produites par *G. chilensis* en réponse à la blessure, étaient suffisantes pour réduire l'adhésion des spores et la pénétration des filaments de certains épiphytes (Lion *et coll.*, 2006).

L'élicitation des gamétophytes de *C. crispus* par un extrait acellulaire d'*A. operculata* provoque une modification du profil d'acides gras libres. Plusieurs oxylipines en C18 et C20 sont également synthétisées (Bouarab *et coll.*, 2004) (Figure 12). Des études *in vitro* du métabolisme oxydatif des acides gras polyinsaturés ainsi que des tests d'activité enzymatique, couplés à des approches pharmacologiques, laissent supposer que des lipoxygénases sont impliquées dans la biosynthèse de ces différentes oxylipines (Bouarab *et coll.*, 2004, Gaquerel, 2005).

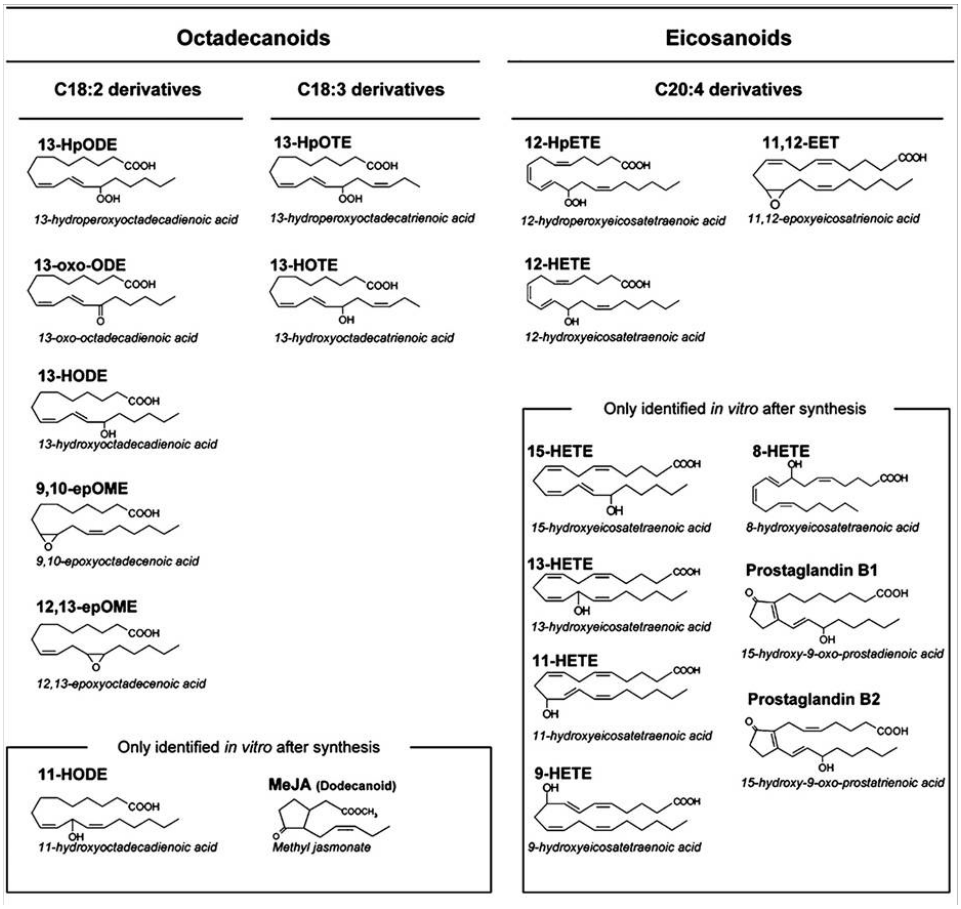


Figure 12 : Dualité oxylipidique chez *C. crispus* au cours des réponses de défense

Ces oxylipines ont été caractérisées dans des extraits de gamétophytes de *C. crispus* élicités par des extraits acellulaires d'*A. operculata* ou à la suite d'incubation de ces mêmes extraits élicités avec des acides gras polyinsaturés exogènes. Des octadecanoïdes, dérivés des acides gras en C18 et des eicosanoïdes, dérivés des acides gras en C20 sont synthétisés en réponse à l'élicitation. L'algue rouge possède et active les voies de signalisation oxylipidique typiquement végétale et animale. D'après Bouarab *et coll.*, (2004).

Des expériences *in vitro* sur des fractions acellulaires de *C. crispus* élicités par l'extrait d'*A. operculata* montrent d'une part la synthèse de prostaglandines B1 et B2 dans le cas d'incubation avec de l'acide arachidonique et d'autre part la synthèse de MeJA dans le cas d'incubation avec l'acide linolénique (Bouarab *et coll.*, 2004) (Figure 12). Il a également été montré que l'élicitation de *C. crispus* par du MeJA induit la synthèse de prostaglandine A2 et E2 ainsi que l'activation de gènes de défense, tels que les GST (Gaquerel *et coll.*, 2007). Hervé *et coll.,* (2006) montrent par ailleurs l'induction du gène codant la NADPH oxydase

chez *C. crispus* en réponse au MeJA, ainsi qu'à certains hydroperoxides de l'acide linoéique et de l'acide arachidonique.
Les oxylipines produites au cours de l'interaction avec *A. operculata* pourraient jouer un rôle important de messagers dans l'induction de la biosynthèse des phénylpropanoïdes et dans la résistance à l'endophyte. En effet, l'application d'un inhibiteur de lipoxygénase abolit l'accumulation des composés autofluorescents autour des sites de pénétration de l'endophyte et rend le gamétophyte sensible à l'infection. De plus certaines oxylipines, en C18 comme en C20 ainsi que le MeJA stimulent les activités shikimate deshydrogenase et phénylalanine ammonia-lyase aussi bien chez le gamétophyte que le sporophyte, ce qui a pour effet de rendre ce dernier transitoirement résistant à l'infection (Bouarab *et coll.*, 2004). Enfin, étant donné la toxicité avérée des prostaglandines d'algues rouges pour la consommation humaine (Noguchi *et coll.*, 1994), les prostaglandines produites chez *C. crispus* en conditions de stress pourraient être impliquées dans la résistance aux brouteurs.

L'identification d'acide jasmonique en tant que composé endogène de *C. crispus*, mais aussi de *L. digitata,* reste pour l'instant infructueuse. Cependant, l'étude de Gaquerel *et coll.,* (2007) met clairement en évidence que le MeJA est absorbé par *C. crispus* et qu'il induit de manière dose dépendante la production de plusieurs oxylipines. Le MeJA est de plus un régulateur transcriptionnel des gènes de défense (Collèn *et coll.*, 2006a, Gaquerel *et coll.*, 2007, Hervé *et coll.*, 2006). La présence d'acide jasmonique endogène a par ailleurs été mise en évidence chez une autre algue rouge, *Gelidium latifolium* (Krupina et Dathe, 1991) et les enzymes conduisant à sa biosynthèse à partir de l'acide linolénique ont également été identifiées chez deux autres algues rouges, *Lithothamnion coralloides* et *Gracilariopsis sp* (Hamberg et Gardner, 1992, Hamberg et Gerwick, 1993). L'ensemble des ces études tendent à suggérer l'existence chez les algues d'une voie de biosynthèse conduisant à la production de MeJA ou du moins, d'une cyclopentenone similaire.

Au regard des résultats acquis au cours de ces études sur *L. digitata*, *G. chilensis* et C. *crispus*, la fonction biologique des oxylipines chez les algues comme métabolites de défense semble beaucoup plus claire. Elles appartiendraient directement à l'arsenal chimique permettant de lutter contre les épiphytes et les herbivores. Elles joueraient également un rôle important dans la signalisation intra et/ou intercellulaire, à la manière d'une hormone de stress, permettant la transduction du signal conduisant à l'activation de certains gènes de

défense et à l'activation de voies de biosynthèse permettant la production de métabolites secondaires de défense.

Une information importante qui ressort également des résultats exposés précédemment, est la dualité lipidique et oxylipidique des algues. Les algues marines ont en effet la particularité de synthétiser des acides gras polyinsaturés en C20 comme en C18, ce qui n'est pas le cas des animaux et des plantes. En effet, les mammifères sont complètement dépendants de leur alimentation pour ce qui est de l'acide linoléique et de l'acide linolénique, à partir desquels ils synthétisent l'acide arachidonique, qui est le principal précurseur de leurs oxylipines. Au contraire, les plantes synthétisent surtout des acides gras en C18 et à quelques exceptions près, jamais d'acide arachidonique. En plus de posséder la capacité à synthétiser les deux types d'acides gras, les études mentionnées précédemment montrent que les macroalgues utilisent à la fois des oxylipines de type eicosanoïdes et octadecanoïdes dans la mise en place et la régulation de leurs réponses de défense. Ceci n'est pas sans rappeler les études récentes montrant que les mammifères, en plus des dérivés de l'acide arachidonique, mobilisent également des dérivés oxydés de l'acide linoléique comme composés de défense (Ishizaki *et coll.*, 1995). Le schéma évolutif le plus probable expliquant la dualité oxilipidique de ces deux lignées, algues et mammifères seraient que ces deux catégories de dérivés lipidiques préexistaient avant la séparation des lignées eucaryotes photosynthétiques et que la divergence des plantes supérieures se serait accompagnée de la perte de la capacité à synthétiser l'acide arachidonique (Bouarab *et coll.*, 2004) (Figure 13).

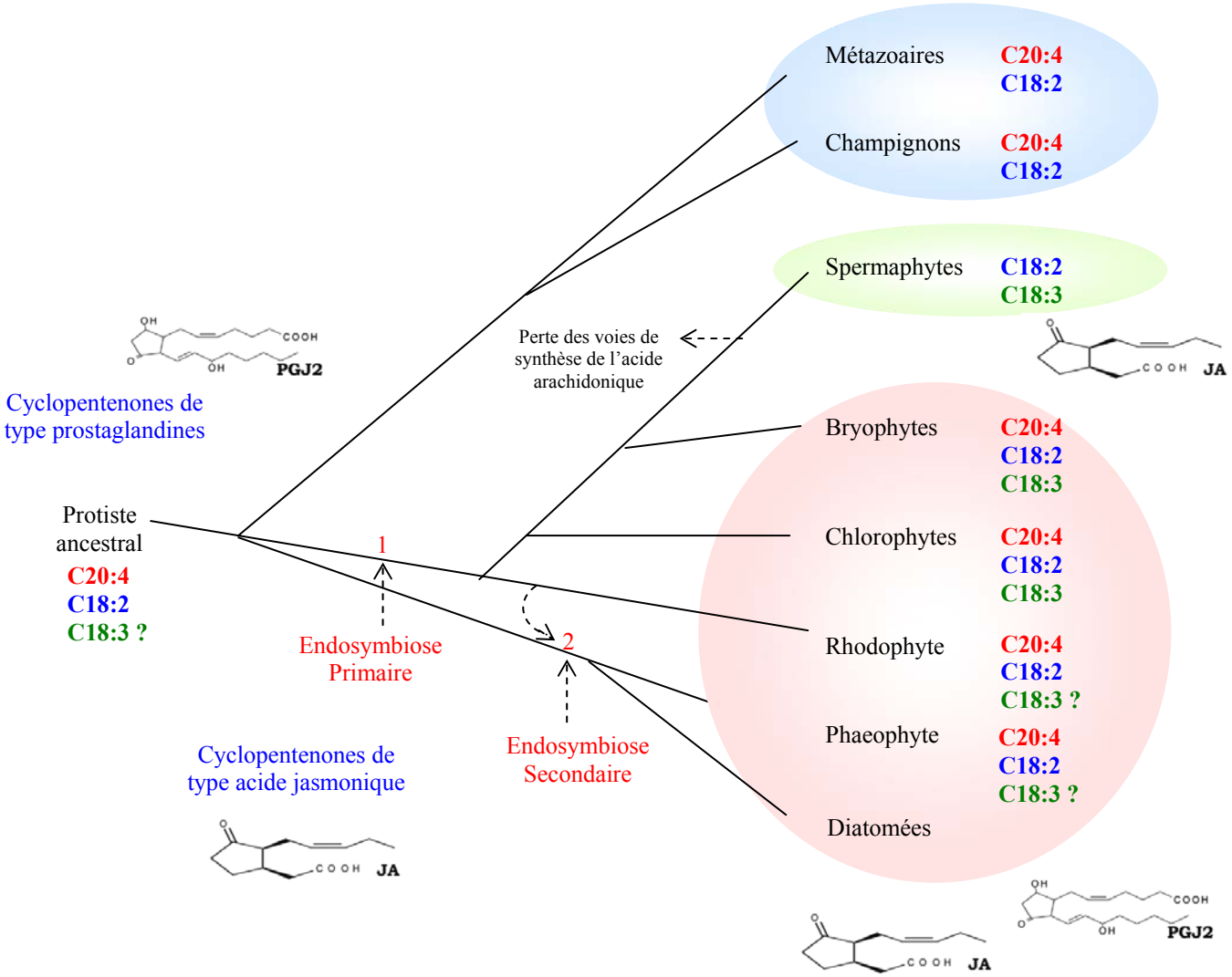


Figure 13 : Représentation spéculative de la distribution des acides gras polyinsaturés et de leurs dérivés cyclopentanones chez les eucaryotes

Les différents groupes, animaux, champignons, plantes supérieures, mousses, algues vertes, rouges et brunes sont représentés. L'endosymbiose entre un hôte eucaryote et une cyanobactérie (1) a donné naissance à la lignée des Rhodophytes, de laquelle la lignée verte a divergé (algues vertes et plantes vertes). Compte tenu de la large distribution des voies de biosynthèse des acides gras en C20 et C18, les règles de parcimonie laissent supposer que l'ancêtre commun possédait ces deux voies. Les prostaglandines telles que la prostaglandine J2 (PGJ2) sont retrouvées dans la plupart des lignées eucaryotes à l'exception des plantes supérieures. La présence de l'acide jasmonique chez les algues rouges et chez les plantes supérieures provient probablement de l'endosymbiose primaire chloroplastique. Les algues brunes, qui appartiennent au même phylum que les diatomées et les oomycètes, sont issues d'une endosymbiose secondaire (2) entre un protiste sans plaste et un ancêtre unicellulaire d'algue rouge, ont conservé les deux voies de signalisation. Les spermaphytes ne possèdent pas de voies de biosynthèse des oxylipines en C20, en raison de la probable perte d'élongase ou desaturase. Modifié d'après Bouarab *et coll.,* (2004).

III. Le métabolisme halogéné, un métabolisme de défense chez les algues marines ?

" Va donc faire un tour au bord de la mer, l'air iodé te fera le plus grand bien."

Un conseil régulièrement dispensé dans notre région et non sans raison : les algues qui forment des peuplements très denses sur les côtes bretonnes sont la source d'une production massive de composés organiques halogénés volatils (COHV) et d'iode moléculaire gazeux (I_2), auxquels aucun nez ne peut se soustraire ! Une stratégie somme toute agréable pour assimiler l'iode dont notre corps a besoin pour synthétiser des hormones vitales à son fonctionnement. Le métabolisme halogéné des algues marines a particulièrement été étudié ces dernières années en raison de sa contribution importante au cycle biogéochimique des halogènes. Les COHV, et plus particulièrement l'I_2, ont de plus un impact significatif sur la destruction de l'ozone et la formation des nuages au-dessus des zones côtières (McFiggans *et coll.*, 2004, O'Dowd *et coll.*, 2002). De nombreuses études sont entreprises pour comprendre les mécanismes biochimiques et physiologiques de formation de ces composés, avec le but ultime de prédire leur réel impact sur la chimie de l'atmosphère et notamment la destruction de l'ozone. L'augmentation de la production des COHV chez les macroalgues marines est très généralement associée au stress oxydant généré à marée basse (Carpenter *et coll.*, 1999) et plusieurs études tendent à montrer que ce métabolisme prépondérant chez les algues serait associé aux réponses de défense.

III.A Métabolisme halogéné et haloperoxydases

III.A.1 Les algues, des accumulateurs d'halogénures

Les organismes marins et plus particulièrement les algues sont connus depuis longtemps pour concentrer les halogénures de leur environnement. A l'exception du fluor qui est majoritairement présent dans la croute terrestre sous forme inorganique, le chlore, le brome et l'iode sont surtout présents dans les océans avec des concentrations respectives de l'ordre de 500 mM, 1 mM et 0,5 µM. Le chlore est trouvé sous forme de NaCl, alors que l'iode et le brome sont majoritairement présents sous forme ioniques.

La concentration de l'iode par les sporophytes de *L. digitata* a été décrite dès le début du 19ème siècle par Courtois (Courtois, 1813). L'iode peut représenter jusqu'à 4,7 % du poids sec des jeunes plantules, ce qui correspond à un facteur de concentration de 10^6 par rapport à l'eau de mer (Küpper *et coll.*, 1998), mais des variations sont observées en fonction des tissus (Ar Gall *et coll.*, 2004). Par exemple, les jeunes plantules sont les plus riches en iode, ainsi que la zone méristématique par rapport aux extrémités distales du thalle (Figure 14). Les algues rouges appartenant aux Céramiales sont les algues qui concentrent le plus le brome à hauteur de 3,7 % de leur poids sec (Saenko *et coll.*, 1978). En raison de l'importance de l'iode dans la santé humaine, la très grande majorité des études a ciblé le contenu en iode des algues commerciales (Teas *et coll.*, 2004) et a montré que cet élément est essentiellement présent sous la forme d'iodures (Shah *et coll.*, 2005).

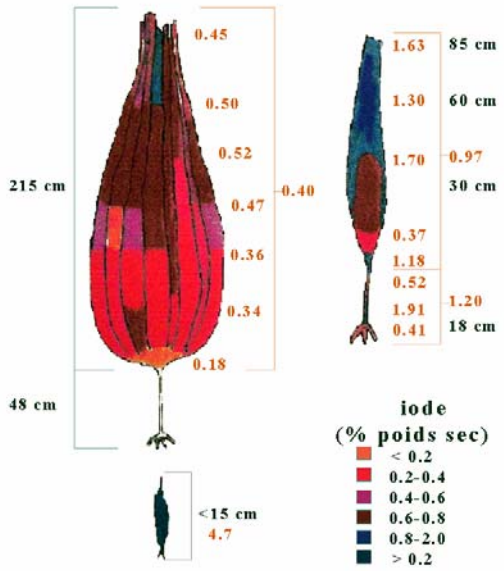


Figure 14 : Accumulation d'iode dans les sporophytes de *L. digitata*

Les plantules les plus jeunes sont les plus concentrées en iode, avec une concentration pouvant atteindre 4,7 % du poids sec. Globalement, plus les thalles sont âgés et grands, et moins ils contiennent d'iode. D'après Küpper *et coll.,* (1998).

Les algues qui accumulent l'iode présentent également de fortes concentrations de brome, ce qui suggère qu'un mécanisme commun d'absorption et de rétention est impliqué, bien qu'il ne soit toujours pas clairement élucidé. L'hypothèse d'un stockage de l'iode dans des vacuoles non spécialisées des cellules corticales de la lame ou dans des physodes des cellules du stipe (Dangeard, 1957) a été très récemment remise en question grâce à des études d'imagerie microscopique, montrant une localisation majoritairement pariétale de cet élément (Verhaeghe *et coll.*, non publié).

III.A.2 Les enzymes de l'halogénation

Concernant les enzymes du métabolisme halogéné, une classe particulière de peroxydases, les haloperoxydases dépendantes du vanadium (v-HPO) sont impliquées dans l'absorption de l'iode et du brome chez les algues, dans la production des COHV, de terpènes et composés phénoliques halogénés (Butler et Carter-Franklin, 2004, Leblanc *et coll.*, 2006). Les haloperoxydases catalysent l'oxydation d'halogénures en présence de peroxyde d'hydrogène en produisant un intermédiaire instable et diffusible, un acide hypohaleux, qui réagit avec de nombreux squelettes carbonés (Figure 15).

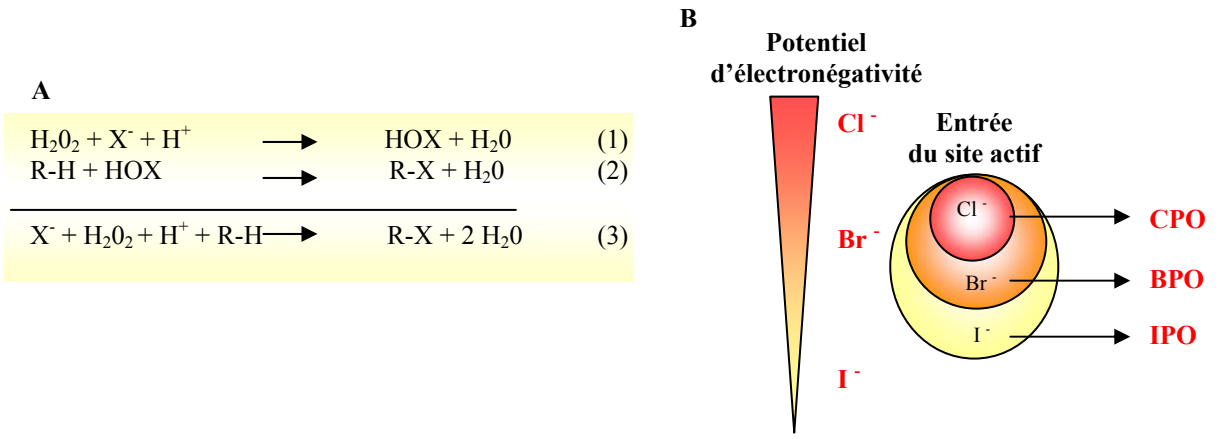


Figure 15 : Les haloperoxydases : réaction enzymatique et classification

A) Réaction enzymatique catalysée par les HPO. Les haloperoxydases oxydent les halogénures (X^-) en présence de peroxyde d'hydrogène H_2O_2 (1) et produisent directement (3) ou indirectement (2) des composés organiques halogénés. L'acide hypohaleux produit (HOX) est considéré comme un intermédiaire. En présence d'un accepteur nucléophile (substrat organique R-H), un composé organique halogéné (R-X) est synthétisé.
B) Classification des HPO en fonction du potentiel électronégatif de l'halogénure qu'elles sont capables d'oxyder.
CPO : chloroperoxydase, BPO : bromoperoxydase, IPO : iodoperoxydase

Les haloperoxydases sont nommées selon l'halogénure le plus électronégatif qu'elles sont capables d'oxyder : une chloroperoxydase (CPO) oxyde le chlorure, le bromure et l'iodure, une bromoperoxydase (BPO) oxyde le bromure et l'iodure, et une iodoperoxydase (IPO) oxyde uniquement l'iodure (Figure 15). Chez les algues marines, ce sont majoritairement des BPO et des IPO qui ont été détectées et elle appartiennent à la catégorie des haloperoxydases dépendantes du vanadium. Toutefois, certaines algues rouges possèdent également des halopéroxydases à hème (Murphy *et coll.*, 2000), notamment *C. crispus* où une séquence présentant de fortes similarités avec les myeloperoxydases (CPO) de globules blancs a été identifiée (Collèn *et coll.*, 2006b).

Egalement chez *C. crispus* et chez *E. siliculosus*, les récentes données EST et génomiques indiquent la présence de déhalogénases, soulignant l'importance du métabolisme halogéné chez ces algues rouge et brune. Des halogénures méthyle-transférases sont aussi impliquées dans la production de composés halogénés, plus spécifiquement des monohalométhanes (CH_3X) (Manley, 2002). Ces enzymes utilisent la S-adénosyl-méthionine (AdoMet) comme donneur de méthyle et elles ont par ailleurs été identifiées chez des espèces très diverses, plantes, micro et macro algues, champignons, bactéries … Les halogénures méthyle-transférases semblent être la voie enzymatique principale de production des composés halogénés chez les microalgues (Manley, 2002, Moore *et coll.*, 1996), notamment chez les diatomées où les récentes données de génomique ont confirmé l'absence d'haloperoxydases dépendantes du vanadium (Armbrust *et coll.*, 2004, Scala *et coll.*, 2002). Les halogénures méthyle-transférases peuvent jouer un rôle important dans la production des COHV dans les zones océaniques. Chez la diatomée *Stephanopyxis turris*, une nouvelle activité d'halogénation a récemment été mise en évidence, générant des aldéhydes halogénés et nommée hydroperoxyde halolyase (Wichard et Pohnert, 2006).

III.A.3 L'absorption d'iode chez *L. digitata*

Bien que les laminaires soient connues depuis le début du 19ème siècle comme les plus importants réservoirs d'iode parmi les systèmes vivants, les mécanismes biochimiques qui conduisent à l'accumulation de cet halogène et la signification biologique de cette dernière sont loin d'être complètement élucidés.

Un lien entre l'absorption d'iode et le métabolisme oxydatif était déjà soupçonné au début du siècle dernier (Dangeard, 1928, Shaw, 1959), mais le rôle des haloperoxydases dans cette absorption n'a été mis en évidence que récemment. Les premières études menées au sein

du laboratoire sur les mécanismes de l'absorption de l'iode chez *L. digitata* ont conduit à proposer un mécanisme de diffusion facilitée faisant intervenir les v-HPO (Küpper *et coll.*, 1998). Le rôle majeur de ces enzymes est entre autres étayé par le fait que l'expression des v-BPO et leur activité sont très fortes chez le sporophyte qui concentre l'iode, au contraire du gamétophyte qui ne l'accumule pas (Colin *et coll.*, 2003, Crépineau *et coll.*, 2000). L'identification d'une iodoperoxydase chez *L. digitata* est venue renforcer cette hypothèse (Colin *et coll.*, 2005). Dans ce premier modèle, les HPO présentes dans la paroi catalyseraient, en présence de peroxyde d'hydrogène, l'oxydation d'iodure en acide hypo-iodeux (HOI). Un niveau basal de peroxyde d'hydrogène existe dans la cellule comme sous-produit du métabolisme cellulaire, entre autres de la photosynthèse et de la respiration mitochondriale. L'iode oxydé pourrait être alors soit réémis sous forme d'I_2 ou de COHV, soit traversé de façon facilitée la membrane plasmique sous forme d'I_2 ou HOI. Dans la cellule, ces espèces iodées lipophiles seraient ensuite transformées en composés organiques iodés ou réduites en iodures et stockées dans des vacuoles spécialisées (Figure 16). Ce modèle laisse en suspend deux questions : i) comment la cellule génère-t-elle et gère-t-elle un aussi fort pouvoir réducteur et ii) comment la cellule assure-t-elle l'imperméabilité des vacuoles à l'iodure, dont la concentration est estimée à 30 µM (Leblanc *et coll.*, 2006).

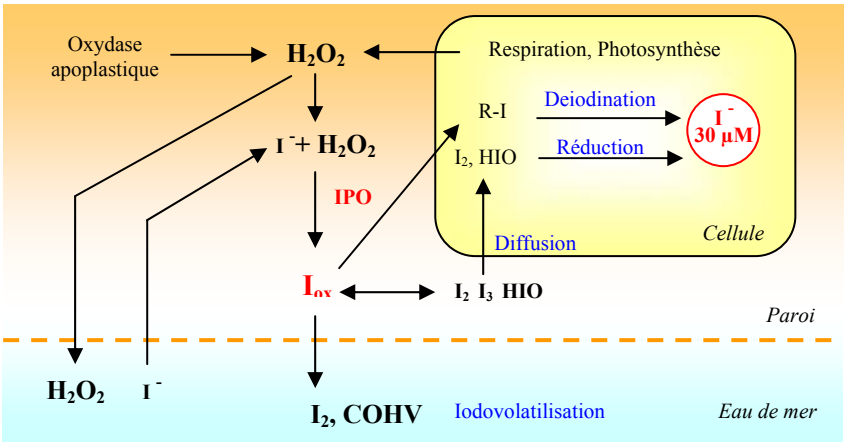


Figure 16 : Mécanisme putatif de l'entrée d'iode et de son stockage chez *L. digitata* proposé par Küpper *et coll.*, (1998)

Le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) apoplastique est consommé par une iodoperoxydase (IPO) afin d'oxyder l'iodure (I^-) en acide hypo-iodeux (HIO), qui est lui-même très réactif. L'IPO catalyse également l'iodination de composés organiques. Lorsque le squelette carboné contient moins de 3 atomes de carbones, les composés sont volatils et forment les COHV émis dans l'atmosphère ; de l'iode moléculaire I_2 est également émis. Ces composés sont à l'origine des phénomènes d'iodovolatilisation. Lorsque le squelette carboné est plus long, il y aurait formation de composés organiques intracellulaires. L'iode oxydé, sous forme HIO traverserait la membrane par diffusion facilitée et pourrait être stocké, après réduction en iodure, dans des vacuoles. Modifié d'après Küpper *et coll.,* (1998). De récents résultats en cours de publication invalide désormais ce modèle, voir Figure 17.

Des travaux récents d'imagerie conduisent à l'invalidation partielle de ce modèle, dans la mesure où ils montrent clairement que l'iode est essentiellement présent sous forme inorganique dans les tissus périphériques de l'algue et plus particulièrement dans les espaces intercellulaires (Verhaeghe *et coll.*, non publié). Les auteurs montrent également que l'iode se colocalise avec des sources carbonées, azotées et soufrées, ce qui laisse envisager que des protéines et des polysaccharides pourraient être impliqués dans le piégeage de l'iode au niveau de l'apoplasme. Un nouveau modèle de l'absorption d'iode est donc d'actualité (Figure 17).

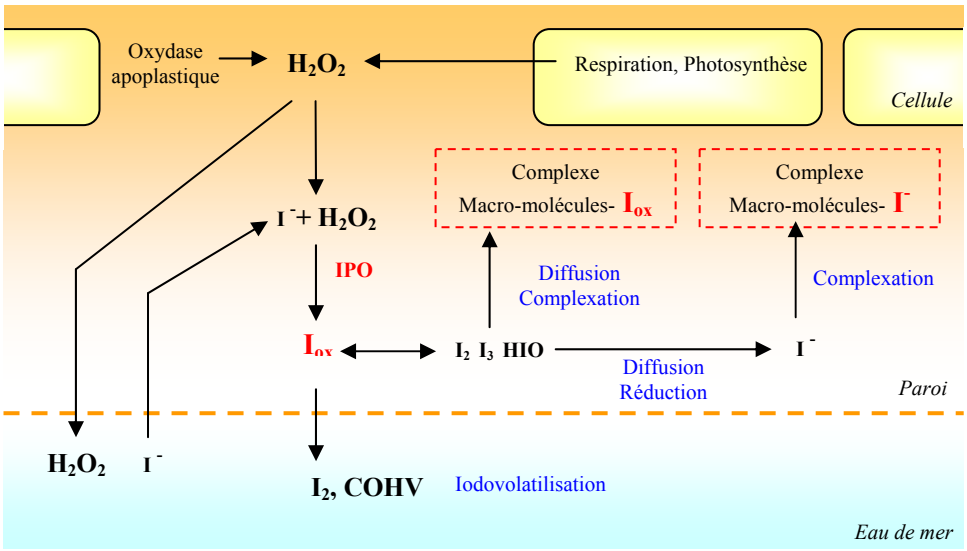


Figure 17 : Modèle actuel de l'absorption d'iode et de son stockage chez *L. digitata* proposé par Verhaeghe *et coll.*, (non publié)

L'iodure serait oxydé par une IPO pariétale, puis rapidement réduit par les nombreux équilibres chimiques des espèces iodées en solution. Il serait alors piégé par les systèmes macromoléculaires de la paroi, tels que les polysaccharides et les protéines. Une fraction significative de l'iodure pourrait s'accumuler dans des vésicules méristodermiques. Une partie des formes oxydées iodées pourraient également réagir avec des squelettes carbonés, entre autres au niveau de résidus aromatiques, pour former des composés organiques halogénés. Le stockage direct des formes oxydées de l'iode, piégées par les macromolécules, est chimiquement envisageable et moins coûteux en énergie. Modifié d'après Verhaeghe *et coll.,* (non publié).

L'iodure serait oxydé par une v-IPO pariétale, puis rapidement réduit et complexé aux systèmes macromoléculaires de la paroi, tels que les polysaccharides et les protéines. Une fraction significative de l'iodure pourrait s'accumuler dans des vésicules méristodermiques. Une partie des formes oxydées iodées pourrait également réagir avec des squelettes carbonés, entre autres au niveau de résidus aromatiques, pour former des composés organiques iodés. Le stockage direct des formes oxydées de l'iode, complexées aux macromolécules est

chimiquement envisageable et moins coûteux en énergie. Toutefois, il laisse à nouveau en suspend le problème de la survie des cellules dans un tel environnement oxydant et la génération du pouvoir réducteur nécessaire.

La localisation pariétale de l'iode ainsi que dans des vésicules méristodermiques est tout à fait en accord avec une mobilisation rapide de l'iode au cours de la réponse au stress oxydant. Le changement de potentiel redox pariétal dû au *burst* oxydant serait le facteur déclenchant du relargage d'iodure et d'iode moléculaire. Cette localisation pariétale du stock d'iode assure également une disponibilité immédiate aux haloperoxydases pour synthétiser des composés iodés toxiques.

III.B Un rôle dans la protection cellulaire

Les stress abiotiques tels que des excès de lumière (Mtolera *et coll.*, 1996), des rayonnements UV (Laturnus *et coll.*, 2004) ou encore des changements de température (Abrahamsson *et coll.*, 2003) entraînent chez les algues une augmentation de la production d'EAO et de COHV. De même, la perception d'un pathogène est suivie d'un *burst* oxydant que ce soit suite à une élicitation ou à une interaction directe (voir paragraphe II.C.1). Les EAO, produites naturellement par le métabolisme basal, deviennent toxiques à fortes concentrations aussi bien pour le pathogène que pour la plante. Chez les algues, les haloperoxydases qui consomment du peroxyde d'hydrogène pourraient jouer un rôle important dans les processus de détoxication cellulaire, tant au niveau constitutif qu'en conditions de stress, où la production des EAO est augmentée (Manley, 2002).

Au cours des interactions biotiques, les haloperoxydases pourraient également être directement impliquées dans le maintien de l'intégrité cellulaire. Il a été montré *in vitro* que les haloperoxydases sont capables de réaliser le pontage oxydatif de polyphénols en présence de peroxyde d'hydrogène et d'halogénures (Berglin *et coll.*, 2004). Or, ces deux substrats sont effectivement relargés dans la paroi au cours des réponses précoces de défense de *L. digitata* (Küpper *et coll.*, 1998). Par ailleurs, certaines algues brunes possèdent des isoformes extracellulaires de v-BPO (Butler *et coll.*, 1990, Jordan et Vilter, 1991, Krenn *et coll.*, 1989). Compte tenu de ces éléments, chez les algues brunes, les v-HPO pourraient assurer le pontage oxydatif des alginates et de polyphénols, grâce à la libération d'iodure et de peroxyde d'hydrogène déclenchée par le stress. Elles seraient ainsi responsables du renforcement

pariétal et par conséquent de la protection mécanique contre les pathogènes et les herbivores, comme cela est observé dans les réponses de défense des plantes (Brisson *et coll.*, 1994).

III.C Un arsenal varié de la défense chimique

Les composés organiques halogénés produits par les algues sont de nature très variée, allant de la simple molécule formée d'un atome de carbone jusqu'à des molécules complexes, tels que des dérivés d'acides gras, terpéniques, indoliques, lipidiques…(Gribble, 2003) (Figure 18).

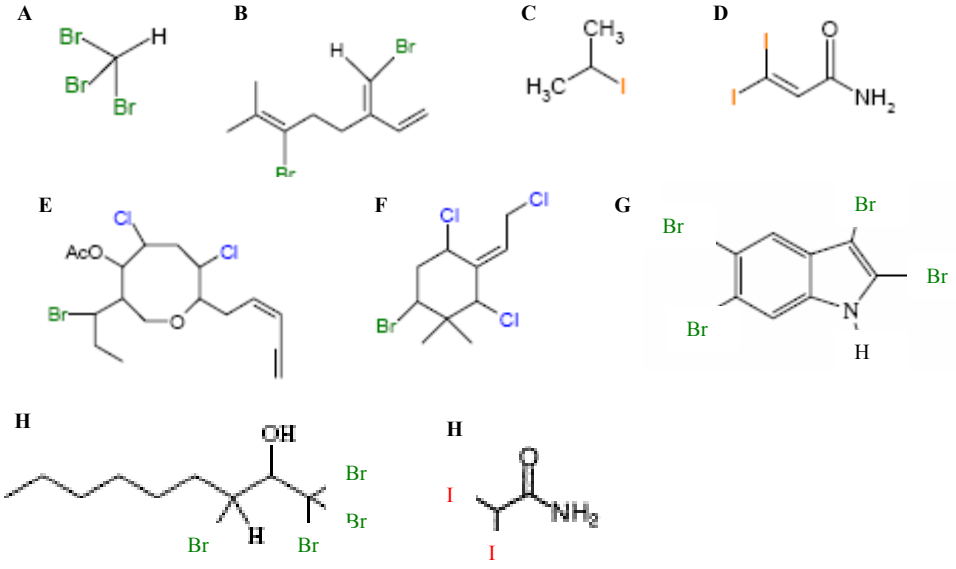


Figure 18 : Diversité de la nature chimique des composés halogénés produits par les algues marine

A) le bromoforme B) un monoterpène acyclique C) isopropyl d'iode D) un ester d'éthyle iodé E) une C15 acétogénine F) un monoterpène cyclique G) un composé indolique bromé H) divers organohalogènes.

La corrélation entre l'émission de peroxyde d'hydrogène et l'augmentation de la production de COHV a d'abord conduit à penser que les COHV représentaient des métabolites secondaires issus de la détoxication des EAO générées au cours des nombreux stress oxydants auxquels les algues sont soumises (Pedersen *et coll.*, 1996). La possibilité que les COHV ne soient pas de simples déchets du métabolisme halogéné, mais de véritables

composés de défense a longtemps été controversée, bien que plusieurs d'entre eux présentent des activités antibiotiques (Manley, 2002). Ainsi des études récentes tentent de montrer le rôle défensif direct des composés halogénés, volatils ou non, produits par les macroalgues.

III.C.1 Les COHV et les halogénures

Chez les algues rouges, les COHV semblent avoir un rôle physiologique important dans les défenses actives, agissant comme substances biocides, répulsives ou encore anti-adhésion vis-à-vis de microorganismes épiphytes, de pathogènes ou d'herbivores. Le bromoforme produit par les algues rouges *Corallina pilulifera* et *Lithophyllum yessoense* inhibe la croissance des diatomées épiphytiques à la surface de l'algue. Cet effet anti-prolifératif semble par ailleurs dépendant d'activité v-BPO (Ohsawa *et coll.*, 2001). De même, le bromoforme et l'acide dibromoacétique sont produits en grande quantité chez l'algue rouge *Asparagopsis armata*. Lorsqu'ils sont relargués à la surface du thalle, à partir de leur glande de stockage, ils possèdent une forte activité antibiotique vis-à-vis des bactéries épiphytes (Paul *et coll.*, 2006a). Ils ont aussi un pouvoir répulsif sur les brouteurs. En effet, lorsque les algues sont cultivées en absence de source bromée, le métabolisme associé est interrompu, et les algues sont alors très appréciées des brouteurs (Paul *et coll.*, 2006b). Les algues rouges appartenant au genre *Laurencia* sont également très étudiées en raison du large panel de métabolites secondaires halogénés qu'elles produisent. De nombreux composés aux propriétés antibactériennes, aussi performants que des antibiotiques commerciaux, ont été isolés chez ces espèces (Vairappan *et coll.*, 2001, Vairappan, 2003).

Chez *C. crispus* et *G. conferta*, l'élicitation respective par l'extrait acellulaire d'*A. operculata* et les oligoagars induisent un *burst* oxydant associé à une augmentation de la production de COHV (Bouarab *et coll.*, non publié, Weinberger *et coll.*, non publié). Chez *C. crispus*, certains des COHV produits sont directement toxiques pour les spores de l'endophyte ou bloquent leur germination. Par ailleurs, chez *G. chilensis* et chez *C. crispus*, la production d'EAO impliquant des oxydases pariétales, et non une NADPH oxydase membranaire, n'est pas associée à l'augmentation de l'émission de COHV et n'a pas d'effet sur la microflore agarolytique épiphyte chez *G. chilensis* (Bouarab *et coll.*, non publié, Weinberger *et coll.*, non publié). Cette différence tout à fait remarquable suggère que l'activation des haloperoxydases nécessite des événements de signalisation associés à la production d'EAO au niveau membranaire. Dans le cas des oxydases pariétales, le peroxyde d'hydrogène produit serait

rapidement dilué dans l'eau de mer environnante et ne permettrait pas de servir de substrat aux haloperoxydases. Au contraire, la diffusion du peroxyde d'hydrogène depuis la membrane vers l'extérieur de l'apoplaste favoriserait l'interaction avec le site actif des haloperoxydases. Ces deux études parallèles, non publiées à ce jour, mettent en avant la corrélation entre l'augmentation de l'émission de COHV associée à un *burst* oxydant dépendant d'une NADPH oxydase et l'élimination de microorganismes pathogènes. Elles apportent de nouvelles preuves que les COHV sont des composés de défense à part entière.
Ces études confirment également le rôle actif du métabolisme halogéné dans la défense, en montrant que l'émission de COHV est corrélée à l'activation de canaux anioniques générant un efflux de bromure (Bouarab *et coll.*, non publié, Weinberger *et coll.*, non publié). Le stock interne d'halogénures de l'algue est donc mobilisé pour produire ces composés et non pas les halogénures présents dans l'eau de mer environnante. Ces observations peuvent être mises en parallèle avec les efflux d'iodure mesurés chez *L. digitata* suite à l'élicitation par les oligoguluronates (Fievet, communication personnelle).

Chez les algues brunes, il n'y a pour l'instant aucune démonstration expérimentale du rôle défensif des COHV. Cependant, les laminaires sont des concentrateurs d'iode et le fort potentiel antiseptique des espèces iodées est connu depuis longtemps (teinture d'iode et iodoforme). Des solutions aqueuses ou alcooliques d'iode sont toujours très utilisées en médecine et la bétadine fait partie de toutes les pharmacies privées. Des études chimiques sur les différentes espèces d'iode en solution montrent que la forme la plus active pour des usages de désinfection est l'iode moléculaire, I_2 (Gottardi, 1999).

Chez *L. digitata*, il y a plusieurs démonstrations d'un lien entre le stress oxydant et la mobilisation du stock d'iode. Suite à l'application de peroxyde d'hydrogène, un efflux d'iodure est mesuré (Küpper *et coll.*, 1998). En réponse à l'élicitation par les oligoguluronates, qui déclenche un busrt oxydant, on note une émission de COHV et d'I_2 (iodovolatilisation) (Palmer *et coll.*, 2005). Cet iode moléculaire peut se former chimiquement à partir d'iodure (I^-) et de peroxyde d'hydrogène sous l'action d'activité haloperoxydase. Chez les laminaires, le *burst* oxydant, l'efflux d'iodure, les v-HPO pariétales pourraient prendre une part importante dans les réponses de défense précoces, en utilisant l'iode moléculaire comme composé de défense.

III.C.2 Les composés halogénés, des antibactériens de choix

A bien y regarder, il apparaît que l'usage de composés halogénés oxydés aux propriétés bactéricides est un phénomène répandu, aussi bien naturellement présent chez de nombreux êtres vivants que pour des applications industrielles ou domestiques. En plus de leur caractère biocide, les acides hypohaleux sont particulièrement bien décrits pour provoquer la dispersion des biofilms. Les composés halogénés produits par les algues sont la source d'un champ d'investigation visant à comprendre les mécanismes par lesquels ils contrôlent la croissance des biofilms. Le système antagoniste des homosérines lactones acylées chez *D. pulchra* a particulièrement bien été étudié ces dernières années.

III.C.2.a Les acides hypohaleux, toxicité directe et disperseurs de biofilm

Chez les bactéries Gram négatives, les homosérines lactones acylées (AHLs) sont les actrices majeures d'un système de régulation transcriptionnelle, qui contrôlent de nombreux phénotypes facilitant l'interaction des bactéries avec leur environnement biotique ou abiotique. Citons entre autres parmi ces nombreux phénotypes : la bioluminescence, la motilité, la formation d'un biofilm, la synthèse d'antibiotique… L'acide hypobromeux (HOBr) produit par *L. digitata* en présence de peroxyde d'hydrogène est capable de désactiver certaines AHLs (Borchardt *et coll.*, 2001). Ainsi, l'émission d'acide hypobromeux par *L. digitata* peut être considérée comme un mécanisme de défense vis-à-vis des bactéries, à la fois par son caractère biocide ainsi que par sa capacité à couper la communication intercellulaire bactérienne en empêchant ainsi la formation d'un biofilm. A l'image de l'acide hypochloreux (HOCl), l'acide hypobromeux pourrait également interagir et dégrader les biopolymères qui font partie intégrante du biofilm et participer ainsi à sa destruction (Hawkins et Davies, 1998). Le rôle défensif de l'acide hypobromeux chez *L. digitata*, dont la production est lié au stress oxydant et à une activité v-HPO n'est pas sans rappeler une réponse classique de défense observée chez les mammifères.

En effet, les neutrophiles qui sont rapidement stimulés au cours d'une infection, établissent un *burst* respiratoire caractérisé par une forte augmentation de la consommation d'oxygène et qui s'accompagne de la production d'une grande quantité de peroxyde d'hydrogène par activation d'une NADPH oxydase. Les neutrophiles relarguent alors entre autres de l'acide hypochloreux (HOCl) et de l'acide hypobromeux par activation de myeloperoxydases (Gaut *et coll.*, 2001). La myeloperoxydase, qui est une haloperoxydase

hème-dépendante, oxyde de nombreux composés organiques en présence de peroxyde d'hydrogène, mais l'oxydation des halogénures est sa spécificité. Il semblerait même que ces enzymes aient une préférence pour le bromure, qui est toutefois près de 10000 fois moins abondant que le chlorure (Thomas *et coll.*, 1995). Les acides hypohalogéneux produits réagissent eux-même avec l'anion superoxyde, le nitrite ou des amines pour former des composés également bactéricides. La génération de composés halogénés antimicrobiens via les myeloperoxydases ou les eosinophyles peroxydases est l'une des lignes de défense les plus essentielles des leucocytes (Hampton *et coll.*, 1998).

III.C.2.b Les furanones, antagonistes des AHL

L'algue rouge *Delisea pulchra* produit de nombreux métabolites secondaires halogénés non volatils, notamment des lactones qui inhibent la communication cellulaire bactérienne, nommé fréquemment 'quorum sensing' (Givskov *et coll.*, 1996, Rasmussen *et coll.*, 2000). Ces furanones sont produites dans des vésicules au sein de cellules spécialisées, ce qui permet de les libérer à la surface du thalle, dans des concentrations importantes et biologiquement actives. Il existe ainsi une forte corrélation entre la concentration en furanones du thalle et la quantité de bactéries présente en surface (Maximilien *et coll.*, 1998). Les auteurs montrent que l'inhibition de la croissance des bactéries par les furanones n'est pas le résultat d'un effet direct sur la croissance, mais d'une inhibition de l'adhésion, de la nage ou de l'essaimage selon les espèces bactériennes, soit : des phénomènes directement soumis à une communication cellulaire dépendante des AHL. Le mécanisme par lequel les lactones halogénées de *D. pulchra* affectent la communication bactérienne a été partiellement élucidé à la suite de ces premières études. Il s'avère que les furanones sont des antagonistes des AHL, avec une structure très proche (Figure 19) et qu'elles sont capables de se fixer sur les récepteurs de ces dernières, de type Lux-R (Manefield *et coll.*, 1999). La fixation de furanones à la protéine Lux-R la rend plus sensible à la protéolyse, ce qui conduit à une forte diminution de sa concentration cellulaire (Manefield *et coll.*, 2002). Les furanones halogénées produites par *D. pulchra* constituent ainsi un système de défense qui peut être immédiatement activé par libération des vésicules en surface à la suite de la reconnaissance des bactéries pathogènes. Les furanones forment une ligne de défense en théorie efficace, puisqu'elles permettent à cette algue de contrôler l'ensemble des phénotypes bactérien dépendants des AHL. En système hétérologue, il a été montré qu'elles inhibent l'expression de certains

facteurs de virulence ou encore la production d'antibiotiques chez la bactérie phytopathogène *Erwinia caratovora* (Manefield *et coll.*, 2001).

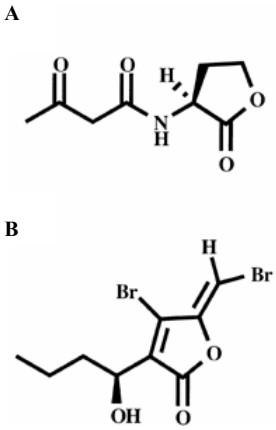


Figure 19 : Analogue structural des homosérines lactones produit par l'algue rouge *Delisea pulchra*

A) Structure de la 3-oxo-C6-homosérine lactone produit par la bactérie *Erwinia carotovora*, B) Structure de la 4-bromo-5-(bromoethylene)-3-(1'hydroxybutyl)-2(5H)-furarone produite *D. pulchra*.

Des études préliminaires menées sur plusieurs espèces végétales et plusieurs phénotypes associés aux AHL chez des bactéries, indiquent que des systèmes de défense analogues, par production de molécules antagonistes des AHL, existent chez les plantes (Teplitski *et coll.*, 2000).

Les études menées sur les furanones halogénées de *D. pulchra* illustrent que le métabolisme halogéné des macroalgues doit être considéré comme une source de mécanismes de défense naturellement présents (défense passive). L'augmentation de l'émission des COHV, suite à l'élicitation, et leurs activités antiseptiques ou répulsives leur accordent un rôle supplémentaire dans la défense active. En raison de son importance, il se pourrait que le métabolisme halogéné contribue de manière importante, et ce à différents niveaux, aux réponses de défense des macroalgues. Ainsi, dans l'état actuel des connaissances, trois grandes fonctions de défense peuvent lui être attribué : la détoxication des EAO, le renforcement pariétal et la défense chimique. Les haloperoxydases dépendantes du vanadium,

qui sont les enzymes clés de ce métabolisme, se situent au carrefour de ces trois fonctions (Figure 20). Il est remarquable que l'expression hétérologue de gènes codant des haloperoxydases chez les plantes, qui ne possèdent pas naturellement ces enzymes, leur confère une résistance accrue à certains pathogènes fongiques (Rajasekaran *et coll.*, 2000).

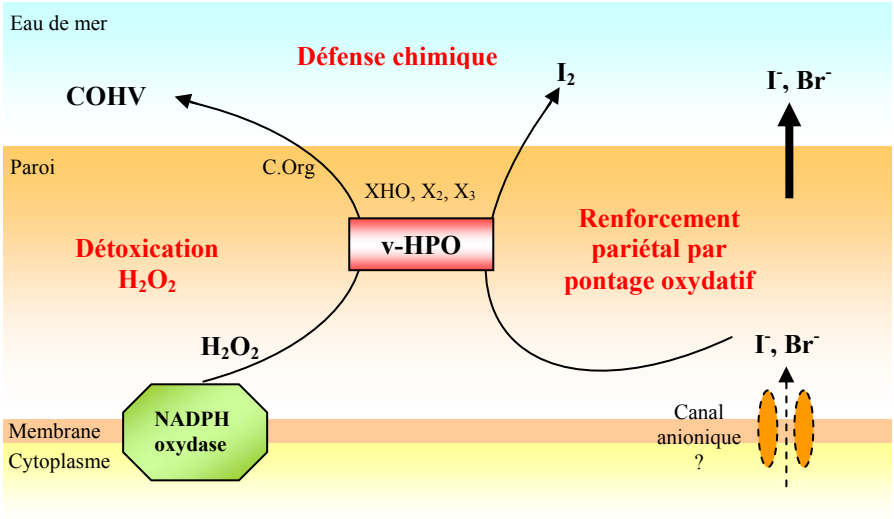


Figure 20 : Rôles biologiques putatifs des haloperoxydases dépendantes du vanadium et du métabolisme halogéné dans les défenses des macroalgues

Les haloperoxydases dépendantes du vanadium (v-HPO) catalysent l'oxydation des halogénures en présence de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et d'halogénure (I^-, Br^-), en générant un composé instable, un acide hypohaleux (XHO), qui réagit avec des composés organiques (C. Org) pour former des composés organiques halogénés volatils (COHV). De l'iode moléculaire I_2, potentiellement toxique, est formé au cours de cette réaction.

La production de métabolites halogénés constituerait une voie de défense originale et spécifique aux algues marines par rapport aux plantes terrestres. Toutefois, l'implication de composés halogénés dans la défense n'est pas une exclusivité parfaite des macroalgues, puisque les neutrophiles des mammifères ont eux aussi adopté cette stratégie.

Par ailleurs, les résultats acquis sur les furanones halogénées de *D. pulchra* insinuent également que les métabolites halogénés peuvent jouer un rôle dans les processus de communications et de signalisation. Le potentiel des métabolites halogénés comme molécule signal intra ou interplante chez les algues reste un vaste domaine à explorer.

IV. Avancées transcriptomiques et génomiques chez les algues marines

Le développement fulgurant des outils de séquençage et de bio-informatique a conduit ces 10 dernières années à une explosion générale des données génomiques et transcriptomiques. Au-delà de l'intérêt propre de la connaissance du bagage génétique des organismes, ces données permettent d'accéder à une vision globale de la génétique de l'évolution, de l'adaptation environnementale, du développement ou encore de l'acquisition des voies métaboliques.

Parmi les organismes dont les génomes ont été récemment séquencés, on compte désormais quelques microalgues et pour l'instant, à défaut de génome chez les macroalgues, de nombreux projets d'Etiquettes de Séquences Transcrites (EST) ont été développés. Ces programmes EST permettent d'accéder à la représentation du transcriptome d'une situation biologique donnée et génèrent des gènes candidats pour des approches transcriptomiques secondaires. Les premières 'images' du transcriptome des réponses de défense des macroalgues ont ainsi été publiées ces deux dernières années.

IV.A Ascension des données génomiques et transcriptomiques chez les algues

Ces dernières années, plusieurs génomes de microalgues ont été séquencés et sont maintenant accessibles au public (Tableau 2). Parmi les premiers figurent le génome complet ou quasi complet de l'algue rouge *C. merolae* (http://merolae.biol.s.u-tokyo.ac.jp/ (Matsuzaki *et coll.*, 2004)), celui de la diatomée *T. pseudonana* (http://genome.jgi-psf.org/thaps1/thaps1.home.html (Armbrust *et coll.*, 2004)) ainsi que celui de l'algue verte picoeucaryote *Osteococcus tauri* (http://genome.jgi-psf.org/Ostta4/Ostta4.home.html (Derelle *et coll.*, 2006)). Plusieurs autres génomes sont en cours de finalisation et partiellement disponibles : celui de la diatomée *P. tricornutum* (http://genome.jgi-psf.org/Phatr2/Phatr2.home.html (Maheswari *et coll.*, 2005, Scala *et coll.*, 2002) et de l'algue verte *Chlamydomonas reinhardtii* (http://genome.jgi-psf.org/Chlre3/Chlre3.home.html). En ce qui concerne les génomes de macroalgues, aucun n'est actuellement disponible publiquement, mais celui de l'algue brune *E. siliculosus*, dont le projet est porté par le groupe de M. Cock de

Roscoff, est désormais complètement séquencé avec une couverture 11X et l'annotation est en cours (http://www.cns.fr/externe/Francais/Projets/Projet_KY/KY.html. La couverture 1X du génome de l'algue rouge *C. crispus* a également été récemment acquise et le séquençage complet (12X) du génome a été entrepris au Genoscope (France) (http://www.intlgenome.org/viewOrganisms.cfm?centerID=9, Collèn J., communication personnelle). Un second génome de macroalgue rouge est en cours de séquençage au Joint Genome Institute (JGI, USA) et devrait être publié en 2008, celui de *Porphyra purpurea* (http://www.jgi.doe.gov/sequencing/why/CSP2008/ppurpurea.html). Les génomes complets d'une macroalgue rouge et brune seront ainsi prochainement disponibles et permettront de nombreuses investigations. Le séquençage du génome de *C. crispus* sera d'autant plus intéressant d'un point de vue 'décryptage de la défense', en raison des nombreux acquis sur l'induction et la signalisation de ses réponses de défense. En attendant le développement d'un pathosystème chez *E. siliculosus*, les données génomiques de cette algue permettront tout de même de progresser sur la nature des gènes impliqués dans la défense au regard des résultats acquis chez l'algue brune *L. digitata*, qui appartient à une lignée évolutive proche.

Tableau 2 : Liste des génomes d'algues disponibles en septembre 2007

	Etat	Références
LES MICRO-ALGUES		
Diatomées		
Thalassiosira pseudonana	Terminé	Armbrust *et coll.*, 2004
Phaedactylum tricornutum	Terminé	Maheswari *et coll.*, 2005
Algues rouges		
Cyanidioscyzon merolae	Terminé	Matsuzaki *et coll.,* (2004)
Algues vertes		
Ostreococcus tauri	Terminé	Derelle *et coll.*, 2006
Chlamydomonas reinhardtii	En cours	
LES MACRO-ALGUES		
Phaeophycées		
Ectocarpus siliculosus	Terminé, en cours d'annotation	Non publié
Rhodophycées		
Chondrus crispus	1X, terminé ; début 12X	
Porphyra purpurea	En cours, prévu pour 2008	

En absence de génome, l'exploitation de banques EST constitue une stratégie efficace et moins onéreuse pour identifier des gènes d'intérêt. Les banques EST des algues rouges *P. yezoensis* (Nikaido et coll., 2000), *C. crispus* (Collèn *et coll.*, 2006b), *Gracilaria gracilis* (Lluisma et Ragan, 1997), *Gracilaria lemaneiformis* (Sun *et coll.*, 2002), *Gracilaria changii* (Teo *et coll.*, 2007), des algues brunes *L. digitata* (Crépineau *et coll.*, 2000, Roeder *et coll.*, 2005) et *Sargassum binderi* (Wong *et coll.*, 2007), de la diatomée *P. tricornutum* (Scala et coll., 2002) et enfin de l'algue verte *Ulva linza* (Stanley *et coll.*, 2005) constituent l'essentiel de la ressource transcriptomique algale disponible publiquement sur le site du National Center for Biotechnology Information (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbEST/). Plusieurs autres banques EST ont été générées, sans toutefois être rendues publiques, notamment à partir des macroalgues *Fucus serratus*, *Fucus vesiculosus*, *Laminaria saccharina*, *E. siliculosus* et *U. linza*. Ces projets sont organisés dans une base de données coordonnée par le réseau d'excellence Marine Genomics Europe http://www.marine-genomics-europe.org/.

L'ensemble des données EST de macroalgues disponible à ce jour est répertorié dans le tableau 3.

Tableau 3 : Banques EST disponibles chez les macroalgues en septembre 2007

Espèces	Nombre d'EST	Références
Ulvophycées		
Ulva linza	1898	Stanley *et coll.*, (2005)
Rhodophycées		
Chondrus crispus	4114	Collèn *et coll.*, (2006b)
Gracilaria gracilis	200	Lluisma et Ragan, (1997)
Gracilaria lemaneiformis	180	Sun *et coll.,* (2002)
Gracilaria changii	8088	Teo *et coll.*, (2007)
Porphyra yezoensis	21954	Nikaido *et coll.,* (2000) Asamizu *et coll.*, (2003)
Phaeophycées		
Laminaria digitata	2922	Crépineau *et coll.*, (2000) Roeder *et coll.*, (2005)
Sagassum binderi	2304	Wong *et coll.*, (2007)
Laminaria saccharina	2208	Non publié, accès SAMS/MGE
Fucus serratus	3448	Non publié, accès SAMS/MGE
Fucus vesiculosus	4496	Non publié, accès SAMS/MGE
Ectocarpus siliculosus	26000	Non publié, accès SAMS/MGE

Tableau 4 : Recherche *in silico* de gènes putatifs représentatifs des voies de défenses dans les banques EST de macroalgues.

Les banques ont été explorées sur la base de l'annotation des séquences et par mots clés et correspondent aux références du tableau 3. Ul : *Ulva linza*, Gg : *Gracilaria gracilis*, Cc : *Chondrus crispus*, Py : *Porphyra yezoensis*, Ld : *L. digitata*, Ls : *Laminaria saccharina*, Fs : *Fucus serratus*, Fv : *Fucus vesiculosus*, Es : *Ectocarpus siliculosus*

	Verte	Rouges			Brunes				
	Ul	Gg	Cc	Py	Ld	Ls	Fs	Fv	Es
Métabolisme oxydatif									
NADPH oxydase			+	+					
Catalase				+					+
Ascorbate peroxydase			+	+					+
Glutathion peroxydase	+			+					+
Peroxydase			+	+					
Mn superoxide dismutase			+	+			+	+	+
Monodéhydroascorbate réductase			+	+					+
L-acide aminé oxydase			+	+					
Méthionine sulfoxide réductase		+	+	+	+	+			+
Detoxication									
Thiorédoxine / Disulfide isomérase	+			+	+	+	+	+	+
Thiorédoxine réductase				+	+				+
Glutathion réductase				+					
Glutathion-S-transférase	+	+	+	+	+				+
Peroxirédoxine /Alkyl hydroperoxyde réductase			+	+	+	+	+	+	+
Glutarédoxine				+	+		+	+	+
Cytochrome P450 réductase				+					+
Enzyme à Cytochrome P450			+	+			+		+
ABC transporteur	+			+	+				+
Metabolisme halogéné									
v-BPO			+	+	+	+	+		+
v-IPO				+	+				
Haloacide dehalogénase				+					+
Haloalkane dehalogénase			+	-					+
Dehaloperoxydase				-					+
Voie du shikimate									
DAHP synthase			+	+					
Shikimate dehydrogénase				-					
Shikimate kinase				+					+
Chorismate synthase	+			+					
Voie des phénylpropanoïdes									
Phénylalanine ammonia-lyase									
Chalcone synthase									+
Chalcone isomérase									+
Acide benzoïque-2-hydroxylase				+					
Voie des oxylipines									
Phospholipase				+	+				
Lipoxygénase				+					+
Acides gras oxygénase				-					+
Allène oxide cyclase				-					+
Prostaglandine synthase				+					+
HSP									
HSP 70	+	+	+	+	+	+	+		+
HSP 90	+		+	+	+		+	+	+
Chaperonine (HSP 60)	+		+	+	+		+	+	+
Small HSP	+		+	+					+

IV.B Des banques EST comme stratégie initiale pour rechercher des gènes de défense putatifs

Jusqu'à présent les bases moléculaires de l'immunité des macroalgues n'avaient pas ou peu été explorées en raison de l'absence de données de génétique. L'augmentation de ces données, notamment des données EST permet d'identifier des gènes de défense putatifs ou plus généralement impliqués dans la réponse de l'algue à une agression pathogène, en se basant sur la similarité de ces gènes avec ceux décrits dans un tel contexte chez d'autres organismes (Tableau 4). Cette approche *in silico* permet d'obtenir une première vision des régulations transcriptionnelles qui s'opèrent, ainsi que des voies métaboliques pouvant être impliquées au cours des interactions biotiques chez les algues.

P. yezoensis est l'algue rouge pour laquelle la densité de données EST est la plus importante, avec plus de 20 000 séquences (http://www.kazusa.or.jp/en/plant/porphyra/EST/). Elles sont issues d'un programme visant à identifier les gènes impliqués dans les différences physiologiques et morphologiques existant entre le sporophyte filamenteux (Asamizu *et coll.*, 2003) et le gamétophyte représenté par un thalle foliacé (Nikaido *et coll.*, 2000). Ces deux études ont conduit à l'identification de 4496 ADNc différents, dont seuls 22 % sont exprimés chez les deux générations. Par ailleurs, une fonction putative n'a pu être attribuée qu'à un tiers des séquences. Les gènes putatifs de défense soulignés par ce travail sont liés au métabolisme oxydatif, au processus de détoxication, à la voie du shikimate et des phénylpropanoïdes et comprennent plusieurs *Heat shock* Protéines (HSP). Les mêmes voies métaboliques potentielles sont identifiées dans les banques EST d'*E. siliculosus*, générées au sein du laboratoire dans l'équipe de M. Cock. Ces banques correspondent également à l'étude de l'alternance de génération chez cette algue et ont généré près de 26000 EST.

Le potentiel des banques EST comme stratégie initiale pour rechercher des gènes de défense putatifs a été récemment illustré par deux études menées en parallèle au laboratoire sur l'algue brune *L. digitata* et l'algue rouge *C. crispus*. Chez ces deux algues, pour lesquelles un certain nombre d'aspect des mécanismes de défense au niveau physiologique et

biochimique sont désormais disponibles, les données EST ont permis de conforter les résultats acquis et ont généré de nombreuses perspectives.

IV.B.1 Les banques EST de *L. digitata*

Une première banque EST a été réalisée au laboratoire pour comparer le sporophyte macroscopique et le gamétophyte microscopique de *L. digitata* (Crépineau *et coll.*, 2000). Sur les 905 EST obtenues au total, près de 44 % ont pu être annotées. La très grande majorité des gènes identifiés correspond à des protéines ribosomales, ainsi qu'aux gènes impliqués dans le métabolisme du carbone, de la synthèse pariétale et du métabolisme halogéné. Ces résultats sont tout à fait cohérents avec la place prépondérante de ces voies métaboliques chez *L. digitata*. Cette banque, réalisée à partir de conditions de culture standard, a ainsi essentiellement conduit à l'identification de gènes de ménage. Afin d'enrichir les données EST en gènes de stress, la construction d'une nouvelle librairie à partir de protoplastes de sporophyte a été entreprise (Roeder *et coll.*, 2005).

Le protoplaste représente en effet une cellule soumise à un état de stress intense. Elle est isolée de ses consœurs, et de fait privée de communication, elle est dépossédée de son support physique et ainsi soumise à un fort stress osmotique. Le protoplaste est également confronté à un stress oxydant conséquent, avec des concentrations en peroxyde d'hydrogène dans le milieu d'incubation allant jusqu'à 120 µM (Benet *et coll.*, 1997). Par ailleurs, les protoplastes sont obtenus par digestion enzymatique de la paroi, ce qui implique que les cellules sont au contact de fragments pariétaux éliciteurs, les oligoguluronates. Ces derniers sont eux-mêmes connus pour déclencher un *burst* oxydant et mimer une agression pathogène (Küpper *et coll.*, 2001, Küpper *et coll.*, 2002). Le protoplaste serait ainsi soumis à la combinaison ultime d'un stress mécanique, osmotique et biotique. Il représente donc un modèle idéal pour identifier des gènes de stress et de défense.

Le séquençage de la librairie d'ADNc de protoplastes de *L digitata* a généré 1985 EST, avec 45 % d'entre elles présentant une similarité avec les séquences déposées dans GeneBank. Plus de 23 % appartiennent à la catégorie 'stress et défense', soit 3 fois plus que dans la banque de sporophyte, ce qui confirme que l'outil protoplaste est pertinent dans ce type de recherche. Cependant, les séquences les plus exprimées correspondent à un nombre

restreint de gènes, à savoir HSP 70 et HSP 90, v-BPO, glutathion-S-transférases (GST) et thiorédoxines (Roeder *et coll.*, 2005).

Les HSP participent au repliement des protéines endommagées ou nouvellement synthétisées ainsi qu'à la prévention de leur agrégation (Wang *et coll.*, 2004). La très grande quantité de gènes codant des HSP dans la banque de protoplastes révèle la nécessité de protéger les protéines des dommages causés par le stress oxydant et prévenir la mort cellulaire. La forte représentation des thiorédoxines et thiorédoxine réductases, qui forment le système thiorédoxine impliqué dans la régulation de l'homéostasie rédox (Arner et Holmgren, 2000), va également dans ce sens. Les thiorédoxines sont impliquées très généralement dans les réponses au stress oxydant chez les plantes (Meyer *et coll.*, 2005), mais aussi chez les bactéries, les levures et les mammifères (Müller, 1991, Nordberg et Arner, 2001, Ritz *et coll.*, 2000). Dans cette réponse au stress oxydant, conformément à leur activité enzymatique décrite précédemment, les haloperoxydases doivent également jouer un rôle important du fait de leur large distribution.

Des gènes codant des GST constituent la dernière catégorie de gènes putatifs de défense identifiés par l'étude de Roeder *et coll.,* (2005). Les GST sont responsables de la détoxication des xénobiotiques, des radicaux libres, des époxydes, des dérivés halogénés… (Hayes et McLellan, 1999, Marrs, 1996). Certaines GST possèdent une activité peroxydase ou glutathion peroxydase et jouent un rôle dans l'élimination des hydroperoxydes d'acides gras générés au cours d'un stress oxydant (Dixon *et coll.*, 2002a). Enfin, quelques GST, notamment celles qui appartiennent à la classe sigma des mammifères, détiennent une activité prostaglandine synthase (Hayes et McLellan, 1999). Or l'étude plus poussée des gènes de GST identifiés chez *L. digitata* grâce à la banque d'ADNc de protoplaste a révélé que ces dernières présentent de fortes identités de séquences avec la classe sigma des mammifères (de Franco, 2005). Par ailleurs, des études de phylogénie laissent envisager que les GST d'algues rouges et brunes constituent de nouvelles classes de GST, non décrites à ce jour et dont la fonction biologique et biochimique n'est pas encore connue (Hervé, 2006, Hervé *et coll.*, non publié).

Cet exemple illustre parfaitement que la stratégie EST conduite à partir du modèle protoplaste, s'est avérée pertinente dans l'identification de gènes de défense. Elle a considérablement enrichie la quantité de données transcriptomiques liée à la réponse au stress disponibles chez *L. digitata*. Elle a conduit de surcroit à l'identification de gènes appartenant à une nouvelle classe évolutive de GST, ouvrant ainsi de nombreuses voies de recherches.

IV.B.2 Les banques EST de *C. crispus*

L'approche similaire chez l'algue rouge *C. crispus* a conduit à l'identification de 2291 ADNc non redondants, à partir des librairies d'ADNc de thalles et de protoplastes, avec respectivement 2052 et 2002 EST (Collèn *et coll.*, 2006b). Plus de 50 % des EST ne présentent aucune identité de séquences, ce qui soulève d'une part le manque de données congruentes dans les banques de données et d'autre part la particularité du métabolisme des algues rouges. De manière comparable aux résultats acquis chez *L. digitata*, la banque d'ADNc de protoplastes a considérablement enrichi les données transcriptomiques en gènes de stress, dans la mesure où 5 fois plus de gènes de cette catégorie ont été répertoriés dans cette banque par rapport à la banque de thalle.

La comparaison des banques de protoplastes de *L. digitata* et de *C. crispus* indique des points de convergence. Dans les deux cas, on remarque une diminution de l'expression des gènes de ménage et des gènes impliqués dans la synthèse protéique en faveur d'une augmentation de l'expression des gènes de stress et des gènes impliqués dans l'organisation cellulaire. Les gènes de stress identifiés chez les deux algues codent essentiellement pour des GST, des v-BPO, des HSP. L'importance du métabolisme halogéné chez *Chondrus* est renforcée par l'identification d'un nouveau gène codant une haloalkane déhalogénase. Ces enzymes sont responsables chez les bactéries de la coupure des liaisons carbone-halogénures (Janssen *et coll.*, 1994). Cette enzyme pourrait jouer un rôle similaire aux GST dans la détoxication des espèces halogénées intracellulaires.

De manière très intéressante, la banque d'ADNc de protoplastes de *C. crispus* a permis d'identifier des marqueurs moléculaires correspondant à des réponses de défense observées au niveau biochimique. Tout d'abord, le gène codant la NADPH oxydase, désignée comme responsable du *burst* oxydant, a été isolé et a fait l'objet d'études approfondies (Hervé *et coll.*, 2006) (voir paragraphe II.C.1.a). L'identification d'un transcrit codant une L-acide aminé oxydase vient conforter le fait que l'oxydation de la L-asparagine est importante dans les mécanismes de reconnaissance du pathogène endophyte *A. operculata*, ainsi que dans la résistance de l'algue rouge (Weinberger *et coll.*, 2002, Weinberger *et coll.*, 2005b) (voir paragraphe II.C.1.b). De plus, plusieurs transcrits ont l'originalité de correspondre à des gènes jusqu'alors identifiés uniquement dans la lignée animale, tels que ceux codant des éosinophile peroxydases, ovoperoxydases ou encore des enzymes à cytochrome P450, sans compter la

singularité des GST déjà mentionnée. Ces enzymes de type péroxydase pourraient être impliquées dans la gestion du stress oxydant. Les gènes codant les enzymes à cytochrome P450 constituent quant à eux les premiers marqueurs moléculaires potentiellement impliqués dans la biosynthèse des oxylipines, qui sont abondamment produites au cours des réponses de défense de *C. crispus* (Bouarab *et coll.*, 2004) (voir paragraphe II.C.3).

IV.B.3 Singularité de la gestion du stress oxydant chez les macroalgues

Au-delà des points de convergence observés entre les banques d'ADNc de protoplastes de *L. digitata* et de *C. crispus*, la différence de représentation des gènes codant les enzymes anti-oxydantes est particulièrement notable.

La génération du *burst* oxydant est l'une des réponses de défense les plus précoces mises en place par les plantes, mais aussi par les algues. Les formes activées de l'oxygène sont produites de façon continue à l'intérieur des cellules par le métabolisme basal, notamment par la photosynthèse et la respiration. Les plantes ont donc développé de nombreux systèmes permettant de maintenir l'équilibre redox cellulaire. Lorsqu'elles sont soumises à un stress biotique ou abiotique, cet équilibre est rompu et les EAO s'accumulent, devenant toxiques pour les structures cellulaires. Un certain nombre de molécules anti-oxydantes s'opposent à la propagation des réactions radicalaires dues aux EAO, en formant en général des radicaux moins réactifs, comme par exemple la vitamine A (carotenoïdes), l'acide ascorbique et le glutathion. Les enzymes à activité anti-oxydante permettent une réduction directe des ions superoxydes et du peroxyde d'hydrogène. Il s'agit entre autres des superoxyde dismutase, catalase, glutathion peroxydase et ascorbate peroxydase (Desikan *et coll.*, 2001, Mittler, 2002).

Curieusement, aucun des gènes codant ces enzymes anti-oxydantes classiques n'a été identifié dans la banque EST de protoplastes de *L. digitata*. Les séquences protéiques de ces enzymes sont relativement bien conservées, et Roeder *et coll.,* (2005) pensent que si les transcrits avaient été présents dans la banque de protoplastes de *L. digitata*, alors ils auraient du être identifiés. Au contraire, plusieurs d'entre eux ont été trouvés dans les banques de thalles et de protoplastes de *C. crispus*. Cependant, ils ne sont pas surexprimés dans la banque de protoplastes de *C. crispus*.

Par ailleurs, une recherche rapide dans les banques EST de *L. saccharina*, *F. serratus* et *F. vesiculosus*, basée sur l'annotation des EST, indique qu'aucun transcrit codant ces enzymes anti-oxydantes classiques n'est présent, alors que ces banques ont été construites à partir

d'ARN correspondant à des algues stressées (Tableau 4). Bien que ces banques restent relativement restreintes, de 2000 à 5000 EST, cette absence reste surprenante compte-tenu de l'importance des enzymes correspondantes pour l'homéostasie redox et l'intégrité cellulaire chez les plantes. Comment expliquer alors l'absence de gènes codant les enzymes de détoxication dans ces banques d'algues brunes ?

Une des explications possibles est la quantité relativement faible de données transcriptomiques chez les lignées d'algues, quel que soit le phylum auquel elles appartiennent, qui fait que les gènes codant les enzymes anti-oxydantes n'ont pas encore été isolés. Toutefois, ils peuvent être présents dans les banques et faire partie des nombreux gènes auxquels aucune fonction n'a pu être attribuée par manque d'identité de séquences. Ainsi, il faut rappeler que chez *L. digitata* les régions 3'UTR sont très longues et que ces séquences non codantes, nombreuses dans les banques, ne favorisent pas l'identification des ADNc. Par ailleurs, la présence de ces séquences non encore identifiées, est appuyée par le fait que de nombreux gènes relatifs aux enzymes anti-oxydantes sont effectivement présents dans les banques de sporophyte et de gamétophyte d'*E. siliculosus*, dont la représentativité est bien plus importante (Tableau 4).

La deuxième raison que l'on peut évoquer est d'ordre biologique : les gènes codant les enzymes de détoxication seraient réprimés au cours du stress oxydant. Chez les plantes supérieures, de telles répressions des activités ou des gènes codant les catalases et les ascorbate peroxydases ont été montrées suite à l'élicitation (Clark *et coll.*, 2000, Durner et Klessig, 1995, Mittler *et coll.*, 1998). Des plants de tabac transgéniques, avec de faibles niveaux d'expression des gènes codant les enzymes anti-oxydantes, ont des niveaux de peroxyde d'hydrogène et de protéines PR constitutifs et inductibles plus élevés que les plantes sauvages. Ils sont aussi plus résistants aux pathogènes (Mittler *et coll.*, 1999). Ces études montrent qu'au cours d'une interaction biotique, la plante augmente sa production d'EAO tout en diminuant sa capacité à les détoxifier. Il est actuellement admis que le *burst* oxydant, intense, rapide et transitoire, permet l'élimination du pathogène ou du moins, la diminution de sa progression, et qu'il est nécessaire à l'activation de réponses de défense, incluant la mort cellulaire programmée (Dangl *et coll.*, 1996, Hammond-Kosack et Jones, 1996). Par ailleurs, le peroxyde d'hydrogène constitue un messager secondaire important fortement impliqué dans la réponse hypersensible et dans le développement de la résistance systémique acquise. Dans ce cas, la présence de peroxyde d'hydrogène à une concentration plus élevée que la normale,

afin qu'il puisse servir de signal, tout en restant non toxique pour la cellule, est absolument nécessaire. La baisse d'activité des enzymes anti-oxydantes ou la répression des gènes les codant est ainsi une réalité, nécessaire à la mise en place des réponses de défense, en particulier dans l'induction des gènes codant les protéines PR et la mise en place de la résistance systémique acquise qui s'établit sur le long terme (Chen *et coll.*, 1993). A la manière des phénomènes observés chez les plantes, il est ainsi possible que les gènes codant les enzymes anti-oxydantes classiques soient partiellement réprimés au cours du stress oxydant chez les algues.

En parallèle, les algues marines, et plus particulièrement encore, les algues brunes, pourraient avoir développé une stratégie singulièrement différente des autres espèces animales et végétales pour lutter contre le stress oxydant.

Par exemple, le compartiment protéique pourrait jouer un rôle important chez les algues, dans la mesure où le seul gène codant une enzyme anti-oxydante classique, identifié systématiquement dans ces banques d'algues brunes, code une méthionine sulfoxide réductase (Tableau 4). Les résidus méthionine des protéines constituent un compartiment immédiatement disponible pour réduire les espèces activées de l'oxygène en cas de stress oxydant. Une fois oxydées, les méthionines doivent être rapidement réduites pour maintenir l'intégrité protéique et c'est la fonction des méthionine sulfloxide réductases (Levine *et coll.*, 1996).

Les haloperoxydases représentent également des candidats intéressants dans la gestion du stress oxydant, car elles peuvent être considérées comme des enzymes de détoxication (voir paragraphes III.A.2 et III.B). Plusieurs gènes ont été caractérisés, appartenant à des familles multigéniques chez les algues rouges (Cosse, 2003), comme brunes (Colin *et coll.*, 2003). La banque de protoplastes de *L. digitata* a par ailleurs conduit à l'identification d'une nouvelle sous-famille de v-BPO, nettement différente de celle des gènes caractérisés auparavant (v-BPO1, v-BPO2), dont l'expression est constitutive. Des expériences de northern blot ont confirmé que ces gènes n'étaient pas exprimés chez le sporophyte et qu'ils étaient spécifiquement et fortement induits chez les protoplastes (Roeder *et coll.*, 2005). Depuis, plusieurs ADNc complets correspondant à cette sous famille de v-BPO ont été complètement caractérisés (v-BPO3 à v-BPO7).

Chez les plantes, il existe une certaine plasticité du compartiment enzymatique antioxydant. La perte de l'activité ascorbate peroxydase est compensée par l'induction des superoxyde dismutase, catalase et glutathion réductase, tandis que la perte de l'activité catalase est

compensée par l'induction d'ascorbate peroxydase, glutathion peroxydase et autres oxydases (Mittler, 2002). Chez *L. digitata*, le nombre important de représentants HPO pourrait participer à cette plasticité. Il s'avère que chez *C. crispus*, la plasticité des enzymes anti-oxydantes peut être réellement de mise, puisque des haloperoxydases sont présentes aux côtés des ascorbate peroxydase, catalase, glutathion peroxydase et superoxyde dismutase (Collèn *et coll.*, 2006b). Or les bromopéroxydases de *C. crispus* sont également codées par une famille multigénique, mais elle comporte très peu de membres contrairement à celle de *L. digitata*. De même, le génome de l'algue brune d'*E. siliculosus* contient de nombreux gènes codant les enzymes anti-oxydantes classiques, mais peu de gènes codant des haloperoxydases. Ces résultats appuient d'une part l'hypothèse du rôle antioxydant joué par les haloperoxydases chez *L. digitata* et d'autre part, qu'il existe chez cette algue brune une gestion du stress oxydant tout à fait originale.

Considérant, a) l'absence d'EST codant les enzymes anti-oxydantes classiques, b) la forte représentation des gènes codant les haloperoxydases, particulièrement dans les banques représentatives d'état de stress, c) le caractère multigénique des haloperoxydases et enfin, d) la spécificité d'expression de certaines v-BPO, il semblerait que chez *L.digitata*, il existe un lien très étroit entre la gestion du stress oxydant et l'activation du métabolisme halogéné. Il relève d'un intérêt tout à fait particulier de vérifier l'hypothèse que les algues pourraient impliquer la diversité des haloperoxydases dans des fonctions biologiques définies et propres à chacune, avec des membres spécifiquement dédiés à la détoxication des espèces activées de l'oxygène.

IV.C <u>Développement d'outil d'expression différentielle chez les macroalgues : Identification de gènes de défense</u>

Les données obtenues à partir des banques EST de protoplastes de *L. digitata* et de *C. crispus* montrent que les stratégies EST constituent un outil intéressant pour produire un large répertoire de séquences correspondant à des gènes de stress. Les séquences obtenues autorisent alors le développement d'outils d'analyse d'expression différentielle, tels que les puces à ADN (microarrays) et permettent d'étudier la régulation du transcriptome dans des conditions physiologiques ou écologiques d'intérêt, à savoir en ce qui nous concerne, les interactions hôte/pathogène.

La première puce à ADN de macroalgue a ainsi été construite au laboratoire. Elle contient 1920 ADNc issus des banques de protoplastes et de thalles de *C. crispus*, représentant 1295 gènes théoriquement différents. Elle a été utilisée pour suivre l'expression des gènes de l'algue rouge en réponse à l'élicitation par le MeJA, ce qui constitue à notre connaissance la première approche transcriptomique chez une algue dans un contexte de réponses de défense (Collèn *et coll.*, 2006a). Il est effectivement décrit que le MeJA joue probablement un rôle important dans la régulation des défenses de *C. crispus*, dans la mesure où il active le métabolisme des acides gras en C18 et en C20 et qu'il conduit à la synthèse de nombreuses hydroperoxydes et cyclopentenones (Bouarab *et coll.*, 2004, Gaquerel *et coll.*, 2007) (voir paragraphe II.C.3). Cécile Hervé a montré par ailleurs au cours de sa thèse que le MeJA régule la transcription des gènes de GST et de NADPH oxydase chez *C. crispus* (Hervé, 2006, Hervé *et coll.*, 2006).

L'étude de Collèn *et coll.,* (2006a) montre que le MeJA affecte l'expression de 6 % des gènes étudiés, avec des facteurs allant de 4 à 11 pour 1 % d'entre eux. Sur la cinétique étudiée, les effets les plus marquants sont observés 6 heures après élicitation. Un profil d'expression général se caractérise par une surexpression des gènes de stress concomitant à une répression des gènes impliqués dans la conversion énergétique et dans le métabolisme général. Parmi les gènes de stress fortement induits, on trouve de nombreuses HSP, GST, peroxydases, xenobiotique réductases. Le métabolisme oxydatif est très certainement impliqué dans la réponse au MeJA, comme en témoigne l'induction des gènes de NADPH oxydase, peroxyrédoxine, catalase, ascorbate peroxydase, Mn-SOD et Msr. Il est remarquable que les gènes surexprimés correspondent à de nombreux gènes initialement identifiés grâce à la banque de protoplastes. L'induction du gène codant la deoxy-D-arabino-heptulosate-7-phosphate synthase (DHAP synthase), qui est la première enzyme de la voie du shikimate, vient appuyer l'implication de cette voie et de celles des phénylpropanoïdes dans les réponses de défense de *C. crispus* et renforce l'idée que l'induction des ces voies est liée à la signalisation oxylipidique (voir paragraphes II.C.2 et II.C.3).

Le profil d'expression des gènes en réponse au MeJA chez *C. crispus* est similaire à celui observé chez *A. thaliana* (Taki *et coll.*, 2005, von Rad *et coll.*, 2005). Cette similarité confirme un certain nombre de résultats acquis au niveau biochimique, à savoir que les algues rouges partagent avec les plantes supérieures, plusieurs aspects de leurs réponses de défense.

En conclusion, les connaissances relativement mineures et éparses des gènes liés aux réponses de défense chez les macroalgues sont essentiellement dues à la pauvreté des données génomiques et transcriptomiques actuellement disponibles. Les banques EST développées à grande échelle, comme celle de *P. yezoensis* ou d' *E. siliculosus* ont déjà permis d'identifier de nombreux gènes impliqués dans les principales voies de défense des plantes (Tableau 4), mais aussi parfois des animaux. Par ailleurs, les génomes de *Porphyra*, de *Chondrus* et d'*Ectocarpus* seront bientôt disponibles. L'ensemble de cette information génomique et transcriptomique devrait permettre dans les prochaines années de développer des puces à ADN à grande échelle et de progresser plus rapidement dans la régulation transcriptionnelle des réponses de défense des macroalgues.

Les algues rouges, qui ont une origine commune avec les plantes vertes, semblent partager avec ces dernières un certain nombre de réponses de défense. Au contraire, les algues brunes appartiennent à une lignée évolutive indépendante et elles ont pu conserver des mécanismes de défense ancestraux, communs à la lignée verte et/ ou à celles des animaux ou encore développer des mécanismes de défense spécifiques et originaux. Pour ces raisons évolutives; en particulier chez les algues brunes, il est necessaire de mettre en place à la fois des approches ciblées et des approches sans *a priori* afin de progresser dans l'étude des régulations transcriptionnelles qui s'oppèrent au cours des réponses de défense.

CONTEXTE
&
PROBLEMATIQUE

Contexte & Problématique

I. Modèle d'étude : *Laminaria digitata*

I.A Position phylogénétique

Les algues représentent un assemblage très divers d'organismes autotrophes, comprenant des lignées unicellulaires (les microalgues) et des lignées multicellulaires (les macroalgues). Les macroalgues sont ainsi des organismes photosynthétiques, multicellulaires, non vascularisés, sans tiges, ni racines, ni feuilles, qui vivent dans la mer. Au contraire des microalgues, les macroalgues sont fixées sur un substrat (roche, autre algue, bouée …) et elles structurent les écosystèmes côtiers en formant des populations denses et organisées. Elles sont classifiées sur la base de leur composition pigmentaire, à savoir algues brunes (chlorophylle a et c, caroténoïdes), algues rouges (chlorophylle a, phycoéryhtrine) et algues vertes (chlorophylle a et b). Elles appartiennent à des lignées évolutives indépendantes (Figure 21).

Une endosymbiose primaire entre une cyanobactérie photosynthétique et un hôte eucaryote, aurait donné naissance aux algues rouges (Rhodophyta) et à la lignée verte comprenant les algues vertes (Chlorophyta) et les plantes terrestres (Streptophyta). Les algues brunes (Phaeophyta) sont issues d'une endosymbiose secondaire entre un protiste sans plaste et un ancêtre unicellulaire d'algue rouge. Les algues brunes, les diatomées ainsi que les oomycètes appartiennent à la lignée des hétérochontes (Boyen, 2001, Baldauf, 2003). *L. digitata* qui est le modèle biologique de cette étude sur la régulation du transcriptome des algues brunes au cours des réponses de défense appartient à cette lignée des hétérochontes.

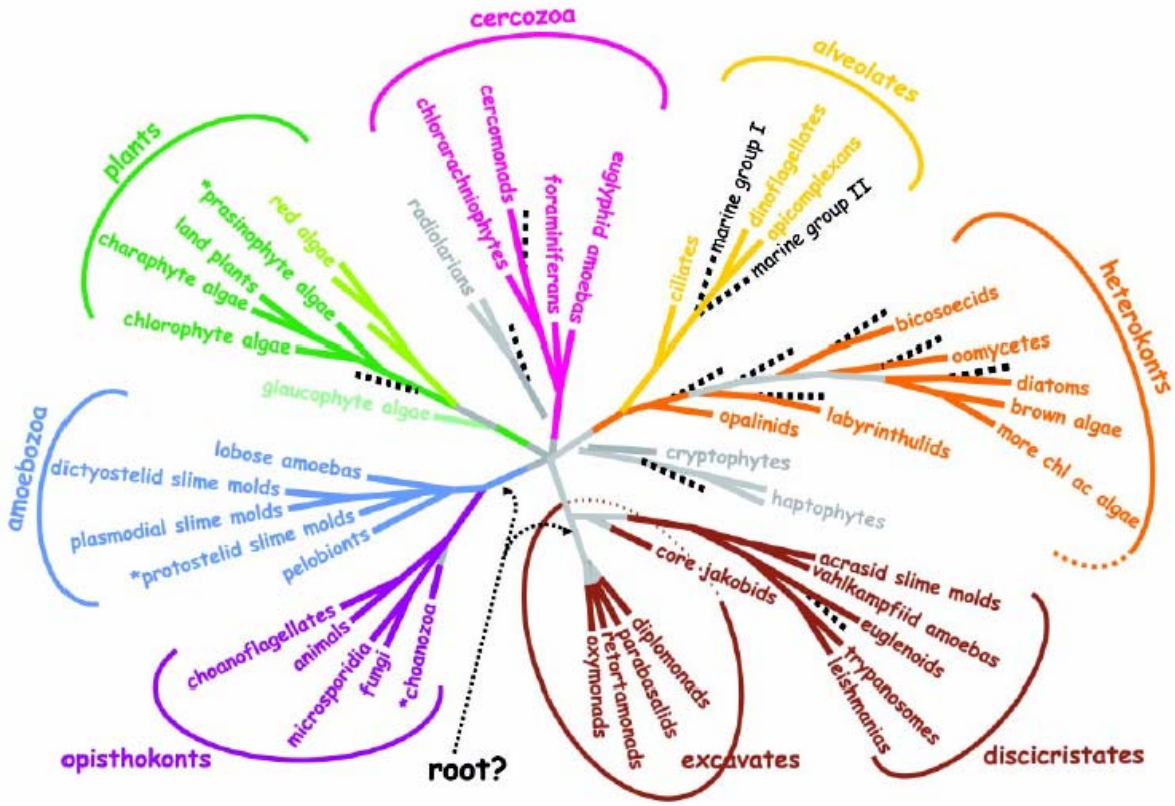


Figure 21 : Arbre phylogénétique des eucaryotes d'après Baldauf ., (2003)

I.B <u>Cycle biologique</u>

L. digitata est une algue brune appartenant à la classe des Phéophycées et à l'ordre des Laminariales. Sa répartition géographique s'étend des côtes du Spitzberg au golfe de Gascogne, où elle forme des populations en général relativement dense dans les étages infralittoraux. Elle est donc immergée en permanence, à l'exception des marées à fort coefficient, au moins égal à 90. Cette algue est donc peu soumise à la dessiccation, aux variations de température et de salinité (Figure 22).

Figure 22 : Peuplement dense de *L. digitata* formant des forêts dans les étages infralittoraux
Ile de Sieck, Santec (29).

Le cycle biologique de *L. digitata*, découvert par Sauvageau dans les bacs de l'aquarium de Roscoff pendant la première guerre mondiale, est digénétique hétéromorphe (Sauvageau, 1918). Les sporophytes diploïdes correspondent à la génération visible. Ce sont de grands thalles bruns pouvant atteindre 3 à 4 m, avec une durée de vie maximale de 4 à 5 ans. Anatomiquement, on distingue la lame divisée en lanières, d'où son nom 'digitata', un stipe lisse, flexible et cylindrique, fixé au substrat rocheux par un crampon. Le sporophyte à maturité produit des spores méiotiques dans des sporocystes en sores disséminés sur la lame et visibles sous forme de taches sombres. Les gamétophytes mâles et femelles engendrés par ces spores sont microscopiques, réduits à quelques cellules. La fusion des gamètes se fait sur le gamétophyte femelle et aboutit à un œuf diploïde qui se développe en un nouveau sporophyte de grande taille (Figure 23).

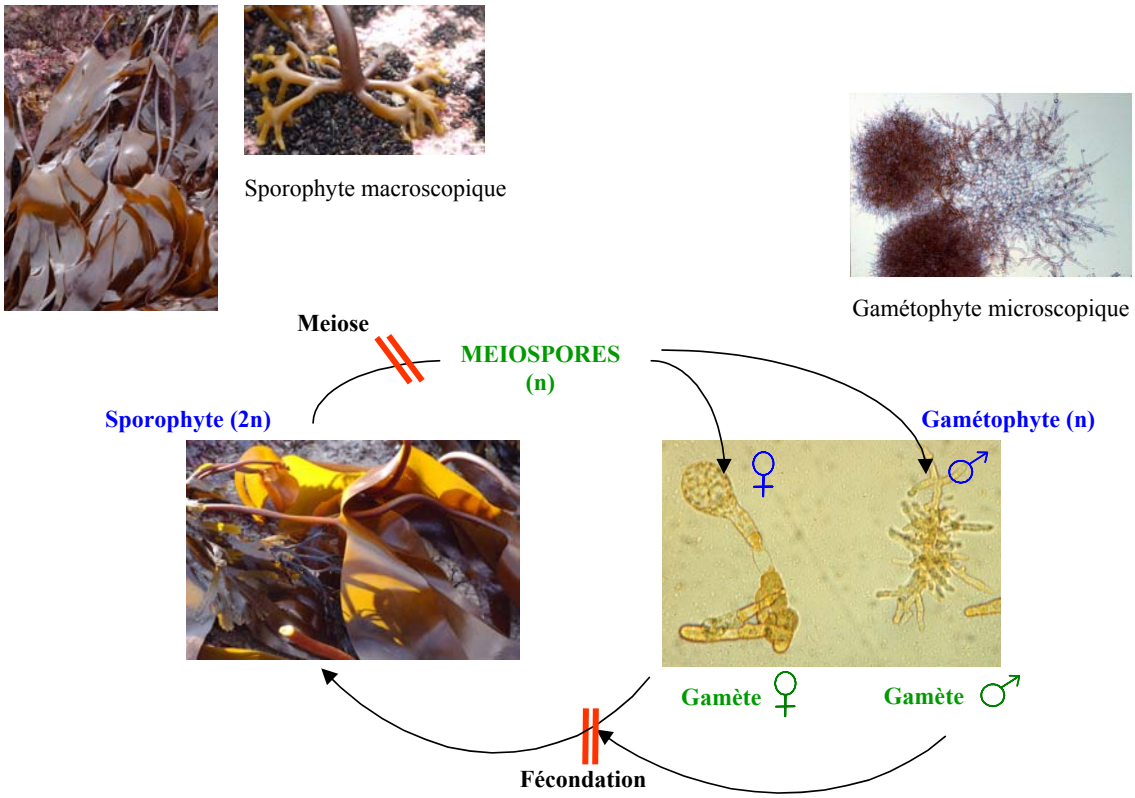


Figure 23 : Cycle digénétique hétéromorphe de *L. digitata*

Le sporophyte (2n) produit des spores méiotiques (n) qui donnent naissance à des gamétophytes mâles (n) ou femelles (n). La fusion des gamètes redonne un nouveau sporophyte (2n)
Le sporophyte macroscopique est fixé au substrat rocheux par un crampon, un stipe lisse et flexible le relie à la lame divisée en lanières. Le gamétophyte est microscopique.

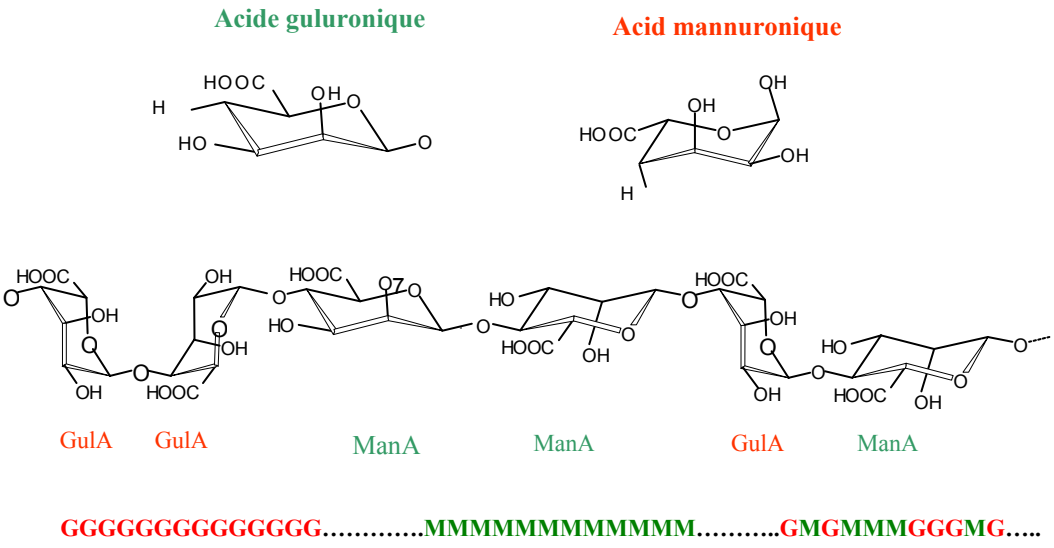


Figure 24 : L'alginate est le principal constituant de la paroi de *L. digitata*

Il est composé de deux types de sucres : acide α-L-guluronique (G) et acide β-D-mannuronique (M): Les chaînes de polysaccharides sont constituées de l'alternance de blocs homogènes de G ou de M, et de blocs hétérogènes contenant les deux types de sucres (MG).

La paroi de *L. digitata* est composée de cellulose et essentiellement d'alginates, qui peuvent représenter jusqu'à 45 % du poids sec de l'algue. Les alginates sont des polysaccharides d'acide α-L-guluronique (G) et d'acide β-D-mannuronique (M), qui forment des chaines avec une distribution aléatoire de trois types de blocs, enchaînement de M, de G ou alternance de M et de G (Figure 24).

I.C Valorisation de la ressource algale de *L. digitata*

Dans les régions où les laminaires poussent et plus particulièrement en Bretagne, les champs de laminaires sont exploités pour fournir la matière première nécessaire à l'extraction des alginates, qui constituent un hydrocolloïde très demandé par l'industrie agroalimentaire, pharmaceutique, cosmétique et textile. Les alginates peuvent absorber jusqu'à 140 fois leur volume d'eau ! Les alginates ont la propriété de former des gels de rhéologie variable en fonction de leur teneur en acides guluroniques et de la nature des cations présents en solutions. En raison de leur charge, ils interagissent également avec de nombreuses molécules biologiques, telles que des protéines ou des acides gras. Ils sont utilisés dans l'industrie sous l'appellation E400 à E405. Les applications industrielles des alginates sont ainsi très diverses : texture de produits alimentaires ou cosmétiques, stabilisation, empreinte dentaire, plâtrage d'estomac, traitement des papiers, propriétés absorbantes des couches, fixation des colorants dans le textile, fil biodégradable, précipitation des impuretés dans les eaux usées …

II. Vers une meilleure compréhension du transcriptome de la défense chez *L. digitata*

Les données de la littérature concernant l'activation des voies de défense au cours d'interaction hôte-pathogène chez les algues sont relativement restreintes. Les études portent essentiellement sur des approches physiologiques et biochimiques, qui ont toutefois permis de montrer qu'il existe un certain nombre de réponses de défense conservées avec les plantes ou les animaux (confère Introduction). Toutefois, la grande majorité des voies métaboliques impliquées dans la défense reste à identifier. Les approches moléculaires, notamment l'analyse de la régulation du transcriptome au cours des interactions biotiques, sont des

stratégies intéressantes pour accéder à ces informations. Avec l'augmentation ces dernières années des données EST et génomique, une approche moléculaire des réponses de défense est désormais envisageable.

Afin de définir le contexte dans lequel se place la problématique de mon projet de thèse, je rappellerai brièvement les acquis sur les réponses de défense de *L. digitata*, ainsi que les grandes lignes du métabolisme halogéné et je résumerai les données transcriptomiques disponibles chez cette algue.

II.A Les acquis sur les réponses de défense de *L. digitata*

L'application d'oligoguluronates induit chez les sporophytes de *L. digitata* un *burst* oxydant comparable à celui observé au cours d'interactions hôte-pathogène chez les plantes, avec émission de peroxyde d'hydrogène et augmentation de la consommation en oxygène (Figure 25). Les oligoguluronates sont donc reconnus par l'algue comme un signal indiquant une agression biotique. Ils sont produits naturellement au cours de la dégradation de la paroi par un agent pathogène ou par une bactérie alginolytique. Les oligoguluronates, peuvent également être produits au laboratoire à partir d'alginate purifié et à défaut de pathosystème, ils peuvent alors servir d'éliciteur pour étudier les réponses de défense de *L. digitata*.

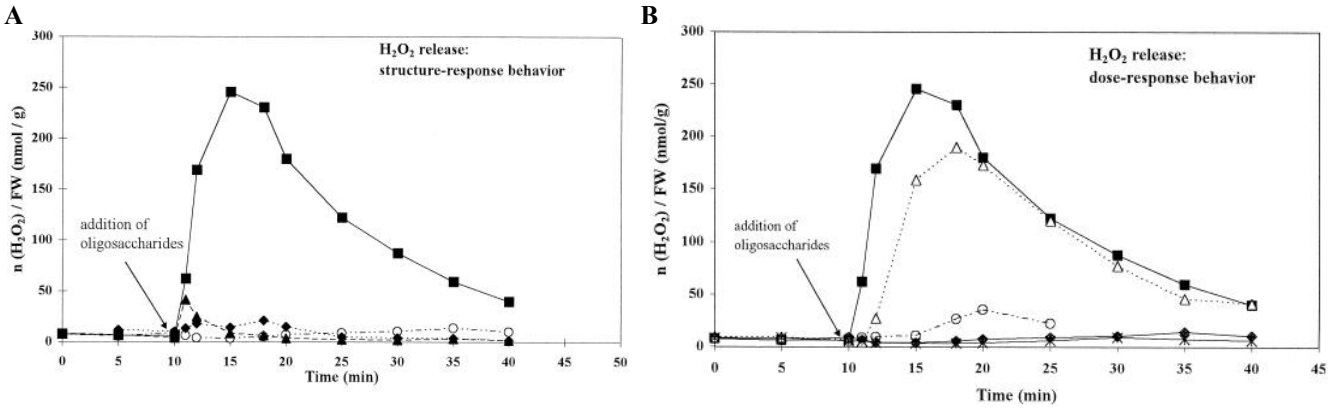


Figure 25 : *Burst* oxydant chez *L. digitata* consécutif à l'élicitation par les oligoguluronates

A. L'émission d'H_2O_2 est liée à la structure des oligosaccharides. Seuls les oligosaccharides de type GG déclenchent le *burst* oxydant. Blocks GG(■), Blocks MG (▲), Blocks MM (♦), contrôle eau (○)
B. La quantité d' H_2O_2 émise est dose dépendante. 1 µg mL^{-1} (+) 10 µg mL^{-1} (Δ) 100 µg mL^{-1} (■) contrôle eau (♦). Le seuil de déclenchement est de 2,5 µg mL^{-1}. D'après Küpper *et coll.,* (2001).

L'émission de peroxyde d'hydrogène dépend de la dose d'oligoguluronates appliquée et une période réfractaire de 3 heures est observée, pendant laquelle l'algue ne peut réagir à une nouvelle stimulation par le même éliciteur. Ces observations sont en faveur de l'existence d'un récepteur spécifique aux oligoguluronates. La production de peroxyde d'hydrogène est due à l'activation d'une flavoenzyme oxydase, très probablement une NADPH oxydase. La transduction du signal aboutissant à la mise en place du *burst* oxydant est similaire à celle observée chez les plantes supérieures, avec la participation de phosphorylation, de phospholipase A2, d'influx calcique, d'efflux potassique et anioniques (Küpper *et coll.*, 2001).

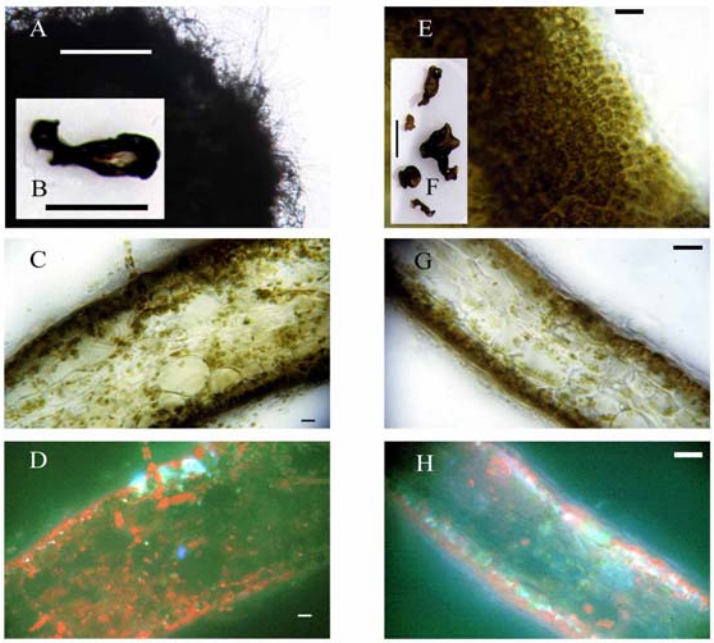


Figure 26 : Les oligoguluronates induisent une résistance à *L. tomentosoides* chez *L. digitata*

Dans les contrôles, les thalles sont complètement envahis (A-D). Des composés autofluorescents sous UV s'accumulent au site de pénétration de l'endophyte (D). Un prétraitement des thalles par 150 µg/mL d'oligoguluronates pendant 2 heures, 10 jours avant l'inoculation de l'endophyte, limite très nettement la croissance de *L. tomentosoides* que ce soit en épiphyte ou en endophyte (E-H). Cette protection accrue s'accompagne de l'accumulation abondante et générale de composés autofluorescents bleus (H). D'après Küpper *et coll.,* (2002).

Le peroxyde d'hydrogène émis joue un rôle important dans le contrôle de la croissance de bactéries épiphytiques, potentiellement pathogènes (Küpper *et coll.*, 2001, Küpper *et coll.*, 2002). Il a également été montré que *L. digitata* présente une résistance accrue à l'algue brune

endophyte *Laminariocolax tomentosoides* lorsque le thalle est prétraité avec des oligoguluronates. Le *burst* oxydant induit par les oligoguluronates pourrait jouer alors un rôle dans l'induction de la résistance à l'endophyte. Cette protection s'accompagne de la production générale de composés autofluoresents sous UV dans tout le cortex, contrairement à une production localisée au site de pénétration chez les algues n'ayant pas été au préalable en contact avec l'éliciteur (Figure 26) (Küpper *et coll.*, 2002).

Enfin, il a été récemment mis en évidence que les LPS, qui sont des PAMPs largement décrits chez les plantes et les animaux, sont également reconnus par *L. digitata*. L'algue brune reconnaît donc aussi bien des éliciteurs endogènes que des éliciteurs exogènes. Bien que la cinétique d'émission de peroxyde d'hydrogène soit différente de celle induite par les oligoguluronates, les LPS provoquent également un *burst* oxydant. Ce dernier s'accompagne de la libération d'acides gras et de la biosynthèse d'oxylipines, contrairement à l'élicitation par les oligoguluronates (Küpper *et coll.*, 2006). Ces résultats récents suggèrent que des voies de signalisation différentes sont impliquées dans le *burst* oxydant et la biosynthèse des oxylipines.

II.B Un métabolisme halogéné actif, impliqué dans la défense ?

Chez *L. digitata*, les haloperoxydases représentent 2,4 % des ARNm totaux exprimés chez le sporophyte, ce qui suggère un métabolisme halogéné actif via l'intervention de ces enzymes (Crépineau *et coll.*, 2000). Elles sont codées par des familles multigéniques dont plusieurs représentant bromoperoxydases et iodoperoxydases ont été caractérisés au laboratoire (Colin *et coll.*, 2003, Colin *et coll.*, 2005). Certains membres, comme la v-BPO3 ne sont exprimés qu'en condition de stress oxydant (Roeder *et coll.*, 2005).

D'autre part, les sporophytes de *L. digitata* sont des accumulateurs d'iode exceptionnels, avec des concentrations maximales 100 000 fois supérieures à celle de l'eau de mer (0,5 µM). Le rôle biologique de cette accumulation est inconnu, mais les haloperoxydases pourraient être impliqués dans cette absorption (Küpper *et coll.*, 1998). D'autre part, les laminaires constituent un compartiment majeur de la production de composés organiques halogénés volatils, notamment à marée basse (Carpenter *et coll.*, 1999). Cette production est souvent interprétée comme une réponse des algues au stress oxydant (Pedersen *et coll.*, 1996).

Enfin, au laboratoire, des résultats préliminaires ont montré un efflux d'iode et une émission accrue de COHV consécutifs à l'élicitation par les oligoguluronates chez *L. digitata*.

L'ensemble des ces résultats montrent l'importance du métabolisme halogéné chez *L. digitata*. Ils suggèrent également qu'il serait lié aux mécanismes de défense et/ou aux réponses au stress.

II.C Les données transcriptomiques disponibles chez *L. digitata*

Au laboratoire deux projets EST successifs ont été menés chez *L. digitata*. Le premier a généré un peu moins de 500 EST pour chacune des deux phases du cycle de vie. Les gènes mis en évidence correspondent à des gènes de ménages, comme les protéines ribosomales, ainsi qu'aux gènes du métabolisme carboné et halogéné (Crépineau *et coll.*, 2000). La conception d'une banque EST à partir de protoplastes a constitué une alternative intéressante pour obtenir un profil transcriptomique représentatif d'un état de stress. Vingt trois % des 1985 EST générées appartiennent à la catégorie 'Stress & Défense', soit 3 fois plus que dans la banque de sporophyte. Dans cette catégorie, parmi les EST auxquelles une fonction putative a pu être attribuée, on note la présence d'HSP, de bromoperoxydases, de thiorédoxines et de GST (Roeder *et coll.*, 2005).

La construction d'une banque soustractive à partir d'ARN extraits de sporophyte de *L. digitata* élicité ou non par des oligoguluronates a également été conduite sans toutefois être complètement finalisée. Cette banque contient 272 EST, dont la majorité correspond à des fonctions inconnues (Roeder, 2006). La première recherche d'identité de séquence a toutefois indiqué la présence de v-BPO, d'HSP, de thiorédoxine peroxydase et d'enzymes de la voie des pentoses phosphates, soit un profil similaire aux EST dites de 'stress' identifiées par l'approche EST menée sur les protoplastes.

II.D La problématique et les objectifs

L'identification et la caractérisation des gènes réprimés et surexprimés en réponse à l'attaque par un agent pathogène sont importantes, et nécessaires, à la compréhension des mécanismes moléculaires qui contrôlent les réponses de défense. De nombreuses avancées ont été réalisées ces dernières années sur la régulation du transcriptome associée à la défense chez les plantes supérieures (Eulgem, 2005). Au contraire, chez les macroalgues marines, la

compréhension moléculaire des mécanismes de défense commence à peine à se développer, entre autres grâce aux travaux de Collèn *et coll.,* 2006 et à la thèse de Cécile Hervé réalisés au laboratoire sur l'algue rouge *C. crispus*. Chez les algues brunes, aucune étude transcriptomique n'a été menée dans le cadre d'interaction hôte-pathogène ou d'élicitation mimant cette interaction.

Chez *L. digitata*, les précédentes études sur les réponses de défense, suite à l'élicitation par les oligoguluronates, ont permis d'appréhender la transduction du signal conduisant à la production d'un *burst* oxydant, ainsi que la mise en place tardive de la résistance. Néanmoins, entre ces deux réponses aucune donnée de permet de comprendre comment le message intracellulaire est transmis pour que l'algue puisse assurer sa défense (Figure 27).

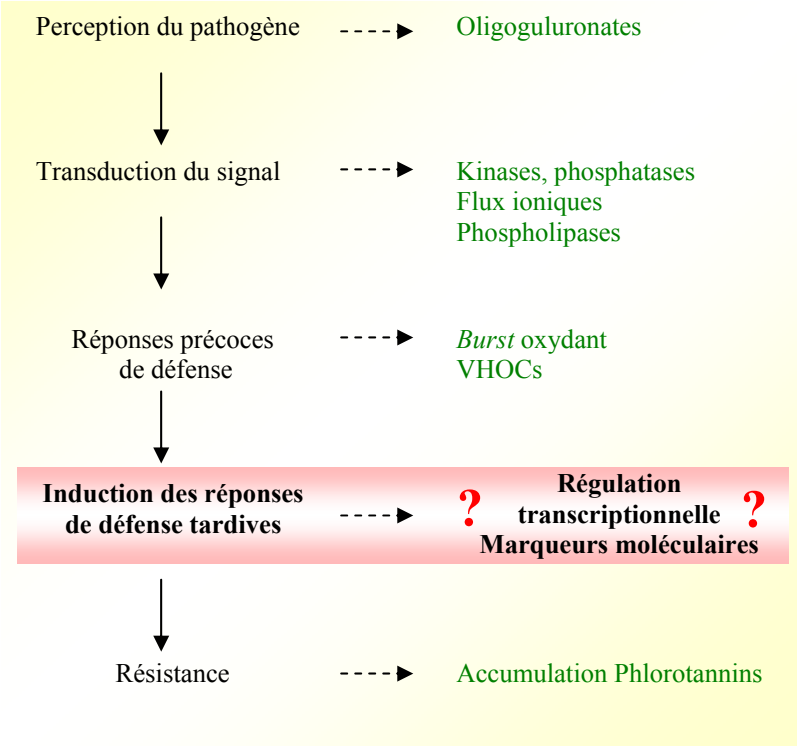


Figure 27: Positionnement de la problématique de thèse : De la perception à la résistance, l'absence de marqueurs moléculaires de défense chez l'algue brune *L. digitata*

Un verrou de taille à la progression de la compréhension des mécanismes de défense de *L. digitata* est l'absence de marqueur enzymatique ou moléculaire. En ce qui concerne les marqueurs enzymatiques, toutes les tentatives d'extraction de l'intégralité des protéines, ou du moins d'une grande majorité des ces protéines, ont échoué. Seule une fraction restreinte, contenant d'ailleurs les haloperoxydases, est accessible. Bien qu'il existe de nombreuses évidences que le métabolisme halogéné pourrait jouer un rôle important dans les défenses de *L. digitata*, les haloperoxydases ne se sont pas avérées être des marqueurs enzymatiques fiables de défense. La récente acquisition d'une quantité raisonnable de données EST chez *L. digitata* entrouvrait donc la possibilité de se tourner vers la recherche de marqueurs moléculaires.

Dans ce contexte global, la problématique d'étude de ma thèse a été définie par **la compréhension des mécanismes moléculaires qui contrôlent les réponses de défense de *L. digitata,* notamment en lien avec le métabolisme halogéné**.

Plusieurs questions étaient sous jacentes à cette problématique :

Est-ce que les gènes impliqués dans les réponses de défenses des algues brunes sont conservés avec les plantes et / ou les animaux ? Est-ce que la régulation du transcriptome au cours des réponses de défense est temporelle comme cela est montré chez d'autres eucaryotes ? Ou au contraire, est-ce que les algues ont développé une régulation différente de leur transcriptome du point de vue de la qualité des gènes, de la quantité ou de la cinétique ?

Quelles informations la régulation du transcriptome apporte-t-elle sur les voies métaboliques mises en jeu au cours des réponses de défense ? Confirment-elles les mécanismes mis en avant par les données génomiques et EST ?

Enfin, si cette régulation existe, quelles sont les voies de transduction du signal intracellulaire conduisant à cette régulation ?

Afin d'identifier les gènes jouant un rôle dans une réponse biologique donnée, une des premières approches méthodologiques consiste à explorer le changement global de l'expression des gènes qui s'opère au cours de cette réponse. Ainsi, afin de mieux comprendre les événements moléculaires qui régulent les réponses de défense chez *L. digitata*, les techniques d'hybridation soustractive et de *macroarrays* ont été développées.

Cette stratégie devait permettre :

1. d'avoir une vue globale de la régulation transcriptionnelle s'opérant au cours des réponses de défense
2. d'identifier des marqueurs moléculaires des réponses de défense, qui pourraient ensuite servir à des études diverses sur les interactions biotiques de *L. digitata* en conditions contrôlées de laboratoire ou dans des populations naturelles.
3. d'identifier les voies métaboliques impliquées dans les réponses de défense
4. de comprendre les relations entre le métabolisme halogéné et les autres voies du métabolisme de défense chez *L. digitata*, en accordant un intérêt particulier à l'expression de différents membres d'haloperoxydases caractérisés au laboratoire.

Une fois les marqueurs moléculaires des réponses de défense isolés, il était alors possible de débuter la dissection de la cascade de transduction du signal aboutissant à l'activation des gènes de défense.

Enfin, afin d'établir le lien entre métabolisme halogéné et réponses de défense, l'approche transcriptomique devait être complétée par la caractérisation de métabolites halogénés produits suite à l'élicitation.

MATERIELS
&
METHODES

Matériels & Methodes

I. Matériel végétal et traitement

I.A Matériel végétal

Nous maîtrisons au laboratoire le cycle de vie de *L. digitata* et de ce fait la production de gamétophytes et de sporophytes. Un thalle sauvage et mature, prêt à sporuler, de *L. digitata* est récolté afin de réaliser la libération des spores au laboratoire. La formation des gamétophytes mâles et femelles est observée au microscope, ainsi que la fusion des gamètes donnant naissance aux sporophytes (Figure 23). Les très jeunes sporophytes sont alors isolés et mis en culture dans de l'eau de mer filtrée, stérile, oxygénée et enrichie en milieu Provasoli ES (Starr et Zeikus, 1987) (Figure 28). Le milieu de culture est changé chaque semaine. Quatre mois au minimum sont nécessaires pour obtenir des plantules d'au moins 5 cm. La photopériode de la salle de culture est de 10 heures de jour et de 14 heures d'obscurité, sous un flux lumineux de 40 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$. La température est de 13 °C. Les jeunes plantules dites de culture ont été utilisées pour mener les expériences de *macroarrays* et la validation par PCR Quantitative.

Figure 28 : Culture de *L. digitata* au laboratoire

Les sporophytes sauvages de *L. digitata* ont été récoltés au lieu dit du Bloscon à Roscoff à marée basse lors de marée à fort coefficient (supérieur à 95). Il s'agit de jeunes plantules de 5 à 8 cm, pesant de 100 à 250 mg. Elles sont maintenues sous agitation en ballon dans de l'eau de mer filtrée, stérile et oxygénée durant deux jours afin de stabiliser leur état physiologique avant de pratiquer l'élicitation. Les plantules non utilisées dans la semaine ne sont pas conservées.

I.B Elicitation par les oligoguluronates

I.B.1 Préparation d'oligoguluronates

Les oligoguluronates sont préparés par hydrolyse acide à partir de poudre de stipe de *L. hyperborea* (Protan, Norway) (Heyraud *et coll.*, 1996). Une solution à 0,5 % d'alginate est hydrolysée à chaud (100 °C) pendant 4 à 5 heures par 0,3 M d'acide chlorhydrique. Les trois types d'oligosaccharides produits, oligoguluronates (GG), oligomannuronates (MM) et oligosaccharides hybrides (MG), sont séparés par des étapes de centrifugation et de précipitation sélective. La fraction correspondant aux oligoguluronates est dialysée, lyophylisée et analysée en RMN afin de vérifier sa pureté. La distribution de taille des oligosaccharides produits est vérifiée par la technique de Carbohydate-PAGE.

I.B.2 Elicitation de jeunes sporophytes

Les plantules de *L. digitata* sont élicitées par les oligoguluronates à raison de 150 µg/mL, qui correspond à la concentration optimale déterminée par Küpper *et coll.,* (2001). Chaque plantule est placée sous agitation dans 10 ml d'eau de mer fraichement filtrée et stérilisée. L'émission de peroxyde d'hydrogène dans le milieu d'incubation, correspondant à la mise en place d'un *burst* oxydant, est mesurée par chimioluminescence, afin de vérifier la réussite de l'élicitation. Chaque élicitation, ainsi que leur contrôle sont menés en triplicat. Une heure après élicitation, les algues sont placées dans un plus grand volume d'eau (100 mL) et conservées sous agitation avant d'être congelées instantanément par l'azote liquide à 3, 6, 12 ou 24 heures après élicitation. Les plantules congelées sont conservées à -80 °C.

I.B.3 Traitement inhibiteur

Les plantules ayant subi un traitement inhibiteur ont été maintenues pendant 1 heure sous agitation avant élicitation par les oligoguluronates selon cette séquence : 10 min dans l'eau de mer, 30 minutes d'incubation avec les différents inhibiteurs, renouvellement de l'eau de mer, puis à nouveau 20 minutes dans l'eau de mer (Figure 29). Cette séquence permet de vérifier l'état de stress des plantules par l'émission de peroxyde d'hydrogène avant l'élicitation, notamment les effets éventuels des inhibiteurs ou de leur solvant. La production de peroxyde d'hydrogène dans l'eau de mer a été suivie pendant 1 heure. Les algues ont été congelées 3, 6 et 12 heures après élicitation.

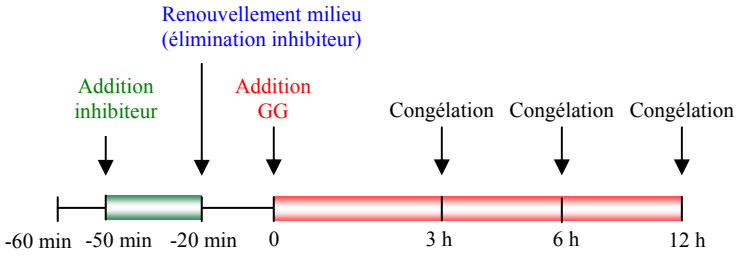


Figure 29 : Plan d'expérimentation des élicitation de plantules de *L. digitata*

Après contrôle de l'état de stress des plantules pendant 10 min (mesure de l'émission de peroxyde d'hydrogène), les plantules sont prétraitées ou non avec les inhibiteurs pendant 30 minutes. L'eau de mer d'incubation est alors éliminée dans tous les échantillons, les plantules sont rincées avec de l'eau de mer et incubées à nouveau pendant 20 minutes. Elles sont alors élicitées par 150 µg/mL d'oligoguluronates. L'émission de peroxyde d'hydrogène, caractéristique du *burst* oxydant, est mesurée au cours de la première heure, afin de vérifier le succès de l'élicitation et l'effet des inhibiteurs sur la production du peroxyde d'hydrogène. Chaque condition est réalisée en triplicat. Les plantules ont été congelées 3, 6 et 12 heures après élicitation.

Les inhibiteurs ont été testés aux concentrations suivantes : DPI 10 µM (Sigma), quinacrine 20 µM (Sigma), chlorpromazine-HCl 20 µM (Sigma), staurosporine 15 µM (Sigma), apigénine 50 µM (Sigma), verapamyl 100 µM (Sigma), A9C 100 µM (Sigma). Les inhibiteurs ont été solubilisés dans le DMSO 0,5 % (Sigma) ou l'eau 1,25 %. Ces concentrations correspondent à celles utilisées par Küpper *et coll.,* (2001), à l'exception de la quinacrine et de la chlorpromazine, dont les concentrations à 500 et 100 µM respectivement se sont avérées létales pour les plantules. Un test d'effet dose a montré que 20 µM suffise largement pour obtenir un effet significatif de l'inhibiteur sur le *burst* oxydant sans altération visible des plantules dans les 24 heures qui suivent son application.

I.C Dosage du peroxyde d'hydrogène par chimioluminescence.

L'émission de peroxyde d'hydrogène par les plantules élicitées par les oligoguluronates est mesurée à l'aide d'un luminomètre (Lumat LB9507, EG&G Bertold Evry, France). Cet appareil est doté de deux injecteurs reliés aux solutions de réactif : le luminol en solution dans le DMSO (Sigma) dilué à une concentration finale de 0,3 M dans de l'eau distillée (injection 50 µL) et la peroxydase HRP (Sigma), en solution dans du tampon phosphate 10 mM pH 7,8 (injection 100 µL). La mesure de la luminescence, issue de l'oxydation du luminol en aminoaphtalate par le peroxyde d'hydrogène en présence de peroxydase est mesurée sur des aliquots de 250 µL du milieu d'incubation des algues. La concentration en peroxyde d'hydrogène est déterminée à l'aide d'une gamme étalon.

II. Analyse de biologie moléculaire

II.A Extraction des acides nucléiques

Un protocole d'extraction en eppendorf des acides nucléiques, et plus particulièrement de l'ARN, a été adapté à partir du protocole d'extraction classique de K. Apt (Apt *et coll.*, 1995), afin de permettre le traitement d'un plus grand nombre d'échantillons.

Les plantules de *L. digitata* (100 à 150 mg/plantule) sont broyées à la main dans un mortier en une fine poudre en présence d'azote liquide et de sable de Fontainebleau. La

poudre est extraite pendant 30 minutes sous agitation vigoureuse dans un tampon contenant 100 mM Tris-HCl pH 7,5, 2 % CTAB, 1,5 M NaCl, 50 mM EDTA, 50 mM DTT à raison de 9 mL/g de matière fraîche. Les ARN sont extraits v/v par séparation de phase en présence de chloroforme/alcool isoamylique (24:1). Une étape de centrifugation (15 min, 10 000 *g*) permet de récupérer la phase aqueuse qui contient les ARN. Les polysaccharides qui sont très abondants dans cette phase aqueuse doivent être précipités par l'addition lente et sous agitation de 0,3 volume d'éthanol à 100 %. Une seconde extraction par le chloroforme/alcool isoamylique (24:1), suivi d'une centrifugation (15 min, 10 000 *g*) permet d'éliminer les polysaccharides précipités. La phase aqueuse contient les acides nucléiques, ARN et ADN.

II.A.1 Extraction des ARN

Les ARN présents dans la phase aqueuse sont précipités sur la nuit à -20 °C en amenant la phase aqueuse à 3 M de LiCl et 1 % de β- mercaptoéthanol. Les ARN sont alors culotés par centrifugation à 4 °C (45 min, 15 min, 10 000 *g*) et resuspendus dans du tampon 10 mM Tris pH 7,5, 1 mM EDTA (TE). Les contaminants protéiques sont éliminés par deux extractions successives v/v au phenol/chloroforme (1:1). Les ARN sont ensuite purifiés par une extraction v/v au chloroforme/alcool isoamylique (24:1). L'ARN contenu dans la phase aqueuse est enfin précipité à -20 °C sur la nuit par 0,1 volume de d'acétate de sodium 3 M pH 5,5 et par 2,5 volumes d'éthanol 100 %. L'ARN est conservé sous cette forme jusqu'à utilisation.

II.A.2 Extraction de l'ADN génomique

L'ADN génomique présent dans la phase aqueuse est précipité par un volume d'isopropanol à température ambiante pendant au moins 4 heures. Une centrifugation (30 min, 10 000 *g*) permet de récupérer l'ADN et de le solubiliser dans du TE. Il est ensuite purifié des contaminants ARN et protéiques sur gradient de chlorure de césium. La solution d'ADN est amenée à 4,5 M de CsCl et 600 µg/mL de bromure d'éthidium, puis délicatement coulée dans un tube à sceller, qui est centrifugé pendant 48 heures à 50000 *g*. L'ADN est prélevé à l'aide d'une seringue sous UV. Le bromure d'éthydium est éliminé par lavages successifs au butanol saturé en eau, puis l'ADN est dilué dans 1 volume d'eau avant d'être précipité par 2 volumes d'éthanol 100 %. Une dernière centrifugation permet de récupérer l'ADN purifié et de le redissoudre dans l'eau.

II.B Séquençage et analyse des séquences

II.B.1 Séquençage

Les ADNc correspondant à l'ensemble des gènes candidats déterminés par l'approche *macroarray* ont été entièrement séquencés deux fois dans les deux sens, d'une part afin d'obtenir leur séquence complète et de valider leur annotation et d'autre part, afin d'obtenir la séquence en 3' dans laquelle les amorces de PCR Quantitative ont été définies.

La réaction de séquence par PCR est réalisée à partir de 100 ng de plasmide purifié en présence du système de marquage Big Dye Terminator version 3 (Applied Biosystem), qui consiste en un marquage de chaque acide nucléotidique situé en fin de brin par un fluochrome différent. Les produits de PCR sont purifiés à l'aide du kit Montage SEQ96 Sequencing Reaction Clean Up (Millipore) et repris dans une solution permettant l'injection dans le séquenceur automatique 3130XL (Applied Biosystem). Le séquençage a été réalisé sur la plate forme de génomique de la Station Biologique de Roscoff.

II.B.2 Analyse des séquences

L'identité des séquences de l'ensemble des EST issues de la banque soustractive ainsi que des EST correspondant aux 96 gènes définissant le filtre dédié stress, a été vérifiée par comparaison aux banques de données du NCBI à l'aide des programmes BlastN et tBlastX sur le site http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/.

Le regroupement des séquences en contig correspondant à un même ADNc a été réalisé à l'aide du logiciel Sequencher version 4.0 (Genes Code Corporation). L'analyse des séquences nucléotidiques et leur traduction en séquences protéiques primaires ainsi que les alignements ont été réalisées à l'aide du logiciel DNAMAN version 4.15 (Lynnon Biosoft), ainsi que par les programmes disponibles en ligne sur le serveur Expasy à l'adresse suivante, http://www.expasy.org/.

Les alignements protéiques ont été réalisés en utilisant le programme MAFFT, disponible en ligne à l'adresse http://bioinformatics.uams.edu/mafft/.

II.C Analyses transcriptionnelles

II.C.1 Construction d'une banque d'ADNc par la technique SSH

Une banque d'ADNc spécifique du sporophyte élicité par les oligoguluronates a été obtenue au laboratoire, avant mon arrivée, par la technique d'hybridation suppressive soustractive (Substractive and Supressive Hybridisation, SSH en anglais).

Les ARNm ont été isolés à partir de l'ARN total à l'aide du kit PolyA Tract mRNA Isolation System (Promega). Les ADNc ont été synthétisés à partir d'1 µg d'ARNm en utilisant le kit SMART PCR cDNA Synthesis (Clontech). L'hybridation soustractive, basée sur des étapes de PCR, entre les ADNc issus des algues élicitées (designés comme 'tester') et les ADNc issus des algues témoins (designés comme 'driver') a été menée à l'aide du kit PCR-Select cDNA Subtraction (Clontech). Les ADNc soustraits ont été clonés dans le vecteur pCR 2.1-TOPO (Invitrogen) pour générer une banque plasmidique. Des colonies blanches ont été prélevées au hasard pour réaliser un séquençage et générer une banque de 272 EST.

Les détails du protocole conduisant à l'obtention de cette banque d'EST sont décrits par Roeder, (2005).

II.C.2 *Macroarray*

Afin d'étudier la régulation du transcriptome de *L. digitata* en réponse à l'élicitation par les oligoguluronates, une *macroarray* à petite échelle a été construite. Grâce aux données EST disponibles à partir des banques d'ADNc de sporophytes et de protoplastes, ainsi qu'à partir de la banque SSH, 96 gènes ont été sélectionnés pour générer cette *macroarray*. Cette technique a été choisie en raison de sa mise en place relativement simple, de sa faisabilité en interne, de son coût raisonnable et de son caractère réutilisable.

II.C.2.a Obtention des ADNc représentatifs des 96 gènes

Environ 15 % des 96 ADNc sélectionnés pour construire le filtre dédié stress étaient conservés à -20 °C sous forme de plasmides. Dans un premier temps, j'ai donc réalisé la transformation de bactéries compétentes de type DH5α pour tous ces ADNc.

Après culture de l'ensemble des clones, j'ai vérifié la conservation de l'ADNc d'intérêt par extraction du plasmide à l'aide du kit Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification system (Promega) et déterminé la taille de l'insert par dépôt sur gel d'agarose du

produit de digestion enzymatique du plasmide. J'ai enfin réalisé la mise au format plaque 96 puits des stocks glycerol bactériens correspondant au schéma du filtre.

II.C.2.b Production du filtre macroarray

Les plasmides correspondant aux 96 ADNc d'intérêt, ainsi que les plasmides correspondant aux contrôles positifs et négatifs ont été extraits et dosés en triplicat au spectrophotomètre à 260 nm. Leur concentration a été amenée à 100 ng/µL. Chaque plasmide a été déposé une seule fois à la main à l'aide d'une micropipette à raison de 1 µL selon le format 13 colonnes et 8 lignes sur une membrane de nylon Hybond N^+ (GE Healthcare) de taille 12 x 7 cm, ce qui correspond à 1,2 dépôt / cm^2.

Les membranes ont été dénaturées pendant 5 min dans une solution 0,5 M NaOH, 0,5 M NaCl, puis neutralisées 5 min dans une solution 0,5 M Tris-Hcl pH7,5, 0,5 M NaCl et enfin rinçées dans du tampon 2X SSC (0,3 M NaCl, 30 mM Na_3 Citrate). Après séchage complet, les dépôts ont été fixés sous UV (GS Gene Linker, BioRad).

II.C.2.c Principe du protocole d'hybridation de macroarrays

Les *macroarrays* ont été hybridées selon le protocole décrit par Mazurais *et coll.*, (2005). Il comprend deux étapes. Une première hybridation, dite 'hybridation vecteur', consiste à hybrider le filtre avec un oligonucléotide radiomarqué au ^{33}P dont la séquence est complémentaire d'une séquence présente sur chaque entité de la membrane. Cette hybridation, menée avec l'oligonucléotide dénommé T7, permet de vérifier la qualité et l'homogénéité du dépôt, et d'estimer la quantité relative de chaque dépôt. Elle permet la normalisation entre les différentes membranes. Les membranes sont ensuite deshybridées puis hybridées à nouveau avec l'échantillon d'ADNc d'intérêt marqué au ^{33}P. Cette deuxième hybridation est nommée 'hybridation cible complexe'. Afin de rendre les intensités indépendantes des quantités déposées, les valeurs obtenues lors de l'hybridation avec un échantillon sont corrigées pour chaque gène par la valeur de l'intensité vecteur correspondante (Mazurais *et coll.*, 2005).

II.C.2.d Hybridation vecteur

Les 96 ADNc d'intérêt sont insérés dans trois vecteurs plasmidiques différents : le pBK-CMV (Stratagene), le pBlueScript SK^+ (Stratagene) et le pCR2.1-TOPO (Invitrogen). Ces trois plasmides possèdent tous la séquence dite T7 (**5'**GTAATACGACTCACTATAGGGCGAA **3')**, qui peut être utilisée comme oligovecteur, permettant la normalisation entre les différents dépôts d'une membrane.

Un microgramme de cet oligonucléotide est marqué au ^{33}P en présence de T4 polynucléotide kinase (Invitrogen). L'oligonucléotide marqué est purifié sur colonne MicroSpin G25 (GE Healthcare) et la quantification de l'incorporation du ^{33}P est réalisée au compteur à scintillation (TRICARB 3171 TR/SL, Packard). Les membranes sont préhybridées pendant 4 heures à 42 °C dans un tampon 5X SSC, 5X Denhardt's, 0,5 % SDS, 100 µg/mL sperme de poisson dénaturé avant d'être hybridée sur la nuit par 5.10^6 cpm d'oligonucléotide T7 radioactif. Les membranes sont ensuite lavées dans un tampon 2X SSC, 0,1 % SDS, puis séchées et exposées contre un écran phosphore. Les membranes sont finalement deshybridées afin de permettre l'hybridation avec la cible complexe.

Les détails du protocole de l'hybridation vecteur sont donnés en annexe 2.

II.C.2.e Hybridation cible complexe

La cible compexe d'ADNc radioactive est obtenue comme suit :

Après élimination de la structure secondaire des ARN et saturation de leur queue polyA par l'oligonucléotide dT, les ADNc marqués sont synthétisés à partir de 10 µg d'ARN total par transcription inverse (Superscript RNase-H free, Invitrogen) pendant 2 heures à 42 °C en présence d' [α-^{33}P] dCTP. Les ARN sont ensuite éliminés par 30 min d'incubation à 68 °C après l'addition successive d' 1 µL de 10 % SDS, d' 1 µL 0,5 M EDTA et de 3 µL 3 M NAOH. La solution est ensuite neutralisée par ajout de 10 µL 1 M Tris-HCl et 3 µL 2 N HCl. La cible compexe obtenue est ensuite dénaturée 5 min à 100 °C et les séquences polyT sont saturées pendant 2H30 à 65 °C en présence de poly(dA80). L'intégralité de la cible ainsi obtenue est utilisée pour l'hybridation. Les membranes sont préhybridées (6 heures) et hybridées (24 heures) dans le même tampon que celui utilisé pour l'hybridation vecteur. Après exposition contre un écran phosphore pour acquérir les signaux, les membranes sont finalement deshybridées par 3 bains successifs d'1 heure à 80 °C dans le tampon 0,1X SSC, 0,1 % SDS.

Les détails du protocole de l'hybridation cible complexe sont donnés en annexe 3.

II.C.2.f Acquisition et analyse des données

Après exposition des membranes, les écrans phosphores sont scannés à l'aide du STORM 840 (Molecular Dynamics) à la résolution de 50 µm. Le signal d'hybridation est quantifié à l'aide du logiciel d'analyse de *macroarray* ArrayGauge (Fujifilm) et normalisé grâce au logiciel Excel (Microsoft). Les données sont transformées en logarithme afin de décrire une loi normale, puis centrées (médiane = 0) et réduites (variance = 0) afin de minimiser la variabilité technique. Les données ont été soumises à une analyse de variance ANOVA à l'aide du logiciel GeneAnova (Didier *et coll.*, 2002).

II.C.3 RT-PCR Quantitative

II.C.3.a Obtention d'ADNc pour les réactions de PCR Quantitative

Afin de ne pas biaiser les résultats de PCR Quantitative, il est nécessaire de s'assurer que les ARN utilisés pour synthétiser les ADNc ne sont pas contaminés par de l'ADN génomique.

L'ARN, précipité dans l'éthanol et conservé à -20 °C, est culoté par centrifugation (45 min à 10000 *g*), lavé par 100 µL d'éthanol à 80 %, puis recentrifugé à nouveau (30 min à 10000 *g*). Après élimination de l'éthanol, le culot d'ARN est séché sur glace avant d'être resolubilisé. La contamination par de l'ADN génomique est éliminée par un traitement à la DNAse I de Stratagene (10 min à 37 °C) (Figure 30). L'élimination de la DNAse nécessite un nouveau traitement au phénol/chloroforme. Un traitement direct de l'ARN par la DNAse avant la première étape de phénol/chlorophorme est inefficace, la DNAse étant sensible à des contaminants protéiques non encore éliminés.

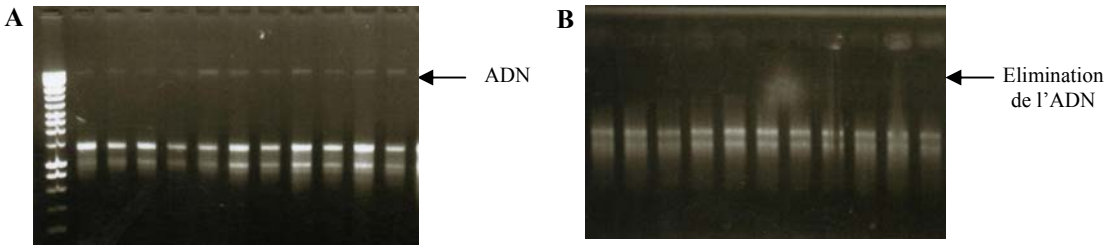


Figure 30 : Intégrité et quantité des ARN extraits, élimination de la contamination ADN

Les ARN sont soumis à une migration électrophorétique sur gel d'agarose 1% .Les deux bandes majoritaires correspondent aux ARN ribosomaux 18S et 28S. La migration sur gel permet de visualiser l'intégrité et la quantité des ARN extraits et révèle la présence de contaminants ADN (A). Un traitement des échantillons d'ARN par une DNAse permet d'éliminer cette contamination (B).

L'ARN total est alors quantifié par deux dosages spectrophotométriques au Nanodrop ND 1000 (Labtech) et il est soumis à une électrophorèse sur gel d'agarose pour vérifier son intégrité (Figure 30). L'absence de contamination par l'ADN génomique est évaluée par PCR sur l'ARN total à l'aide des amorces spécifiques des gènes codant la protéine ribosomale L36 et l'actine (Figure 31).

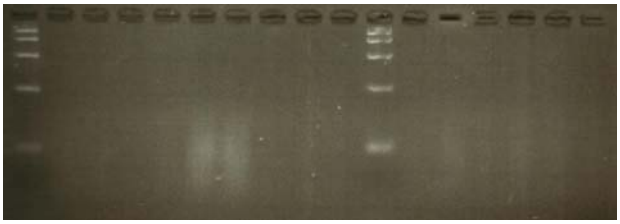


Figure 31 : Essai d'amplification par PCR de RPL36 sur les ARN

L'absence d'amplification confirme l'absence de contamination ADN dans les échantillons d'ARN.

L'ARN total (400 ng) est rétrotranscrit en ADNc par la transcriptase inverse Improm II de Promega dans 40 µL, et est ensuite dilué à 1 ng/µL. Les détails du protocole de transcription inverse utilisé pour générer les ADNc destinés aux expériences de PCR Quantitative sont décrits en annexe 4.

II.C.3.b Technologie de PCR Quantitative

Les expériences de PCR Quantitative concernant les plantules de culture ont été réalisées avec le système de détection GeneAmp 5700 (Applied Biosystem) en utilisant le Power SYBR Green master kit (Applied Biosystem) selon les recommandations du fournisseur. Les expériences de PCR Quantitative concernant les plantules sauvages et celles traitées aux inhibiteurs ont été réalisées avec le système de détection Chromo4 Real Time PCR (Biorad) en utilisant l'ABsolute Sybr Green ROX Mix (AbGene) selon les recommandations du fournisseur.

Les amorces spécifiques utilisées pour les réactions sont définies à l'aide du logiciel Primer Express 1.0 (Applied Biosystem), en recherchant des amplicons de longeur comprise entre 60 et 100 pb (Tableau 5). La qualité des amorces est vérifiée par PCR classique sur les ADNc et l'ADN génomique, afin de vérifier leur capacité à amplifier les séquences aux tailles attendues et l'absence d'amplification d'une zone intronique (dans le cas où la structure du gène n'est pas connue).

Par ailleurs, un couple d'amorces a été défini dans une zone intronique cu gène codant v-IPO3 afin de vérifier à nouveau l'absence de contamination par de l'ADN, ou dans quel cas, d'effectuer la correction nécessaire. Ce couple a montré qu'il ne subsistait aucune trace d'ADN dans les échantillons analysés.

Tableau 5 : Liste des amorces utilisées pour les expériences de PCR Quantitative

Gène	Amorce sens	Amorce anti-sens	Longueur amplicon
RPL36	ATCGCGGCTTGTGTCTCTTG	ACCGCACACCAACCCTTTC	76
Actine	GGATGTCGCGCACGATCT	ACCTGACGGACAACCTGATGA	87
Tubuline	TCGTGCAGTTGGGTTTCGA	CAAGACGCCATGCGATACG	62
BPO1	GCGAGGTTGAGGGCAAGAA	TCCTGCCGTAGAGCTCAAGAA	96
BPO3	TTCACGTTCAGTGTCGCATGA	GCGTCCCCTGATTGGTGTAG	87
IPO1	CGTTCATGGTCGTGGAAAGA	GCAAACGATAGCGTCATGCA	89
IPO3	AAGTATCAGTCAGGCTGGGGAG	GCCAACCTGCGTAACACGTT	107
THX1	TGACTGGCGTCGGGTTGT	TGACTGGCGTCGGGTTGT	72
THX2	TGTACGCTCAAGGCGAGCTT	TCCCCCGCTTCGTTCA	64
THX3	GGGGAGTTTGCAGATCCAGC	CCCGCTCTAGGCCGTGA	90
THX4	CTGCCAACAGTTTGCGACTTT	CCCCAGCTCACACCGAAA	71
G6PDH	CCGCGCAGTAGTGTGGAAT	GCTACGCTTTGCGGTTGAC	81
6PGDH-1	GGGGGGGGGGAGGTG	GTCTGACCTACATACCGACGAGAC	89
6PGDH-2	GCCGCGAACTGTGGTGTAC	GAAGATGGCGATGGCGTAA	81
Inconnu Bslde 3D04	CGAGGTACCGACGACCTGAT	GTAAAAGGAAAAAAACGTGGCAAA	85
Inconnu Bslde 3E08	TGGCTATGCTCGCAAATGG	GGCAGAACAGGTCGTGCTATC	93
Inconnu Bslde 3F09	TCATGTGGTGCTACTGTTGTGGTA	ACCCAAGCGCTCATTAATTTTC	88
M1PDH	TGGAGTCAAGTACTCCGACGTAATC	TGGAGTCAAGTACTCCGACGTAATC	65
SAMS	ACGCTCCCGTGCTTGAAAG	CCGTATCCTACCCCGAGGTT	80
HSP70	TGAAACGGTTGTGTCATTGGA	TTCGCGTGCCGAAAAAAT	98
Isopropylmalate deshydratase	AGCGTAGCGCCCAAGAGA	AGCGTAGCGCCCAAGAGA	82
Mercuric reductase	GGAACACCACGAAGAGGAAGAG	CCCCCGTTGTCCATCATATT	91

Après une étape de dénaturation de 10 min à 95 °C, les 40 cycles de PCR se décomposent en deux étapes : 15 s de dénaturation à 95 °C et 60 s d'hybridation-élongation à 60 °C. L'ADN génomique de *L. digitata* est utilisé comme matrice de référence pour générer une courbe de standardisation, par dilution sériée d'ADN génomique de concentration connue. Connaissant la masse du génome de sporophyte de *L. digitata* (1,4 pg) (Le Gall *et coll.*, 1993) et en considérant qu'il n'existe q'une copie de gène par génome, il est possible de déterminer le nombre de copies de gène, en équivalent génome, présent dans chaque dilution (Charrier *et coll.*, 2002) (Tableau 6).

Tableau 6 : Gamme étalon réalisée pour les expériences de PCR Quantitative

Quantité d'ADNg par puits	50 ng	12,5 ng	3,125 ng	0,78 ng	200 pg	50 pg	12,5 pg	3 pg
Nombre de copies simple brin (équivalent génome)	71427	17857	4469	1116	279	69	17	4

Les systèmes GeneAmp 5700 et Chromo4 mesurent la fluorescence émise et déterminent pour chaque gène étudié, d'après la droite étalon obtenue, le nombre de copies en équivalent génome dans les échantillons d'ADNc testés. La spécificité de l'hybridation des amorces est vérifiée en réalisant la courbe de dissociation en fin de PCR et l'efficacité de la réaction est calculée par la pente des droites étalons. Une réaction sans matrice est réalisée pour déterminer le bruit de fond et chaque échantillon est mesuré deux fois, les valeurs obtenues étant alors moyennées.

II.C.3.c Traitement des données de PCR Quantitative

Les données acquises par PCR Quantitative ont été analysées avec les logiciels GeneAmp 5700 SDS (Applied Biosystem) et Opticon monitor 3 (BioRad) pour les mesures réalisées respectivement avec le système GeneAmp et le système Chromo4.

Dans un premier temps, pour chaque échantillon, l'expression du gène d'intérêt est normalisée par l'expression des gènes codant la protéine ribosomale L36, l'actine, et la tubuline, représentants une gamme étendue de niveau d'expression basal (rapport r). Puis, dans un second temps, le rapport r des échantillons élicités est rapporté au rapport r de l'échantillon témoin correspondant (rapport R). Le changement du niveau d'expression des gènes est ainsi exprimé en n-fois par rapport au contrôle.

Compte tenu du faible nombre de répétitions (3), il est délicat de supposer que les données suivent une distribution normale à variance égale. Les données obtenues par PCR Quantitative ont donc été soumises à des tests statistiques non paramétriques : le test de Cramer non Mises permet de comparer la distribution globale des données représentant les échantillons témoins et élicités et le test de la médiane repose, comme son nom l'indique sur sur la comparaison de la tendance centrale des deux types d'échantillons. La différence d'expression des gènes entre algues témoins et élicitées a été interprétée au risque α de 5 %.

II.C.3.d Vérification des séquences amplifiées par PCR Quantitative

La pertinence et l'efficacité des amorces ont été vérifiées par trois paramètres : unicité du pic de dissociation, obtention d'un seul amplicon visible sur gel d'agarose après PCR et PCR Quantitative sur ADNc. Toutefois, afin de lever toute ambiguité, notamment sur les gènes appartenant à des familles multigéniques, comme ceux codant les halopreoxydases, les amplicons obtenus à la suite de la PCR Quantitative ont été séquencés.

Plusieurs stratégies ont été menées sans aucun résultat :

- Purification directe du produit de PCR Quantitative à l'aide du kit MultiScreen PCRμ96 (Millipore) ou purification après dépôt sur gel à l'aide du kit MinElute Gel Extraction (Quiagen), conçu pour purifier des produits d'un minimum de 70 pb : rendement extrêmement faible (300 à 400 ng) et impossibilté d'obtenir une réaction de séquençage correcte.
- Purification directe du produit de PCR Quantitative à l'aide du kit PCR CleanUp Gel Extraction Nucleotrap (Macherey Nalgen), conçu pour purifier des produits de 50 à 200 pb : rendement trop faible (< 200 ng) pour permettre une réaction de séquençage.
- Dilution du produit de PCR Quantitative, suivie d'une nouvelle PCR classique, avant purification sur gel avec le kit MinElute Gel Extraction (Quiagen). La dilution préliminaire et la nouvelle PCR devaient permettre d'une part de diminuer les contaminants de la réaction de PCR Quantitative et d'autre part d'augmenter la quantité de matrice. Malgré un rendement correct, aucune réaction de séquençage n'a pu être obtenue.

J'ai finalement opté pour la stratégie suivante qui a permis d'obtenir le séquençage des amplicons générés par PCR Quantitative pour chaque gène étudié :

1) Dilution au 1/100ième du produit de PCR Quantitative obtenu à partir de 12,5 ng d'ADN génomique, suivie d'une nouvelle PCR classique;

2) Purification sur gel avec le kit NucleoSpin II (Macherey Nalgen);

3) Ligation du produit purifié dans le pGEMT (Promega) et clonage dans la bactérie compétente JM109 High Efficiency (Promega);

4) Sélection de 3 clones pour chaque gène étudié et mise en culture des bactéries;

5) Purification des plasmides à l'aide du kit Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification system (Promega).

Les réactions de séquençage ont été réalisées deux fois dans les deux sens pour chacun des trois clones représentatifs des gènes étudiés par PCR Quantitative. Elles ont permis de confirmer définitivement l'exactitude des amplicons obtenus par rapport aux amplicons théoriques définis initialement.

RESULTATS
&
DISCUSSION

Chapitre I. Vers la construction en interne d'un filtre dédié stress

Au cours de la thèse de Vincent Roeder, la quantité de données transcriptomiques disponible chez *L. digitata* a largement été augmentée. Une banque de 1985 EST issue de protoplastes a été générée afin d'identifier des gènes impliqués dans la synthèse de la paroi cellulaire ainsi que des marqueurs moléculaires de la réponse au stress. En parallèle, une approche d'hybridation soustractive avait été initiée à partir d'ARN extraits de sporophytes élicités par les oligoguluronates à 3 et 6 heures afin d'identifier des gènes impliqués dans les réponses de défense.

Une collaboration avec un laboratoire du GSF (Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit) en Allemagne a permis d'acquérir en 2003 des ADNc *macroarrays* de *L. digitata*. Notre laboratoire disposait alors de la ressource transcriptomique nécessaire, mais ne possédait aucune expertise dans l'obtention et l'utilisation de cet outil. Il a donc fourni les clones d'ADNc nécessaires, 189 au total, sans participer à la fabrication des membranes. Dans le cadre de mon projet de thèse, la disponibilité de ces *macroarrays* pouvait apporter rapidement une contribution importante à l'analyse des régulations transcriptionnelles s'opérant au cours de la réponse aux oligoguluronates chez *L. digitata*.

Après m'être attachée à développer un protocole d'hybridation, j'ai pu constater que les supports que nous avions reçus n'étaient en aucun point utilisables. La collaboration mise en place ne permettant donc pas d'obtenir des ADNc *macroarrays* de qualité et dans des délais raisonnables, nous avons dû abandonner cette possibilité et nous tourner vers la construction d'un filtre en interne. L'absence de plateau technique rapidement disponible a orienté notre choix vers un filtre, certes plus restreint en raison du caractère manuel inévitable, mais correspondant tout de même à nos besoins, à savoir la recherche de gènes marqueurs de défense.

Dans ce premier chapitre, je décrirai brièvement les problèmes techniques rencontrés pour hybrider les *macroarrays*, comment j'en suis finalement arrivée à renoncer à leur

utilisation pour construire un filtre orienté stress et enfin j'émettrai quelques réflexions sur la qualité des deux supports utilisés.

I. Hybridation des *macroarrays*

I.A Mise au point d'un protocole d'hybridation

Le protocole d'hybridation utilisé par Desprez *et coll.*, (1998) a été choisi comme point de départ. Ce protocole consiste à obtenir en une seule étape à partir des ARNm, des ADNc simple brin marqués au ^{33}P. J'ai expérimenté plusieurs variantes de ce protocole en modifiant la stringence et la composition du tampon d'hybridation, la température d'hybridation, la quantité de sonde, la durée des lavages et la stringence des tampons de lavage. Bien que la sonde obtenue soit à priori suffisamment abondante et de bonne qualité, aucune hybridation n'a pu être menée à bien.

Afin de poursuivre la mise au point du protocole d'hybridation, sans endommager les membranes, les essais suivants ont été réalisés sur des dots de dilution d'ADNc de *L. digitata* et d'ADNc de NADPH oxydase de *Chondrus crispus*, considéré comme contrôle positif. Dans un premier temps, la synthèse d'ADNc a été découplée de l'obtention de la sonde, afin de valider cette première étape du protocole. Puis, des expériences ont été menées à froid, marquage à la fluoresceine, comme à chaud, au ^{32}P, afin d'identifier les meilleures conditions d'hybridation. Au final, le marquage au ^{32}P d'ADNc grâce au kit Megaprime Labelling (GE Healthcare) s'est avéré produire une sonde correcte. Les détails du protocole ainsi mis au point sont donnés en annexe 1.

I.B Expression différentielle : artefact ou réalité ?

Les ADNc ayant servis à l'hybridation des *macroarrays* proviennent d'ARN extraits de plantules de culture de *L. digitata*, suite à une cinétique d'élicitation par les oligoguluronates à 6, 12 et 24 heures. Les premiers résultats ont été très encourageants dans la mesure où des différences d'intensité étaient nettement visibles entre les conditions 'contrôle' et 'élicitée' (Figure 32).

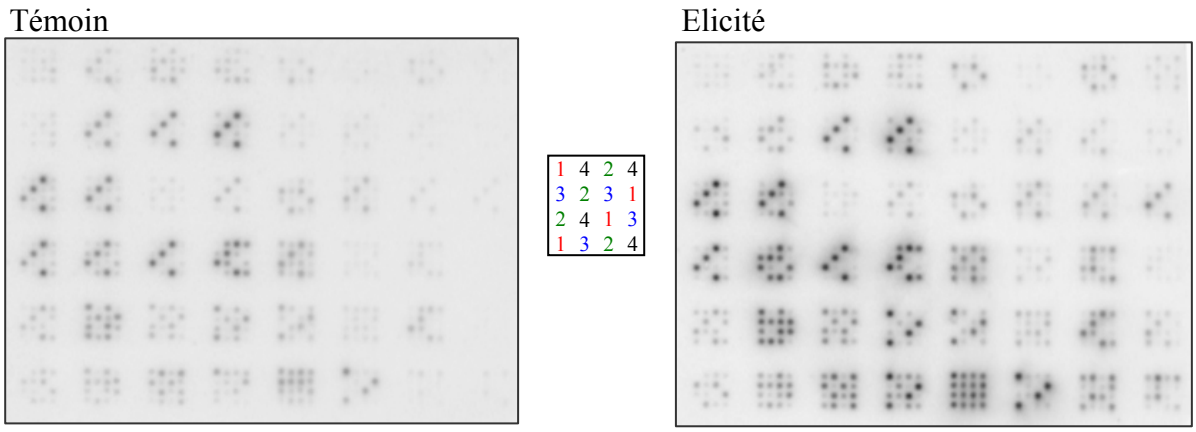


Figure 32 : Hybridation de *macroarrays* par des ADNc marqués

Les filtres ont été hybridés avec des cibles complexes marquées au ^{32}P correspondant à la condition témoin ou élicitée, 6 heures après élicitation par les oligoguluronates.
Chacun des 189 clones a été déposé 4 fois au sein d'un même bloc, selon le schéma figuré, ce qui est clairement visible sur les membranes hybridées.

J'ai dans un premier temps essayé de transposer l'utilisation d'un logiciel d'analyse de microarrays (GenePix® Pro 6.0, Molecular Devices) disponible au laboratoire à l'analyse des *macroarrays*. Ce logiciel s'est avéré inadapté à l'analyse des données de *macroarrays*, en raison tout d'abord du faible nombre de dépôts, mais essentiellement en raison des nombreux paramètres intervenant dans la quantification et le traitement des données de microarrays, qui n'existent pas avec la technique de *macroarrays*. Grâce à la formation dispensée par Infobiogene sur la technique de *macroarray* et les outils d'analyse de données transcriptomiques, j'ai modifié le protocole d'hybridation afin de mener des hybridations aux résultats plus fiables et d'entreprendre au mieux les analyses de ces résultats.

Le protocole employé au final pour réaliser rigoureusement à bien cette expérience sur le transcriptome de *L. digitata* correspond à celui développé par le TAGC, INSERM ERM 206 et décrit par Mazurais *et coll.,* (2005). Il est décrit dans son principe et succintement dans le chapitre 'Matériel & Méthodes' et plus en détail en annexes 2 et 3.

L'hybridation vecteur a montré d'importantes différences dans la qualité et la quantité des dépôts au sein d'une même membrane et entre les membranes. Une contamination des clones a également été mise en évidence, par l'absence de position "vide", c'est-à-dire ne contenant théoriquement aucun clone, comme indiqué par le schéma de dépôt. De plus, l'un des lots de membranes reçues présentait un réel défaut de conception, avec le non dépôt de plus de la moitié des clones, dû certainement à une erreur de programmation du *spotteur* (Figure 33).

Enfin, ce même lot a subi une erreur de découpage flagrante, en biais, éliminant une partie de la membrane. L'orientation des membranes s'est ainsi avérée délicate.

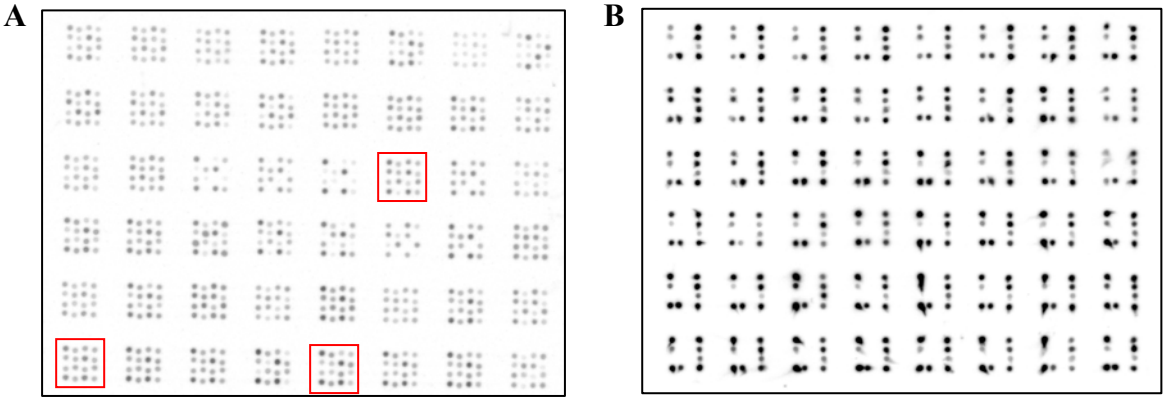


Figure 33 : Hybridation vecteur des *macroarrays*

Les filtres ont été hybridés avec l'oligonucléotide T7 marqué au ^{33}P. A et B représentent deux jeux distincts de membranes mis à notre disposition. En A, l'encadrement rouge représente les contaminations mises en évidence, 4 positions au sein de ces blocks devant être 'vide'. En B, une partie des clones n'a pas été déposée.

L'ensemble de toutes ces observations a donc montré sans ambiguïté que les membranes étaient inutilisables. L'expression différentielle observée pour certains gènes était complètement artéfactuelle et les résultats globalement ininterprétables.

II. Création d'un filtre orienté stress

Dans la mesure où j'avais d'ores et déjà mis au point au laboratoire la technique de *macroarrays* et acquis des compétences pour l'analyse bioinformatique des données, nous avons décidé de poursuivre les approches filtres en construisant notre propre support.

J'ai entrepris la sélection de 96 clones d'intérêt sur l'ensemble des banques EST de *L. digitata* disponibles au laboratoire. Ce nombre 96 correspond au format plaque, qui semblait le plus facile à manipuler et à mettre en place dans des conditions manuelles. Une place prépondérante a été accordée aux clones issus de la banque soustractive, dans la mesure où ils représentaient d'ores et déjà des gènes putatifs de défense. J'ai donc procédé dans un premier

temps à l'analyse complète de la banque soustractive, puis dans un second temps, j'ai recherché des gènes candidats dans les autres banques EST de *L. digitata* disponibles.

II.A Analyse de la banque soustractive

L'analyse de la banque soustractive, générée avant mon arrivée au laboratoire, n'avait pas été finalisée. Deux cent soixante douze clones avaient été obtenus et séquencés, à partir des ADNc soustraits et potentiellement spécifiques du sporophyte élicité. Une première approche de validation de la soustraction a été conduite par hybridation de dot représentant quelques clones selon les recommandations du kit PCR Select Differential Screening (Clontech). Il était donc nécessaire de valider l'expression différentielle, suite à l'élicitation, des gènes mis en avant par cette banque soustractive. Compte tenu du caractère manuel du filtre, il était impossible de déposer les 272 clones isolés. Cela m'a donc conduit à analyser finement les EST de la banque soustractive.

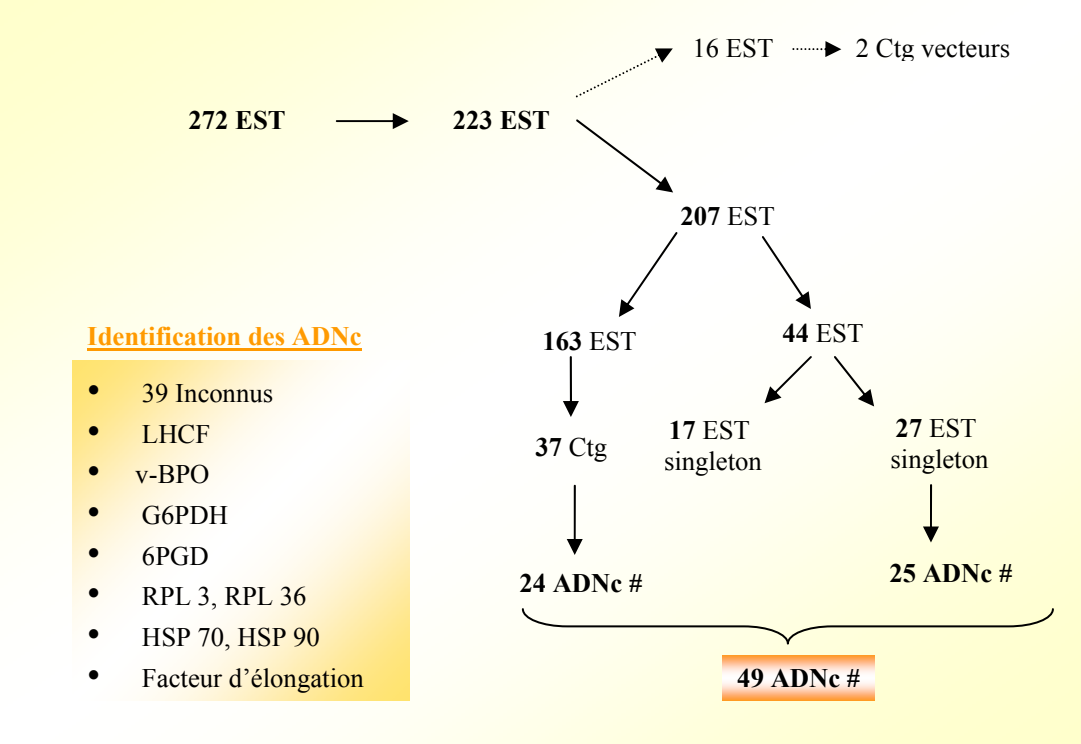


Figure 34 : Analyse des EST générées par la construction de la banque soustractive

272 clones issus de la banque d'ADNc soustractive de *L. digitata*, obtenue à partir de sporophytes élicités à 3 et 6 heures ont été séquencés. 223 séquences valides ont été générées et assemblées éventuellement en contigs, 49 ADNc différents ont été identifiés. Ctg, contigs, EST, Etiquettes de Séquence Transcrites.

Les 272 EST de la banque d'ADNc soustractive de *L. digitata*, obtenue à partir de sporophytes élicités à 3 et 6 heures ont été assemblées en contig à l'aide du logiciel Sequencher (Genes Code Corporation). Trente neuf contig, dont deux représentants du vecteur, et 44 singletons ont été déterminés. Les séquences ont été comparées à l'aide du programme BlastN aux données contenues dans les autres banques de *L. digitata* (protoplaste, sporophyte et gamétophyte). Quarante neuf ADNc différents ont ainsi été identifiés, puis comparés aux bases de données nucléotique et protéique de GeneBank à l'aide du programme BlastX (Figure 34). La description complète de l'annotation des 49 ADNc identifiés est donnée en annexe 5. Une fonction putative a pu ainsi être attribuée à 10 d'entre eux : *Light Harvesting Complex 6* (LHCF6), vanadium bromoperoxydase (v-BPO), glucose-6-phosphate deshydrogénase, 6 phosphogluconate deshydrogénase, *Heat shock Protein* 70 et 90, protéines ribosomales L3 et L36 et facteur d'élongation 1 alpha. Ces ADNc présentant une identité significative avec des protéines connues appartiennent aux catégories fonctionnelles Stress et Défense (3), Métabolisme (3), Synthèse protéique (3), Energie (1) et Inconnue (39) telles qu'elles ont été définies par le MIPS (Munich Information center for Protein Sequences, http://mips.gsf.de/proj/funcatDB/search_main_frame.html) pour *A. thaliana*.

Près de 61 % des ADNc identifiés dans cette banque soustractive sont représentés par moins de trois clones et les singletons sont abondants (Annexe 5). Cela démontre que la redondance des transcrits fortement exprimés a été correctement éliminée et que la banque est vraisemblablement représentative des différents produits de gènes de la condition étudiée. Ce résultat illustre en soit le bon déroulement de la technique SSH et lui confère une certaine validité technique. En effet, la méthode SSH est basée sur une PCR qui combine normalisation et soustraction en une seule étape, ce qui augmente l'accessibilité aux gènes faiblement abondants (Diatchenko *et coll.*, 1996). Elle présente donc l'avantage de détecter les gènes faiblement transcrits et différentiellement exprimés, tout en supprimant l'amplification des gènes abondants. Cependant, l'efficacité de cette soustraction nécessite la digestion des ADNc par une enzyme de restriction, qui génère de petits fragments, en moyenne 300 à 400 pb dans notre étude. La conséquence directe de cette longueur restreinte est la réduction de la quantité d'information de séquence disponible pour attribuer une fonction putative aux ADNc. Ainsi, les ADNc représentés par des clones uniques n'ont pas pu être annotés. La difficulté d'annoter les clones chez *L. digitata* est accentuée par le fait que les ADNc obtenus correspondent très majoritairement à la partie 3' non traduite du transcrit. En effet, chez *L. digitata*, ces régions 3'UTR sont très longues, souvent plus de 1000 pb, et peu

conservées (Moulin *et coll.*, 1999). L'identification de 10 ADNc n'a été possible que par l'existence dans les autres banques de *L. digitata* de séquences identiques plus longues, elles-mêmes étant présentes sous forme de contigs. Les ADNc identifiés se répartissent de manière égale entre les catégories fonctionnelles 'Stress et Défense', 'Métabolisme' et 'Synthèse protéique'. Cette distribution homogène n'est pas aberrante, dans la mesure où peu de gènes ont été identifiés. Les 39 ADNc 'inconnus' constituent des gènes de défense putatifs.

II.B Finalisation du filtre

L'ensemble de la ressource transcriptomique et génomique de *L. digitata* disponible au laboratoire a ensuite été exploré afin de déterminer des candidats intéressants pour compléter la membrane. Ce criblage *in silico* avec *a priori* s'est effectué selon trois critères: gènes d'intérêt déjà étudiés au laboratoire (haloperoxydases, C5 épimérases…), gènes de fonction connue en liaison avec les réponses de défense (GST, thiorédoxines…) et gènes de ménage (protéines ribosomales, actine, tubuline …). L'ensemble des 96 ADNc sélectionnés au final est décrits dans le tableau 7 par catégorie fonctionnelle.

Le schéma de la membrane a été complété par des contrôles positifs, plasmides non recombinants ayant servis à construire les différentes banques dont les clones sont issus, et négatifs, ADNc hétérologues ou eau (Figure 35).

La totalité des filtres générés a été soumis à une hybridation vecteur à l'aide de l'oligonuléotide T7, dont la séquence est présente sur l'ensemble des plasmides considérés. Cette hybridation a montré que la quantité, la qualité et l'homogénéité des dépôts étaient tout à fait correctes, avec une bonne reproductibilité entre les membranes (Figure 35).

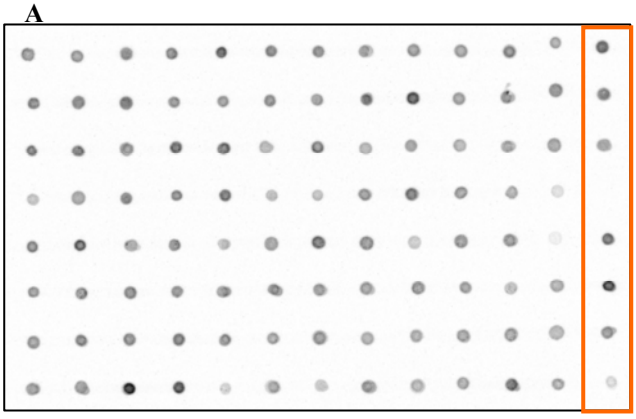
Tableau 7 : Sélection des 96 ADNc déposés sur le filtre dédié stress

Clones	N° accession	ADNc SSH	Meilleure e-value (Blast X)	N° accession de la séquence présentant la meilleure homologie	Source de la séquence	Identification putative
Energie						
Sest024	AW400526	-	6,E-49	CAB61332	*Laminaria digitata*	6 -phosphogluconate deshydrogénase 1
Pld 13C09	CN467500	6	6,E-43	AJ130772	*Laminaria digitata*	6-phosphogluconate dehydrogénase 2
Pld 1F10	CN466563	7		AJ130772	*Laminaria digitata*	6-phosphogluconate deshydrogénase 1
Pld 21B03	CN468174	-	3,E-15	AF360175	*Arabidopsis thaliana*	ATP synthase chaine delta
Pld 5B11	CN466843	16	8,E-56	AJ130773	*Laminaria digitata*	Glucose-6-phosphate 1-dehydrogénase
Pld 4E07	CN466780	-	1,E-51	AF226860	*Laminaria saccharina*	Light harvesting protein 4
Pld 4B07	CN466744	1	8,E-106	AF226862	*Laminaria saccharina*	Light harvesting protein 6
Sest185	AW400490	-	3,E-17	AAK21910	*Vaucheria litorea*	Phosphoribulokinase précurseur
Pld9B06	CN467138	-	2,E-67	X86783	*Haematococcus pluvialis*	Phytoene desaturase
Métabolisme						
Pld 12B04	CN467393	-	4,E-50	D10335	*Oryza sativa*	Adenylate kinase
Sest256	AW400670	-	4,E-11	BAA95609	*Octopus vulgaris*	Arginine kinase
S135	AJ496449	-	-	-	-	C5 épimérase E1
Pld 2A10	AJ496451	-	-	-	-	C5 épimérase E3
Pld 5B01	AJ496454	-	-	-	-	C5 épimérase E6
Pld 13G08	CN467545	-	3,E-07	BC007369	*Homo sapiens*	Guanylate kinase 1
Sest481	AW400894	-	4,E-21	ABH11014	*Polytomella parva*	Isopropylmalate deshydratase
Pld 14E07	CN467610	-	5,E-35	X79205	*Acanthamoeba castellanii*	L-méthionine S-Adénosyltransférase
Pld 2E01	CN466610	-	5,E-18	Z23023	*Solanum tuberosum*	Malate deshydrogénase
Pld 19H08	CN468073	-	4,E-19	AF055716	*Eimeria tenella*	Mannitol-1-phosphate deshydrogénase
Sest316	AW400732	-	7,E-23	CAA41636	*Chlorella sorokiniana*	NADP glutamate deshydrogénase
Pld 22C01	CN468270	-	1,E-24	U55019	*Saccharum officinarum*	Nucleoside-diphosphate kinase
Pld 19D03	CN468023	-	9,E-11	AJ249834	*Digitalis lanata*	Putative Acyl-CoA-binding protein
Pld 4C10	CN466759	-	8,E-10	AY096578	*Arabidopsis thaliana*	Pyrophosphate fructose 6 phosphotransférase
Sest330	AW400747	-	2,E-53	AAN31489	*Phytophthora infestans*	S-adénosyl méthionine synthétase
Pld 5F10	CN466889	-	2,E-06	AF144393	*Arabidopsis thaliana*	Thiorédoxine like 5
Pld 2G11	CN466640	-	1,E-34	AL161502	*Arabidopsis thaliana*	Thiorédoxine putative
Organisation cellulaire						
Pld 16H06	CN467804	-	1,E-89	X98885	*Fucus vesiculosus*	Actine beta
Pld 25A10	CN468422	-	5,E-35	Z98866	-	Histone H2A/H2B/H3/H4
Pld 3E10	CN466691	-	6,E-94	U58642	*Pelvetia fastigiata*	Tubuline alpha
Pld 20D03	CN468112	-	4,E-37	M79341	*Ectocarpus variabilis*	Tubuline beta

Clones	N° accession	ADNc SSH	Meilleure e-value (Blast X)	N° accession de la séquence présentant la meilleure homologie	Source de la séquence	Identification putative
Signalisation cellulaire						
Pld 11B10	CN467315	-	5,E-12	AL162459	*Arabidopsis thaliana*	Phospholipase like protein
Pld 15F03	CN467699	-	3,E-81	X53574	*Chlamydomonas reinhardtii*	Proteine G, sous unité beta
Pld 12F06	CN467441	-	9,E-44	U27299	*Arabidopsis thaliana*	Sérine/thréonine phosphatase type2A sous unité régulatrice
Transport cellulaire						
Pld 23C06	CN468352	-	1,E-18	AB075550	*Nicotiana tabacum*	Pleiotropic drug resistance ABC transporter PDR1
Pld 18E06	CN467950	-	3,E-14	U11583	*Saccharomyces cerevisiae*	Putative ABC transporter
Transcription						
Sest327	AW400744	-	7,E-36	XP_001024027	*Tetrahymena thermophila*	Arginyl tRNA synthétase
Sest280	AW400695	-	9,E-19	AAF94456	*Vibrio cholerae*	Asparaginyl-tRNA synthétase
Pld 14G06	CN467630	-	1,E-22	AF051234	*Picea mariana*	Facteur de transcription BTF3
Pld 16D10	CN467769	-	3,E-23	AL021730	*Schizosaccharomyces pombe*	RNA polymerase I, sous unité alpha
Synthèse protéique						
Pld 14F03	CN467617	8	1,E-76	AJ249839	*Phytophthora infestans*	Facteur d'élongation 1 alpha
Pld 22B07	CN468265	-	8,E-17	AF401569	*Ictalurus punctatus*	Protéine ribosomale L14
Pld 17B08	CN467830	30	6,E-12	AL162971	*Arabidopsis thaliana*	Protéine ribosomale L36
Stress et défense						
Pld 6G05	CN466957	-	5,E-26	AE006000	*Caulobacter crescentus*	AhpC/TSA family protein
Pld 12G09	CN467455	-	4,E-19	Y10613	*Ascaris suum*	Glutathion-S-transférase
Pld 5A07	CN466828	-	3,E-07	AF082570	*Platynota idaeusalis*	Glutathion-S-transférase
Pld 9A08	CN467128	-	6,E-18	AF082570	*Platynota idaeusalis*	Glutathion transférase
Pld 18B10	CN467921	9	3,E-29	AF005993	*Triticum aestivum*	Heat Shock Protein, HSP 70
Pld 2F07	CN466626	15	8,E-20	AF402101	*Achlya ambisexualis*	Heat Shock Protein, HSP 90
Pld 22E08	CN468294	-	3,E-30	AP003599	*Nostoc sp.*	Mercuric réductase
Pld 22D12	CN468288	-	4,E-24	AF162204	*Lactuca sativa*	Méthionine sulfoxide réductase
vBPO1	AJ491786	-	-	-	-	vBPO1
vBPO3	-	-	-	-	-	vBPO3
vBPO4	-	-	-	-	-	vBPO4
vBPO7	-	-	-	-	-	vBPO7
vIPO1	AJ619804	-	-	-	-	vIPO1
Non Classé						
Bslde 2A04	-	20	-	-	-	Inconnue
Bslde 2B06	-	25	-	-	-	Inconnue

Clones	N° accession	ADNc SSH	Meilleure e-value (Blast X)	N° accession de la séquence présentant la meilleure homologie	Source de la séquence	Identification putative
Bslde 2B11	-	21	-	-	-	Inconnue
Bslde 2C02	-	36	-	-	-	Inconnue
Bslde 2D03	-	10	-	-	-	Inconnue
Bslde 2E02	-	18	-	-	-	Inconnue
Bslde 2E05	-	14	-	-	-	Inconnue
Bslde 2F12	-	39	-	-	-	Inconnue
Bslde 2G03	-	38	-	-	-	Inconnue
Bslde 2G11	-	32	-	-	-	Inconnue
Bslde 2H02	-	40	-	-	-	Inconnue
Bslde 2H11	-	41	-	-	-	Inconnue
Bslde 3A07	-	19	-	-	-	Inconnue
Bslde 3C08	-	42	-	-	-	Inconnue
Bslde 3D04	-	43	-	-	-	Inconnue
Bslde 3D06	-	26	-	-	-	Inconnue
Bslde 3D10	-	44	-	-	-	Inconnue
Bslde 3E08	-	45	-	-	-	Inconnue
Bslde 3E12	-	33	-	-	-	Inconnue
Bslde 3F09	-	46	-	-	-	Inconnue
Bslde 3F10	-	23	-	-	-	Inconnue
Bslde 3H01	-	24	-	-	-	Inconnue
Bslde 3H04	-	47	-	-	-	Inconnue
Bslde 4A07	-	13	-	-	-	Inconnue
Bslde 4B06	-	31	-	-	-	Inconnue
Bslde 4C02	-	34	-	-	-	Inconnue
Bslde 4E03	-	48	-	-	-	Inconnue
Bslde 4F05	-	35	-	-	-	Inconnue
Bslde 4F09	-	49	-	-	-	Inconnue
Pld 15B12	CN467667	5	-	-	-	Inconnue
Pld 16A01	CN467727	-	1,E-08	AF188145	*Oxytricha nova*	Inconnue
Pld 21G06	CN468232	17	-	-	-	Inconnue
Pld 2B09	CN466593	29	-	-	-	Inconnue
Pld 2H01	CN466641	22	-	-	-	Inconnue
Pld 2H09	CN466644	-	-	-	-	Inconnue
Pld 3F05	CN466698	2	-	-	-	Inconnue
Pld 4E09	CN466782	4	-	-	-	Inconnue
Pld 7H05	CN467037	28	-	-	-	Inconnue
Pld 8D09	CN467083	27	-	-	-	Inconnue
Sest21	AW400523	-	-	-	-	Inconnue
Sest435	AW400851	-	-	-	-	Inconnue

A



B

- **Plasmides sans insert**
  - pBK-CMV
  - pBluescript
  - TOPO
- **Eau**
- **ADNc contrôle**

Clone	N° accession	Source	Identification
- cct 003C11	CO651470	*Chondrus cripus*	Phycoerythrine
- cct 009C01	CO651833	*Chondrus cripus*	Phycocyanine alpha phycocyanobiline lyase
- GcLox	-	*Gracilaria chilensis*	Lipoxygénase
- PfPka	-	*Plasmodium falciparum*	Protéine kinase A

Figure 35 : Hybridation vecteur des filtres "dédiés stress"

A. L'ensemble des filtres générés a été soumis à une hybridation vecteur avec l'oligonucléotide T7, marqué au ^{33}P. L'encadrement orange représente la ligne de contrôles positifs et négatifs.
B. Sélection des contrôles positifs et négatifs inclus dans le schéma du filtre dédié stress (du haut vers le bas).

II.C Réflexions sur la qualité des filtres générés

L'analyse des données *macroarrays* repose sur la comparaison de l'intensité des signaux après hybridation radioactive. Cette intensité du signal est directement liée à la quantité de matrice présente (source technique) et bien sûr au niveau d'expression de l'ADNc considéré (source biologique). L'hybridation vecteur qui permet d'accéder à la quantité des dépôts, mais aussi à leur qualité (forme, homogénéité, alignement), a démontré qu'il serait difficile d'utiliser en confiance les *macroarrays* disponibles. En effet, bien qu'un robot *spotteur* ait été utilisé, le biais lié au dépôt des plasmides était trop important. Par contre, malgré un dépôt manuel, le filtre "dédié stress" s'est avéré relativement homogène.

Cependant, ce dépôt manuel exige un travail long et minutieux, qui ne saurait être envisagé pour des plans expérimentaux plus développés, comprenant un grand nombre de conditions expérimentales (égal au nombre de filtres à préparer) ou un grand nombre de gènes (équivalent au nombre de dépôt à réaliser et augmentant la taille du filtre). Une dernière limite au dépôt manuel réside dans le fait qu'il a tendance à générer des dépôts annulaires, dits en forme de "*donuts* ". Il est en effet plus difficile de maîtriser systématiquement l'impact du cône sur la membrane que de régler les aiguilles du robot "spotteur".

Par ailleurs, il est très probable que la différence de qualité entre les deux filtres ne soit pas exclusivement due à la nature et la qualité du dépôt. En effet, un soin particulier a été apporté pour que la quantité déposée sur le filtre "dédié stress" soit identique (100 ng) pour tous les plasmides, ce qui n'a pas été le cas pour les *macroarrays*. Cette étape supplémentaire a permis d'éliminer une première source de biais purement technique. Les légères variations d'intensité résiduelles sont dues à la nature même des produits. En effet, les ADNc déposés proviennent de banques réalisées avec des plasmides différents, pBK, pBlueScript et TOPO, dont la taille varie entre 3,9 et 4,5 Kb. De plus, la longueur des inserts est très étendue, de 300 pb en moyenne pour les clones de la banque soustractive à plus de 2500 pb pour certains clones de la banque de protoplastes. La quantité déposée ne correspond donc pas à un nombre identique de copies pour tous les plasmides. Il ne faut cependant pas se formaliser d'une telle disparité, récurrente et intrinsèque à l'étape de transcription inverse nécessaire à la construction des banques. Ce biais est notamment corrigé par l'hybridation vecteur.

Un troisième point sur lequel il est nécessaire d'attirer l'attention est l'absence de contrôle dans le *design* de la *macroarray*. C'est un point supplémentaire à porter au discrédit de ces filtres. En effet, afin de valider l'hybridation, il est nécessaire de se référencer à des contrôles positifs, correspondant à des gènes surexprimés, dans les conditions données, ainsi qu'à des contrôles négatifs, correspondant à des gènes ne présentant aucune homologie avec des séquences de l'espèce étudiée. En ce sens, lors du *design* du filtre "dédié stress", des points de contrôle ont été ajoutés : les plasmides sans insert et l'eau servant à valider la qualité de l'hybridation, les ADNc hétérologues étant destinés à évaluer l'hybridation non spécifique. Aucun contrôle positif particulier n'a été déposé dans la mesure où de nombreux ADNc sélectionnés remplissaient déjà cette fonction.

L'ensemble des commentaires apportés sur la nature et la quantité des produits déposés montre à quel point l'hybridation vecteur des filtres est une étape cruciale nécessaire à la normalisation des données et à leur interprétation.

Chapitre II. *Macroarray* : un outil de profilage d'expression génique des réponses de défense

Afin de progresser dans la compréhension des événements moléculaires qui régulent les réponses de défense chez *L. digitata*, les techniques d'hybridation soustractive et de *macroarrays* ont été développées. Un filtre à échelle réduite, contenant 96 clones, a été construit à partir des clones issus de la banque soustractive, ainsi qu'à partir de clones sélectionnés avec a priori dans des banques de sporophytes et de protoplastes de *L. digitata*. Le profil d'expression des gènes candidats a été étudié à différents temps après élicitation par les oligoguluronates afin de discriminer les inductions précoces et d'observer les phénomènes de régulation.

Dans ce deuxième chapitre, je décrirai les différents aspects de la régulation du transcriptome observés suite à l'élicitation, j'insisterai sur les avantages d'une approche soustractive pour mener cette étude et j'essaierai de replacer les gènes identifiés dans le contexte des réponses de défense.

I. Une stratégie payante pour l'identification de gènes de défense

I.A Régulation transcriptionnelle de la réponse aux oligoguluronates mise en évidence par *macroarray*

Les plantules de culture de *L. digitata* ont été incubées en présence d'oligoguluronates pendant 6, 12 et 24 heures. La cinétique a été répliquée 3 fois. Les ARN totaux extraits ont servi à la préparation de cibles complexes d'ADNc pour l'analyse de *macroarrays* (Figure 36).

L'intensité du signal pour chaque ADNc a été quantifiée, corrigée, normalisée et transformée comme décrit dans le chapitre " Matériels & Méthodes ".

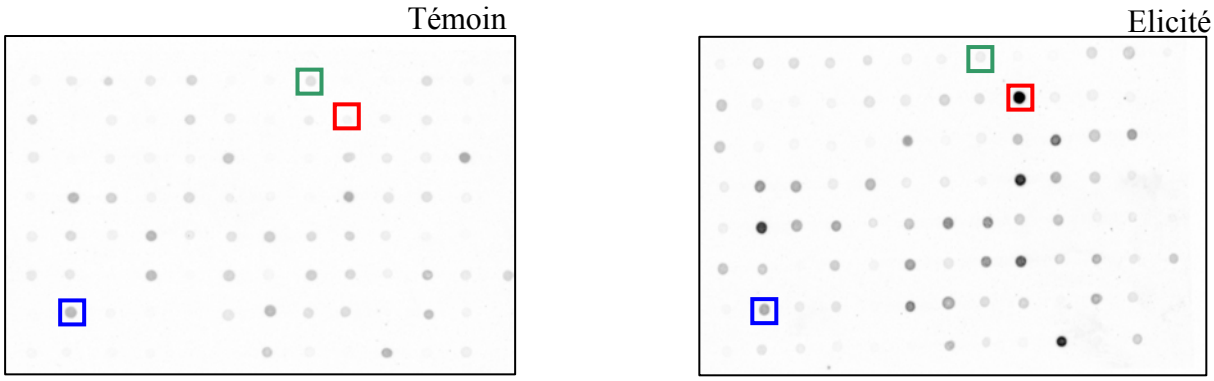


Figure 36 : Hybridation de *macroarrays*

Quatre-vingt-seize ADNc ont été sélectionnés et déposés sur membrane de nylon. Les filtres ont été hybridés avec des cibles complexes marquées au ^{33}P correspondant à la condition témoin ou élicitée, 6 heures, 12 heures ou 24 heures après élicitation par les oligoguluronates. La figure illustre un des résultats obtenus à 6 heures pour un des réplicats biologiques. Les encadrements rouge, vert et bleu marquent des exemples de gènes respectivement surexprimé, réprimé, et constant.

En raison du faible nombre de gènes considérés, les outils classiques d'analyse transcriptomique n'ont pas pu être mis en œuvre. La procédure d'ANOVA, avec une P value de 0,05 et de 0,1, a été appliquée à l'ensemble du jeu de données ou sur chaque temps de cinétique pris indépendamment. Les résultats générés par cette approche statistique se sont avérés limités. Afin d'identifier les gènes régulés par les oligoguluronates, les profils d'expression ont donc été analysés gène par gène. La moyenne du triplicat biologique a été calculée. Seuls les gènes présentant une variation d'expression d'un facteur 2, calculée par le ratio élicité/témoin, ont été considérés comme présentant un changement significatif, à la condition que le profil d'expression soit similaire pour au moins 2 réplicats sur 3.

Selon le point de cinétique considéré, de 34 à 51 % des gènes étudiés ne présentent pas de profil d'expression similaire sur les réplicats. Il est impossible de déterminer si leur expression est affectée par les oligoguluronates. Cette variabilité peut expliquer partiellement les limites de l'ANOVA. Considérant l'ensemble des points de cinétique, 67 gènes apparaissent régulés par les oligoguluronates, dont 44 strictement surexprimés et 15 réprimés. L'expression de 29 d'entre eux n'est pas affectée (Figure 37).

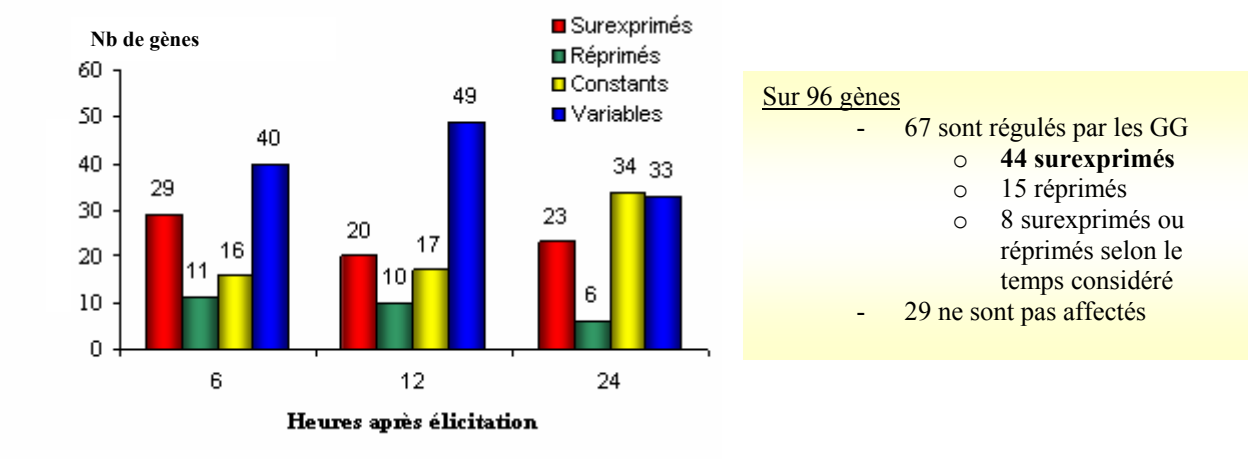


Figure 37 : Profil général d'expression des gènes observé au cours du temps en réponse aux oligoguluronates

Les changements transcriptionnels déclenchés par l'élicitation sont régulés rapidement comme en témoigne la diminution dans le temps du nombre de gènes affectés dans leur expression, concomitante à l'augmentation du nombre de gènes dont l'expression est constante. Le maximum de variations est d'ailleurs observé à 6 heures, c'est-à-dire au premier point de cinétique, avec 40 gènes dont l'expression est modifiée (Figure 37). Parmi eux, les gènes surexprimés sont majoritaires à 72 %. L'ensemble des gènes surexprimés, au nombre de 52, montre des profils d'expression différents, avec une induction transitoire pour certains ou s'inscrivant dans la durée pour d'autres (Figure 38).

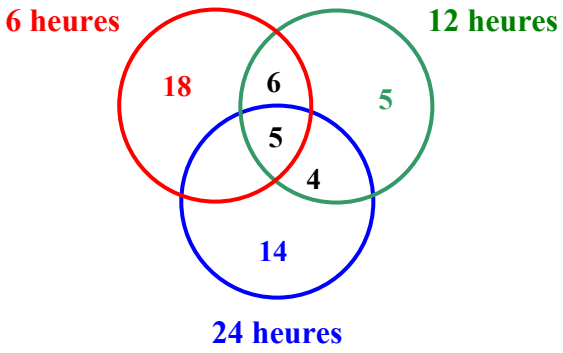


Figure 38 : Répartition au cours du temps des gènes surexprimés en réponse aux GG

Dix-huit gènes ne sont surexprimés qu'à 6 heures et 5 à 12 heures. Il est notable qu'un nombre important de gènes, 14, sont exclusivement induits à 24 heures. Enfin, 5 gènes apparaissent très fortement régulés par les oligoguluronates en étant surexprimés tout au long des 24 heures. Les profils d'expression de l'ensemble des gènes étudiés sont représentés dans le tableau 8 et classés par catégorie fonctionnelle. Ils sont regroupés par profils d'expression en annexe 6.

Les gènes surexprimés aux différents points de la cinétique correspondent à des kinases (CN467393, AW400670), des GST (CN467455, CN467128), une thiorédoxine (CN466889), des HSP (CN466626, CN467921), des acides aminés t-RNA synthétases (AW400695, AW400744), des 6-phosphogluconate deshydrogénases (AW400526, CN467500), une phospholipase (CN467315), un facteur de transcription (CN467630), une ATP synthase (CN468174), un *ABC transporter* (CN467950), une S-adénosyl-méthionine synthase (AW400747), une protéine de complexes pigmentaires photosynthétiques, *Light harvesting protein 4* (CN466780), une malate deshydrogénase (CN466610), une mercuric réductase (CN468294), une mannitol-1-phosphate deshydrogénase (CN468073), une C5 épimérase (AJ496454), une protéine putative se liant à l'acyl-CoA (CN468023) et la v-BPO3.

Tableau 8 : Expression de l'ensemble des gènes étudiés au cours de la cinétique d'élicitation par les oligoguluronates

Clones	N° accession	Identification putative	Heures après élicitation 6	12	24	
Energie						
Sest024	AW400526	6 -phosphogluconate deshydrogénase	8,3	2,0	1,6	
Pld 13C09	CN467500	6-phosphogluconate dehydrogénase	12,7	4,5	7,0	
Pld 1F10	CN466563	6-phosphogluconate deshydrogénase	1,4	5,6	1,6	
Pld 21B03	CN468174	*ATP synthase delta chain*	16,1	2,6	0,9	
Pld 5B11	CN466843	Glucose-6-phosphate 1-deshydrogénase	0,9	1,5	1,5	
Pld 4E07	CN466780	*Light harvesting protein 4*	1,9	4,1	8,9	
Pld 4B07	CN466744	*Light harvesting protein 6*	0,3	25,5	1,1	
Sest185	AW400490	*Phosphoribulokinase precursor*	0,9	0,8	1,0	
Pld9B06	CN467138	Phytoene desaturase	3,7	6,3	2,8	
Métabolisme						
Pld 12B04	CN467393	Adenylate kinase	27,1	4,4	1,1	
Sest256	AW400670	Arginine kinase	17,3	2,5	1,1	
S135	AJ496449	C5 épimérase E1	0,3	0,9	0,7	*
Pld 2A10	AJ496451	C5 épimérase E3	0,7	0,9	0,9	*
Pld 5B01	AJ496454	C5 epimérase E6	0,3	0,5	6,5	
Pld 13G08	CN467545	Guanylate kinase 1	1,5	20,2	0,4	
Sest481	AW400894	Isopropylmalate deshydratase	6,2	1,0	0,8	*
Pld 14E07	CN467610	L-méthionine S-Adenosyltransferase	564,8	0,5	0,7	
Pld 2E01	CN466610	Malate deshydrogénase	2,3	0,8	0,8	
Pld 19H08	CN468073	Mannitol-1-phosphate deshydrogénase	55,1	17,4	3,8	
Sest316	AW400732	NADP glutamate deshydrogénase	281,2	1,0	1,6	*
Pld 22C01	CN468270	Nucleoside-diphosphate kinase	0,5	1,1	1,4	
Pld 19D03	CN468023	*Putative Acyl-CoA-binding protein*	4,8	1,6	0,7	
Pld 4C10	CN466759	Pyrophosphate fructose 6 phosphotransferase	1,1	1,1	4,7	
Sest330	AW400747	S-adénosyl méthionine synthase	2,6	23,8	0,5	
Pld 5F10	CN466889	Thiorédoxine like 5	2,6	15,9	2,5	
Pld 2G11	CN466640	Thiorédoxine putative	1,5	0,9	1,4	*
Organisation cellulaire						
Pld 16H06	CN467804	Actine beta	1,1	3,3	1,3	
Pld 25A10	CN468422	Histone H2A/H2B/H3/H4	1,2	1,7	1,5	
Pld 3E10	CN466691	Tubuline alpha	7,5	0,8	0,6	*
Pld 20D03	CN468112	Tubuline beta	1,0	0,6	1,1	
Signalisation cellulaire						
Pld 11B10	CN467315	*Phospholipase like protein*	1,5	5,2	1,1	
Pld 15F03	CN467699	Protéine G, sous unité beta	1,4	1,0	1,1	*
Pld 12F06	CN467441	Sérine/thréonine phosphatase type2A sous unité régulatrice	2,0	4,6	0,8	
Transport cellulaire						
Pld 23C06	CN468352	*Pleiotropic drug resistance 1 ABC transporter*	75,7	0,5	3,9	*
Pld 18E06	CN467950	*Putative ABC transporter*	2,0	1,2	1,3	
Transcription						
Sest327	AW400744	Arginyl tRNA synthétase	8,3	5,2	1,1	
Sest280	AW400695	Asparaginyl-tRNA synthétase	4,9	4,1	0,7	
Pld 14G06	CN467630	Facteur de transcription BTF3	0,5	1,1	3,9	
Pld 16D10	CN467769	RNA polymerase I, sous unité alpha	1,2	1,2	0,7	
Synthèse protéique						
Pld 14F03	CN467617	Facteur d'élongation 1 alpha	0,9	0,3	1,5	
Pld 22B07	CN468265	Protéine ribosomale L14	0,2	0,7	11,7	
Pld 17B08	CN467830	Protéine ribosomale L36	0,8	1,2	0,9	
Stress et défense						

Pld 6G05	CN466957	*AhpC/TSA family protein*	0,7	0,4	0,8	*
Pld 12G09	CN467455	Glutathion-S-transférase	3,3	2,6	0,7	
Pld 5A07	CN466828	Glutathion-S-transférase	0,3	0,5	0,7	*
Pld 9A08	CN467128	Glutathion transférase	2,9	1,8	0,6	*
Pld 18B10	CN467921	*Heat Shock Protein, HSP 70*	0,9	0,6	6,3	*
Pld 2F07	CN466626	*Heat Shock Protein, HSP 90*	2,3	7,9	1,6	
Pld 22E08	CN468294	Mercuric réductase	3,0	3,3	3,4	*
Pld 22D12	CN468288	Méthionine sulfoxide réductase	0,9	3,0	3,0	
vBPO1	AJ491786	v-BPO1	1,0	1,3	1,7	
vBPO3	-	v-BPO3	4,1	5,6	3,6	
vBPO4	-	v-BPO4	0,6	0,9	1,2	
vBPO7	-	v-BPO7	1,1	2,0	1,0	
vIPO1	AJ619804	v-IPO1	0,8	0,7	2,1	
Non Classé						
Bslde 2A04	-	Inconnue	2,2	6,1	2,4	
Bslde 2B06	-	Inconnue	25,1	0,3	0,9	
Bslde 2B11	-	Inconnue	1,4	0,4	1,0	*
Bslde 2C02	-	Inconnue	3,7	1,2	1,1	*
Bslde 2D03	-	Inconnue	1,5	1,9	1,5	*
Bslde 2E02	-	Inconnue	8,2	1,0	0,6	
Bslde 2E05	-	Inconnue	0,4	0,9	1,9	
Bslde 2F12	-	Inconnue	0,1	2,0	11,4	*
Bslde 2G03	-	Inconnue	0,6	0,9	2,5	*
Bslde 2G11	-	Inconnue	1,2	1,2	2,5	*
Bslde 2H02	-	Inconnue	3,1	0,4	0,3	*
Bslde 2H11	-	Inconnue	3,6	1,4	55,6	*
Bslde 3A07	-	Inconnue	0,2	0,8	0,8	
Bslde 3C08	-	Inconnue	1,1	0,8	0,4	*
Bslde 3D04	-	Inconnue	5,4	6,0	22,5	*
Bslde 3D06	-	Inconnue	0,8	35,7	2,1	
Bslde 3D10	-	Inconnue	5,9	0,7	0,4	
Bslde 3E08	-	Inconnue	18,5	0,8	7,5	
Bslde 3E12	-	Inconnue	0,7	0,8	1,6	*
Bslde 3F09	-	Inconnue	3,4	21,4	1,1	*
Bslde 3F10	-	Inconnue	0,8	7,0	5,4	*
Bslde 3H01	-	Inconnue	1,0	24,1	1,0	
Bslde 3H04	-	Inconnue	2,2	3,0	1,1	
Bslde 4A07	-	Inconnue	1,5	1,0	1,2	
Bslde 4B06	-	Inconnue	1,6	4,9	4,9	
Bslde 4C02	-	Inconnue	1,1	1,1	0,7	
Bslde 4E03	-	Inconnue	2,7	20,7	7,1	
Bslde 4F05	-	Inconnue	1,5	1,6	1,9	
Bslde 4F09	-	Inconnue	4,6	3,2	1,2	
Pld 15B12	CN467667	Inconnue	1,1	13,9	3,6	*
Pld 16A01	CN467727	Inconnue	1,8	14,9	2,5	
Pld 21G06	CN468232	Inconnue	6,3	4,3	2,0	
Pld 2B09	CN466593	Inconnue	0,5	0,2	0,4	*
Pld 2H01	CN466641	Inconnue	6,9	2,9	1,8	*
Pld 2H09	CN466644	Inconnue	1,3	2,6	12,2	
Pld 3F05	CN466698	Inconnue	1,6	0,9	0,7	
Pld 4E09	CN466782	Inconnue	1,4	1,7	8,2	
Pld 7H05	CN467037	Inconnue	2,6	56,3	1,3	
Pld 8D09	CN467083	Inconnue	17,0	0,8	0,5	*
Sest21	AW400523	Inconnue	1,1	1,5	2,2	*
Sest435	AW400851	Inconnue	8,2	0,5	0,4	

Le nom du clone, son numéro d'accession, sa fonction putative et son profil d'expression au cours de la cinétique d'élicitation sont indiqués. Les valeurs donnent le facteur d'induction correspondant à la moyenne de l'intensité relative stressée/témoin des triplicats biologiques. Les cellules en fond plein représentent les profils d'expression vérifiés pour au moins deux des réplicats biologiques, en rouge pour la surexpression, en vert pour la répression et en jaune pour le caractère stable. * indique si l'expression du gène considéré a été validée par ANOVA.

I.B Une régulation rapide et séquentielle du transcriptome : réponses précoces et tardives ?

La combinaison des approches SSH et *macroarrays* a permis d'identifier 44 gènes strictement surexprimés en réponse aux oligoguluronates. Tous points de cinétique confondus, ce sont 70 % des gènes étudiés qui sont régulés par l'éliciteur. En raison de la nature des clones constituants la membrane, choisis pour leur implication potentielle dans la réponse au stress, ce fort pourcentage de gènes surexprimés semble tout à fait correct.

L'étude de l'expression des gènes au cours d'une cinétique étendue sur 24 heures permet de mettre en évidence une régulation fine et rapide du transcriptome. En effet, le maximum de changements est observé 6 heures après élicitation et le nombre de gènes non affectés augmente dans les heures qui suivent. De nombreuses études transcriptomiques des réponses de défense montrent une régulation très rapide de l'induction et du niveau d'expression des gènes, où des changements importants sont observés dès la première heure suivant l'application de l'éliciteur (Chen *et coll.*, 2007, Suzuki *et coll.*, 2007). Par ailleurs, une majorité de gènes sont surexprimés de manière très ponctuelle, à 6 heures (kinases, AcylCOA binding protein), 12 heures (phospholipase, HSP 90) ou 24 heures (HSP 70), pour revenir à leur niveau d'expression de base, voire être réprimés au temps de cinétique suivant. On peut cependant s'interroger sur la pertinence du lien direct avec les réponses de défense des gènes induits tardivement, du fait de leur nombre important. La signification de telles différences dans les profils d'induction n'est pas évidente, mais peut être représentative de différentes voies de signalisation ou de fonctions diverses. Les gènes de défense impliqués dans la transduction du signal ou dans les réponses précoces de défense peuvent ainsi être discriminés des gènes de défense correspondant à des réponses plus tardives comme l'activation de voies métaboliques secondaires. Malheureusement, l'absence d'annotation, même putative, pour la majorité des gènes ne permet pas de dresser une cartographie des activations séquentielles observées et d'établir un parallèle avec les phénomènes observés chez les plantes supérieures. A l'inverse de ces inductions ponctuelles, certains gènes sont fortement induits tout au long de la cinétique, comme la mannitol-1-phosphate deshydrogénase ou l'inconnu 'Bslde3D04'. Ces gènes constituent des candidats particulièrement intéressants pour affiner l'analyse des réponses transcriptionnelles de la défense de *L. digitata*. Enfin, il est notable qu'aucun gène ne présente une induction biphasique sur la cinétique d'élicitation, c'est-à-dire avec une

induction ponctuelle à 6 et 24 heures, contrairement à ce qui a été observé par Susuki *et coll.,* (2007) chez des cellules de tabac en réponse à l'élicitation.

Dans cette étude visant à identifier les gènes impliqués dans les réponses de défense chez *L. digitata*, la combinaison des approches SSH et ADNc *macroarrays* s'est avérée très efficace et pertinente dans la mesure où plus d'une quarantaine de gènes candidats ont été mis en évidence. Le couplage de ces deux techniques pour identifier rapidement des gènes différentiellement exprimés dans une condition donnée a effectivement fait ses preuves ces dernières années (Ji *et coll.*, 2003, Shi *et coll.*, 2005, Suzuki *et coll.*, 2007, Zheng *et coll.*, 2004). Les gènes identifiés peuvent alors servir de marqueurs moléculaires pour des approches plus fonctionnelles.

II. La banque soustractive, un premier pas vers la caractérisation du transcriptome de la défense

La construction d'une banque soustractive permet d'accéder à la représentation du transcriptome spécifique d'une condition donnée. La technique SSH a ainsi fait ses preuves ces dernières années en permettant de discriminer des séquences génome-spécifiques (Agron *et coll.*, 2002, Bogush *et coll.*, 1999), mais surtout en permettant d'identifier des gènes impliqués dans divers processus biologiques tels que le développement (Ji *et coll.*, 2003), la différenciation cellulaire (Le *et coll.*, 2005), la symbiose (Voiblet *et coll.*, 2001), la réponse à des stress abiotiques, tels que les stress salin, hydrique, métallique…(Wawrzynska *et coll.*, 2005, Zeng *et coll.*, 2006, Zheng *et coll.*, 2004). De nombreuses interactions hôte-pathogène ont également été étudiées au niveau moléculaire par des approches SSH (Beyer *et coll.*, 2001, Bittner-Eddy *et coll.*, 2003, Cramer *et coll.*, 2006, Degenhardt *et coll.*, 2005, Fernandez *et coll.*, 2004). Cependant, malgré la disponibilité de cet outil intéressant, très peu d'approches SSH ont été entreprises chez les macroalgues. Seules, la réponse à la dessiccation chez *Fucus vesiculosus* (Pearson *et coll.*, 2001) et l'alternance de générations sporophyte / gamétophyte chez *Porphyra purpurea* (Liu *et coll.*, 1994) ont été abordées par cette approche moléculaire. La banque soustractive construite au cours de la thèse de Vincent Roeder et

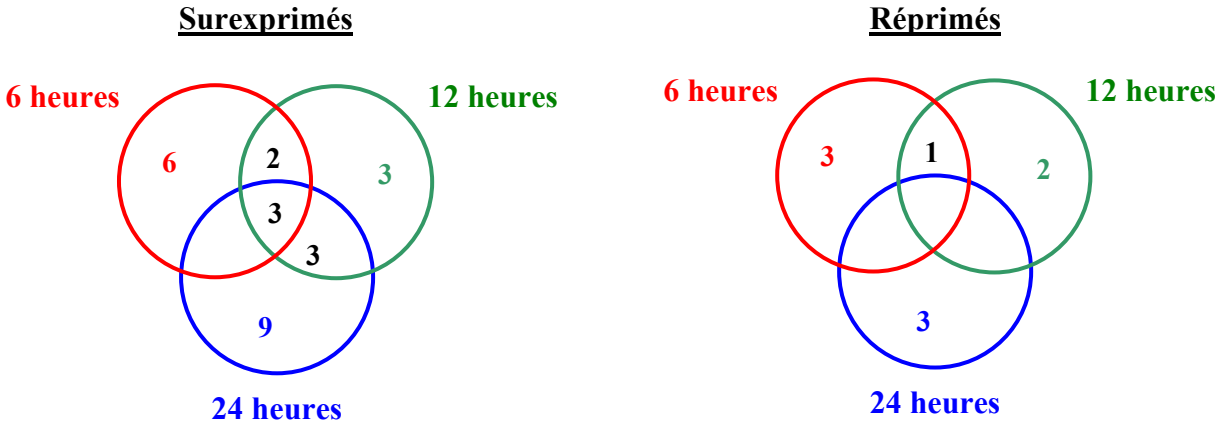
analysée au cours de ce travail constitue la première approche de ce genre menée chez une macroalgue dans le cadre d'étude sur les interactions hôte-pathogène.

II.A Expression des EST issues de la banque soustractive analysée par *macroarray*

La quasi-totalité des ADNc identifiés dans la banque soustractive, 46 sur 49, a été représentée par un clone sur la membrane. Seuls les ADNc notés 11, 12 et 37 n'ont pas été pris en compte. Le premier correspondait à un clone de la banque de protoplastes dont l'identité de séquence était erronée. Le second code une protéine ribosomale et n'a de ce fait pas été pris en compte. Aucun clone représentatif du dernier n'a pu être récupéré. Enfin, l'ADNc noté 3, correspondant à une v-BPO, est représenté par les clones de v-BPO 1, 3, 4 et 7 caractérisés au laboratoire.

L'analyse par *macroarrays* de l'expression des gènes clonés suite à l'approche SSH montre que 26 d'entre eux sont surexprimés (Tableau 8), ce qui représente 57 % de la banque soustractive. A l'exception de 4 d'entre eux, ces gènes codent pour des protéines de fonction inconnue (Annexe 6). Par ailleurs, 12 de ces profils d'expression sont validés par ANOVA, ce qui conforte la réalité de leur induction par les oligoguluronates. Neuf gènes sont réprimés tandis que les derniers présentent des profils d'expression constants ou variables entre les réplicats (Figure 39).

La répartition au cours du temps des gènes induits doit être également considérée. On en dénombre en effet seulement 11 induits dès 6 heures, alors qu'un nombre quasi similaire, 9, est induit tardivement à 24 heures (Figure 39). On note également que 3 des 5 gènes régulés positivement par les oligoguluronates tout au long de la cinétique proviennent de la banque soustractive.



	Surexprimés	Réprimés	Constants
Nb d'ADNc	26*	9	11
% banque SSH	57	20	23

* dont 12 validés par ANOVA, soit 24 % de la banque

Figure 39 : Validation de la banque soustractive, répartition des clones surexprimés et réprimés au cours du temps après analyse par *macroarray*

II.B Intérêt et validation de la banque soustractive

Cinquante-sept pour cent des gènes issus de l'approche SSH ont été validés par *macroarrays*. Ce résultat est tout à fait comparable aux données de la littérature sur d'autres banques SSH, où le pourcentage de gènes validés par d'autres approches, type *macroarray*, microarray ou PCR Quantitative, est compris entre 10 et 95 % et dépend principalement du matériel biologique (Desai *et coll.*, 2000, Die *et coll.*, 2007). Concernant les autres gènes issus de cette banque, qui apparaissent constants ou réprimés par l'approche *macroarray*, il est possible que des régulations très rapides ayant eu lieu avant 6 heures, n'aient pas été mises en évidence par la cinétique d'élicitation étudiée (6, 12 et 24 heures). Il pourrait s'agir de gènes induits très précocement avant trois heures. Les résultats obtenus en *macroarrays* montrent par ailleurs que les délais d'induction observés ne correspondent pas toujours à la cinétique d'élicitation pratiquée pour construire la banque soustractive. En effet, cette dernière a été générée à partir d'un pool d'ARNm extraits 3 et 6 heures après élicitation. Or, sur les 26 EST surexprimées, 15 le sont après 6 heures. Cette remarque souligne d'une part la forte variabilité biologique rencontrée et d'autre part met l'accent sur les précautions à prendre quant au classement des gènes dans des catégories séquentielles d'expression.

La technique d'hybridation soustractive a été développée dans le but de cloner les ADNc correspondant aux gènes surexprimés ou spécifiques à partir d'une population d'ARN donnée (Diatchenko *et coll.*, 1996). Appliquée à notre modèle d'étude, la SSH montre qu'elle permet également l'isolement de gènes sans aucune connaissance de leur séquence ou de leur identité. Ainsi, près de 80 % des ADNc isolés par SSH correspondent à des protéines inconnues et non conservées. Ce pourcentage très élevé réside essentiellement dans la faible quantité de données transcriptomiques disponibles chez *L. digitata* et plus généralement chez les macroalgues brunes. Cependant, même chez les plantes supérieures où les données moléculaires sont plus abondantes, les approches SSH conduisent également à l'identification de nouveaux transcrits (Le *et coll.*, 2005). C'est par exemple le cas dans les études menées chez le blé où 40 % des séquences surexprimées dans l'interaction avec l'agent pathogène *Fusarium graminearum* restent inconnues (Golkari *et coll.*, 2007). Ces transcrits représentent autant de nouveaux gènes de défense potentiels. Les approches SSH représentent donc un outil intéressant et efficace pour identifier de nouveaux gènes, en particulier chez les espèces phylogénétiquement éloignées des espèces modèles étudiées, pour lesquelles peu de données transcriptomiques et génomiques sont disponibles.

La construction des banques SSH a également l'intérêt d'augmenter le nombre d'ADNc pouvant être utilisés dans la construction d'ADNc *macroarrays*. Dans notre cas, elle a permis la construction d'un filtre orienté stress. A l'inverse, l'approche SSH peut constituer un outil intéressant pour diminuer le nombre de clones étudiés dans une approche plus globale, type microarrays, lorsque la quantité de données transcriptomiques est abondante (Golkari *et coll.*, 2007).

III. Identification par *macroarray* de voie de signalisation et d'activation de voie métabolique suite à l'élicitation

L'approche *macroarray* menée chez *L. digitata* a permis d'identifier 67 gènes surexprimés ou réprimés en réponse aux oligoguluronates. Près de la moitié d'entre eux correspondent à des protéines inconnues, ce qui limite la compréhension des événements moléculaires mis en place. Cependant, lorsqu'une fonction putative a pu leur être attribuée, il

apparaît que certains des gènes identifiés sont connus ou fortement soupçonnés de jouer un rôle dans les réponses de défense d'autres organismes, plantes ou animaux.

Les gènes surexprimés mis en évidence montrent que la transduction du signal passe par la libération potentielle d'acides gras (phospholipase), par le jeu de phosphorylations (kinases, ATP synthase) et l'induction de facteur de transcription (BTF3 like facteur de transcription). Les résultats montrent également la mise en place d'une régulation et/ou d'une augmentation de la synthèse protéique (acides aminés t-RNA synthétases), de processus de détoxication et de protection cellulaire (GST, thiorédoxines, HSP), et une activation de la voie des pentoses phosphates (6-phosphogluconate deshydrogénases). L'implication dans les mécanismes de défense de *L. digitata* de certains gènes surexprimés est discutée plus en avant dans les paragraphes suivants, en raison de leur forte implication dans l'activation de voies métaboliques ou dans des processus de défense. Il s'agit en particulier des gènes codant la S-adénosyl-méthionine synthétase, les GST, les ABC transporteurs, les HSP, et les LHCFs. Le rôle de la mannitol-1-phosphate deshydrogénase, de la v-BPO3 et de la voie des pentoses phosphates, qui correspondent également à des gènes fortement soulignés par ce travail, sont discutés plus en détails dans le chapitre 3, dans la mesure où l'expression de ces gènes a fait l'objet d'une étude plus approfondie.

III.A La S-adénosyl-méthionine synthétase

Une S-adénosyl-méthionine synthétase, SAMS, (AW400747), est induite à partir de 6 h et présente une forte surexpression à 12 heures. Ce gène est représenté par un second clone sur la membrane, CN467670, qui montre également une forte induction à 6 heures, bien qu'elle ne soit pas parfaitement reproductible. L'identification de la SAMS, comme gène de défense ou plus généralement de stress, n'est pas un cas isolé. En effet, chez les plantes supérieures, l'expression de la SAMS est augmentée par de nombreux facteurs environnementaux, tels que le stress salin (Espartero *et coll.*, 1994, Sánchez-Aguayo *et coll.*, 2004, Schröder *et coll.*, 1997) ainsi que par l'application d'éliciteur fongique (Kawalleck *et coll.*, 1992, Schröder *et coll.*, 1997). La SAMS est responsable de la synthèse de la S-adénosyl-méthionine, communément nommée AdoMet. Cette molécule est en quelque sorte le donneur universel de groupement méthyle dans de nombreuses réactions de transméthylation (Tabor et Tabor, 1984b). Par exemple, l'AdoMet est le substrat utilisé par les méthyltransférases dans les réactions de conjugaison du métabolisme de phase II, visant à

favorisé l'élimination des xénobiotiques. Chez les plantes supérieures, l'AdoMet est un précurseur de l'éthylène (Kende, 1993), des polyamines (Tabor et Tabor, 1984a) et elle est indispensable à la biosynthèse des phénylpropanoïdes (Higuchi, 1982). Dans l'état actuel des connaissances, il n'existe pas de preuves expérimentales de la participation de ces composés, éthylène (Broekaert *et coll.*, 2006), polyamines (Walters, 2003) ou phénylpropanoïdes (Dixon et Paiva, 1995, Dixon *et coll.*, 2002b) dans les réponses de défense des algues, alors qu'ils sont largement décrits chez les plantes supérieures. La SAMS constitue cependant un intéressant marqueur moléculaire de la défense à large spectre du fait de son implication dans de nombreuses voies métaboliques.

III.B Les glutathion-S-transférases

Les analyses en *macroarrays* montrent que 3 gènes, codant des glutathion-S-transférases *a priori* différentes, ne présentent pas le même profil d'expression en réponse à l'élicitation par les oligoguluronates. Les GST 54 (CN467455) et GST 8 (CN467128) sont toutes les deux surexprimées à 6 heures et retrouvent un niveau d'expression de base sur le reste de la cinétique, tandis que la GST 19 (CN466828) est continuellement réprimée au cours de 24 heures. L'induction de la GST 8 par les oligoguluronates, mais également de la GST 78, non présente sur le filtre, a été confirmée par Pierre Olivier de Franco, actuellement en thèse dans notre groupe (de Franco, 2005). Il montre que ces GST 8 et 78 de *L. digitata* sont induites par les oligoguluronates et par le cuivre, mais qu'elles sont inhibées par le MeJA et les hydroperoxydes d'acides gras. Elles affichent un profil d'expression opposé à celui observé pour les GST de *C. crispus*, qui sont inhibées par les métaux lourds, mais induites par les oxylipines (Gaquerel *et coll.*, 2007, Hervé, 2006, Hervé *et coll.*, non publié).

Les GST assurent la réaction de conjugaison du glutathion à de nombreux composés électrophiles et xénobiotiques, afin de faciliter leur élimination. Ce sont des enzymes du métabolisme de phase II très impliquées dans la détoxication des radicaux libres, des époxydes, des aromatiques hétérocycliques, des halogénés … Elles peuvent donc jouer un rôle majeur dans la réduction des dommages causés par l'infection. Chez les plantes, l'induction de GST a été montrée en réponse à l'acide salicylique (Sappl *et coll.*, 2004), à l'acide jasmonique (Wagner *et coll.*, 2002). Certains gènes de GST seraient spécifiquement induits lors d'un stress oxydatif (Dixon *et coll.*, 2002a).

III.C Les ABC transporteurs

Parmi les gènes fortement surexprimés à 6 heures (x 75), on note un gène codant un *ATP binding cassette* (ABC) transporteur putatif. Ces transporteurs représentent une famille extrêmement étendue de protéines qui assurent la translocation membranaire d'une très grande diversité structurale de molécules, aux rôles biologiques variés. Les ABC transporteurs ont été classés en plusieurs sous-familles dont l'une est dénommée PDR pour pleiotropic drug résistance. Plusieurs études ont suggéré ou démontré l'implication de cette famille d'ABC transporteurs dans la sécrétion de composés antimicrobiens par les plantes, ainsi que la surexpression des gènes les codant, au cours d'interactions hôte-pathogène compatibles et incompatibles (Sasabe *et coll.*, 2002, Stukkens *et coll.*, 2005). Le gène de l'ABC transporteur, représenté par le clone CN467950, qui est fortement surexprimé, n'a pu être classé dans la sous-famille PDR par manque d'information de séquences. Il n'est cependant pas exclu qu'il appartienne à cette famille de transporteur connue pour participer aux réponses de défense. Le second ABC transporteur, représenté par le clone CN468352, code un PDR, mais ne présente quant à lui aucune variation d'expression notable. Ces deux profils d'expression distincts illustrent la diversité des ABC transporteurs, qui doit également exister chez les algues, et l'implication, propre à chacun, dans des processus biologiques donnés. Par ailleurs, il est assez tentant de mettre en avant l'induction simultanée de gènes codant des GST et d'un gène codant un ABC transporteur. En effet les ABC transporteurs sont responsables très généralement du métabolisme de phase III, qui consiste en l'élimination des composés conjugués, notamment au glutathion, lors du métabolisme de phase II, dans lesquels les GST jouent un rôle important. La surexpression de ces deux types de gènes en réponse aux oligoguluronates est d'un point de vue biologique tout à fait pertinent.

III.D Les *Heat shock* Protéines

Le niveau des transcrits codant les HSP 90 et HSP 70 augmente fortement 12 et 24 heures après élicitation. Il a été montré que la synthèse de ces protéines est activée après de nombreux stress biotiques et abiotiques. Ces protéines chaperonnes participent activement au repliement des chaînes polypeptidiques, nouvellement synthétisées ou dénaturées et elles protègent les protéines des phénomènes d'agrégation. De plus les HSP 70 et 90 interagissent

avec des effecteurs impliqués dans la réponse au stress, dont les sérine/thréonine kinases, ce qui suggère leur participation active dans la transduction du signal (Wang *et coll.*, 2004). L'identification des transcrits codant les HSP 70 et 90 dans la réponse aux oligoguluronates chez *L. digitata* illustre ici l'intervention relativement ubiquiste de ces protéines dans la réponse au stress. Toutefois, certaines études tendent à montrer que les HSP 90 pourraient être impliquées dans les réponses de défense bien plus directement que par sa seule propriété de maintenir l'intégrité du pool protéique. En effet, des mutations dans les gènes d'HSP 90 chez *A. thaliana* entraîne une perte de la résistance à la maladie montrant que l'HSP 90 interagit directement avec des protéines impliquées dans la résistance (Lu *et coll.*, 2003, Takahashi *et coll.*, 2003).

III.E Les pigments photosynthétiques

Une induction nette du gène codant un *light harvesting complex* de type 4 (LHCF 4) est mise en évidence dans les 12 heures qui suivent l'élicitation. Les espèces activées de l'oxygène produites, si elles ne sont pas éliminées rapidement, peuvent entraîner la mort cellulaire, par peroxydation des lipides membranaires, oxydation des protéines et dénaturation des acides nucléiques. Elles peuvent donc avoir un effet délétère sur la chlorophylle et les autres pigments photosynthétiques. Suite à l'élicitation par les oligoguluronates induisant un *burst* oxydant, la nécessité de restaurer des complexes antennaires de pigments pourrait expliquer la surexpression du gène codant LHCF4 chez *L. digitata*. Cependant, la littérature fait plutôt état en général, au cours des interactions hôte-pathogène, d'une répression des gènes impliqués dans la photosynthèse (Rizhsky *et coll.*, 2002), avec deux raisons principales : le détournement de l'énergie attribuée au métabolisme basal pour l'alimentation des réponses de défense, et la diminution de la production de sources carbonées, que le pathogène pourrait utiliser.

III.F La répression des gènes du métabolisme basal ?

Il a été montré que les réponses de défense des plantes incluent également la répression de certains jeux de gènes. Par exemple, le niveau d'expression de la beta tubuline chez le soja (Ebel *et coll.*, 2001), de certaines histones, kinases et cyclines mitotiques chez le persil (Logemann *et coll.*, 1995) décroît lorsque les cellules sont traitées par des éliciteurs

fongiques. Il en va de même pour les MAP kinases et les cyclines chez les cellules de tabac (Suzuki *et coll.*, 2006). La plupart des gènes réprimés sont impliqués dans la division cellulaire ou dans la croissance des plantes. De plus, leur répression est concomitante à la surexpression des gènes de défense, ce qui indique une mobilisation des ressources vers une réorientation du métabolisme global afin de répondre à l'agression pathogène (Ebel *et coll.*, 2001).

Chez *L. digitata*, peu de gènes réprimés suite à l'élicitation par les oligoguluronates ont été identifiés. Une des raisons principales réside dans la nature même des ADNc sélectionnés pour réaliser la *macroarray*, qui ont été choisis pour leur potentielle implication dans les réponses de défenses. Les gènes de ménage codant la tubuline, les histones, l'actine, ou encore la protéine ribosomale L36 ont une expression relativement stable, contrairement aux études mentionnées chez certaines plantes supérieures. Il est tout de même remarquable de noter que les tubulines α et β identifiées chez *L. digitata* ne présentent pas le même profil d'expression. En effet, la tubuline α est surexprimée ponctuellement à 6 heures, tandis que l'expression de la tubuline β ne varie pas ou peu. Les plantes possèdent plusieurs isoformes de tubuline α et β et il a été proposé que chaque isotype pourrait avoir une fonction spécifique durant le développement de la plante (Giani et Breviario, 1996) ou en réponse à des stress environnementaux (Giani *et coll.*, 1998). Ebel *et coll.*, (2001) ont également montré que seule l'expression de la tubuline β1 est réprimée par l'oligoglucane issus de *Phytophtora sojae*, tandis que la tubuline β2 n'est pas affectée. L'identification de deux formes de tubuline d'expression distincte en réponse aux oligoguluronates chez *L. digitata* va dans le sens des hypothèses émises pour les plantes supérieures, à savoir une spécificité fonctionnelle de chaque isotype. Ebel *et coll.*, (2001) suggèrent également que le retour à un niveau d'expression basale des gènes de ménage, tels que la tubuline, indique que la cellule a d'ores et déjà activé ses réponses de défense et que les fonctions régulatrices des gènes de ménage reprennent. Chez *L. digitata*, seul le profil d'expression de la protéine ribosomale L14 (RPL 14) en réponse aux oligoguluronates pourrait aller dans le sens de la proposition d'Ebel *et coll.*, (2001). En effet, RPL 14 est réprimée dans les premières heures qui suivent l'élicitation, alors que son expression revient vers son niveau de base après 24 heures, avec peut être même une surexpression. La nette augmentation du nombre de gènes dont l'expression n'est pas affectée à 24 heures est également un argument en faveur de l'idée que *L. digitata* met en place ses réponses de défense en moins de 24 heures, avant de reprendre son métabolisme de base.

En raison de l'échelle relativement réduite avec laquelle cette approche transcriptomique a été menée, 96 ADNc, et du fort pourcentage de séquences inconnues considérées, plus de 40 %, il est difficile de mettre en évidence un réseau étendu de régulation et d'établir un schéma poussé des interconnexions possibles avec les réponses de défense. Toutefois, il est assez clair que le profil des gènes surexprimés en réponse aux oligoguluronates chez *L. digitata* présente une ressemblance certaine avec celui des gènes surexprimés en réponse à différents éliciteurs chez le tabac (Suzuki *et coll.*, 2007). De plus il a été récemment montré, chez *A. thaliana,* que la reconnaissance de PAMPs différents, passe par des voies de signalisation communes pour arriver à l'activation d'une voie de MAP kinases identique et induit globalement les mêmes changements transcriptionnels (Zipfel *et coll.*, 2006). Les résultats acquis, bien que très préliminaires, laissent envisager que la réponse transcriptionnelle précoce aux PAMPs, et plus généralement aux éliciteurs, pourrait être régulée par des mécanismes conservés chez les plantes supérieures et chez les algues.

La seule étude menée chez *L. digitata* sur les réponses de défense suite à l'élicitation par des PAMPs concerne des LPS et la régulation du transcriptome n'a pas été étudiée (Küpper *et coll.*, 2006). Cependant, les auteurs montrent que l'application de LPS induit un *burst* oxydant, impliquant très probablement une NADPH oxydase, ainsi que la libération rapide d'acides gras libres, accompagnée de l'accumulation de dérivés oxydés de l'acide linolénique et de l'acide eicosapentaenoique. Chez les animaux et chez les plantes, un *burst* d'oxyde nitrique est tenu pour jouer un rôle important dans la transduction du signal suite à la reconnaissance de LPS. Aucune production de NO n'a pu être détectée chez *L. digitata*. Bien que des différences dans les mécanismes de transduction puissent exister, cette étude montre une fois de plus la conservation des réponses de défense entre les mammifères, les plantes et les algues, avec la reconnaissance des PAMPs et la signalisation oxylipidique.

Chapitre III. Identification de marqueurs moléculaires des réponses de défense

A la suite des approches SSH et *macroarrays*, une cinquantaine de gènes ont été identifiés comme marqueurs moléculaires potentiellement intéressants des réponses de défense de *L. digitata*. D'une part afin de valider cette approche transcriptomique globale et d'autre part dans le but d'affiner la compréhension de la régulation du transcriptome suite à l'élicitation par les oligoguluronates, une vingtaine de gènes ont été sélectionnés, représentatifs de la diversité de profil d'expression observée par *macroarray*, et étudiés par PCR Quantitative.

La comparaison des réponses transcriptionnelles des algues sauvages, récoltées en mer et celles issues de culture de laboratoire a été initiée, ainsi qu'une première approche de la transduction du signal conduisant à l'activation de la transcription.

Dans ce troisième chapitre, je présenterai tout d'abord les résultats de PCR Quantitative qui ont servi à valider la stratégie d'identification des marqueurs moléculaires adoptée dans ce travail. Je montrerai ensuite qu'il existe un certain nombre d'arguments en faveur d'un phénomène de potentialisation chez les algues sauvages, favorisant la réactivité des plantules face à une agression pathogène. Je mettrai également l'accent sur l'implication dans les réponses de défense de certains gènes identifiés, présentant tous la particularité d'être liés au *burst* oxydant, à savoir, les gènes codant les haloperoxydases, les enzymes de la voie des pentoses phosphates, la mannitol-1-phosphate deshydrogénase et les thiorédoxines. Enfin, je développerai les arguments indiquant l'existence de plusieurs voies de signalisation intracellulaires conduisant à l'activation de la transcription des gènes de défense, entre autres l'hypothèse d'une médiation par le peroxyde d'hydrogène.

I. Validation de l'approche *macroarray* par PCR Quantitative

I.A Comparaison des résultats d'expression obtenue par *macroarray* et PCR Quantitative

Suite à l'approche *macroarrays*, 52 gènes surexprimés consécutivement à l'élicitation par les oligoguluronates ont été identifiés. Afin de valider cette approche transcriptomique globale, le profil d'expression de 12 d'entre eux, c'est-à-dire 20 % des gènes identifiés, a été suivi par une méthode plus fine et plus spécifique, la PCR Quantitative. Les 12 gènes ont été sélectionnés afin de représenter l'hétérogénéité des ADNc identifiés : surexpression continue ou ponctuelle, identification première du clone à partir de la banque soustractive, validation par ANOVA, fonction putative connue ou non, implication dans les mécanismes de défense, représentants d'une même famille multigénique ou encore ADNc codant la même fonction mais présentant des profils d'expression différents.

En faisant abstraction du facteur temps, l'analyse de l'expression de ces 12 gènes par PCR Quantitative montre que 10 d'entre eux sont effectivement surexprimés suite à l'élicitation par les oligoguluronates (Tableau 9). De ce point de vue, on peut considérer que moins de 20 % des gènes identifiés par *macroarrays* sont de faux positifs. Ceci représente un résultat tout à fait satisfaisant dans la mesure où le seuil considéré n'était que d'un facteur deux, donc relativement faible, et qu'aucune statistique n'a été appliquée pour sélectionner les gènes induits.

Cependant, un certain nombre d'observations tempère quelque peu ce résultat positif. Tout d'abord, la surexpression est parfois observée avec un décalage dans le temps, c'est le cas de 4 gènes sur 10. Par exemple, par *macroarray*, l'inconnu Bslde 3E08 est fortement surexprimé à 6 heures et potentiellement 24 heures, alors que l'analyse par PCR Quantitative montre une induction à 12 et 24 heures. C'est également le cas pour le gène codant l'isopropylmalate deshydratase qui est surexprimé à 6 heures en *macroarray* et à 24 heures en PCR Quantitative. Ensuite, les facteurs de surexpression ne sont pas toujours du même ordre de grandeur. Par exemple, les gènes codant la SAMS et la THX1 sont surexprimés à 12 heures d'un facteur 24 et 16 respectivement, alors qu'une induction d'un facteur 2 seulement est montrée par PCR Quantitative. Enfin, de manière surprenante, les 2 gènes identifiés comme les plus surexprimés et ce, sur l'ensemble de la cinétique, ne sont absolument pas validés par PCR Quantitative. Le profil du gène codant la M1PDH est parfaitement stable et

le gène codant l'inconnu Bslde 3D04 s'avère même être réprimé. Par ailleurs, afin d'étendre notre compréhension des régulations au sein de familles de gènes ou de voie métabolique, des analyses d'expression par PCR Quantitative ont également été menées sur 5 ADNc apparaissant non surexprimés par l'approche *macroarray*. La répression de la THX4 est validée, mais pour tous les autres gènes considérés, une surexpression ponctuelle est observée.

Tableau 9 : Validation par PCR Quantitative des gènes identifiés comme marqueurs de défense par l'approche *macroarrays*

Clone	N° accession	Identification putative	Expression en *macroarrays* Heures après élicitation			Expression en PCR-Q Heures après élicitation		
			6	12	24	6	12	24
Gènes identifiés à partir des résultats *macroarrays*								
Pld 19H08	CN468073	M1PDH	55,1	17,4	3,8	1,1	1,2	1,2
Pld 22E08	CN468294	Mercuric réductase	3,0	3,3	3,4	7,0	3,7	8,0
Bslde 3D04	-	Inconnue	5,4	6,0	22,5	0,3	0,4	0,3
Sest330	AW400747	SAMS	2,6	23,8	0,5	1,1	2,5	1,3
Sest481	AW400894	Isopropylmalate deshydratase	6,2	1,0	0,8	1,5	1,1	2,4
Bslde 3E08	-	Inconnue	18,5	0,8	7,5	1,1	2,2	2,8
Sest024	AW400526	6PGDH-1	8,3	2,0	1,6	11,3	5,2	3,7
Bslde 3F09	-	Inconnue	3,4	21,4	1,1	0,6	2,4	1,9
Pld 5F10	CN466889	Thiorédoxine like 5 (THX1)	2,6	15,9	2,5	8,4	2,4	2,3
Pld 13C09	CN467500	6PGDH-2	12,7	4,5	7,0	676,6	7,8	2,9
vBPO3	-	Bromoperoxydase 3	4,1	5,6	3,6	1,5	5,8	2,4
Pld 18B10	CN467921	HSP 70	0,9	0,6	6,3	3,8	2,4	9,1
Gènes sélectionnés pour leur fonction putative								
vBPO1	AJ491786	Bromoperoxydase 1	1,0	1,3	1,7	1,4	0,4	4,6
vIPO1	AJ619804	Iodoperoxydase 1	0,8	0,7	2,1	3,1	0,9	1,1
vIPO3	-	Iodoperoxydase 3	-	-	-	0,8	0,5	1,5
Pld 5B11	CN466843	G6PDH	0,9	1,5	1,5	1,0	1,5	3,0
Pld 2G11	CN466640	Thiorédoxine putative (THX2)	1,5	0,9	1,4	1,4	2,4	2,3
Pld 6B02	CN466926	DsbA Oxydoréductase (THX3)	-	-	-	1,3	1,7	1,9
Pld 6G05	CN466957	AhpC/TSA *family protein* (THX4)	0,7	0,4	0,8	0,4	0,5	0,9

Le tableau présente les profils d'expression obtenus avec chacune des deux méthodes. Le nom du clone, son numéro d'accession, sa fonction putative et son profil d'expression au cours de la cinétique d'élicitation sont indiqués. Pour l'approche *macroarrays*, les valeurs donnent le facteur d'induction correspondant à la moyenne de l'intensité relative stressée/témoin des triplicats biologiques. Les cellules en fond plein représentent les profils d'expression vérifiés pour au moins deux des réplicats biologiques, en rouge pour la surexpression, en vert pour la répression et en jaune pour le caractère stable. Pour la PCR-Q les valeurs représentent la moyenne de l'intensité relative stressée/témoin des triplicats biologiques après normalisation par l'actine. Les valeurs en couleur correspondent à une induction ou répression de facteur 2, telle que l'expression des gènes a été considérée par *macroarray*.

Au final, l'expression de 17 gènes d'intérêt révélés par l'approche *macroarray* a été étudiée par PCR Quantitative. Considérant le même seuil d'induction et ce quelque soit le temps de cinétique, 65 % des gènes examinés présentent le même profil d'expression. Ces résultats sont tout à fait similaires à certaines données de la littérature (Chen *et coll.*, 2007). Toutefois, la corrélation tenant compte du temps d'induction et du facteur d'induction est assez mauvaise par rapport aux résultats obtenus dans des approches comparables en microarrays (Pompe-Novak *et coll.*, 2006, Yang *et coll.*, 2007). Ainsi, en raison de toutes les réfutations décrites précédemment, les résultats obtenus par *macroarrays* doivent être considérés avec précaution et méritent d'être confirmés soit par des répétitions du plan d'expérience, soit par l'application de techniques plus fines.

I.B Biais intrinsèque aux deux méthodes

Bien que globalement concordantes, les techniques de *macroarray* et de PCR Quantitative appliquées à une même sélection de gènes ont aussi montré de nettes différences, avec des décalages dans le temps, des facteurs d'induction différents et parfois des profils d'expression opposés. Ces différences peuvent être générées en partie par des biais intrinsèques aux deux méthodes.

La différence d'expression observée pour certains gènes peut s'expliquer par le fait qu'ils appartiennent à une même famille de gènes, comme c'est le cas des haloperoxydases et des thiorédoxines. Cette hypothèse a déjà été avancée dans d'autres études pour expliquer l'absence de corrélation entre les résultats des deux méthodes sur des protéines ribosomales et des HSP (Collèn *et coll.*, 2006a). En effet, l'hybridation des ADNc par *macroarrays* est une technique bien moins stringente que la PCR Quantitative. La première peut ne pas être assez sélective pour discriminer des séquences relativement proches, au contraire de la seconde, qui est basée sur une amplification à partir d'oligonucléotides très spécifiques. Cette différence de principe des deux méthodes est en soit une explication aux variations observées. Par ailleurs, la valeur d'expression du gène obtenue par *macroarray* fait intervenir de nombreux paramètres, comme la quantité de matériel déposé sur le filtre, l'efficacité de l'hybridation, la qualité de la sonde radioactive, la qualité d'acquisition du signal… Ces paramètres n'existent pas dans la technique de PCR Quantitative ou peuvent être contrôlés et standardisés. Ils génèrent autant de biais qui peuvent engendrer une évaluation incorrecte de l'expression des gènes. Enfin, une des raisons majeures de la différence de résultats entre les deux techniques

peut résider dans la méthode de normalisation. Dans l'approche *macroarray*, la normalisation se fait à partir de l'intensité globale du signal de la membrane et les données sont centrées réduites. Elle nécessite également une correction par l'intensité du signal généré par l'hybridation vecteur. En PCR Quantitative, l'expression du gène d'intérêt est tout simplement rapportée à l'expression d'un gène dit de normalisation, dont l'expression est constante dans les conditions étudiées.

Cette description succincte des méthodes de normalisation des deux techniques illustre qu'elles peuvent être en partie responsables des variations d'expression obtenues par les deux approches méthodologiques.

I.C Biais liés au matériel biologique

Au delà des différences de principe et de normalisation des techniques de *macroarrays* et de PCR Quantitative, il est nécessaire de mentionner un critère propre au matériel biologique, qui pourrait constituer un facteur important, si ce n'est le principal, des différences d'expression observées.

Tout d'abord, la variabilité biologique au sein du même lot de plantules peut affecter l'intensité et le délai des réponses aux oligoguluronates. Alors qu'il s'agît du même lot de culture, les ARN utilisés pour mener les expériences de *macroarray* et de PCR Quantitative ne correspondent pas à la même extraction.

Ensuite, bien qu'aucune preuve concrète n'ait été obtenue, il semblerait que le procédé d'extraction des ARN de *L. digitata* entraîne des molécules inhibitrices des transcriptases inverses. Suite à des problèmes de niveau d'expression des gènes quantifiés par PCR Quantitative, les paramètres de transcription inverse ont été examinés. Il s'est avéré que la diminution de la quantité de matrice pour la transcription inverse augmentait très nettement la quantité d'ADNc obtenue. Ce résultat a été confirmé plusieurs fois et sur plusieurs gènes par PCR semi quantitative et PCR quantitative. De plus, plusieurs transcriptases inverses ont été testées et elles ont montré des efficacités variables, attribuées à leur sensibilité aux inhibiteurs potentiellement présents. Cette probable existence d'inhibiteurs de transcriptase inverse n'a été mise en évidence qu'après la mise en place de l'approche *macroarrays*. Or d'importantes quantités d'ARN, 10 µg, ont été utilisées pour obtenir les cibles complexes ADNc radioactives et la reverse transcriptase utilisée s'est montrée moins efficace que celle utilisée

pour la synthèse des ADNc destinés à la PCR Quantitative. De ce fait, il est parfaitement raisonnable d'émettre des suspicions quant à la représentativité et la quantité réelle de cible complexe utilisée pour réaliser les hybridations *macroarrays*.

Cette information a posteriori ne remet pas en cause les résultats obtenus, dans la mesure où les résultats de PCR Quantitative sont tout de même relativement concordants.

II. Algues cultivées versus algues sauvages : Phénomène de potentialisation

Les différentes études physiologiques et biochimiques menées au laboratoire sur *L. digitata*, notamment au cours de la thèse de F. Küpper, ont mis en évidence une très forte variabilité biologique des algues, y compris entre plantules récoltées sur le même site. Par ailleurs, malgré le conditionnement temporaire des algues récoltées avant la mise en place du plan expérimental, il n'en reste pas moins que les plantules peuvent avoir été soumises à de nombreux stress biotiques et abiotiques, avant leur récolte, qui peuvent avoir un effet sur les paramètres mesurés. Ainsi pour mener des approches de biologie moléculaire, il m'est paru essentiel de travailler sur des plantules obtenues et cultivées au laboratoire, afin de maîtriser parfaitement les conditions expérimentales et de pallier en partie la grande variabilité biologique intrinsèque aux plantules sauvages. De ce fait, l'approche *macroarrays* et sa validation par PCR Quantitative ont été menées sur des plantules de culture (Figure 40).

Afin de confirmer les premiers résultats obtenus et d'approfondir les voies de signalisation qui aboutissent à la régulation du transcriptome, une seconde série d'élicitation de plantules de *L. digitata* par les oligoguluronates, comprenant une approche pharmacologique, a été mise en place. Cependant, l'indisponibilité de ressource biologique de culture m'a contrainte a mené ces dernières expériences sur du matériel sauvage. Par ailleurs, les résultats de *macroarrays* ont montré que le transcriptome était abondamment régulé dans les 6 heures qui suivent l'élicitation et qu'il semblait revenir vers son état initial dès 24 heures. Effectivement, de nombreuses études montrent que les régulations transcriptionnelles au cours des interactions hôte-pathogène ou en réponse à des éliciteurs s'opèrent très rapidement, dès la première heure suivant le stress (Fahrendorf *et coll.*, 1995, Orozco-Cardenas *et coll.*, 2001, Suzuki *et coll.*, 2007). Bien qu'elle se soit avérée largement informative, la cinétique 6, 12, 24 heures définies pour étudier la réponse aux

oligoguluronates, n'était donc pas des plus adaptées. Pour l'ensemble de ces raisons, la deuxième série d'élicitation a été menée plus précocement, à 3, 6 et 12 heures (Figure 40).

La deuxième partie de mon travail de thèse a donc été menée sur des algues sauvages et a permis d'accéder à une information essentielle dans l'étude des interactions hôte-pathogène chez les algues, à savoir la très nette différence des réponses physiologiques et transcriptionnelles entre algues cultivées et récoltées.

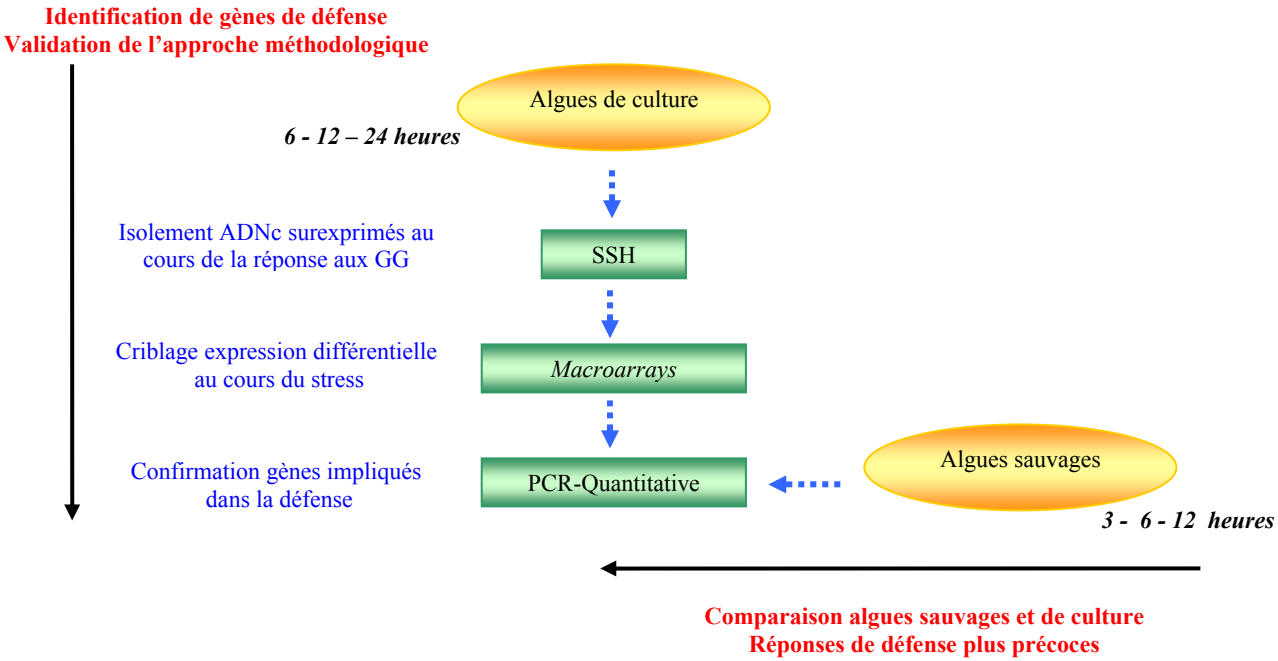


Figure 40 : Résumé de la démarche méthodologique mise en place pour identifier des marqueurs moléculaires de la défense chez *L. digitata*

II.A Comparaison du *burst* oxydant et des réponses transcriptionnelles

La régulation de la transcription suite à l'élicitation par les oligoguluronates a donc été comparée entre de jeunes plantules de *L. digitata* obtenues et cultivées au laboratoire et des plantules sauvages de même taille, récoltées en mer.

Pour ce faire, l'expression de 19 gènes sélectionnés suite à l'approche *macroarray* ou représentant des gènes d'intérêt a été étudiée par PCR Quantitative. Un seul gène, codant une DsbA oxydoréductase, nommée THX3 dans cette étude, n'est pas affecté par l'application de

l'éliciteur. Sur les 18 gènes restants, 8 sont surexprimés chez les deux sources d'algues, tandis que 4 sont induits uniquement chez les plantules sauvages, contre 6 chez celles de culture (Figure 41). Ce résultat indique d'une part que la régulation du transcriptome suite à l'élicitation est globalement conservée entre les deux types de plantules et d'autre part que l'induction des réponses de défense chez les algues de culture coincide avec la surexpression d'un plus grand nombre de gènes.

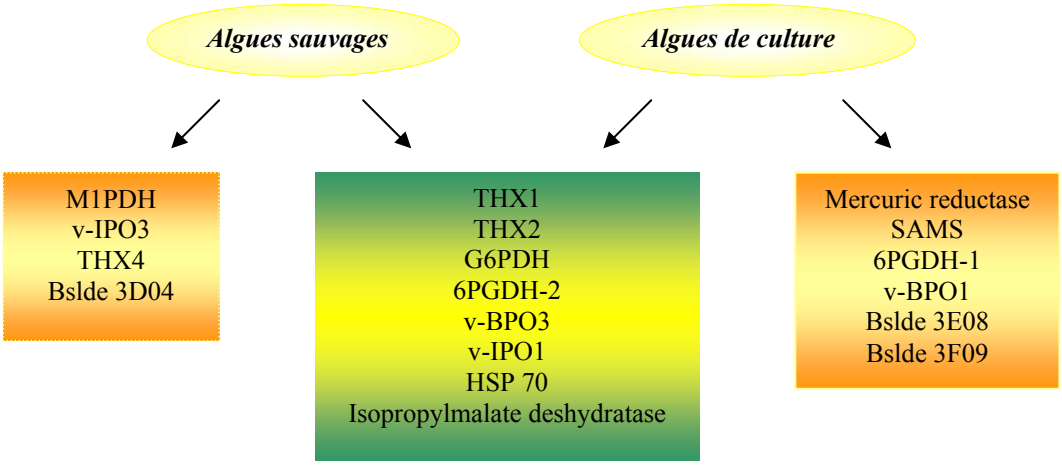


Figure 41 : Discrimination de gènes surexprimés suite à l'élicitation par les oligoguluronates, en fonction de la provenance des plantules (culture ou sauvage) avec un pool commun de gènes surexprimés

Bien que le point de cinétique à 3 heures n'ait pas été étudié chez les algues de culture, il semblerait que l'induction des gènes de défense soit plus rapide chez les algues sauvages. En effet, les régulations du transcriptome apparaissent dans les 6 heures qui suivent l'élicitation et aucun gène étudié n'est surexprimé à 12 heures. Au contraire, c'est à ce temps de cinétique qu'un maximum de gènes est surexprimé chez les algues de culture (Figure 42.A). De plus, chez les algues sauvages la surexpression des gènes est plus ponctuelle, avec seulement 3 gènes sur 12 exprimés à 3 et 6 heures. Au contraire, l'induction des gènes chez les algues de culture a tendance à s'inscrire dans la durée, avec par exemple 4 gènes surexprimés tout au long des 24 heures (Figure 42.B). De plus, près de la moitié des gènes surexprimés dans les deux sources d'algues montrent un facteur d'induction plus fort d'un

facteur 2 à 4 chez les plantules sauvages. C'est par exemple le cas de la THX1, de la G6PDH et de l'isopropylmalate deshydratase (Figure 43).

A)

Heures après élicitation	**3**	**6**	**12**	**24**
Algues sauvages	11	4	0	nd
Algues de culture	nd	6	10	9

B)

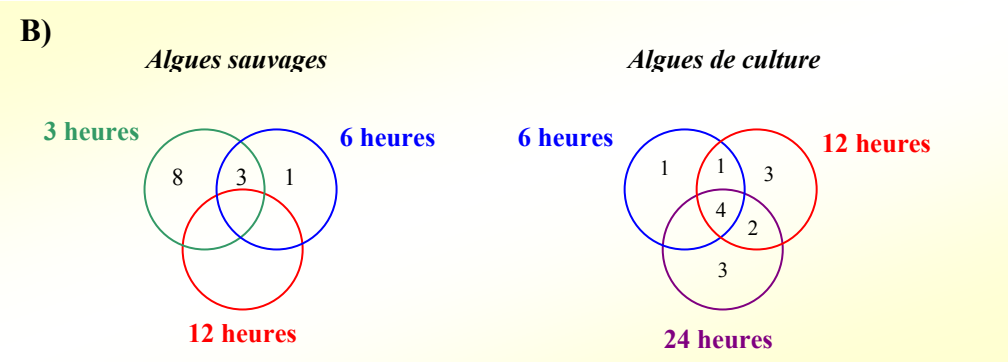


Figure 42 : Comparaison de l'induction de réponses transcriptionnelles aux oligoguluronates chez des plantules sauvages et de culture de *L. digitata*

A) Nombre de gènes surexprimés aux différents points de cinétique étudiés après élicitation. L'encadré indique le temps où le maximum de gènes est induit pour chaque type d'algues et met l'accent sur une induction plus rapide probable des gènes de défense chez les plantules sauvages.
B) Profils d'expression des gènes surexprimés. Les diagrammes illustrent une activation transitoire des gènes de défense chez les plantules sauvages en compraison d'induction s'inscrivant dans la durée chez les algues de culture.

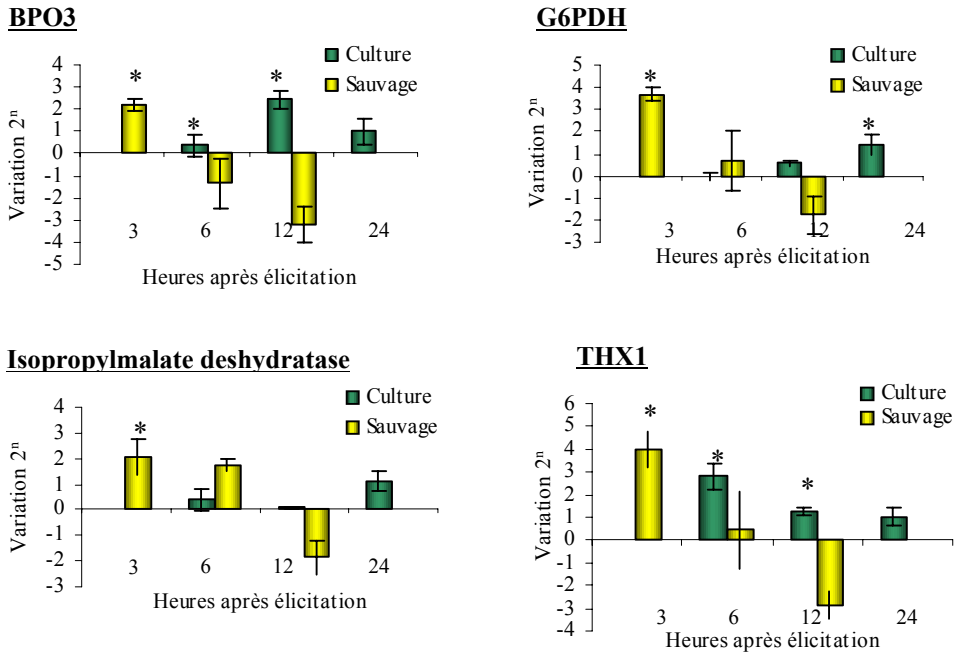


Figure 43 : Profil d'expression de certains transcripts surexprimés à la fois chez les algues sauvages et de culture étudiés par PCR Quantitative

La cinétique d'élicitation par les oligoguluronates est 3-6-12 heures pour les algues sauvages et 6-12-24 heures pour les algues de culture. Les valeurs représentent le log (base2) de la moyenne du triplicat biologique du ratio élicité/témoin après normalisation par l'actine. * Différence d'expression entre élicité et témoin validée statistiquement au risque α = 5 % par le test de la médiane et test de Cramer von Mises.

Un dernier élément de réponse d'ordre physiologique vient compléter les différences observées au niveau transcriptionnel entre plantules sauvages et plantules de culture. La mesure de l'émission du peroxyde d'hydrogène suite à l'élicitation par les oligoguluronates a été comparée chez les deux types de plantules (Figure 44). Il est clairement montré que l'amplitude et la cinétique du *burst* oxydant sont différentes. Les deux types de plantules produisent rapidement du H_2O_2 dans les minutes qui suivent l'application de l'éliciteur, mais le pic d'H_2O_2 est atteint dès 5 min chez les plantules sauvages, alors qu'il nécessite 45 minutes chez les plantules de culture. A ce pic plus tardif, la quantité d'H_2O_2 émise est presque 10 fois supérieure à celle émise par les algues sauvages. Enfin, les plantules sauvages ont complètement régulé cette production massive d'H_2O_2 en moins de 30 minutes, tandis que 3 heures plus tard, la concentration en H_2O_2 est toujours aussi élevée dans l'environnement des algues de culture.

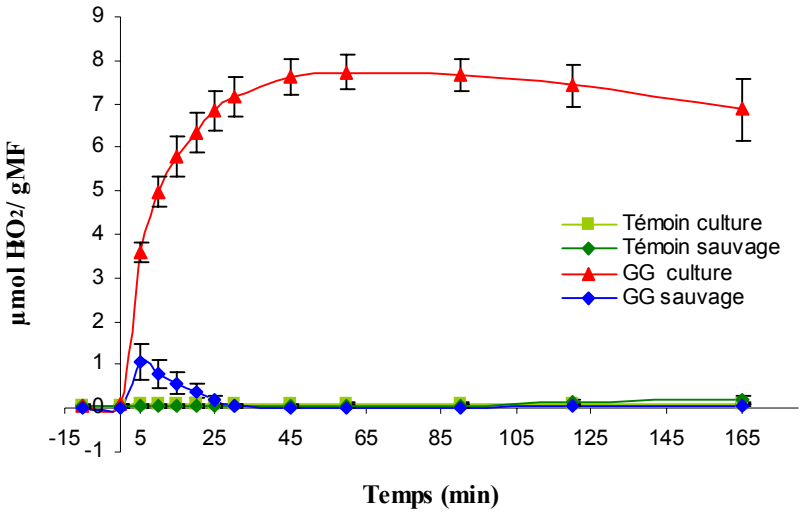


Figure 44 : Induction d'un *burst* oxydant différent chez les plantules de *L. digitata* sauvages et de culture suite à l'élicitation par les oligoguluronates (150 µg/mL)

II.B Phénomène de potentialisation

L'ensemble de ces résultats, physiologiques et transcriptomiques, montre que les plantules sauvages et de culture n'ont pas la même capacité à répondre au stress biotique mimé par l'élicitation par les oligoguluronates.

Au contraire des plantules de culture, qui semblent avoir des difficultés à faire face au stress oxydant, les plantules sauvages sont capables d'éliminer rapidement le peroxyde d'hydrogène émis au cours du *burst* oxydant. Le peroxyde d'hydrogène peut donc dans un premier temps jouer son rôle de messager et induire des cascades de signalisation cellulaire sans affecter l'intégrité cellulaire (Doke *et coll.*, 1996, Laloi *et coll.*, 2004b, Levine *et coll.*, 1994, Orozco-Cardenas *et coll.*, 2001). Les algues de culture se montrent quant à elles incapables d'activer les mécanismes de détoxication et le peroxyde d'hydrogène produit s'accumule à de fortes concentrations, devenant toxique pour l'algue. Au niveau transcriptionnel, les algues sauvages s'avèrent aussi avoir une réponse plus efficace que les algues de culture, dans la mesure où l'induction des gènes de défense est plus rapide et plus intense. Elle est aussi moins coûteuse en énergie, puisqu'elle pourrait nécessiter un moindre nombre de gènes et que les inductions sont de courtes durées. L'ensemble de ces observations

n'est pas sans rappeler un certain nombre d'aspects du phénomène de potentialisation décrit chez les plantes supérieures.

La potentialisation, correspondant à un état d'alerte, " *priming* " en anglais, décrit une augmentation de la résistance d'une plante à de nombreux agents pathogènes, qui est directement liée à l'augmentation de sa capacité à activer ses réponses de défense. L'état de potentialisation peut être induit par des agents nécrotiques et est alors dénommé Resistance Systémique Acquise, SAR en anglais. Il peut aussi être déterminé par colonisation racinaire de bactéries non pathogènes et dans ce cas, il est dénommé Résistance Sytémique Induite, ISR en anglais. L'état de potentialisation peut également être activé par l'exposition à de nombreuses molécules naturelles, comme l'acide salicylique, ou synthétiques, comme l'acide dichloroisonicotinique (INA) ou le benzothiadiazole (BTH), qui sont tous les deux des analogues de l'acide salicylique. Les réponses de défense qui sont activées incluent entre autres la réponse hypersensible, dite HR en anglais, le renforcement pariétal, le *burst* oxydant et l'expression de nombreux gènes de défense (Conrath *et coll.*, 2002) (Figure 45). L'état de potentialisation se traduit par une activation plus forte et/ou plus rapide des réponses de défense lors d'une deuxième confrontation avec un agent pathogène et non par la mise en place de nouvelles réponses (Conrath *et coll.*, 2006).

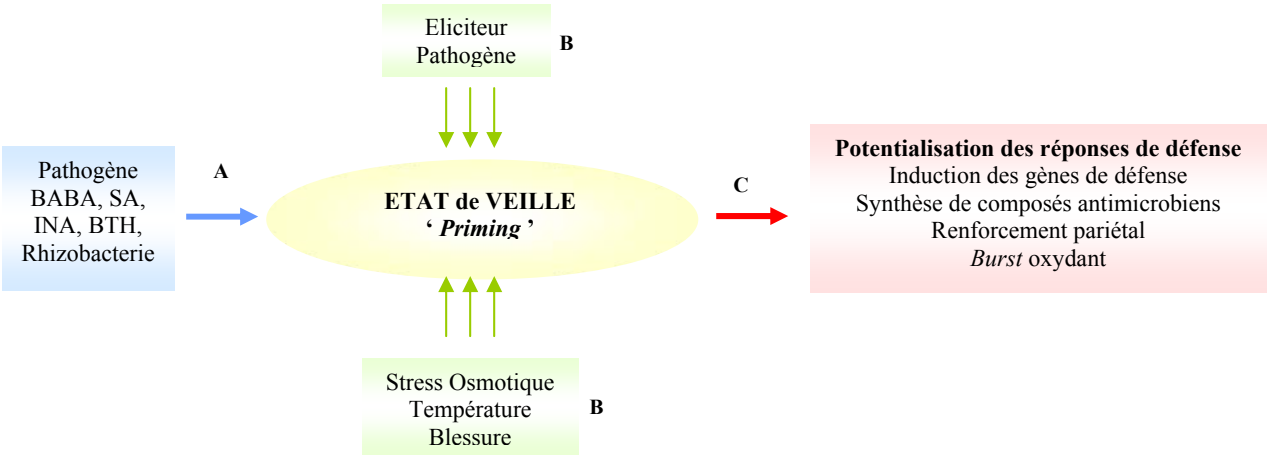


Figure 45 : Phénomène de potentialisation chez les plantes supérieures

Chez les plantes, le traitement avec l'acide salicylique (SA), l'acide β-aminobutyrique (BABA), l'acide dichloronicotinique (INA) ou le benzothiadiazole (BTH) prépare les cellules à réagir plus rapidement et plus efficacement à des agressions pathogènes ultérieures. Les cellules ainsi mise en état de veille sont également mieux protégées contre les stress abiotiques tels que le broutage ou les stress osmotique et thermique. A) Mise en état d'alerte, '*Priming*' B) Exposition secondaire à un stress biotique ou abiotique C) Potentialisation des réponses. Figure adaptée de Conrath *et coll.,* (2002).

Chez les plantules sauvages de *L. digitata*, on retrouve cette induction plus forte et plus rapide des réponses de défense, avec une augmentation de la capacité à gérer le *burst* oxydant et une régulation plus rapide et plus intense des gènes de défense identifiés. Par ailleurs, l'état de potentialisation chez les plantes supérieures fait état d'un renforcement pariétal, qui sert de barrière physique aux invasions pathogènes (Bradley *et coll.*, 1992). Bien que celui n'ait pas été quantifié, nous avons pu systématiquement constater que la paroi des algues de culture était beaucoup plus fine et plus facile à casser lors des étapes de broyage nécessaires à l'extraction des ARNs. L'ensemble de ces observations suggère fortement l'existence d'un état de potentialisation des algues sauvages par rapport aux algues de culture. L'existence de cette différence d'état entre les deux types d'algues, bien qu'il n'ait jamais été montré aussi clairement, n'a en fait rien de surprenant. Les algues sauvages sont récoltées au sein de populations naturelles soumises à la variation de nombreux facteurs abiotiques du fait de leur environnement marin (salinité, luminosité, immersion/émersion …). Elles sont également soumises à la pression d'agents pathogènes, de bactéries alginolytiques et de nombreux brouteurs. Ainsi, les plantules sauvages au contraire des plantules de culture sont continuellement confrontées à de nombreux stress biotiques et abiotiques. Elles ont dû acquérir une sorte d'état de potentialisation afin de mieux survivre dans un environnement, bien plus hostile que le milieu contrôlé des ballons de culture.

Toutefois, les plantules sauvages considérées dans cette étude sont de petite taille, relativement jeunes, non épiphytées et indemnes de blessures visibles. Elles ont été relativement moins soumises aux nombreux stress biotiques et abiotiques que leurs consœurs plus âgées, au pied desquelles elles ont été récoltées. Les plantes adultes émettent par ailleurs des quantités importantes de COHV qui pourraient être les acteurs de la signalisation conduisant à la mise en place d'un état d'alerte chez les plantules plus jeunes. Une telle communication chimique par des composés volatils est décrite chez les plantes.
Suite à une blessure ou à une agression par un herbivore, les plantes émettent des composés organiques volatils (COV). Certains ont un pouvoir attractant pour des prédateurs ou des parasites naturels de leur agresseur et permettent ainsi à la plante de s'en débarrasser (Pare et Tumlinson, 1999). D'autres ont le rôle d'alerter les plantes voisines et d'augmenter leur résistance à une éventuelle agression (Baldwin et Schultz, 1983). Certaines études montrent que la résistance à la maladie induite par les COV entre plantes voisines est réalisée via un phénomène de *priming*. Par exemple, chez le maïs, l'état de potentialisation induit par les COV se traduit par une augmentation de l'expression des gènes de défense corrélée à une

diminution de l'appétence pour la chenille et par une production accrue de terpènes et aromatiques volatils corrélée à l'attractivité du parasite de la chenille (Engelberth *et coll.*, 2004).

La comparaison plantules de culture-plantules sauvages a montré de nettes différences dans la mise en place du *burst* oxydant et dans la régulation du transcriptome suite à l'élicitation. Un phénomène de potentialisation des réponses de défense pourrait exister chez les plantules sauvages et les COV, dont une grande quantité de composés halogénés, pourraient être les acteurs de la communication chimique assurant cette mise en état d'alerte. L'avantage d'utiliser des plantules de culture afin de maîtriser au mieux l'état physiologique des algues, de minimiser l'influence des facteurs extérieurs et de standardiser les expériences, a vu son intérêt quelque peu réduit. Dans l'objectif d'étudier les interactions hôte-pathogène dans un contexte écologique ou physiologique, il sera préférable à l'avenir de travailler avec des plantules sauvage récoltées dans des populations naturelles.

III. Ce qu'indique la régulation des gènes sur les voies métaboliques impliquées dans les réponses de défense

A la suite des approches SSH et *macroarray*, 12 gènes candidats ont été sélectionnés comme marqueurs potentiels des réponses de défense en raison de leur surexpression en réponses aux oligoguluronates. Bien qu'ils ne présentaient pas ce caractère surexprimé ou qu'ils n'aient même pas été étudiés pour certains dans la première partie de ce travail de thèse, 7 autres gènes ont été choisis pour poursuivre l'étude de la régulation du transcriptome de la défense chez *L. digitata*. Ils ont été choisis en raison de leur appartenance à la famille multigénique des haloperoxydases (v-BPO1, v-IPO1 et v-IPO3), à la grande famille des thiorédoxines (THX2, THX3 et THX4) ou encore en raison de leur implication dans la voie des pentoses phosphates (G6PDH). L'expression de ces 19 gènes en réponse aux oligoguluronates a été étudiée par PCR Quantitative chez des plantules sauvages 3 heures, 6 heures et 12 heures après élicitation. La liste complète des 19 gènes étudiés est décrite dans le tableau 9.

Afin de définir les marqueurs moléculaires des réponses de défense de *L. digitata* avec plus de certitude, l'expression des 19 gènes considérés à été normalisée par 3 gènes différents,

protéine ribosomale L36, actine et tubuline. Ces trois gènes montrent une expression relativement constante au cours du temps et au cours du stress oligoguluronates. Ils représentent également plusieurs niveaux d'expression, avec un niveau assez élevé pour la protéine ribosomale, intermédiaire pour l'actine et assez faible pour la tubuline. Seuls les gènes présentant le même profil d'expression pour les 3 normalisations avec un facteur d'induction supérieur à 4 ont été définitivement considérés comme des marqueurs moléculaires de défense. L'ensemble des résultats d'expression obtenus sont présentés dans la figure 46, où les gènes sont classés par catégorie : haloperoxydases, voie des pentoses phosphates, thiorédoxines, inconnus issus de la banque soustractive et autres, regroupant des gènes divers impliqués dans le métabolisme ou la réponse au stress.

Avec les critères de sélection déterminés, il s'avère que 9 gènes seulement peuvent être considérés comme des marqueurs de défense : v-BPO3 et v-IPO3, G6PDH et 6PGDH-2, THX1 et THX4, l'inconnu Bslde 3D04, la M1PDH et l'isopropylmalate deshydratase. Curieusement, à l'exception de la 6PGDH-2, tous ces gènes sont induits 3 heures après élicitation et constituent en ce sens des marqueurs relativement précoces. Cette observation va dans le même sens que de nombreux commentaires déjà apportés sur les temps de cinétique étudiés et sur la réalité biologique du lien avec les réponses de défense des inductions tardives. De plus, à l'exception de deux d'entre eux, la surexpression de ces 9 gènes est suivie au temps de cinétique suivant d'un retour à un niveau d'expression comparable au témoin, voir même réprimé. La forte induction très ponctuelle de ces 9 gènes conforte leur position. L'implication de chacun de ces marqueurs moléculaires dans les réponses de défense de *L. digitata* est discutée en détails dans les paragraphes suivants.

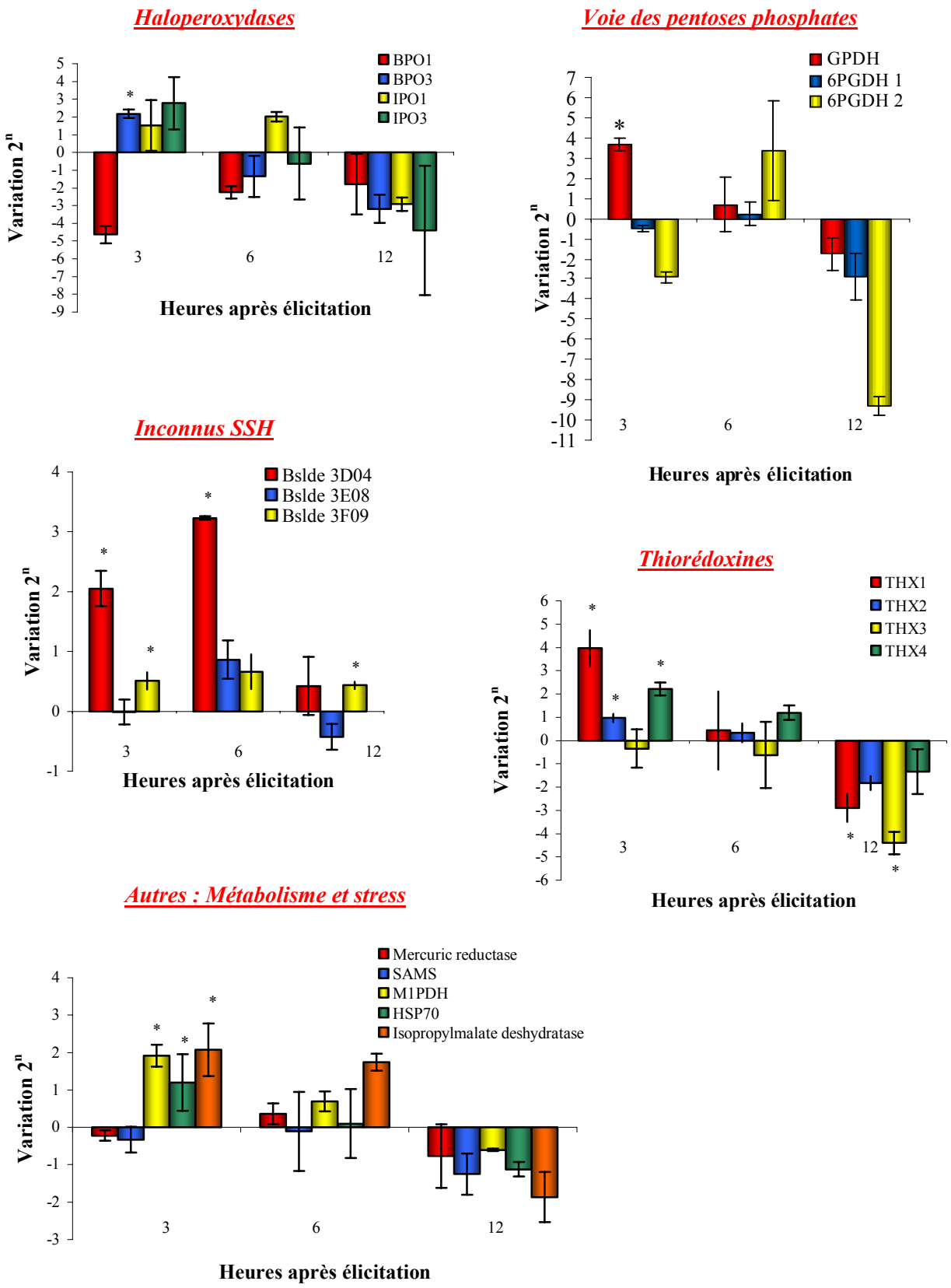


Figure 46 : Profil d'expression des gènes candidats impliqués dans les réponses de défense suite à l'élicitation par les oligoguluronates (150 µg/mL) obtenu par PCR Quantitative

Les valeurs représentent le log (base2) de la moyenne du triplicat biologique du ratio élicité/témoin après normalisation par l'actine. * Différence d'expression entre élicité et témoin validée statistiquement au risque α = 5 % par le test de la médiane et test de Cramer von Mises.

III.A Le métabolisme halogéné : originalité et particularité des algues marines

Les haloperoxydases dépendantes du vanadium sont particulièrement bien décrites chez les algues marines en raison de leur implication dans la synthèse de COHV. Chez *L. digitata*, les haloperoxydases sont codées par des familles multigéniques (Colin *et coll.*, 2003, Colin *et coll.*, 2005). Il a été suggéré que les différents membres ont pu évoluer vers des fonctions spécialisées, comme l'absorption d'iode, le renforcement pariétal ou la défense chimique liée à la formation des COHV (Leblanc *et coll.*, 2006). Pour autant, il n'existe pas à ce jour d'études concrètes validant ces hypothèses. L'expression de 2 bromopéroxydases (v-BPO1, v-BPO3) et de 2 iodopéroxydases (v-IPO1, v-IPO3) a donc été suivie en réponse à l'élicitation par les oligoguluronates, afin d'apporter des premiers éléments de réponse.

Curieusement, le gène codant la v-BPO1 est très fortement réprimé à 3 heures et tend à revenir à son niveau d'expression initial au cours des 12 heures qui suivent. Au contraire, le gène codant la v-BPO3 s'est avéré très clairement surexprimé par l'approche *macroarrays* et les données de PCR Quantitative ont confirmé son induction ponctuelle à 3 heures chez les plantules sauvages. Ces données transcriptomiques confortent les résultats précédemment acquis sur l'expression de ce gène, qui a été isolé à partir de la banque de protoplastes et dont des expériences de northern blot ont montré qu'il ne s'exprime pas chez le sporophyte non stressé (Roeder *et coll.*, 2005). L'ensemble de ces résultats tend à prouver que la v-BPO3 est une enzyme spécifiquement produite au cours de réponses de défense, impliquant un stress oxydant.

Concernant les iodopéroxydases, le gène codant v-IPO1 montre une légère induction à 6 heures avant d'être réprimé. Au contraire, le gène codant v-IPO3 est très fortement induit, uniquement à 3 heures, d'un facteur 7 en moyenne et jusqu'à plus de 20 fois pour l'un des réplicats. Ce nouvel ADNc de v-IPO, isolé par des approches PCR à partir d'ARN de sporophyte élicité par les oligoguluronates, n'avait été mis en évidence dans aucune des banques de laminaire. L'ensemble de ces informations et résultats confirme donc l'existence d'une forme de v-IPO, nommée v-IPO3, très faiblement exprimée chez le sporophyte dans un environnement sain, voir non exprimé. v-IPO3 représenterait tout comme v-BPO3 une forme d'haloperoxydase exclusivement et spécifiquement induite au cours des réponses de défense.

Trois fonctions biologiques principales sont généralement attribuées aux HPO : le renforcement pariétal, la détoxication des EAO, et la synthèse des COHV.

De manière concomitante à la production d'H_2O_2, l'élicitation de *L. digitata* par les oligoguluronates entraîne un net efflux d'iodure (Fievet *et coll.,* communication personnelle). Le pontage oxydatif des polyphénols a été obtenu *in vitro* en présence de H_2O_2, d'haloperoxydase et d'un halogénure (Berglin *et coll.*, 2004, Bitton *et coll.*, 2006). Ainsi, les haloperoxydases dont l'expression est spécifiquement induite par l'application d'oligoguluronates, v-BPO3 et v-IPO3, pourraient donc être sollicitées pour assurer le renforcement pariétal et de fait augmenter la protection mécanique vis-à-vis d'agressions pathogènes ultérieures. Cependant, la cinétique d'induction des gènes codant v-BPO3 et v-IPO3 impose que si ces enzymes sont effectivement impliquées dans le pontage oxydatif des polyphénols et des alginates, ce n'est pas par l'utilisation du H_2O_2 produit au cours du *burst* oxydant, car il est rapidement éliminé.

La réaction d'oxydation d'halogénure que les haloperoxydases catalysent en présence de H_2O_2 pourrait leur attribuer un rôle important dans le contrôle du *burst* oxydant en assurant une détoxication plus efficace du péroxyde d'hydrogène (Collèn *et coll.*, 1994a, Malin *et coll.*, 2001, Manley, 2002). Cependant, l'élimination du H_2O_2 est très rapide, de l'ordre d'une trentaine de minutes, alors que les gènes codant v-BPO3 et v-IPO3 sont induits dans les 3 premières heures suivant l'élicitation. Ces enzymes produites *de novo* ne semblent donc pas impliquées dans la gestion du stress oxydant. Seules les v-BPO1 et v-IPO1, dont les gènes montrent une expression constitutive chez les sporophytes peuvent éventuellement contribuer à la détoxication du H_2O_2. Cette hypothèse est d'autant plus appuyée par le fait que v-BPO1 et v-IPO1 possèdent un peptide signal d'adressage suggérant une localisation pariétale de ces enzymes (Colin *et coll.*, 2003, Colin *et coll.*, 2005).

L'élicitation de *L. digitata* par les oligoguluronates entraîne une augmentation de l'émission de composés carbonés volatils iodés ainsi que d'iode moléculaire I_2 (Malin *et coll.*, 2001, Palmer *et coll.*, 2005). En partenariat avec le Laboratoire de Chimie Analytique Bioinorganique et Environnementale de l'université de Pau (LCABIE, UMR CNRS 5034) nous avons également montré l'augmentation de l'émission de plusieurs composés iodés, notamment la production massive et tardive de CH_2I_2 suite à l'élicitation par les oligoguluronates (Figure 47).

	CH_2I	C_2H_5I	C_3H_7I	C_4H_9I	CH_2I_2
Témoin	0,4	0,12	0,12	0,0	3,39
Elicitée	0,5	0,62	0,37	0,2	**33,6**

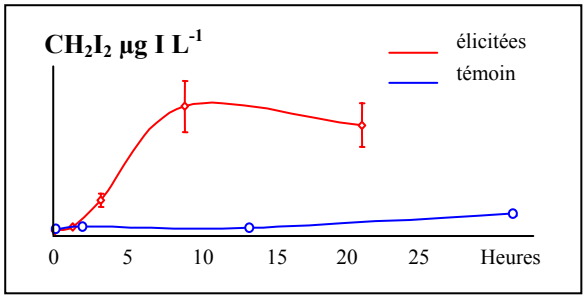


Figure 47: Augmentation de la production de composés volatiles iodés suite à l'élicitation par les oligoguluronates chez *L. digitata*

L'émission de COHV est mesurée par CGC-ICP-MS. Les quantités produites sont exprimées en pmol h^{-1} g^{-1} MF.

La capacité de *L. digitata* à accumuler l'iode, jusqu'à 4,7 % de son poids sec, et à émettre des COHV impose chez cette algue un métabolisme halogéné actif. D'après des travaux récents utilisant la technique d'EXAFS, il apparaît que l'essentiel de l'iode intracellulaire se trouve sous forme iodure. Cependant, les haloperoxydases pourraient fixer des halogénures sur des squelettes carbonés de longueur variée et produire ainsi des métabolites non volatils. En collaboration avec l'équipe de R. Lobinsky du LCABIE, j'ai donc mené des expériences préliminaires afin de valider cette hypothèse. La chromatographie liquide haute performance (HPLC) associée à un spectromètre de masse utilisant un plasma à couplage inductif (ICP MS) comme source d'ionisation est une technique de choix pour séparer et identifier spécifiquement des composés portant un atome particulier, l'iode et le brome dans notre cas. Les analyses ont révélé que *L. digitata* produit naturellement plus d'une vingtaine de composés iodés, certains de haut poids moléculaire et pouvant porter au moins deux atomes d'iode (Figure 48). Les différences de profils obtenus à partir d'extraction organique utilisant des solvants différents indiquent une nature diverse de ces composés iodés. Par couplage avec un détecteur UV, nous avons également pu montrer que certains d'entre eux possèdent des cycles aromatiques. La très grande diversité des composés halogénés produits chez les organismes marins est largement décrite. Elle comprend des indoles, des terpènes, des acétogénines, des phénols… (Dembitsky et Srebnik, 2002, Gribble, 2003). De plus, alors que *L. digitata* émet de nombreux composés bromés volatils, aucun composé bromé intracellulaire n'a été détecté dans les différents extraits préparés. *L. digitata* ne concentre pas le brome

comme elle le fait pour l'iode, il est donc possible qu'elle ne synthétise pas de composés organiques bromés non volatils. S'ils existent, alors ils sont chimiquement très différents des composés iodés mis en évidence et ne pouvaient pas être détectés dans les extraits organiques considérés. Enfin, l'application d'oligoguluronates semble induire une augmentation de l'activité du métabolisme iodé intracellulaire dans les 24 heures qui suivent l'élicitation, par une augmentation de la synthèse de certains composés. L'activité antiseptique des espèces iodées est connue depuis longtemps et fait l'objet d'application médicale. Ainsi, les nombreux composés iodés identifiés chez *L. digitata* représentent un fort potentiel de composés impliqués dans les réponses de défense.

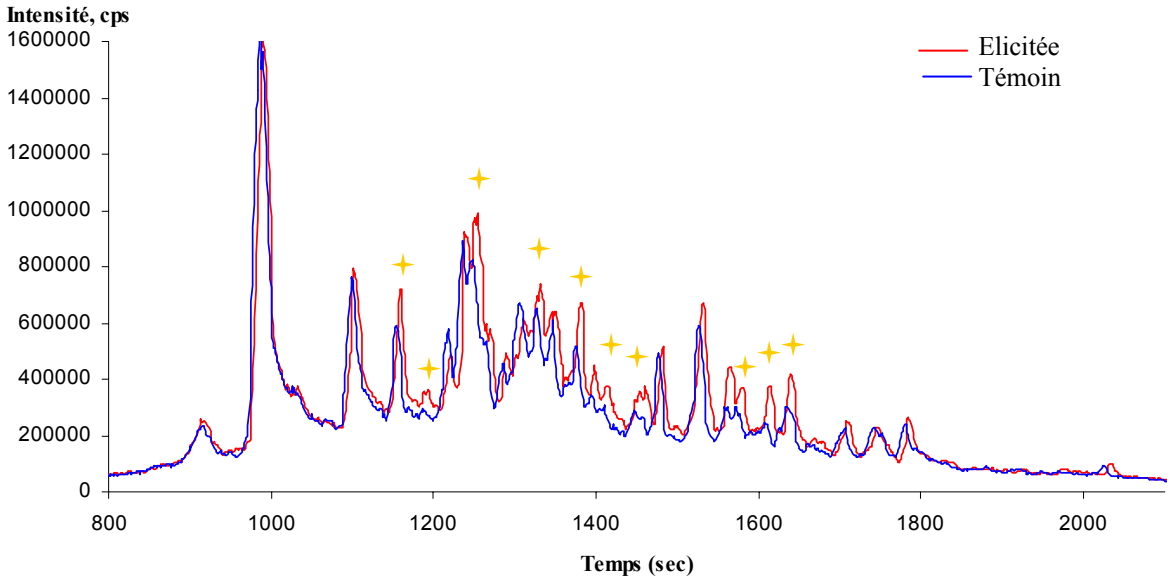


Figure 48 : Mise en évidence de la biosynthèse de composés iodés intracellulaires chez *L. digitata*

La comparaison des algues témoins et élicitées après 24 heures semble indiquer une augmentation du métabolisme iodé suite à l'élicitation par les oligoguluronates. Les étoiles jaunes indiquent des métabolites dont la biosynthèse pourrait être favorisée au cours des réponses de défense. Profil métabolique obtenu par LCP-ICP-MS à partir d'extrait organique.

L'ensemble de ces données décrit un métabolisme halogéné actif chez *L. digitata*, qui est activé au niveau transcriptomique et métabolique au cours des réponses de défense de l'algue. Le délai d'émission des composés volatils suite à l'élicitation et celui nécessaire à l'induction des gènes codant v-BPO3 et v-IPO3 suggèrent que ces enzymes sont impliquées dans la biosynthèse des COHV. v-IPO3 pourrait de plus participer à la synthèse de nouveaux composés iodés intracellulaires et / ou à l'augmentation de leur synthèse.

Par ailleurs, ces résultats suggèrent une transition du métabolisme halogéné basal brome/iode vers un métabolisme plus spécifique de l'iode. L'algue orienterait donc son métabolisme vers la production de composés iodés, au pouvoir anti-oxydant et antibiotique, plus fort que les composés bromés, afin de développer des réponses de défense plus efficaces.

III.B La voie des pentoses phosphates : un rôle central dans la régulation redox cellulaire

Parmi les voies métaboliques impliquées dans les réponses de défense de *L. digitata*, la voie des pentoses phosphates semble occuper une place importante. En effet, les gènes codant les deux premières enzymes de la voie et qui en constituent le tronçon limitant, la glucose-6-phosphate deshydrogénase (G6PDH) et la 6-phosphogluconate deshydrogénase (6PGDH), ont été clairement identifiés comme induits lors de la réponse aux oligoguluronates. Un ADNc codant une G6PDH et deux ADNc codant une 6PGDH ont été identifiés dans la banque soustractive, avant d'être à nouveau révélés par l'approche *macroarrays*. Les expériences de PCR Quantitative montrent la surexpression de la G6PDH à 3 heures, suivi de l'induction de la 6PGDH-2 à 6 heures chez les algues sauvages. La cinétique d'induction des deux gènes peut trouver une cohérence dans l'intervention successive des deux enzymes lors de la synthèse du glucose-6-phosphate.

Les G6PDH et 6PGDH sont des enzymes très conservées au cours de l'évolution et plusieurs isoformes chloroplastiques, cytosoliques et péroxysomales, ont été caractérisées chez différentes espèces végétales (Corpas *et coll.*, 1998, Redinbaugh et Campbell, 1998, Wendt *et coll.*, 2000). A l'encontre des résultats déjà publiés chez *L. digitata* (Moulin *et coll.*, 1999), indiquant l'existence d'un seul gène codant une 6PGDH, ce travail a permis d'identifier 2 ADNc, 6PGDH-1 et 6PGDH-2, codant deux isoformes différentes. Le séquençage de différents clones représentatifs de ces 2 gènes putatifs a montré i) que l'ADNc

6PGDH-1 correspond à l'ADNc complet identifié auparavant dans la banque de sporophyte de *L. digitata*, AW400526 (Moulin *et coll.*, 1999) et ii) que la séquence de l'ADNc 6PGDH-2 est distincte, bien qu'elle corresponde essentiellement à la région 3' non traduite. La surreprésentation de l'ADNc 6PGDH-2 dans les banques correspondant à des états de stress (protoplaste et SSH) et son induction en réponse aux oligoguluronates montrent une régulation différentielle des 2 gènes (Tableau 10).

Tableau 10 : Identification de deux ADNc codant des 6PGDH différentiellement impliquées dans les réponses au stress

	6PGDH-1		**6PGDH-2**	
Banques EST	*Nb clones*	*Représentant*	*Nb clones*	*Représentant*
Sporophyte	+	AW400526 (Sest024)	-	
Protoplaste	2	CN466563 (Pld1F10)	17	CN467500 (Pld13C09)
SSH	1		7	
Induction de l'expression par les GG				
Plantules sauvages		-		+
Plantules de culture		+		+

Chez les plantes, l'implication des enzymes de la voie des pentoses phosphates dans les interactions hôte-pathogène ou suite à l'élicitation est décrite depuis longtemps, sans pour autant distinguer les différentes isoformes. Il a été cependant montré que les gènes codant les G6PDH cytosolique et chloroplastique sont différentiellement exprimés dans une culture cellulaire de persil après élicitation (Batz *et coll.*, 1998). Une régulation différente par le nitrate des isoformes de 6PGDH chez le maïs a également été mise en évidence (Redinbaugh et Campbell, 1998). Ces études confortent assez bien notre hypothèse de l'existence de deux isoformes de 6PGDH et d'une régulation fine de ces isoformes en fonction des facteurs environnants.

Suite à l'élicitation, une des premières réponses de *L. digitata* est la production d'un *burst* oxydant. L'inhibition au moins partielle de ce *burst* par le DPI suggère qu'une NADPH oxydase est impliquée dans la génération du peroxyde d'hydrogène. L'activation de la voie des pentoses phosphates au niveau transcriptionnel pourrait être ainsi directement liée à la nécessité de produire du NADPH pour alimenter la NADPH oxydase, comme cela a été montré dans le système tabac / cryptogéine. En effet, dans ce système, l'activité de la NADPH oxydase est complètement dépendante de la synthèse *de novo* de NADPH, via la voie des

pentoses phosphates (Pugin *et coll.*, 1997). Cependant, la cinétique considérée dans cette étude ne permet pas d'infirmer cette hypothèse, dans la mesure où le *burst* est consécutif à l'élicitation et que l'induction des gènes codant les G6PDH et 6PGDH est observée à partir de 3 heures. Il est cependant possible que ces gènes soient induits plus précocement et n'aient pas pu être mis en évidence par la cinétique étudiée.

Les espèces activées de l'oxygène sont toxiques pour le pathogène, mais également pour la plante, qui doit rapidement les éliminer. Les plantes supérieures possèdent ainsi de nombreux systèmes de détoxication, enzymatiques ou non (Mittler, 2002), qui sont dans bien des cas consommateurs de NADPH. L'induction des gènes de la voie des pentoses phosphates chez *L. digitata* pourrait être ainsi liée à l'activation des processus de détoxication.
Les EAO endommagent rapidement les différentes structures cellulaires, protéiques, lipidiques et nucléiques (Lamb et Dixon, 1997). Ainsi, il n'est pas rare d'observer au cours de stress biotiques ou abiotiques une diminution de l'activité photosynthétique, en partie due aux effets délétères des EAO. Or chez les plantes, la principale source de NADPH provient de la photosynthèse. Lorsque l'appareil photosynthétique est endommagé, la cellule doit se tourner vers d'autres voies métaboliques pour générer son pouvoir réducteur. Chez les animaux, la voie des pentoses phosphates est la source principale de NADPH, voire unique pour certains types cellulaires. Ainsi, l'extinction du gène codant la G6PDH rend les cellules animales sensibles au H_2O_2, sans toutefois affecter la synthèse des pentoses phosphates (Pandolfi *et coll.*, 1995). Chez les plantes, l'expression des transcrits codant les enzymes de la voie des pentoses phosphates a également été décrite en réponse au stress biotique (Fahrendorf *et coll.*, 1995) ou abiotique (Huang *et coll.*, 2003, Nemoto et Sasakuma, 2000), sans que pour autant le lien direct avec le stress oxydant ne soit établi. Récemment, il a été montré que sous certaines conditions expérimentales, des plants de tabac déficients à la fois en APX et CAT sont moins sensibles au stress oxydant que les plantes où un seul des deux gènes a été délété. Ces plants présentent une activité photosynthétique réduite, une nette surexpression de plusieurs gènes codant des enzymes de la voie des pentoses phosphates (transaldolase (TA), transketolase (TK), et ribulose-5-phosphate-isomerase) ainsi que du gène codant la monodehydroascrobate réductase. Les auteurs proposent que l'augmentation de l'activité de la voie des pentoses phosphates permet de produire un supplément de NADPH nécessaire à la régénération de l'acide ascorbique par la monodehydroascrobate réductase. Ainsi, chez ces plants de tabac, la détoxication du peroxyde d'hydrogène pourrait être assurée par un système non enzymatique, l'acide ascorbique.

La surexpression des gènes codant les deux enzymes clés de la voie des pentoses phosphates chez *L. digitata* suite à l'élicitation par les oligoguluronates vient soutenir l'hypothèse que le premier rôle physiologique de ces enzymes serait de fournir le pouvoir réducteur nécessaire à la détoxication des EAO produites au cours des réponses de défense (Figure 49).

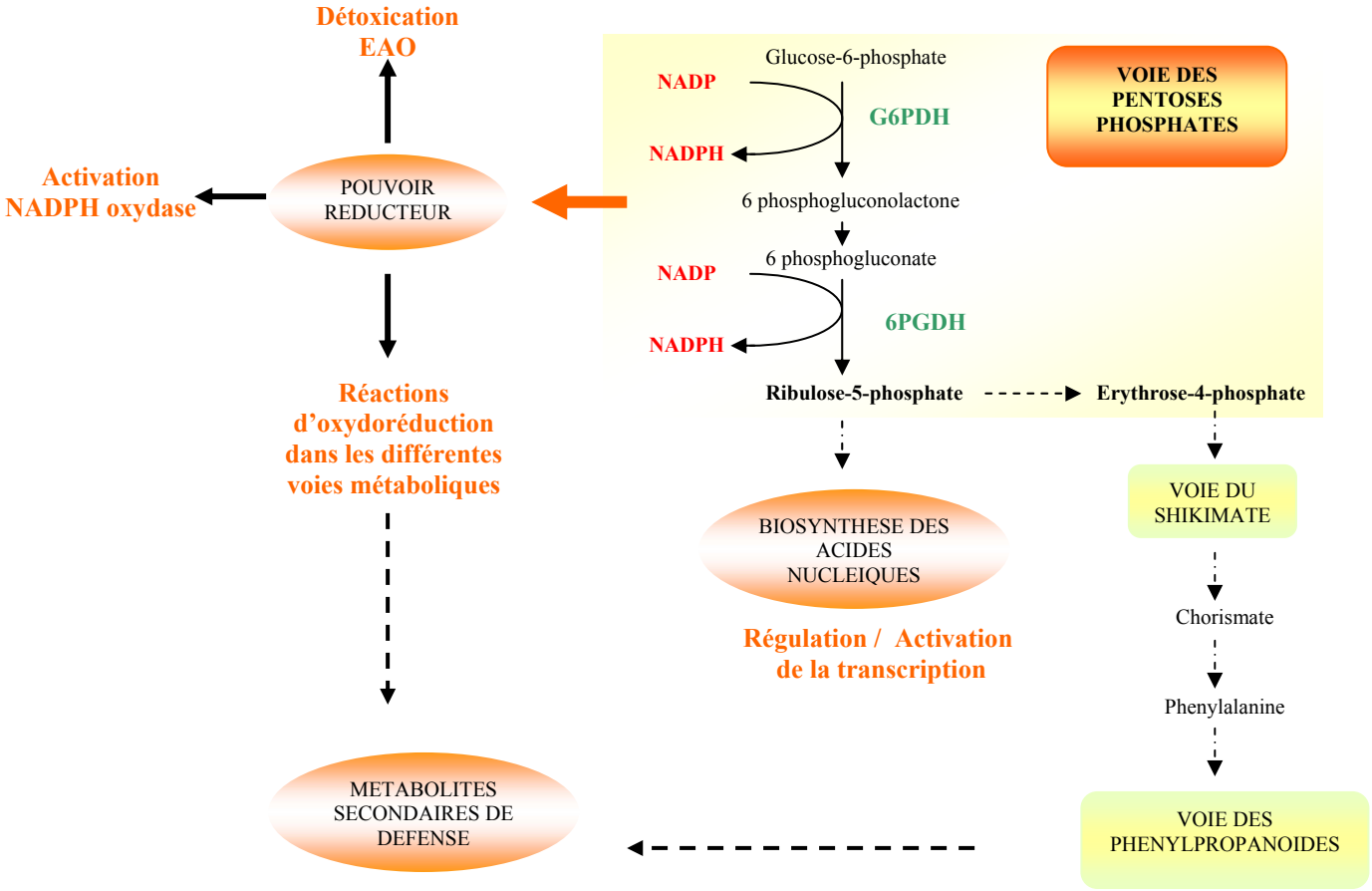


Figure 49 : La voie des pentoses phosphates, un rôle clé dans le métabolisme

La voie des pentoses phosphates est activée au niveau transcriptionnel par les oligoguluronates chez *L. digitata*. Le NADPH produit pourrait alimenter l'activité de la NADPH oxydase. La voie des pentoses phosphates fournirait également le pouvoir réducteur nécessaire à la détoxication des espèces activées de l'oxygène (EAO) ainsi qu'aux nombreuses réactions d'oxydoréduction des différentes voies métaboliques. Elle conduirait également à la formation de plusieurs précurseurs de voies métaboliques importantes, conduisant à la biosynthèse des acides nucléiques ou de métabolites de défense.

Au-delà de son rôle majeur de générateur de NADPH pour la cellule, la voie des pentoses phosphates génère de nombreux intermédiaires clés dans d'autres voies de biosynthèses essentielles (Figure 49). Par exemple, le ribulose-5-phosphate est le précurseur des nucléotides, et en ce sens l'activation de la voie des pentoses phosphates apporterait sa contribution à la régulation de la transcription observée suite à l'élicitation.

Chez les plantes, elle produit également l'erythrose-4-phosphate qui est avec le phosphoenolpyruvate, le précurseur de la voie du shikimate, impliquée dans la biosynthèse des acides aminés aromatiques. La phénylalanine constitue la porte d'entrée de la voie des phénylpropanoïdes, qui génère de nombreux composés impliqués dans les réponses de défenses, comme les phytoalexines, l'acide salicylique ou encore la lignine, impliquée dans le renforcement pariétal (Weaver et Herrmann, 1997).

Pour l'instant aucune EST codant des enzymes impliquées dans la voie du shikimate ou des phénylpropanoïdes n'a été isolée dans les différentes banques de *L. digitata*. Or dans la très grande majorité des systèmes hôte-pathogène étudiés chez les plantes, l'induction des gènes codant les enzymes principales de ces voies a été mise en évidence (Somssich et Hahlbrock, 1998). Un premier criblage rapide des banques EST de macroalgues a permis d'identifier plusieurs gènes impliqués dans ces deux voies métaboliques chez *P. yezoensis* et *E. siliculosus* (Tableau 4, chapitre Introduction), laissant supposer que ces gènes sont également présents chez *L. digitata*, mais que le faible nombre d'EST ne nous a pas encore permis d'y accéder. La synthèse de composés phénoliques impliquant la voie des phénylpropanoïdes avec une activité phénylalanine ammonia-lyase en réponse à une agression pathogène a d'ailleurs été mise en évidence chez l'algue rouge *C. crispus* (Bouarab, 2000, Bouarab *et coll.*, 2004). Chez *L. digitata,* l'accumulation de composés autofluoresents sous UV est observée après élicitation par les oligoguluronates, mais également au site de pénétration de l'endophyte *Laminariocolax*. Il s'agirait de composés aromatiques, tels que des phlorotannins, qui sont des polyphénols spécifiques des algues brunes (Küpper *et coll.*, 2002). La voie des phénylpropanoïdes est responsable de la synthèse de nombreux composés phénoliques solubles, dont certains ont une activité antimicrobienne (les phytoalexines), mais aussi de composés phénoliques liés à la membrane, jouant un rôle dans le renforcement pariétal. La paroi des algues brunes est d'ailleurs naturellement très riche en polyphénols. Pour l'ensemble des ces raisons, les algues brunes pourraient produire des composés de défense issus de la voie des phénylpropanoïdes.

L'activation préliminaire de la voie des pentoses phosphates chez *L. digitata* pourrait d'une part servir à alimenter la NADPH oxydase en NADPH afin de permttre la mise en place du *burst* oxydant. La génération du pouvoir réducteur pourrait d'autre part être nécessaire aux nombreuses réactions d'oxydo-réduction cellulaires, entre autres celles intervenant dans la détoxication des EAO et celles des voies de biosynthèse des composés de défense. Enfin, cette activation de la voie des pentoses phosphates pourrait contribuer à la production des précurseurs indispensables à ces voies de biosynthèse.

III.C La mannitol-1-phosphate deshydrogénase : un nouveau gène de défense ?

Le gène codant la mannitol-1-phosphate deshydrogénase (M1PDH) constitue l'un des gènes les plus fortement surexprimés et ce tout au long de la cinétique. Il semble donc être chez *L. digitata* impliqué dans la défense sans aucune ambigüité. Alors que l'implication du mannitol est largement documentée dans la tolérance au stress osmotique (Stoop *et coll.*, 1996), rares sont les études soulevant un rôle de la mannitol-1-phosphate deshydrogénase dans les réponses à des stress biotiques chez les plantes supérieures.

La caractérisation du gène codant la mannitol deshydrogénase chez le céleri a pourtant soulevé la possibilité de l'implication de cette enzyme, et donc du mannitol, dans les réponses des plantes aux agressions par des agents pathogènes (Williamson *et coll.*, 1995). La recherche d'identité dans les banques de données a montré que les protéines PR ELI3 de fonction inconnue identifiées chez le persil et chez *Arabidopsis* étaient en fait des mannitol deshydrogénases, partageant 80 % d'identité avec la séquence de la mannitol deshydrogénase du céleri. Chez *Arabidopsis*, l'expression d'ELI3 est indispensable à la résistance à *Pseudomonas syringae*. De plus, cette résistance n'existe que dans le contexte d'une interaction incompatible liée au locus RPM1 (Kiedrowski *et coll.*, 1992). Williamson *et coll.*, (1995) montrent également que le traitement de cellules de céleri par l'acide salicylique, connu pour augmenter l'accumulation de protéines PR, augmente l'activité de la mannitol deshydrogénase et induit également l'accumulation de son transcrit. Ces résultats supportent l'hypothèse que la mannitol deshydrogénase pourrait être une PR protéine (Williamson *et coll.*, 1995). De plus, l'expression du gène codant la mannitol deshydrogénase est activée chez le persil par l'application d'éliciteur fongique ainsi que par l'acide salicylique, avec un effet synergique des deux traitements (Thulke et Conrath, 1998). Par ailleurs, il a été très

récemment montré que des lignées d'aubergines transgéniques possédant le gène de la mannitol-1-phosphate deshydrogénase d'*E. coli*, affichaient une résistance accrue à plusieurs pathogènes fongiques, directement liée à la présence de mannitol dans les tissus (Prabhavathi et Rajam, 2007).

La caractérisation de la mannitol deshydrogénase comme PR protéine putative suggère plusieurs possibilités quant à son implication dans les réponses de défense. Le mannitol possède un fort potentiel antioxydant, comme de nombreux sucres alcools, qui lui procure un rôle dans la détoxication des espèces activées de l'oxygène (Shen *et coll.*, 1997a, Shen *et coll.*, 1997b). Le potentiel antioxydant du mannitol a été montré assez directement chez des plants transgéniques exprimant la mannitol-1-phosphate deshydrogénase d'*E. coli* et affichant une diminution des effets délétère des radicaux hydroxyles (Shen *et coll.*, 1997a). Il a de plus été suggéré que l'augmentation de la performance de plants transgénique accumulant le mannitol était due à la capacité de ce dernier à piéger les EAO et non à son effet osmoprotectant (Abebe *et coll.*, 2003).

Chez les plantes supérieures, l'implication des espèces activées de l'oxygène dans la mise en place de la réponse hypersensible, de la résistance systémique acquise, de la modification de la paroi et comme agent toxique direct pouvant entraîner aussi bien la mort du pathogène que de la plante est largement décrite. En tant que molécule anti-oxydante, le mannitol pourrait donc représenter un désavantage pour la plante en empêchant la signalisation par les espèces activées de l'oxygène produites suite à la reconnaissance de l'agent pathogène (Laloi *et coll.*, 2004a, Orozco-Cardenas *et coll.*, 2001). En ce sens, l'élimination du mannitol par l'action de la mannitol deshydrogénase, pourrait permettre à cette signalisation de se mettre en place (Williamson *et coll.*, 1995).

Une seconde hypothèse quant à l'implication de la mannitol deshydrogénase dans les réponses de défense provient du fait qu'en présence d'une source carbonée, la mannitol deshydrogénase est réprimée. L'application d'acide salicylique dans ces mêmes conditions restaure l'expression de la mannitol deshydrogénase. Les auteurs proposent que le mannitol représente alors pour la cellule une source de carbone et d'énergie, dont la demande croissante est inhérente à certaines réponses de défense, telles que la synthèse de la paroi ou de phytoalexines (Williamson *et coll.*, 1995).

Enfin, de nombreux champignons produisent du mannitol comme source de carbone et comme acteur de protection contre les espèces activées de l'oxygène émises par la plante. La dégradation de ce mannitol par la mannitol deshydrogénase de l'hôte pourrait en ce sens limiter la progression du pathogène. Ainsi, l'expression du gène codant la mannitol

deshydrogénase du céleri chez des plants de tabac induit une augmentation de la résistance au pathogène fongique *Alternaria alternata*, qui sécrète du mannitol (Jennings *et coll.*, 2002).

Les algues brunes, comme *L. digitata* sont des accumulateurs tout à fait exceptionnels de mannitol, jusqu'à 30 % de leur poids sec, dans la mesure où ce polyol représente le produit terminal de stockage de leur photosynthèse (Reed et Stewart, 1985). Le mannitol est donc la principale source de carbone des algues. Dans le contexte d'une agression par un agent pathogène, il est fort probable que l'activation de la transcription de la M1PDH joue un rôle clé en permettant la dégradation du mannitol, fournissant ainsi le potentiel carboné et énergétique nécessaire à la synthèse de composés de défense et au maintien de la paroi. De plus, comme cela a été proposé par Williamsson *et coll.*, (1995) pour les plantes supérieures, la diminution de la quantité de mannitol intracellulaire, qui est initialement très forte chez les algues, pourrait contribuer à une meilleure transduction du signal initié par les espèces activées de l'oxygène (Figure 50).

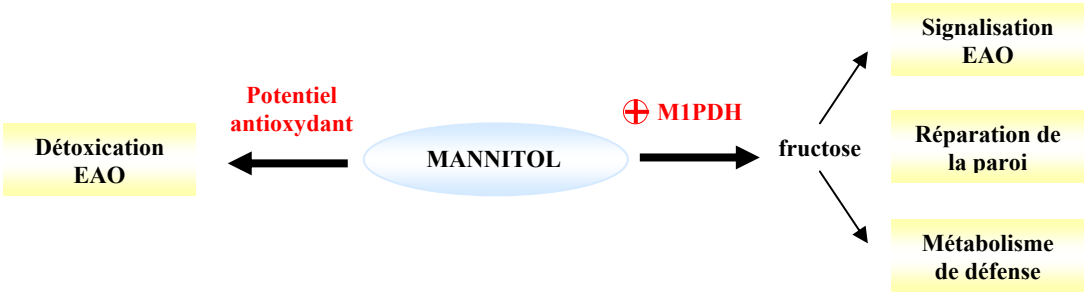


Figure 50 : Rôle du mannitol et de la M1PDH dans les réponses de défense de *L. digitata*

Le mannitol qui peut représenter jusqu'à 30 % du poids sec de l'algue constitue un pool de potentiel oxydant considérable pouvant jouer un rôle important dans la détoxication. L'activation de la transcription de la mannitol-1-phosphate deshydrogénase (M1PDH) conduisant à une protéine active pourrait à court terme fournir la source de carbone nécessaire aux voies métaboliques de défense. En produisant du fructose-6-phosphate, qui est le précurseur de la voie de biosynthèse de l'acide alginique, elle contribuerait à la réparation de la paroi, dégradée par l'agent pathogène. En diminuant le stock de mannitol, la M1PDH pourrait également contribuer à la signalisation des espèces activées de l'oxygène (EAO) en limitant leur élimination.

Par ailleurs l'activité de la M1PDH conduit directement à la production de fructose-6-phosphate, qui le précurseur de la voie de biosynthèse de l'acide alginique, principal constituant de la paroi de *L. digitata*. L'induction du gène codant la M1PDH pourrait être ainsi également liée à la nécessité de restaurer la paroi dégradée au cours de l'agression pathogène.

Toutefois, l'ensemble de ces hypothèses ne peut s'avérer exact que si dans les conditions environnementales de l'interaction biotique, la mannitol-1-phosphate deshydrogénase de *L. digitata* fonctionne effectivement dans le sens de l'oxydation. Les enzymes impliquées dans la biosynthèse et le catabolisme du mannitol sont très bien décrites chez les bactéries, les champignons et les plantes et relativement peu chez les algues. Il semblerait que les algues, ou du moins, les algues rouges, chez qui le mannitol n'est cependant pas le sucre majoritaire issu de la photosynthèse, possèdent un mécanisme enzymatique de biosynthèse et de catabolisme du mannitol du type de certains champignons (Figure 51). Chez ces derniers la M1PDH assure autant la réduction du fructose-6-phosphate que l'oxydation du mannitol-1-phosphate. De plus, la régulation de cette voie métabolique est soumise à certaines conditions environnementales, qui peuvent entraîner un fonctionnement vers la biosynthèse ou vers le catabolisme (Iwamoto et Shiraiwa, 2005).

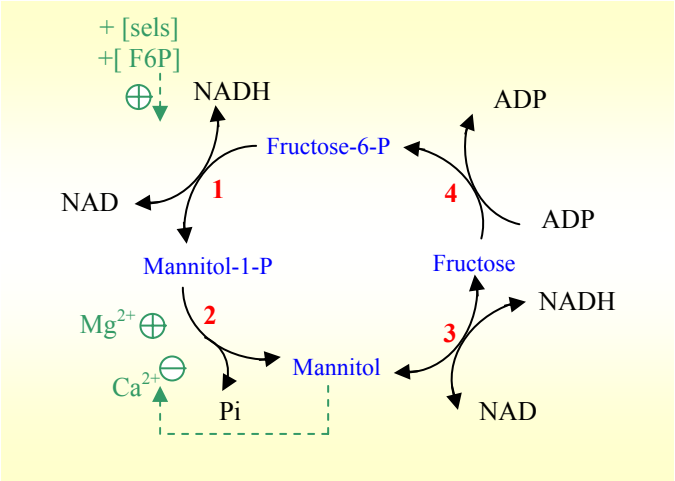


Figure 51: Régulation de la biosynthèse et catabolisme du mannitol chez l'algue rouge *Caloglossa*

1. mannitol-1-phosphate deshydrogénase 2. mannitol-1-phosphatase 3. mannitol-2-deshydrogénase 4. hexokinase. La réaction catalysée par la M1PDH est réversible. Le fructose-6-phosphate (F6P) est le précurseur de la voie de biosynthèse de l'acide alginique, principal composant de la paroi de *L. digitata*. Les régulations positives et négatives de certaines réactions exercées par l'environnement chimique sont indiquées. D'après Iwamoto *et coll.*, 2005.

Compte-tenu des hypothèses soulevées suite à la caractérisation de la mannitol deshydrogénase comme PR protéine chez les plantes supérieures, du pouvoir antioxydant du mannitol et de sa forte concentration chez les algues brunes, il semblerait que la M1PDH soit

un gène de défense particulièrement intéressant et représentant une originalité certaine chez *L. digitata*.

III.D Les thiorédoxines : des enzymes à activité anti-oxydante

III.D.1 Annotation des EST THX1 à THX4

Suite à l'annotation des EST de la banque de protoplastes, 4 contigs représentant des thiorédoxines avaient été identifiés. Les 4 ADNc ont été entièrement séquencés afin de déterminer plus précisément leur identité par homologie de séquence. Il s'avère que les 4 protéines déduites de ces séquences appartiennent effectivement à la grande famille des thiorédoxines, en raison de leur repliement caractéristique, qui correspond à 4 feuillets β situés au cœur hydrophobe de la protéine, entourés de trois hélices α (Figure 52). Cependant, la superfamille des thiorédoxines comprend une très large diversité de protéines. Plusieurs membres possèdent une activité disulfide oxydoréductase, en altérant l'état redox de protéines cibles par l'oxydation réversible de leur site actif dithiol. C'est le cas par exemple des thiorédoxines, des glutarédoxines et de la famille des Dsb protéines. D'autres membres de cette famille possèdent un repliement de type thiorédoxines, mais ne sont pas des disulfides oxydoréductases, comme par exemple, les peroxyrédoxines, les glutathion peroxydases et les GST. Ainsi, la comparaison par blast des 4 thiorédoxines de *L. digitata* à la banque de données protéiques SwissProt indique qu'il s'agit en fait de 4 protéines très différentes avec des fonctions putatives spécifiques : une thiorédoxine-like, une glutarédoxine, une DsbA protéine et une peroxyrédoxine.

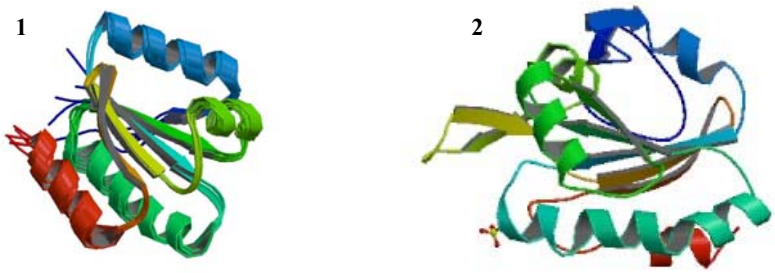


Figure 52: Repliement caractéristique de type thiorédoxine

Le motif thiorédoxine correspond est constitué de 4 feuillets β dont le troisième est antiparallèle, et de trois hélices α
1. Structure RMN de la Trx h1 d'*A. thaliana* 2. Strucure RMN de la Prx de *Populus trichocarpa*

III.D.1.a La THX1, une thiorédoxine-like

L'ADNc de la THX1 de 1841 pb code une protéine de 191 acides aminés, avec un poids moléculaire théorique de 20 kDa et possède un domaine thiorédoxine. La protéine déduite montre 35 % d'identité et 53 % d'homologie avec le précurseur chloroplastique de la thiorédoxine like 5 d'*A. thaliana* (N° accession :Q9FG36). Cette identification correspond au premier hit dans la banque de données SwissProt en utilisant le programme Blast. La présence d'un peptide signal en N-terminal dans la séquence de la thiorédoxine de *L. digitata*, a été déterminée par les 3 algorithmes SignalP, Target P et Predotar. Toutefois, le programme Predotar suggère un adressage vers le reticulum endoplasmique et non pas vers le chloroplaste. A l'exception de ce hit avec *A. thaliana*, la très grande majorité des séquences présentant une identité avec la thiorédoxine de *L. digitata* est d'origine animale. Par ailleurs, la séquence Q9FG36 d'*A. thaliana* a elle-même été annotée à partir d'une autre séquence d'*A. thaliana*, nommée thiorédoxine like 5. Il s'avère qu'au sein d'un arbre phylogénétique construit à l'aide du programme DARWIN, cette thiorédoxine like est isolée des autres thiorédoxines d'*Arabidopsis*. Elle forme un cluster avec les thiorédoxines d'une archébactérie, ainsi qu'avec une thiorédoxine mitochondriale de mammifère (Meyer *et coll.*, 1999). Ainsi, la protéine THX1 de *L. digitata* est très certainement une thiorédoxine (LdTrx), qui semble plus proche phylogénétiquement d'une thiorédoxine d'origine chloroplastique ou mitochondriale.

Les thiorédoxines sont de petites oxydoréductases, conservées dans l'ensemble des organismes, et caractérisées par un site actif dithiol-disulfide, représenté par deux cystéines séparés de deux acides aminés, CXXC. Elles sont codées au niveau du noyau par des familles multigéniques et peuvent être cytosoliques, mitochondriales ou chloroplastiques. A l'état réduit, les thiorédoxines réduisent le pont disulfure de nombreuses protéines cibles. La thiorédoxine oxydée est ensuite elle-même réduite par une flavoproteine thiorédoxine réductase, qui utilise le NADPH comme source de pouvoir réducteur, l'ensemble formant le 'système thiorédoxine' (Figure 53).

III.D.1.b La THX2, une glutarédoxine

L'ADNc de la THX2 de 878 pb est incomplet. La séquence codante représente une protéine putative partielle de 288 acides aminés et possède 3 domaines de type Grx PICOT like pour 'PKC-interacting cousin of thioredoxin', dont le premier est incomplet. La protéine partielle déduite montre 51 % d'identité avec les monothiol glutarédoxines du riz et d'*A. thaliana*. Le site actif des monothiol glutarédoxines est conservé avec la substitution de la

cystéine C-terminale du site actif par une sérine (CXXS). Le terme de PICOT like vient du fait que le premier exemple décrit est une protéine qui interagit avec une isoforme calcium indépendante de protéine kinase C. PICOT inhibe l'activation de la c-Jun N-terminal kinase et la transcription des facteurs de transcription AP-1 et NK-κB dans des cellules lymphocytaires de type T (Witte *et coll.*, 2000). Bien que la protéine soit incomplète, il ne fait aucun doute que THX2 est une Grx de type PICOT (LdGrx).

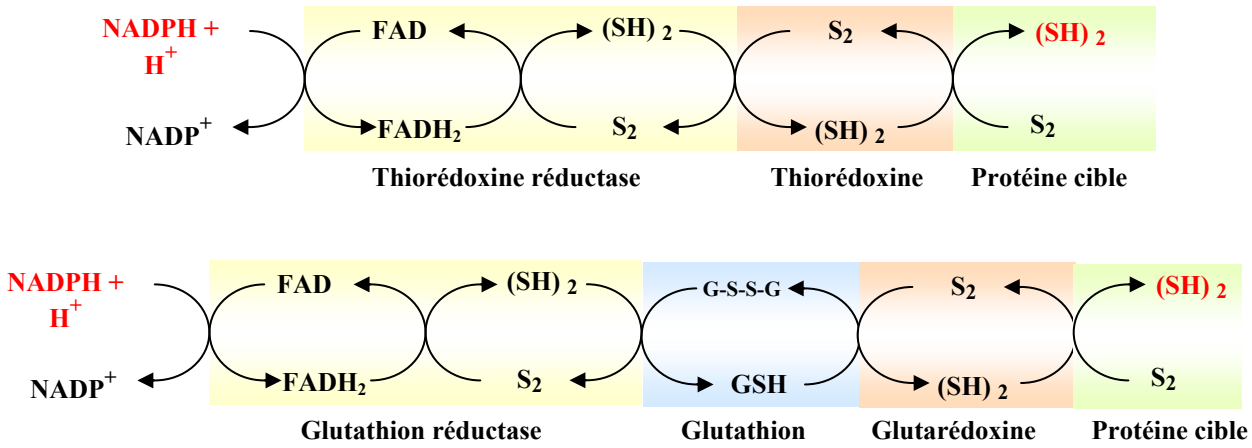


Figure 53: Mécanismes de réduction des ponts disulfures de protéines cibles par le système thiorédoxine et glutarédoxine

La thiorédoxine et la glutarédoxine assurent la réduction des ponts disulfures des protéines cibles en utilisant leur propre site actif comme donneur d'hydrogène. Pour que le système fonctionne, elles doivent être régénérées. Les thiorédoxines et glutathion réductases dépendantes du NADPH contiennent deux sous unités associées à deux molécules de FAD. Chaque sous unité présente un site de fixation pour le FAD et le NADPH, ainsi qu'un pont disulfure dans son site actif. Au cours de la réduction, les électrons sont transférés du NADPH vers le pont disulfure des réductases. Le pont disulfure de la thiorédoxine peut de nouveau être réduit et la thiorédoxine redevient active.

Les glutarédoxines (Grx) ne présentent aucune similarité de séquence avec les thiorédoxines, si ce n'est le site actif CXXC et le repliement de type thiorédoxine. Elles sont également représentées par plusieurs isoformes, avec des localisations cellulaires chloroplastique, mitochondriale et cytosolique. Elles catalysent cependant la même réaction de réduction de pont disulfure de protéines cibles. A la différence des thiorédoxines, elles sont réduites par le glutathion, ce qui est la base même de leur appellation. Le système de régénération complet des Grx fait appel à une glutathion réductase et le système fonctionne au

détriment de NADPH (Figure 53). Glutarédoxines et thiorédoxines partagent ainsi un certain nombre de fonctions biologiques, mais ne constituent pas pour autant des systèmes complètement redondants. Les Grx sont entre autres capables de réduire le déhydroascorbate en ascorbate, qui constitue l'un des métabolites antioxydants cellulaires. Elles possèdent une activité peroxydase et elles jouent également un rôle dans la protection des groupes thiols de certaines protéines par des mécanismes de glutathionylation /deglutathionylation (Rouhier *et coll.*, 2004).

III.D.1.c La THX3, une DsbA oxydoréductase

L'ADNc de la THX3 de 1284 pb est complet et code une protéine de 223 acides aminés avec un poids moléculaire théorique de 25 kDa. La recherche d'identité de séquence protéique dans la banque de données SwissProt n'a donné aucun résultat, mais l'ensemble des identités de séquences obtenues sur la banque de données protéiques non redondante de NCBI est en accord avec la présence d'un domaine conservé de type DsbA-Frne. THX3 est donc probablement une oxydoréductase de type Frne.

Ces protéines sont connues pour être impliquées dans la biosynthèse de polykétides et spécialement dans la production d'antibiotiques aromatiques.

III.D.1.d La THX4, une peroxyrédoxine

L'ADNc de la THX4 de 1758 pb code une protéine de 161 acides aminés, avec un poids moléculaire théorique de 16,5 kDa et possède un domaine conservé de type peroxyrédoxine like 5, qui correspond également au domaine AhpC/TSA, pour 'alkyl hydroperoxyde réductase/thiol specifique antioxydant', défini par Pfam. La protéine déduite de cet ADNc présente 48 % d'identité et 61 % de similitude avec le précurseur mitochondrial de la peroxyrédoxine 5 humaine. Des taux d'identité et de similitude quasi identiques sont obtenus avec le précurseur chloroplastique de la peroxyrédoxine 2E du riz. THX4 serait donc une peroxyrédoxine like 5 (LdPrx). Aucun peptide d'adressage n'a été déterminé sur la séquence de la peroxyrédoxine de *L. digitata*, ce qui est cohérent avec l'alignement des séquences humaine et du riz, et qui laisse supposer qu'il s'agit d'une forme cytosolique.

Les peroxyrédoxines sont des enzymes ubiquistes thiol spécifiques, aussi nommées thiorédoxine peroxydases ou alkyl hydroperoxyde réductases en raison de leur propriété. Elles se distinguent des autres peroxydases car elles ont la particularité de ne pas utiliser de métaux ou de groupement prosthétique au niveau de leur site actif. Les peroxyrédoxines jouent un

rôle antioxydant important au sein des cellules, car elles sont capables de réduire le péroxyde d'hydrogène et les hydroperoxydes organiques (ROOH) respectivement en eau et en alcool correspondant. Les peroxyrédoxines sont directement le substrat de la réaction d'oxydoreduction. La cystéine du site actif est oxydée, soit en disulfure, soit en acide sulfénique (-SOH), par le péroxyde qui est alors détruit. L'enzyme oxydée doit alors être régénérée sous sa forme réduite, en général par une thiorédoxine ou par le glutathion, qui sont eux-mêmes réduits à leur tour. La réaction globale aboutit à la réduction des peroxydes au détriment du NADPH (Figure 54) (Dietz, 2003).

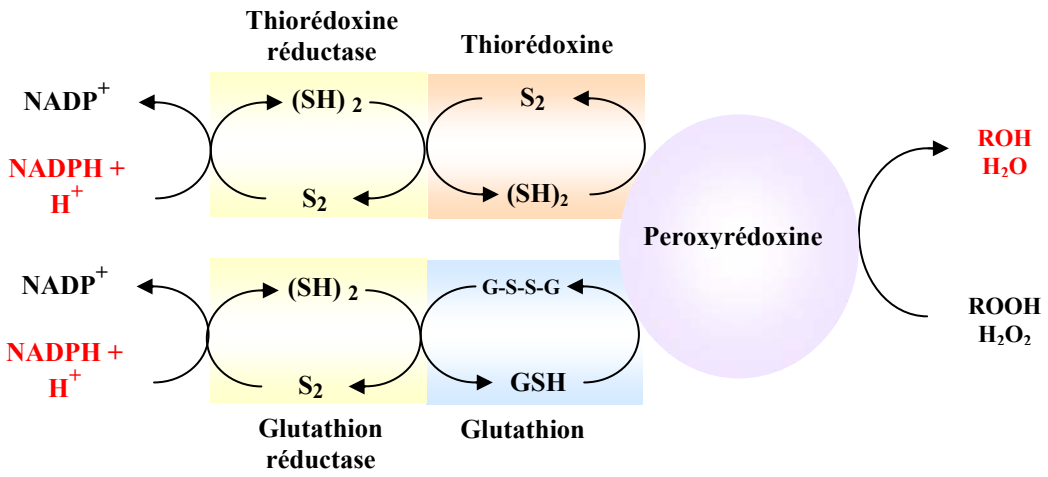


Figure 54: Schéma de la réaction de type peroxydase de la peroxyrédoxine

La peroxyrédoxine assure la détoxication du peroxyde d'hydrogène et des hydroperoxydes organiques en coordination avec les systèmes thiorédoxine/thiorédoxine réductase et glutathion/glutathion réductase.

III.D.2 Expression différentielle des thiorédoxines et rôle putatif dans la réponse au stress

Parmi les 4 représentants de la famille thiorédoxines étudiés, seule la thiorédoxine-like (THX1) et la peroxyrédoxine-like 5 (THX4) sont induites par l'application d'oligoguluronates. La Trx et Prx sont surexprimées à 3 heures d'un facteur 16 et 4 respectivement, avant de revenir à leur niveau d'expression de base, voire être réprimées.

Le rôle de la péroxyredoxine putative dans les réponses de défense de *L. digitata* semble évident en raison de son activité peroxydase. Elle serait directement impliquée dans la gestion du stress oxydant en assurant la réduction du peroxyde d'hydrogène et des hydroperoxydes organiques (Dietz, 2003).

Trx et Grx qui catalysent la même réaction enzymatique de réduction des ponts disulfures ont été régulièrement tenues pour partager de nombreuses fonctions biologiques et constituer des systèmes redondants. Les thiorédoxines, comme les glutarédoxines, jouent un rôle important dans l'homéostasie redox cellulaire, et elles interviennent dans les processus de détoxication en régulant de nombreuses activités enzymatiques et en réparant certains dommages cellulaires (Meyer *et coll.*, 1999, Meyer *et coll.*, 2005). Un certain nombre d'études montre qu'elles possèdent toutefois des spécificités de fonctions, qui ne sont pas interchangeables (Rouhier *et coll.*, 2004). Chez *L. digitata*, les représentants Trx et Grx n'interviennent probablement pas dans les mêmes processus biologiques puisque seule la Trx est surexprimée au cours des réponses de défense.

Compte tenu de sa fonction catalytique putative et des données de la littérature, l'implication de THX1 dans les réponses de défense de *L. digitata* peut se faire à différents niveaux (Figure 55).

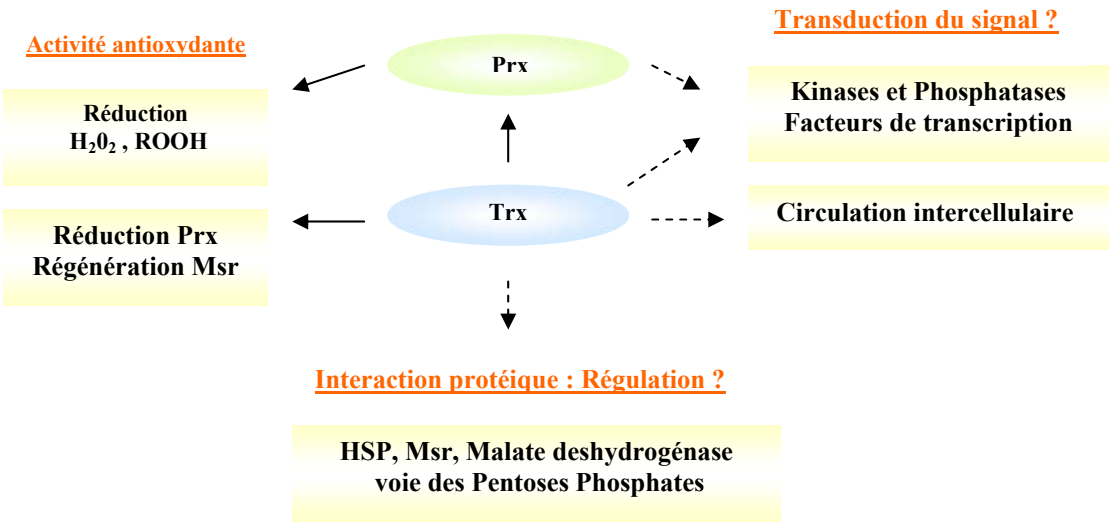


Figure 55: Rôle putatif des thiorédoxines et peroxyrédoxines dans les réponses de défense de *L. digitata*

La Trx peut tout d'abord jouer un rôle dans la réponse au stress oxydant. Il est cependant notable qu'au contraire des nombreuses études publiées chez les animaux et les bactéries montrant clairement l'implication des thiorédoxines au cours du stress oxydant (Nordberg et Arner, 2001), le rôle putatif des thiorédoxines dans ces réponses a été relativement peu adressé chez les plantes. Par ailleurs, relativement peu d'études indiquent la surexpression de gènes codant des Trx au cours d'interactions biotiques. La surexpression de la thiorédoxine cytosolique 5 d'*A. thaliana* a été démontrée suite à la blessure, à l'élicitation et au cours d'interactions incompatibles et compatibles avec des pathogènes bactériens et fongiques (Laloi *et coll.*, 2004b, Reichheld *et coll.*, 2002). Laloi *et coll.*, (2004) montrent également que la Trx 5 est induite dans de nombreuses conditions déclenchant un *burst* oxydant et que l'accumulation de Trx 5 colocalise avec les ions superoxydes. Toutefois, un rôle direct dans la détoxication des EAO n'est pas mis en évidence.

Compte tenu des données actuellement disponibles, les deux fonctions de la Trx dans la gestion du stress oxydant qui paraissent les plus vraisemblables chez *L. digitata* sont les suivantes. Une des ressources cellulaires de détoxication des EAO est constituée par le pool de méthionines protéiques, qui peuvent être oxydées aléatoirement. Les résidus sulfoxide méthionine générés ont ensuite besoin d'être rapidement reconvertis en méthionine afin de conserver l'intégrité des protéines. Les méthionines sulfoxides réductases (Msr) assurent cette reconversion et ce sont ensuite les Trx qui sont responsables de leur régénération sous forme réduite. En appui à cette hypothèse, il est intéressant de noter qu'un gène codant une Msr a été identifié par l'approche *macroarray*, comme étant surexprimé suite à l'élicitation par les oligoguluronates, bien que cette induction ne soit pas parfaitement reproductible d'un échantillon à l'autre. Un deuxième aspect de la contribution des Trx à la résistance au peroxyde d'hydrogène est leur rôle de donneur d'électrons aux peroxyrédoxines (Broin *et coll.*, 2002), qui sont quant-à-elles directement capables de détoxifier le peroxyde d'hydrogène. Dans notre étude, une peroxyrédoxine est également surexprimée en réponse aux oligoguluronates. L'activation des gènes codant ces deux protéines pourrait donc être corrélée.

L'induction de la Trx chez *L. digitata* suite à l'élicitation par les oligoguluronates peut également être liée à la nécessité de réguler l'activité de nombreuses activités enzymatiques et d'orienter le métabolisme vers des voies impliquées dans les réponses de défense. Les approches protéomiques menées ces dernières années ont nettement contribué à élargir les

fonctions putatives des thiorédoxines en isolant de nombreuses cibles de thiorédoxines (Meyer *et coll.*, 2005). Parmi les cibles identifiées, un certain nombre se trouve également être mis en évidence au cours de l'approche transcriptomique menée dans notre étude des réponses de défense de *L. digitata*. Il s'agit entre autres des HSP 70, des Msr, des Prx, de la malate deshydrogénase, ainsi que plusieurs enzymes de la voie des pentoses phosphates.

Un aspect intéressant des différents rôles putatifs attribués aux Trx chez les plantes mérite d'être mentionné dans le cadre de cette étude. Bien qu'elles ne possèdent pas de peptide signal d'excrétion, certaines Trx et Grx ont été localisées dans le phloème des plantes. Cette observation est d'ailleurs à mettre en parallèle avec l'excrétion directe des thiorédoxines dans le sang chez les mammifères. En raison de leur petite taille, les Trx seraient transportées au travers des plasmodesmes et pourraient alors circuler au sein de la plante (Meyer *et coll.*, 1999). Une telle circulation des Trx au sein des thalles de *L. digitata* est tout à fait envisageable. Elles pourraient alors jouer un rôle dans la transduction du signal en interagissant avec des récepteurs spécifiques grâce à leur propriété réductrice.

Enfin, chez les plantes, la localisation et l'activité de NPR1, qui est un régulateur clé de la SAR, sont conditionnées par la réduction de ponts disulfures intramoléculaires (Mou *et coll.*, 2003). De plus, NPR1 ne peut stimuler la fixation du facteur de transcription TGA1 sur les séquences promotrices des gènes de défense, que si les cystéines de ce dernier sont réduites (Despres *et coll.*, 2003). Ces résultats récents suggèrent que des disulfides oxydoréductases, telles que les Trx et Grx, pourraient réguler l'activité de ce facteur de transcription. Il a été montré très récemment que la Grx 480 d'*A. thaliana* est surexprimée au cours d'interaction compatible et incompatible et qu'elle interagit directement avec le facteur de transcription TGA (Ndamukong *et coll.*, 2007). Les auteurs n'ont cependant pas réussi à mettre en évidence que la Grx 480 était directement responsable de la réduction du facteur TGA, permettant ainsi son activation.

L'ensemble de ces études laissent envisager que les Trx, Grx et Prx pourraient participer aux défenses des plantes contre les pathogènes, non seulement par leur effet antioxydant, comme les peroxyrédoxines, mais aussi en intervenant dans la transduction du signal, notamment par la régulation directe de facteurs de transcription spécifiques. L'identification d'une thiorédoxine-like et d'une peroxyrédoxine-like comme marqueurs des

réponses de défense de *L. digitata* offre ainsi des candidats prometteurs à des études plus poussées sur la signalisation des réponses de défense

IV. Régulation transcriptionnelle liée au *burst* oxydant

Chez les plantes, la mise en place d'un *burst* oxydant précoce au cours des interactions hôte-pathogène incompatibles ou suite à l'application d'éliciteur est largement décrite. De nombreux rôles ont été attribués à cette réponse de défense précoce et ubiquiste : toxicité pour le pathogène ou mort cellulaire de la plante, avec mise en place de la réponse hypersensible, renforcement de la paroi par pontage oxydatif des glycoprotéines, peroxydation des lipides, dommages membranaires... Par ailleurs, certaines études soulèvent de plus en plus l'évidence d'un rôle signalétique des EAO dans l'activation des réponses de défense, notamment en association avec l'acide salicylique dans la mise en place de la résistance systémique acquise. La rapidité avec laquelle le péroxyde d'hydrogène est émis, ainsi que son caractère diffusible au travers de membranes suggèrent qu'il pourrait constituer un messager secondaire intra ou intercellulaire (Alvarez *et coll.*, 1998, Lamb et Dixon, 1997, Levine *et coll.*, 1994, Torres *et coll.*, 2006).

Grâce aux marqueurs moléculaires de défense identifiés, j'ai pu aborder la transduction du signal, consécutive à la reconnaissance des oligoguluronates, chez *L. digitata*, notamment en explorant le rôle du peroxyde d'hydrogène dans l'induction des gènes de défense. Une approche pharmacologique a été mise en place, affectant des événements cellulaires en amont ou en aval du *burst* oxydant. Différents inhibiteurs ont été étudiés au regard de leur effet sur l'émission du peroxyde d'hydrogène et sur l'expression des gènes de défense.

IV.A Dissection de la signalisation du *burst* oxydant par une approche pharmacologique

Les événements de signalisation intracellulaire conduisant à la production de peroxyde d'hydrogène suite à l'élicitation par les oligoguluronates ont été mis en évidence par Küpper *et coll.,* (2001) au moyen d'une approche pharmacologique (Figure 6, Introduction). J'ai dans

un premier temps testé les effets de différents inhibiteurs sur l'émission de peroxyde d'hydrogène, notamment pour vérifier la cascade de transduction du signal.

Parmi les inhibiteurs considérés, seul l'apigénine n'affecte pas la production d'H_2O_2. La staurosporine, le DPI et le vérapamyl entraînent une diminution partielle de l'émission d'H_2O_2, tandis que la quinacrine et la chlorpromazine inhibent complètement le *burst*. Au contraire, l'A9C augmente la production d'H_2O_2 (Tableau 11). Les effets inhibiteurs obtenus sur le *burst* oxydant de *L. digitata* induit par les oligoguluronates sont moins nets que ceux précédemment publiés, avec une diminution du H_2O_2 produit, plutôt qu'une inhibition totale et un effet opposé de l'inhibiteur de canaux anioniques (Küpper *et coll.*, 2001). Ceci peut s'expliquer par la variabilité biologique des plantules, par les conditions d'expérimentation qui peuvent être différentes, ainsi que par le pourcentage réel de pénétration des inhibiteurs testés.

Tableau 11 : Effet d'inhibiteurs sur le *burst* oxydant de *L. digitata* induit par les oligoguluronates

	Fonction	Concentration	Augmentation / Inhibition
Quinacrine	inhibiteur spécifique de flavoprotéine oxydases et non spécifique de phospholipase A2	20 µM	- 100 %
Chlorpromazine	inhibiteur non spécifique de phospholipase A2	20 µM	- 100 %
Verapamyl	antagoniste de canaux calciques	100 µM	- 77 %
Staurosporine	inhibiteur général de kinases	15 µM	- 40 %
DPI	inhibiteur spécifique de NADPH oxydase	10 µM	- 35 %
A9C	inhibiteur des canaux anioniques	100 µM	+ 30 %
Apigénine	inhibiteur général de MAP kinases	50 µM	0 %

A la suite de la perception des oligoguluronates, les événements cellulaires conduisant à la production de peroxyde d'hydrogène et à la mise en place du *burst* oxydant sont similaires à ceux décrits chez les plantes : événements de phosphorylation/déphosphorylation, activation de canaux, influx calcique, activation de phospholipase, activation d'une flavoenzyme, vraisemblablement une NADPH oxydase.

IV.B Mise en évidence de trois voies de signalisation conduisant à l'activation de la transcription

L'expression des marqueurs de défense a été déterminée par PCR Quantitative 3 heures après élicitation dans les algues témoins, les algues élicitées par les oligoguluronates et les algues élicitées préalablement traitées par les différents inhibiteurs (Figure 56). L'expression des gènes d'intérêt normalisée par l'actine, la tubuline et la protéine ribosomale L36 donne les mêmes résultats.

La grande disparité des réponses en fonction des traitements, mais également en fonction des gènes est tout à fait remarquable, d'autant plus qu'elle existe de manière très nette, même au sein d'une même famille de gène, comme par exemple celle des haloperoxydases (Figure 56). Par exemple, l'apigénine, un inhibiteur de MAP kinases qui agit donc bien en aval du *burst* oxydant dans la voie de signalisation, inhibe l'expression de v-IPO3, mais pas celle de v-BPO3.

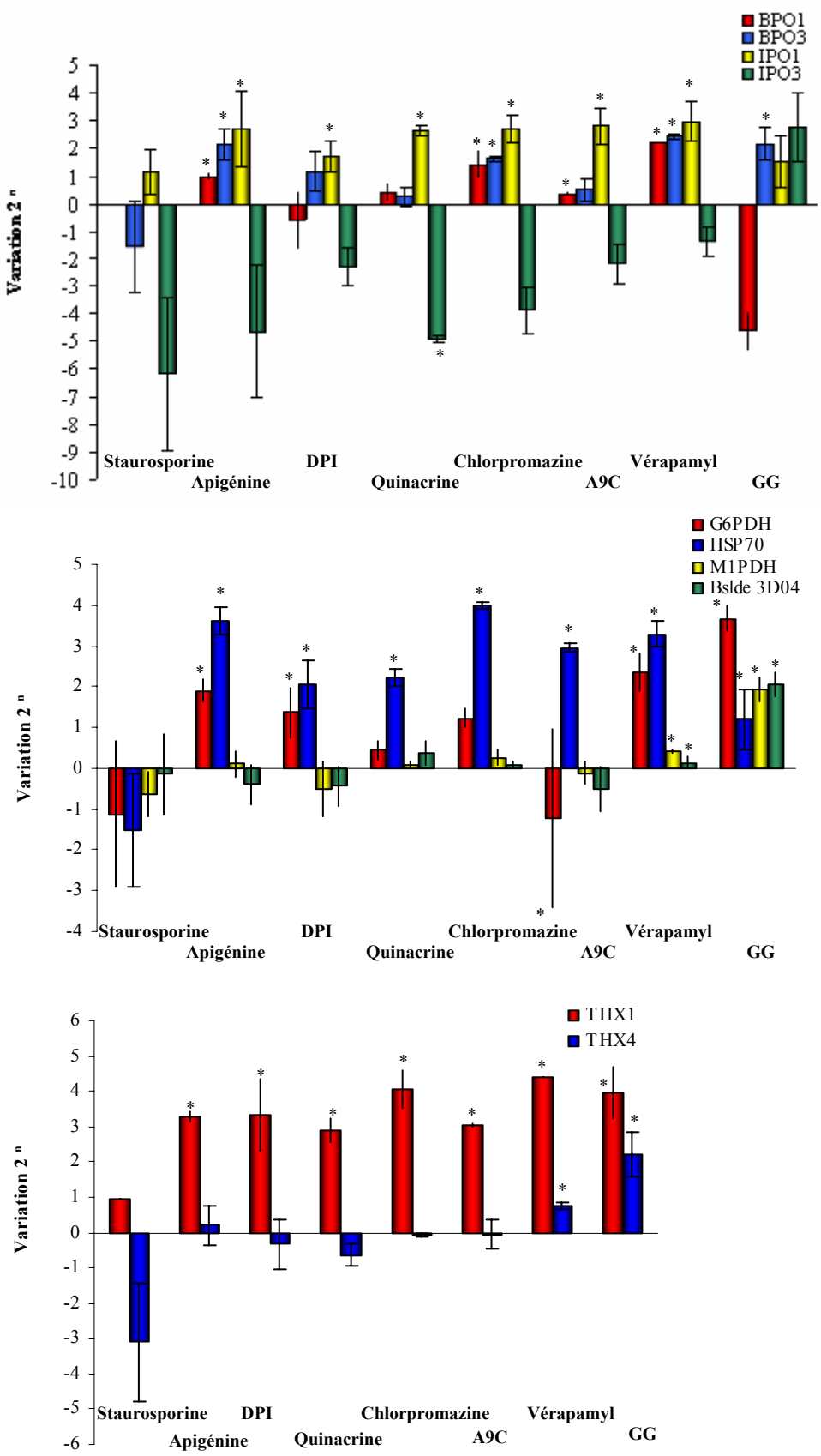


Figure 56: Altération de l'expression des gènes de défense induits par les oligoguluronates (150 µg/mL) suite à l'application d'inhibiteurs affectant le *burst* oxydant

Les valeurs d'expression, obtenue par PCR Quantitative représentent le log (base2) de la moyenne du triplicat biologique du ratio élicité/témoin après normalisation par l'actine. * Différence d'expression entre élicitée (prétraitée ou non avec un inhibiteur) et témoin validée statistiquement au risque α = 5 % par le test de la médiane et test de Cramer von Mises.

Cette approche pharmacologique du *burst* oxydant et de l'expression des gènes indique l'existence d'au moins 3 voies de signalisation distinctes conduisant à l'activation de la transcription des gènes de défense Les événements de signalisation et les différentes voies de transduction conduisant à l'activation des gènes mis en avant par ce travail sont modélisés dans la figure 57.

Les gènes codant THX1, HSP 70 et v-IPO1 sont les seuls dont l'expression n'est affectée que par la staurosporine, un inhibiteur général de kinases. L'induction de ces gènes est donc complètement indépendante du *burst* oxydant et nécessite très certainement des cascades de phosphorylation. De plus, leur induction ne semble pas impliquer de MAP kinases, dans la mesure où l'application d'apigénine n'a pas d'effet sur leur expression (Figure 57, voie A).

Au contraire, l'apigénine bloque l'expression des gènes codant la M1PDH, la v-IPO3, la THX4 et l'inconnu Bslde 3D04. La régulation de ces gènes est donc soumise à une voie de MAP kinases, ce qui ne semble pas être le cas des autres marqueurs de défense considérés. De plus, l'expression de ces gènes est bloquée par les inhibiteurs situés en amont du *burst* oxydant, notamment par le DPI, qui inhibe la NADPH oxydase, directement responsable de la production du peroxyde d'hydrogène. L'induction de ces gènes est donc dépendante d'une voie de signalisation où le peroxyde d'hydrogène joue un rôle messager clé (Figure 57, voie B).

Les gènes codant v-BPO3 et G6PDH ont un profil d'expression selon les traitements inhibiteurs plus complexe que les autres marqueurs de défense. Le peroxyde d'hydrogène pourrait jouer un rôle dans leur induction, mais le fait que la chlorpromazine et le verapamyl, qui suppriment quasi totalement l'émission de peroxyde d'hydrogène, affectent peu ou pas leur expression, laisse supposer que des voies de signalisation parallèles doivent également intervenir dans leur régulation (Figure 57, voie C).

Enfin, le gène codant v-BPO1 est le seul marqueur considéré dans cette étude dont l'expression est réprimée par l'élicitation. Bien que son profil d'expression après l'application des différents traitements ne soit pas très net, il semblerait qu'une diminution partielle ou totale du *burst* oxydant lève la répression de ce gène. Le peroxyde d'hydrogène pourrait donc être un messager dans la transduction du signal conduisant à la répression de v-BPO1. De plus, la répression de ce gène pourrait passer par une voie de MAP kinase, car l'application d'apigénine restaure l'expression de v-BPO1, même en présence de péroxyde d'hydrogène (Figure 57, voie B).

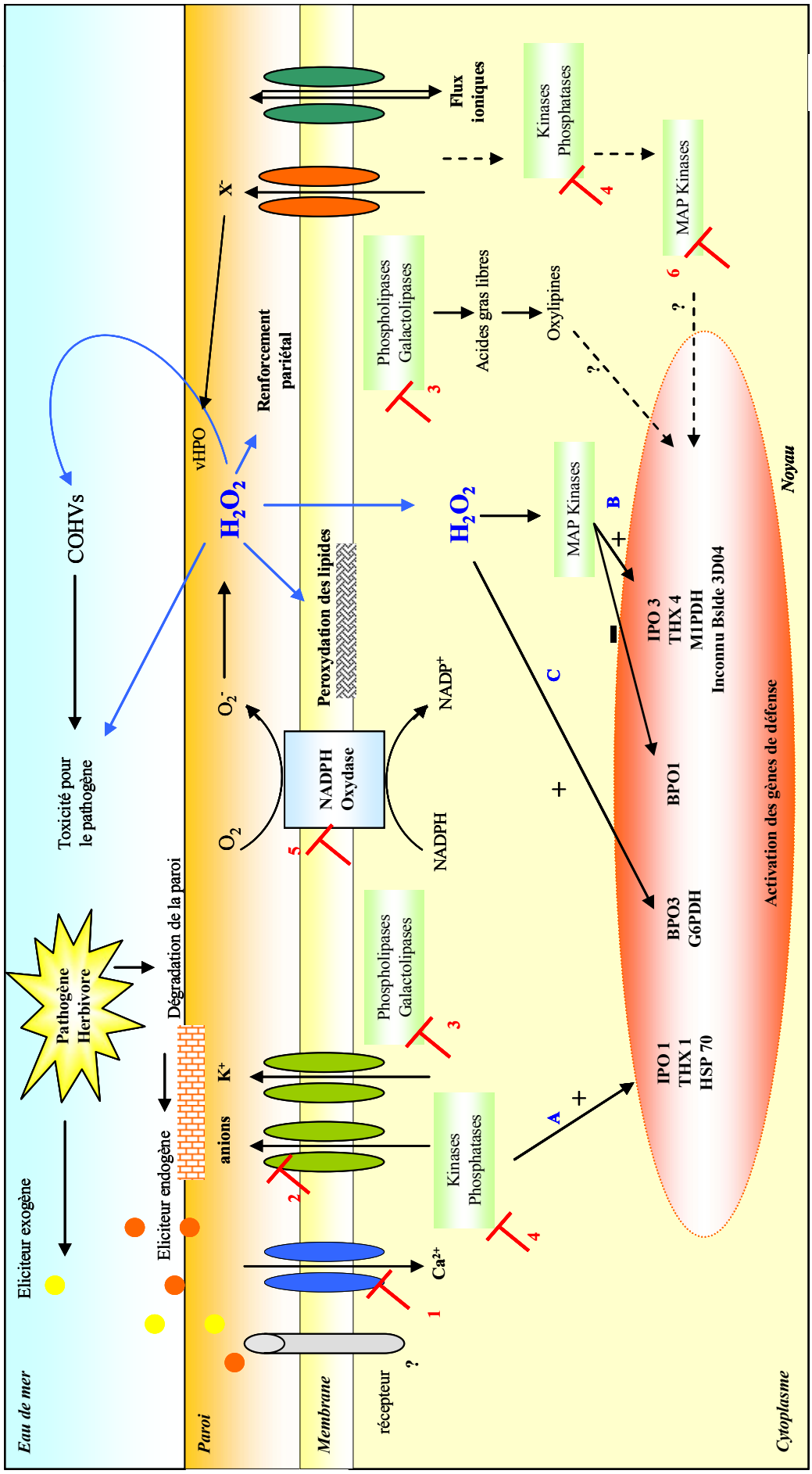


Figure 57 : Modélisation hypothétique de la signalisation intracellulaire, consécutive au burst oxydant, conduisant à l'activation des gènes de défense

Approche pharmacologique permettant d'accéder aux voies de signalisation intracellulaire 1) A9C, antagoniste des canaux calciques 2) Verapamyl, inhibiteur des canaux anioniques 3) Chlorpromazine, inhibiteur de la phospholipase A2 4) Staurosporine, inhibition des kinases 5) DPI, inhibiteur de la NADH oxydase et Quinacrine, inhibiteur de flavoenzyme oxydases 6) Apigénine, inhibiteur de MAP kinases.
Mise en évidence d'au moins 3 voies de signalisation conduisant à l'activation de la transcription des gènes de défense : A) Kinases dépendante B) H_2O_2 et MAPK dépendante C) H_2O_2 dépendante

Ces résultats illustrent la complexité et la diversité des événements de signalisation intracellulaire conduisant à l'activation des gènes et à la mise en place des réponses de défense.

IV.C Une voie de signalisation déterminée en fonction du type de gènes considéré ?

Chez les plantes supérieures, il est montré qu'en inhibant la production du peroxyde d'hydrogène par l'utilisation d'inhibiteurs de NADPH oxydase, tel que le DPI, ou en facilitant son élimination par surexpression des gènes codant la catalase ou l'ascorbate peroxydase, que le peroxyde d'hydrogène active la transcription de certains gènes de défense.

Par exemple, chez les cellules de soja, l'application exogène d'H_2O_2 provoque une légère accumulation des transcrits codant la phénylalanine ammonia-lyase et la chalcone synthase, dans des quantités égales à celles induites par un éliciteur fongique, alors qu'il provoque une rapide induction de ceux codant les GST, glutathion peroxydase et polyubiquitine. L'inhibition du *burst* oxydatif par l'application de DPI en amont de l'élicitation des cellules, tout comme l'application de catalase, perturbent la surexpression des GST, mais pas de la PAL (Levine *et coll.*, 1994). Ainsi, chez le soja, le péroxyde d'hydrogène induit l'expression des gènes de protection cellulaire, mais pas des gènes de défense proprement dits, comme ceux impliqués dans la synthèse des phytoalexines.
Dans une approche comparable chez *Arabidopsis*, il est montré que le péroxyde d'hydrogène induit la PAL, mais pas l'athranilate synthase, responsable chez cette plante de la biosynthèse des phytoalexines (Desikan *et coll.*, 1998). Desikan *et coll.,* (1998) confirment que le peroxyde d'hydrogène régule l'expression de certains gènes de défense, mais pas ceux impliqués dans l'induction de la biosynthèse des phytoalexines. Orozco-Cardenas *et coll.,* (2001) ont également mis en évidence une régulation ciblée de certains gènes par le peroxyde d'hydrogène en réponse à des éliciteurs mimant la blessure chez la tomate. Les gènes impliqués dans la signalisation, comme l'allene oxyde synthase, la lipoxygénase et la prosystémine sont induits dans les 30 minutes avec une expression maximale à 4 heures et ne sont pas affectés par le DPI. Au contraire, les gènes impliqués directement dans la défense, comme les protéines inhibitrices de protéases et la polyphenol oxydase, exprimés normalement à partir de 4 heures, avec une expression maximale à 12 heures, sont totalement

réprimés (Orozco-Cardenas *et coll.*, 2001). Chez la tomate, au contraire des résultats obtenus chez le soja, le peroxyde d'hydrogène est un messager secondaire pour l'induction des gènes de défense, mais pas pour les gènes impliqués dans la signalisation.
D'après les données actuelles de la littérature chez les plantes supérieures, il apparaît ainsi que les gènes régulés par le peroxyde d'hydrogène sont de nature variée et dépendent des systèmes étudiés. De plus, il a été montré que l'induction de certains gènes de défense fait appel à plusieurs voies de signalisation indépendantes, comme par exemple pour les GST (Desikan *et coll.*, 1998, Sharma *et coll.*, 1996).

Chez *L. digitata*, l'expression des gènes de défense codant les v-BPO1, v-IPO3, THX4, M1PDH et inconnu Bslde 3D04 nécessite la mise en place d'un *burst* oxydant avec production de peroxyde d'hydrogène, tandis que l'activation des gènes codant les THX1, HSP 70 et v-IPO1 est totalement indépendante de cette production. Le manque de données fonctionnelles concernant le rôle de ces différents gènes dans les réponses de défense de *L. digitata* ne permet pas pour l'instant d'établir une séparation logique entre les gènes, comme cela a été proposé dans les études menées chez les plantes supérieures. L'induction des gènes codant les v-BPO3 et G6PDH semble être partiellement liée à la production de peroxyde d'hydrogène, mais pas de manière aussi exclusive que les autres marqueurs de défense. Pour ces gènes en particulier, plusieurs voies de signalisation parallèles et indépendantes doivent être envisagées.

L'approche pharmacologique autour du *burst* oxydant de *L. digitata* montre que l'activation des gènes de défense passe par au moins trois voies de signalisation différentes. Elle montre aussi que le peroxyde d'hydrogène est nécessaire à l'activation de certains gènes. Comme cela a été proposé pour les plantes (Lamb, 1994), il existe donc chez *L. digitata* un réseau de régulation très fin conduisant à l'activation des gènes de défense, avec des embranchements très précoces, qui permettent une grande flexibilité des réponses de défense selon les conditions.

CONCLUSIONS
&
PERSPECTIVES

Conclusions & Perspectives

Mon travail de thèse avait pour objectif d'étudier la régulation du transcriptome de *L. digitata* en réponse à l'élicitation par les oligoguluronates dans le but d'identifier des marqueurs moléculaires des réponses de défense et de disséquer les voies de signalisation conduisant à la mise en place de ces réponses. Il représente la première analyse du transcriptome chez une algue brune dans le contexte d'une interaction hôte-pathogène mimée par un éliciteur.

- A partir des données EST disponibles au laboratoire, j'ai développé des outils des études transcriptomiques globales. D'une part, j'ai construit un filtre "dédié stress" et mis au point les procédures d'hybridation et d'analyse de *macroarrays*. Ces filtres sont désormais disponibles pour mener d'autres études transcriptomiques chez *L. digitata*. D'autre part, j'ai transposé la technique de PCR Quantitative à l'étude de l'expression des gènes chez *L. digitata*.
- Le développement de ces outils a permis d'identifier une dizaine de gènes impliqués dans la mise en place des réponses de défense de *L. digitata*, comme certains membres de la famille des haloperoxydases, des thiorédoxines et de la voie des pentoses phosphates, ainsi que la mannitol-1-phosphate deshydrogénase et un gène de fonction inconnue 'Bslde 3D04', en cours de caractérisation.
- Ces marqueurs moléculaires ont été utilisés dans une approche pharmacologique qui a conduit à la première modélisation de la signalisation intracellulaire conduisant à l'activation des gènes impliqués dans les réponses de défense chez *L. digitata*. Le peroxyde d'hydrogène joue un rôle important dans la transduction du signal, qui s'avère par ailleurs complexe, comprenant plusieurs voies distinctes (Figure 57).
- Enfin, mon travail de thèse souligne l'implication du métabolisme halogéné dans les réponses de défense, en démontrant l'expression différentielle des gènes codant les haloperoxydases. Il apporte de plus les premières preuves expérimentales que les différents

membres de la famille des haloperoxydases ont évolué vers des fonctions biologiques spécifiques.

En conclusion, les résultats acquis au cours de mon travail de thèse ont permis de progresser significativement sur la compréhension des mécanismes moléculaires et de la signalisation intracellulaire aboutissant à la mise en place de la résistance chez *L. digitata* (Figure 58).

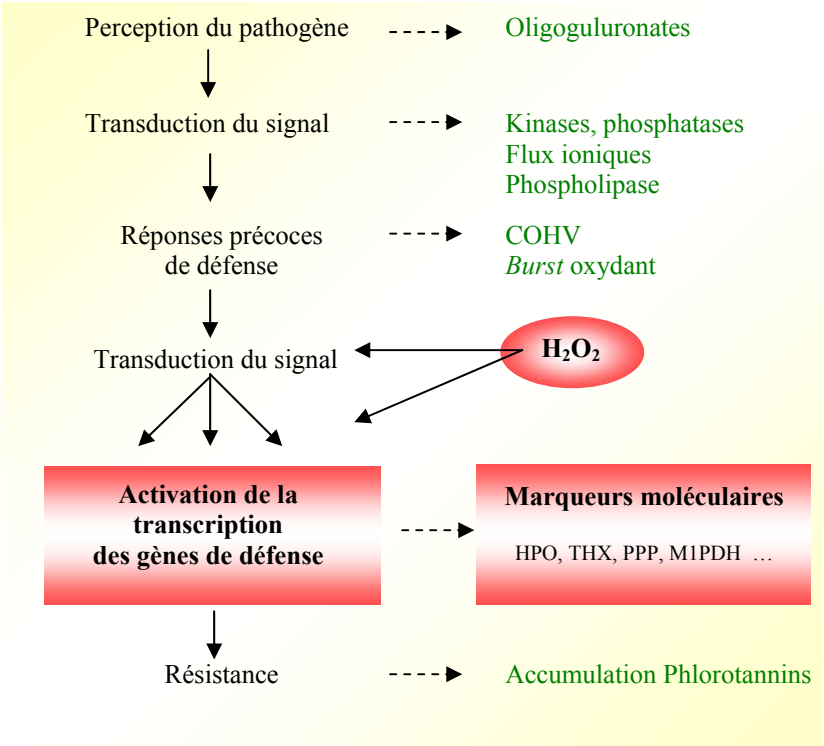


Figure 58 : Positionnement des résultats acquis au cours de ma thèse dans la signalisation aboutissant à la résistance de *L. digitata*

HPO : haloperoxydases, THX : thiorédoxines, PPP : voie des pentoses phosphates, M1PDH : mannitol-1-phosphate deshydrogénase.

Mon travail de thèse suscite également de multiples réflexions quant aux approches méthodologiques et aux questions biologiques, notamment sur la singularité des défenses des algues brunes, avec une gestion tout à fait originale du stress oxydant et un métabolisme halogéné actif, ainsi que sur la conservation des mécanismes de défense entre phylum. Il

ouvre de nombreuses perspectives dans l'étude des interactions hôte-pathogène chez les macroalgues marines.

I. Approches transcriptomiques des défenses chez les macroalgues

Jusqu'à l'acquisition récente des données génomiques chez les algues, l'étude de la régulation du transcriptome dans le contexte d'interactions algue-pathogène ne pouvait pas être envisagée. A partir des données génomiques, les possibilités de déduire des voies métaboliques ou de signalisation potentiellement impliquées dans les défenses sont toutefois limitées par la quantité relativement faible de séquences identifiées dans les banques, de l'ordre de 40 %.

L**es outils d'analyse du transcriptome**, tels que SSH, macro ou microarray et PCR Quantitative, **sont des outils puissants pour la compréhension des réponses de défense, comme le montrent leur développement et leur mise en œuvre au cours de mon travail de thèse**. A la lumière des résultats obtenus, l'impossibilité de réaliser un décryptage exhaustif du transcriptome ne s'est pas révélée être un handicap compte tenu des objectifs visés.

Le choix arbitraire de 96 gènes, annotés pour leur potentielle implication dans les réponses de défense, est apparu pertinent pour identifier des marqueurs permettant d'étudier la régulation de l'expression génique mise en œuvre au cours de ces réponses et ouvrant de nouvelles perspectives dans l'étude des interactions hôte-pathogène chez les algues. Des approches plus globales sur des données génomiques seront nécessaires pour affiner l'identification de gènes de défense débutée au au cours de ma thèse, à la condition de pouvoir valider la fonction putative des gènes caractérisés.

Afin de progresser dans l'étude des interactions biotiques chez les algues, particulièrement au niveau moléculaire, il devient maintenant nécessaire de développer des modèles et des systèmes hôte-pathogène compatibles avec les outils génomiques et génétiques. Parmi les algues modèles potentielles, l'algue brune filamenteuse *E. siliculosus* a finalement été choisie (Peters *et coll.*, 2004). Des outils de génétique sont en cours de développement, tels que la mutagénèse, la transformation, le RNAi, qui devraient permettre d'adresser finement les voies métaboliques et les marqueurs moléculaires de défense des

algues. Le génome d'*E. siliculosus* désormais séquencé, est en cours d'annotation dans notre groupe. Il apporte déjà de nombreuses informations sur les voies métaboliques présentes chez les algues brunes. Par ailleurs, une puce oligonucléotides est en cours de fabrication et il pourrait être envisagé de réaliser une hybridation hétérologue avec des ARNm extraits de *L. digitata* afin d'élargir les réponses transcriptionnelles de la défense.

L'intégration de toutes ces approches avec des approches de profilage métabolique, comme celle que j'ai pu initier sur les métabolites iodés, devra contribuer à une meilleure compréhension globale des réponses de défense chez les algues marines.

II. La gestion du stress oxydant chez *L. digitata*

L'absence de gènes codant les enzymes anti-oxydantes classiques dans les différentes banques EST de *L. digitata* ou dans d'autres banques d'algues brunes, produites à partir d'algues stressées a généré un certain nombre d'interrogations sur la manière dont les algues brunes gèrent le stress oxydant (voir paragraphe Introduction IV.B.3). Les résultats acquis au cours de ma thèse apportent des pistes intéressantes dans l'élucidation des mécanismes par lesquels *L. digitata* fait face au stress oxydant.

II.A Une gestion du stress oxydant originale

J'ai tout d'abord montré que des systèmes thiorédoxine like et peroxyrédoxine sont activés au niveau transcriptionnel suite à l'élicitation. Ces deux enzymes sont très fortement impliquées dans la détoxication des EAO, notamment la peroxyrédoxine, qui est une glutathion peroxydase un peu particulière. Chez les mammifères, les glutathion peroxydases ont d'ailleurs un rôle très important dans la plupart des tissus où elles assurent l'élimination de la quasi-totalité du peroxyde d'hydrogène. **Chez l'algue brune *L. digitata*, thiorédoxines et peroxyrédoxines, associées aux haloperoxydases, pourraient donc représenter une voie enzymatique préférentielle de détoxication des EAO par rapport aux enzymes anti-oxydantes classiques observées chez les plantes**. Au contraire des haloperoxydases,

l'activité des systèmes thiorédoxines like et peroxyrédoxine est totalement dépendante du NADPH, sans lequel, les enzymes ne peuvent se régénérer.

J'ai mis ensuite en évidence que **la voie des pentoses phosphates est fortement impliquée dans les réponses de défense de *L. digitata***, dans la mesure où les gènes codant les enzymes principales et limitantes, la glucose-6-phosphate deshydrogénase et la 6-phosphogluconate deshydrogénase sont nettement surexprimés. Cette induction peut être directement liée à **l'alimentation de la NADPH oxydase en NADPH afin de mettre en place le *burst* oxydant. La nécessité de fournir un pouvoir réducteur important aux cellules**, afin de réaliser les nombreuses réactions d'oxydoréduction des différentes voies métaboliques activées suite au stress, est certainement aussi l'une des raisons justifiant l'activation de la voie des pentoses phosphates. L'activation de cette voie peut donc être directement liée à la gestion du stress oxydant, en fournissant le NADPH aux systèmes thiorédoxines et peroxyrédoxines. La voie des pentoses phosphates pourrait également participer à la réalimentation du pool de métabolites antioxydants en fournissant le NADPH nécessaire à leur réduction.

Chez les algues brunes, il existe au moins deux métabolites antioxydant majeurs, qui du fait de leur abondance, peuvent jouer un rôle important dans les processus de détoxication, ce sont le mannitol et les pigments photosynthétiques de la famille des carotenoïdes. **Le mannitol** peut représenter 30 % du poids sec de l'algue (Reed et Stewart, 1985) et de ce fait, **il pourrait constituer une voie de détoxication des EAO, originale et propre aux algues brunes**.

Mon travail met en avant un argument important en faveur du rôle antioxydant du mannitol chez *L. digitata*. Le gène codant **la mannitol-1-phosphate deshydrogénase** est l'un des gènes dont l'induction est la plus forte suite à l'élicitation. **En diminuant le pool de mannitol, par activation de la M1PDH, la cellule diminuerait sa capacité à détoxifier les EAO et permettrait ainsi au peroxyde d'hydrogène de jouer son rôle de messager**, conduisant entre autres à l'activation des gènes de défense. L'intervention du peroxyde d'hydrogène comme messager conduisant à la régulation de certains gènes soutiendrait cette hypothèse.

Toutefois, le rôle anti-oxydant du mannitol reste à démontrer compte tenu des fortes variations saisonnières de sa concentration chez *L. digitata* (Haug et Jensen, 1954).

Les algues brunes, dont fait partie *L. digitata*, présentent aussi des voies conservées avec les plantes et les animaux dans la gestion du stress oxydant, comme l'implication des systèmes thiorédoxines et peroxyrédoxine. Cependant, elles auraient tiré partie de leur environnement marin pour développer des systèmes de détoxication originaux des espèces activées de l'oxygène.

Elles sont capables de concentrer les halogénures de l'eau de mer, notamment l'iodure de façon très efficace. L**'iode pourrait constituer chez *L. digitata* un pool anti-oxydant majeur**, rapidement remobilisable, puisqu'il est stocké au niveau de la paroi à la surface du thalle. Plusieurs études mettent en effet en évidence un lien étroit entre les mouvements d'iode et le stress oxydant (voir paragraphe Introduction III.C.1). Le peroxyde d'hydrogène diffuse facilement vers l'extérieur de la cellule et sa gestion dans l'apoplasme serait ainsi facilitée par les fortes concentrations en iode qui y règne.

II.B Perspectives

Dans ce contexte, il convient de préciser si *L. digitata* possèdent les gènes codant les enzymes anti-oxydantes classiques. Les banques EST produites n'ayant pas permis de les identifier, des approches PCR à partir d'oligonucléotides dégénérés pourraient rapidement donner des résultats, dans la mesure où ces gènes sont relativement bien conservés. Les nombreuses séquences disponibles dans les banques EST d'*E. siliculosus* et la récente acquisition de son génome devraient faciliter la définition de ces oligonucléotides et l'identification des gènes homologues chez *L. digitata*. Une fois ces gènes identifiés, leur expression suite à l'élicitation par les oligoguluronates pourra être déterminée par PCR Quantitative, afin de vérifier l'hypothèse d'une éventuelle répression au cours du stress.

Parmi les activités anti-oxydantes identifiées dans les banques, il faut citer les méthionines sulfoxydes réductases, thiorédoxines, glutarédoxines et peroxyrédoxines, dont les activités au cours du stress oxydant sont partiellement liées. Trx, Grx et Prx sont codées par des familles multigéniques chez les autres organismes, ont des localisations subcellulaires différentes et bien qu'au sein d'une famille elles puissent partager un certain nombre de fonctions, des spécificités existent. Au cours de ma thèse, je n'ai caractérisé partiellement qu'un seul représentant de Trx, Grx et Prx. Il est nécessaire d'une part d'achever la caractérisation moléculaire de ces gènes, entre autres de la Grx, dont la séquence reste

incomplète, d'autre part d'identifier d'autres membres de ces familles et enfin de déterminer leur implication dans les réponses de défense. Ce travail est d'autant plus intéressant à réaliser que les Trx et Prx identifiées présentent des séquences originales, proche des archébactéries et des animaux en ce qui concerne la Trx. Par ailleurs, des études assez récentes suggèrent que les Prx et glutathion peroxydases, particulièrement celles qui sont peu abondantes et non exprimées au cours du stress oxydant, sont des senseurs à peroxyde d'hydrogène. Une fois oxydées, elles activent des facteurs de transcription spécifiquement impliqués dans l'induction de gènes de défense (Ndamukong *et coll.*, 2007, Toledano *et coll.*, 2004). La Grx de *L. digitata* qui n'est pas induite par les oligoguluronates pourrait ainsi représenter un candidat 'senseur de peroxyde d'hydrogène' et être impliquée dans la signalisation aboutissant à la transcription des gènes de défense.

Ensuite, ce travail de thèse met en avant l'activation de la voie des pentoses phosphates dans les réponses de défense. Contrairement à ce qui a été déjà publié, j'ai montré la présence d'au moins deux isoformes de 6PGDH chez *L. digitata*, et que seule l'une d'entre elles est spécifiquement impliquée dans la réponse au stress. Tout d'abord, un southern blot devrait valider l'existence de ces deux gènes. Des approches de 5'RACE-PCR ont débuté pour obtenir l'ADNc complet de la 6PGDH-2. La caractérisation moléculaire complète de 6PGHD-2 devrait indiquer s'il existe entre autres en N-terminal un peptide d'adressage plastidial, permettant de distinguer les deux isoformes classiquement identifiées chez les plantes.

Enfin, pour tester la possibilité que le mannitol, en plus de son rôle osmotique, puisse jouer un rôle d'antioxydant chez *L. digitata*, des dosages de mannitol, de mannitol-1-phosphate et/ou de fructose-6-phosphate devraient être réalisés afin d'évaluer l'évolution du pool antioxydant de mannitol. Il est également nécessaire de rechercher plus finement dans les banques disponibles, les gènes codant les enzymes à activité non réversible impliquées dans le catabolisme ou la biosynthèse du mannitol. L'étude de leur expression suite à l'élicitation permettra de mettre en évidence sans ambigüité si le métabolisme du mannitol au cours des réponses de défense est de type biosynthèse ou catabolisme.

III. Originalité d'un métabolisme halogéné actif impliqué dans les réponses de défense

Chez *L. digitata*, la production d'iode moléculaire et de COHV est associée au stress oxydant déclenché par de nombreux facteurs abiotiques et biotiques (Palmer *et coll.*, 2005). Les haloperoxydases dépendantes du vanadium, codées par des familles multigéniques, catalyseraient la formation de cet iode moléculaire et assureraient la synthèse des COHV en présence de peroxyde d'hydrogène et d'halogénures (Leblanc *et coll.*, 2006). Les algues auraient mis à profit la teneur en halogènes particulièrement importante de leur environnement pour développer des activités haloperoxydases conduisant à la production de composés halogénés toxiques (voir paragraphe Introduction III.C).

III.A v-BPO3 et v-IPO3, mise en évidence du lien entre métabolisme de défense et métabolisme halogéné

Mon travail de thèse met en avant plusieurs aspects de l'implication du métabolisme halogéné dans les défenses actives de *L. digitata*.

Au cours de cette étude transcriptomique, j'ai montré qu'il existe des différences d'expression parmi les gènes codant les haloperoxydases suite à l'élicitation par les oligoguluronates. En effet, v-IPO3 et v-BPO3 représentent des formes d'haloperoxydases exclusivement et spécifiquement induites au cours des réponses de défense. Les gènes qui les codent sont par conséquent des marqueurs moléculaires de choix dans l'étude des réponses de défense de *L. digitata*.

Le temps nécessaire à la surexpression des gènes codant v-IPO3 et v-BPO3 suggère que le premier rôle physiologique lié à la régulation de ces enzymes pourrait être la production de composés organiques halogénés, volatils ou non, impliqués dans les réponses de défense. Un rôle dans l'émission d'iode moléculaire ou la détoxication des EAO est peu probable en raison du caractère précoce, voire immédiat de ces deux phénomènes. Au contraire, v-IPO1 et v-BPO1 seraient responsables du métabolisme halogéné basal et pourraient être de fait impliquées dans ces fonctions biologiques. Par ailleurs, v-IPO1 serait impliquée dans l'accumulation d'iode dans les parois, tandis que v-IPO3 pourrait jouer un

rôle déterminant dans la reconstitution spécifique du stock d'iode au cours des réactions de défense.

Enfin, mes résultats indiquent clairement que les gènes codant différents membres de la famille des haloperoxydases ne sont pas induits par les mêmes voies de signalisation intracellulaires, ce qui constitue un argument supplémentaire en faveur d'une spécialisation et d'une régulation spatio-temporelle fine de ces enzymes.

L'ensemble de ces résultats apporte la première preuve expérimentale que **les différents membres de la famille des haloperoxydases ont vraisemblablement évolué vers des fonctions distinctes spécialisées, dont la défense chimique**. Etant donné l'importance de ces familles, d'autres membres, non encore identifiés, pourraient être impliqués plus spécifiquement dans l'absorption d'iode ou le renforcement pariétal.

J'ai également montré que *L. digitata* produit naturellement une grande quantité de métabolites iodés non volatils et peu, voire pas, de métabolites bromés. Cette nature des composés halogénés est très certainement liée à la concentration de l'iode par *L. digitata*. Des expériences préliminaires semblent indiquer que les laminaires sont le siège d'une **augmentation de la biosynthèse des composés iodés non volatils** suite à l'élicitation par les oligoguluronates. Ces métabolites pourraient former **un arsenal chimique de défense**, pouvant être libéré à la surface du thalle, à la manière des furanones halogénées chez *D. pulchra*, mais ils pourraient aussi jouer un rôle dans la communication chimique à distance.

Un état de potentialisation des algues sauvages par rapport aux algues de culture est suggéré par leur différence de réponse transcriptionnelle suite à l'élicitation. Cette capacité accrue à activer les réponses de défense pourrait être directement liée à la génération de **composés halogénés volatils**, qui **pourraient être les messagers d'une communication chimique inter-algue**. Cette hypothèse, si elle s'avère exacte, renforce fortement le rôle essentiel du métabolisme halogéné dans les interactions hôte-pathogène chez les algues marines.

III.B Perspectives

Les résultats acquis au cours de ma thèse sur le rôle du métabolisme halogéné dans les réponses de défense de *L. digitata* ouvrent des perspectives quant à la spécialisation des

fonctions biologiques des haloperoxydases et la mise en évidence du rôle toxique direct des métabolites halogénés produits, ainsi qu'en ce qui concerne la communication chimique.

L'approche transcriptomique menée au cours de ce travail doit être complétée par des approches fonctionnelles et métaboliques afin de confirmer la spécialisation des fonctions des haloperoxydases et de corréler l'expression de réseaux de gènes de défense avec le métabolisme halogéné.
La possession d'un inhibiteur des haloperoxydases ou mieux encore, capable de discriminer les v-BPO et v-IPO, permettrait d'élucider la fonction biologique de ces enzymes. Malheureusement, malgré les efforts menés au cours de la thèse d'E. Verhaeghe (CEA, Saclay) et l'importance de la chimiothèque criblée, aucun inhibiteur n'a pu être identifié. De plus, bien qu'ils soient en cours de développement au laboratoire, aucun outil génétique n'est actuellement disponible chez les macroalgues pour réaliser de l'extinction de gène. Une collaboration a été mise en place avec l'équipe de Jean Paul Cadoret de l'IFREMER afin de réaliser l'expression hétérologue d'haloperoxydase de *L. digitata* chez la diatomée *P. tricornutum.* Une autre démarche possible aujourd'hui pour confirmer le rôle biologique putatif de v-IPO3 et étudier la spécificité biochimique des v-HPO est d'analyser et de comparer les profils des COHV émis et des composés iodés intracellulaires produits après élicitation, lorsque le *burst* oxydant est bloqué ou non par l'usage d'inhibiteurs.

Les expériences préliminaires mettant en évidence la richesse de composés iodés intracellulaires n'ont pas pu être poursuivies au cours de cette thèse. La caractérisation chimique de ces métabolites relève pourtant d'un intérêt majeur afin d'établir leur rôle biologique. Leur potentielle implication dans les réponses de défense devrait être évaluée, soit comme composé à activité directement toxique pour les agresseurs, soit comme médiateurs de la communication chimique.

Bien que le potentiel biocide des COHV soit communément admis, peu d'études le prouvent réellement. Il semble essentiel de tester l'impact des différents COHV émis, entre autres suite à l'élicitation par les oligoguluronates, sur les bactéries épiphytes, en qualité de toxicité, de croissance et de comportements bactériens (essaimage, formation des biofilms …). Cet aspect devrait être abordé au cours de la thèse de Stéphanie Salaün dans notre équipe, qui étudie les bases physicochimiques et moléculaires de l'épiphytisme bactérien chez *L. digitata.*

IV. Immunité innée

Bien que les études des interactions hôte-pathogène chez les algues marines n'en soient qu'à leur début, avec presque dix années de recul, la très grande similitude des mécanismes de défense avec les plantes et les animaux est tout à fait remarquable.

IV.A Conservation des mécanismes de défense et communication à distance

Tout d'abord la perception du pathogène passe par la reconnaissance d'éliciteur endogène ou exogène et la notion de PAMP est très certainement applicable aux algues marines (Leblanc *et coll.*, 2006, Potin *et coll.*, 2002). Ensuite, les séquences d'événements consécutives à la perception du pathogène ou de l'éliciteur sont conservées : phosphorylation et déphosphorylation des protéines, influx calciques, dépolarisation membranaire, flux de protons, alcalinisation extracellulaire et acidification cytoplasmique, et activation de MAP kinases. La production d'espèces activées de l'oxygène au travers d'un *burst* oxydant est très généralement mise en évidence, avec conservation de la machinerie enzymatique, en particulier avec l'implication d'une NADPH oxydase (Hervé *et coll.*, 2006). Parmi les voies de signalisation intracellulaire, l'activation du métabolisme oxydatif des acides gras commence à être bien décrite chez les algues ainsi que l'implication d'hydroperoxydes et du MeJA dans l'activation des gènes de défense (Bouarab *et coll.*, 2004, Collèn *et coll.*, 2006a, Hervé *et coll.*, 2006). Quant aux réponses de défense proprement dites, on retrouve la production de composés toxiques avec l'émission de COHV, ainsi que l'activation de la voie des phénylpropanoïdes et la synthèse de composés phénoliques.

Mon travail de thèse représente la première étude du transcriptome chez une algue brune dans le contexte d'une interaction hôte-pathogène. Elle se distingue des études menées par Collèn *et coll.*, (2006a) et Hervé *et coll.* (2006) sur l'algue rouge *C. crispus* car elle est basée sur l'application d'un éliciteur qui provient directement de la dégradation de la paroi de l'algue par l'agent pathogène. Bien que cette étude ait été menée sur une échelle relativement restreinte, elle montre **la conservation des réponses transcriptionnelles suite à la perception d'un éliciteur entre les algues et les plantes**. Par exemple, on retrouve l'induction des gènes codant les enzymes impliquées dans la signalisation (kinases,

phospholipases), dans la détoxication et la protection cellulaire (GST, thiorédoxines, HSP), ainsi que des gènes codant des enzymes clés de voies métaboliques majeures, comme la SAMS, la G6PDH ou la 6PGDH. Il y a donc une conservation des voies métaboliques mises en jeu au cours des réponses de défense.

Les résultats acquis au cours de ma thèse apportent également la première preuve directe que, tout comme chez les plantes et les animaux, le peroxyde d'hydrogène est un messager cellulaire de l'induction de la transcription au cours des réponses de défense. La concentration en espèces activées de l'oxygène doit être finement régulée afin qu'elles puissent jouer le rôle de messagers sans toutefois devenir toxiques pour la cellule. Sur la base des gènes surexprimés identifiés au cours de ce travail, je propose que comme les plantes, les algues diminuent leur capacité à détoxifier le peroxyde d'hydrogène sur le long terme, afin que ce dernier puisse générer directement ou indirectement une signalisation à distance et l'activation des gènes de défense.

Malgré la conservation de certains mécanismes de défense entre les algues, les plantes et les animaux, au niveau de la régulation du transcriptome et de la signalisation par le peroxyde d'hydrogène, il apparaît que les algues ont développé des mécanismes de défense exclusifs à leur environnement, en sachant entre autres tirer partie de la richesse en halogènes du milieu marin.

Les macroalgues possèdent une autre différence majeure avec les plantes et les animaux, qui est l'absence de vascularisation, tels que le phloème, le xylème ou les vaisseaux, permettant de véhiculer rapidement des signaux vers des zones éloignées de leur site de production. Ces systèmes conducteurs assurent une communication à distance au sein de l'organisme et permettent le développement de la résistance systémique acquise et de l'immunité acquise, respectivement chez les plantes et les animaux. Au cours de leur évolution, les algues ont toutefois pu tirer partie de leur environnement marin, qui constitue en effet un véhiculant de métabolites hydrophiles extrêmement performant.

Les seules algues qui font exception à cette absence de système conducteur sont les laminaires, chez lesquelles des structures tout à fait primaires de conduction ont été mises en évidence sous la forme de cellules médullaires allongées, dits éléments criblés. Ces structures permetttent un transport à longue distance des assimilats de la photosynthèse (Schmitz et Lobban, 1979) et de composés minéraux (Floc'h, 1982). Les nombreux **métabolites iodés**

intracellulaires produits suite à l'élicitation par les oligoguluronates pourraient être les signaux d'une **communication chimique intra-algue permettant la mise en place d'une résistance systémique**, en empruntant les éléments criblés, ou d'une communication inter-algue, s'ils sont relargués dans le milieu.

Compte-tenu du rôle manifeste des COV dans la communication intra et inter-plante des végétaux terrestres et de la potentialisation observée chez les plantules sauvages, il est possible que parmi les **nombreux COHV** produits par les algues se trouvent **les médiateurs d'une communication chimique à distance inter-algue**, également impliqués dans la mise en place des réponses de défense des algues.

IV.B Perspectives

Les résultats acquis au cours de ma thèse ouvrent deux principales voies de recherche en ce qui concerne la signalisation des réponses de défense : tout d'abord sur la signalisation intracellulaire, avec l'implication du peroxyde d'hydrogène, et sur la signalisation à distance, intra-algue (systémie) ou interalgue, avec les candidats potentiels issus du métabolisme halogéné.

La régulation de l'expression de certains gènes chez *L. digitata* par le peroxyde d'hydrogène au cours des réponses de défense devra être étudiée de façon plus approfondie.

Des effets dose de peroxyde d'hydrogène en application exogène, couplé ou non à l'addition de catalase dans le milieu d'incubation, devront être mis en place pour confirmer l'effet du peroxyde d'hydrogène sur l'expression des gènes.

Chez les animaux, le peroxyde d'hydrogène active l'expression des gènes de la réponse immune et inflammatoire, via le facteur de transcription NF-κB, mais aucun homologue n'a encore été identifié chez les plantes. Chez les plantes, les effets de l'acide salicylique sur la transcription des gènes sont médiés par les EAO, via la reconnaissance d'éléments spécifiques de type As-1 dans la région promotrice de ces gènes (Garreton *et coll.*, 2002). Il serait intéressant de savoir si les régions promotrices des gènes identifiés chez *L. digitata* possèdent des éléments de reconnaissance pour des facteurs de transcription classiquement impliqués chez les plantes dans la régulation des gènes de détoxication, de défense ou de réponse aux signaux xénobiotiques. Parmi ces sites de reconnaissance, les W-Box reconnues par les facteurs de transcription WRKY et les éléments As-1 ciblés par les

facteurs de transcription TGA sont les mieux décrits. Toutefois, le génome de *L. digitata* n'étant pas disponible, la recherche de ces éléments de reconnaissance pourrait être entreprise sur le génome de l'algue brune *E. siliculosus*. Après avoir identifié dans le génome d'*E. siliculosus* les orthologues des gènes marqueurs de la défense de *L. digitata*, les éléments en question pourraient être recherchés, de même que les orthologues des gènes codant les facteurs de transcription en question.

Bien que le peroxyde d'hydrogène soit diffusible, il est peu probable qu'il soit le signal mobile assurant l'activation des facteurs de transcription. D'ailleurs chez les animaux, NF-κB ne répond pas au peroxyde d'hydrogène. Le signal secondaire responsable de l'activation des facteurs de transcription pourrait être issu du métabolisme des EAO, comme par exemple des oxilipines. Hervé *et coll.,* (2006) ont d'ailleurs montré que des oxylipines étaient responsables de l'activation de gènes de défense chez l'algue rouge *C. crispus*. Toutefois, l'élicitation de *L. digitata* par les oligoguluronates ne semble pas induire particulièrement la biosynthèse d'oxylipines, au contraire de l'élicitation par les LPS (Küpper *et coll.*, 2006) ou l'application d'un stress cuivrique (Ritter. A, communication personnelle).

Afin de mieux comprendre la cascade de signalisation aboutissant à l'activation de la transcription des gènes de défense, de réels efforts devront être faits pour identifier le ou les signaux médiateurs.

Grâce aux marqueurs moléculaires identifiés, il sera enfin possible d'explorer les mécanismes de signalisation à distance lors des réactions de défense chez *L. digitata*.
Ce travail ambitieux est l'objet de la thèse de François Thomas, qui vient de débuter dans notre équipe. Grâce aux marqueurs moléculaires identifiés au cours de ma thèse, il a déjà pu mettre en évidence des éléments de réponse en faveur d'une réponse systémique chez *L. digitata* suite à l'élicitation par les oligoguluronates. Ces marqueurs moléculaires permettront également d'établir si une médiation chimique extracellulaire, entre deux individus ou au sein d'un même individu, est possible à travers l'eau ou l'air, voire même éventuellement si elle peut concerner deux espèces proches.

Des premiers candidats à la signalisation systémique chez les algues sont apparus ces dernières années au travers des recherches portant sur les oxylipines, notamment le MeJA et certains hydroperoxydes d'acides gras, qui induisent d'importants changements transcriptionnels (Bouarab *et coll.*, 2004, Collèn *et coll.*, 2006a, Hervé *et coll.*, 2006). De plus, si les métabolites iodés produits en réponse à l'élicitation par les oligoguluronates sont

caractérisés, leur rôle dans la mise en place de la systémie pourra également être exploré. Les COHV, du fait de leur très grande diversité et de leur abondance, constituent également des candidats de choix dans la recherche de médiateurs de la communication intra et inter-algues.

Les marqueurs moléculaires mis en évidence au cours de ma thèse seront également utilisés pour étudier des interactions biotiques de type herbivorie, avec le mollusque *Helcion pellucidum*. Associé à des données physiologiques, les réponses transcriptionnelles permettront de mettre en évidence des réponses de défense en conditions contrôlées ou dans le milieu naturel.

Malgré l'éloignement phylogénétique des algues, des plantes et des animaux, il existe une grande conservation des mécanismes de défense. Les enzymes impliquées peuvent être homologues (exemple de la NADPH oxydase) ou différentes (cas des haloperoxydases), et mettre cependant en jeu les mêmes systèmes de régulation. La conservation de plusieurs caractéristiques de l'immunité innée chez les algues suggère que les fonctions cellulaires essentielles de défense sont apparues dans le milieu marin. Poursuivre les études des réponses de défense des algues tant au niveau physiologique, que métabolique et moléculaire, mais également entre individus est nécessaire à la compréhension des interactions biotiques chez les algues. A terme, elles permettront d'apporter des réponses sur l'évolution de l'immunité innée au cours de la diversification des eucaryotes, mais également de proposer des hypothèses sur l'importance des mécanismes de défense dans la structuration des communautés marines.

BIBLIOGRAPHIE

Bibliographie

Abebe T, Guenzi AC, Martin B and Cushman JC. (2003) Tolerance of mannitol-accumulating transgenic wheat to water stress and salinity. *Plant Physiology*, **131**, 1748-1755.

Abrahamsson K, Choo KS, Pedersén M, Johansson G and Snoeijs P. (2003) Effects of temperature on the production of hydrogen peroxide and volatile halocarbons by brackish-water algae. *Phytochemistry*, **64**, 725-734.

Agron PG, Macht M, Radnedge L, Skowronski EW, Miller W and Andersen GL. (2002) Use of subtractive hybridization for comprehensive surveys of prokaryotic genome differences. *FEMS Microbiology Letters*, **211**, 175-182.

Alvarez ME, Pennell RI, Meijer P-J, Ishikawa A, Dixon RA and Lamb C. (1998) Reactive oxygen intermediates mediate a systemic signal network in the establishment of plant pmmunity. *Cell*, **92**, 773-784.

Andrews JH. (1976) The pathology of marine algae. *Biological Reviews*, **51**, 211-253.

Andrews JH. (1977) Observations on the pathology of seaweeds in the Pacific Nothwest. *Canadian Journal of Botany*, **55**, 1019-1027.

Apt KE, Clendennen SK, Powers DA and Grossman AR. (1995) The gene family encoding the fucoxanthin chlorophyll proteins from the brown alga *Macrocystis pyrifera*. *Molecular and General Genetics*, **246**, 455-464.

Ar Gall E, Küpper FC and Kloareg B. (2004) A survey of iodine contents in *Laminaria digitata*. *Botanica Marina*, **47**, 30–37.

Armbrust EV, Berges JA, Bowler C, Green BR, Martinez D, Putnam NH, Zhou S, Allen AE, Apt KE, Bechner M, Brzezinski MA, Chaal BK, Chiovitti A, Davis AK, Demarest MS, Detter JC, Glavina T, Goodstein D, Hadi MZ, Hellsten U, Hildebrand M, Jenkins BD, Jurka J, Kapitonov VV, Kroger N, Lau WW, Lane TW, Larimer FW, Lippmeier JC, Lucas S, Medina M, Montsant A, Obornik M, Parker MS, Palenik B, Pazour GJ, Richardson PM, Rynearson TA, Saito MA, Schwartz DC, Thamatrakoln K, Valentin K, Vardi A, Wilkerson FP and Rokhsar DS. (2004) The genome of the diatom *Thalassiosira pseudonana*: ecology, evolution, and metabolism. *Science*, **306**, 79-86.

Arner ESJ and Holmgren A. (2000) Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. *European Journal of Biochemistry*, **267**, 6102-6109.

Arnold TM, Targett NM, Tanner CE, Hatch WI and Ferrari KE. (2001) Evidence of methyl jasmonate-induced phlorotannin production in *Fucus vesiculosus* (Phaeophycea). *Journal of Phycology*, **37**, 1026-1029.

Asamizu E, Nakajima M, Kitade Y, Saga N, Nakamura Y and Tabata S. (2003) Comparison of RNA expression profiles between the two generations of *Porphyra yezoensis* (Rhodophyta), based on Expressed Sequence Tag frequency analysis. *Journal of Phycology*, **39**, 923-930.

Baldauf, SL. (2003) The deep roots of eukaryotes. *Science*, **300**, 1703-1706.

Baldrige CW and Gerard RW. (1933) The extra respiration of phagocytosis. *American Journal of Physiology*, **103**, 235-236.

Baldwin IT and Schultz JC. (1983) Rapid changes in tree leaf chemistry induced by damage: evidence for communication between plants. *Science*, 277-279.

Batz O, Logemann E, Reinold S and Hahlbrock K. (1998) Extensive reprogramming of primary and secondary metabolism by fungal elicitor or infection in parsley cells. *Biological Chemistry*, **379**, 1127-1135.

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

Berglin M, Delage L, Potin P, Vilter H and Elwing H. (2004) Enzymatic Cross-linking of a phenolic polymer extracted from the marine alga *Fucus serratus*. *Biomacromolecules*, **5**, 2376-2383.

Beyer K, Binder A, Boller T and Collinge M. (2001) Identification of potato genes induced during colonization by *Phytophthora infestans*. *Molecular Plant Pathology*, **2**, 125-134.

Bittner-Eddy PD, Allen RL, Rehmany AP, Birch P and Beynon JL. (2003) Use of suppression subtractive hybridization to identify downy mildew genes expressed during infection of *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant Pathology*, **4**, 501-507.

Bitton R, Ben-Yehuda M, Davidovich M, Balazs Y, Potin P, Delage L, Colin C and Bianco-Peled H. (2006) Structure of algal-born phenolic polymeric adhesives. *Macromolecular Bioscience*, **6**, 737-746.

Blumwald E, Aharon GS and Lam BC-H. (1998) Early signal transduction pathways in plant-pathogen interactions. *Trends in Plant Science*, **3**, 342-346.

Bogush ML, Velikodvorskaya TV, Lebedev YB, Nikolaev LG, Lukyanov SA, Fradkov AF, Pliyev BK, Boichenko MN, Usatova GN, Vorobiev AA, Andersen GL and Sverdlov ED. (1999) Identification and localization of differences between *Escherichia coli* and S*almonella typhimurium* genomes by suppressive subtractive hybridization. *Molecular and General Genetics*, **262**, 721-729.

Borchardt SA, Allain EJ, Michels JJ, Stearns GW, Kelly RF and McCoy WF. (2001) Reaction of acylated homoserine lactone bacterial signaling molecules with oxidized halogen antimicrobials. *Applied and Environnemental Microbiology*, **67**, 3174-3179.

Bouarab K, Potin P, Correa J and Kloareg B. (1999) Sulfated oligosaccharides mediate the interaction between a marine red alga and its green algal pathogenic endophyte. *The Plant Cell*, **11**, 1635-1650.

Bouarab K. (2000). Bases biochimiques et cellulaires des interactions plante-pathogène dans le système *Chondrus crispus - Acrochaete operculata.Université de Paris VI.*Paris

Bouarab K, Kloareg B, Potin P and Correa JA. (2001) Ecological and biochemical aspects in algal infectious diseases. *Cahier de Biologie Marine*, **42**, 91-100.

Bouarab K, Adas F, Gaquerel E, Kloareg B, Salaun JP and Potin P. (2004) The innate immunity of a marine red alga involves oxylipins from both the eicosanoid and octadecanoid pathways. *Plant Physiology*, **135**, 1838-1848.

Bouarab K, Cocquempot B, Weinberger F, Morin P, Kloareg B and Potin P. (non publié) Elicitor-induced volatile halocarbons act as an antimicrobial weapon in the defence system of the red alga *Chondrus crispus*. *Journal of Experimental Botany*, **soumis**.

Boyen, C. (2001) Origin and evolution of plastids and mitochondria: the phylogenetic diversity of algae. *Cahier de Biologie Marine*, **42**, 11-24.

Bradley DJ, Kjellbom P and Lamb CJ. (1992) Elicitor- and wound-induced oxidative cross-linking of a proline-rich plant cell wall protein: a novel, rapid defense response. *Cell*, **70**, 21-30.

Brisson LF, Tenhaken R and Lamb C. (1994) Function of oxidative cross-linking of cell wall structural proteins in plant disease resistance. *The Plant Cell*, **6**, 1703-1712.

Broekaert WF, Delaure SL, De Bolle MFC and Cammue BPA. (2006) The role of ethylene in host-pathogen Interactions. *Annual Review of Phytopathology*, **44**, 393-416.

Broin M, Cuine S, Eymery F and 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**, 1417-1432.

Butler A, Soedjak HS, Polne-Fuller M, Gibor A, Boyen C and Kloareg B. (1990) Studies of vanadium-bromoperoxidase using surface and cortical protoplasts of *Macrocystis pyrifera* (Phaeophyta). *Journal of Phycology*, **26**, 589-592.

Butler A and Carter-Franklin JN. (2004) The role of vanadium bromoperoxidase in the biosynthesis of halogenated marine natural products. *Natural Product Reports*, **21**, 180-188.

Carpenter LJ, Sturges WT, Penkett SA and Liss PS. (1999) Short-lived alkyl iodides and bromides at Mace Head, Ireland:links to biogenic sources and halogen oxide production. *Journal of Geophysical Research*, **104**, 1679-1689.

Charrier B, Champion A, Henry Y and Kreis M. (2002) Expression profiling of the whole *Arabidopsis* shaggy-like kinase multigene family by real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Plant Physiology*, **130**, 577-590.

Chen L-R, Chen Y-J, Lee C-Y and Lin T-Y. (2007) MeJA-induced transcriptional changes in adventitious roots of *Bupleurum kaoi*. *Plant Science*, **173**, 12-24.

Chen Z, Silva H and Klessig DF. (1993) Active oxygen species in the induction of plant systemic acquired resistance by salicylic acid. *Science*, **262**, 1883-1886.

Cheong J-J and Choi YD. (2003) Methyl jasmonate as a vital substance in plants. *Trends in Genetics*, **19**, 409-413.

Clark D, Durner J, Navarre DA and Klessig DF. (2000) Nitric oxide inhibition of tobacco catalase and ascorbate peroxidase. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **13**, 1380-1384.

Colin C, Leblanc C, Wagner E, Delage L, Leize-Wagner E, Van Dorsselaer A, Kloareg B and Potin P. (2003) The brown algal kelp *Laminaria digitata* features distinct bromoperoxidase and iodoperoxidase activities. *The Journal of Biological Chemistry*, **278**, 23545-23552.

Colin C, Leblanc C, Michel G, Wagner E, Leize-Wagner E, Van Dorsselaer A and Potin P. (2005) Vanadium-dependent iodoperoxidases in *Laminaria digitata*, a novel biochemical function diverging from brown algal bromoperoxidases. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, **V10**, 156-166.

Collèn J, Ekdahl A, Abrahamsson K and Pedersen M. (1994a) The involvement of hydrogen peroxide in the production of volatile halogenated compounds by *Meristiella gelidium*. *Phytochemistry*, **36**, 1197-1202.

Collèn J, Pedersen M and Bornman CH. (1994b) A stress-induced oxidative burst in *Eucheuma platycladum* (Rhodophyta). *Physiologia Plantarum*, **92**, 417-422.

Collèn J, Hervé C, Guisle-Marsollier I, Leger JJ and Boyen C. (2006a) Expression profiling of *Chondrus crispus* (Rhodophyta) after exposure to methyl jasmonate. *Journal of Experimental Botany*.

Collèn J, Roeder V, Rousvoal S, Collin O, Kloareg B and Boyen C. (2006b) An Expressed Sequence Tag analysis of thallus and regenerating protoplasts of *Chondrus crispus* (Gigartinales, Rhodophyceae). *Journal of Phycology*, **42**, 104-112.

Conrath U, Pieterse CMJ and Mauch-Mani B. (2002) Priming in plant-pathogen interactions. *Trends in Plant Science*, **7**, 210-216.

Conrath U, Beckers GJM, Flors V, Garcia-Agustin P, Jakab G, Mauch F, Newman M-A, Pieterse CMJ, Poinssot B, Pozo MJ, Pugin A, Schaffrath U, Ton J, Wendehenne D, Zimmerli L and Mauch-Mani B. (2006) Priming: Getting ready for battle. *Molecular Plant Microbe Interaction*, 1062-1071.

Corpas FJ, Barroso JB, Sandalio LM, Distefano S, Palma JM, Lupianez JA and del Rio LA. (1998) A dehydrogenase-mediated recycling system of NADPH in plant peroxisomes. *Biochemical Journal*, **330 (Pt 2)**, 777-784.

Correa JA and Sanchez PA. (1996) Ecological aspects of algal infectious diseases. *Hydrobiologia*, **327**, 89-95.

Correa JA. (1997) Infectious diseases of marine algae : Current knowledge and approaches. In F. E. Round and D. J. Chapman (eds.), *Progress in Phycological Research*. Biopress Ltd, Bristol, Vol. 12, pp. 149-180.

Cosse A. (2003). Clonage et cractérisation biochimique d'haloperoxydases chez l'algue rouge Chnondrus crispus. DEA Interactions Plantes-Microorganismes. Institut National Agronomique Paris-Grignon, Paris

Cosse A, Leblanc C and Potin P. (2007) Dynamics defense of marine macroalgae against pathogens : from early acivated to gene-regulated responses. *Advances in Botanical Research*, **sous presse**.

Courtois MB. (1813) Sur un nouvel acide formé avec la substance découverte par M. Courtois. *Annales de Chimie et de Physique*, **88**, 311-318.

Cramer RA, La Rota CMM, Cho Y, Thon M, Craven KD, Knudson DL, Mitchell TK and Lawrence CB. (2006) Bioinformatic analysis of expressed sequence tags derived from a compatible *Alternaria brassicicola-Brassica oleracea* interaction. *Molecular Plant Pathology*, **7**, 113-124.

Crépineau F, Roscoe T, Kaas R, Kloareg B and Boyen C. (2000) Characterisation of complementary DNAs from the expressed sequence tag analysis of life cycle stages of *Laminaria digitata* (Phaeophyceae). *Plant Molecular Biology*, **43**, 503-513.

Custers JHHV, Harrison SJ, Sela-Buurlage MB, van Deventer E, Lageweg W, Howe PW, van der Meijs PJ, Ponstein AS, Simons BH, Melchers LS and Stuiver MH. (2004) Isolation and characterisation of a class of carbohydrate oxidases from higher plants, with a role in active defence. *The Plant Journal*, **39**, 147-160.

Dangeard P. (1928) Sur le dégagement de l'iode chez les algues marines. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences de Paris*, **186**, 892-894.

Dangeard P. (1957) L'iode des algues, les ioduqes, l'iodovolatilisation. *Le botaniste*, **41**, 187-207.

Dangl JL, Dietrich RA and Richberg MH. (1996) Death don't have no mercy: Cell death programs in plant-microbe interactions. *The Plant Cell*, **8**, 1793-1807.

de Franco P-O. (2005). Etudes des glutathion-S-transferases chez l'algue brune *L. digitata*. Master Sciences du Végétal. Université Paris-Sud, Paris

de Nys R and Steinberg PD. (2002) Linking marine biology and biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology*, **13**, 244-248.

Degenhardt J, Al-Masri AN, Kurkcuoglu S, Szankowski I and Gau AE. (2005) Characterization by suppression subtractive hybridization of transcripts that are differentially expressed in leaves of apple scab-resistant and susceptible cultivars of *Malus domestica*. *Molecular Genetics and Genomics*, **273**, 326-335.

Dembitsky VM and Srebnik M. (2002) Natural halogenated fatty acids: their analogues and derivatives. *Progress in Lipid Research*, **41**, 315-367.

Derelle E, Ferraz C, Rombauts S, Rouze P, Worden AZ, Robbens S, Partensky F, Degroeve S, Echeynie S, Cooke R, Saeys Y, Wuyts J, Jabbari K, Bowler C, Panaud O, Piegu B, Ball SG, Ral J-P, Bouget F-Y, Piganeau G, De Baets B, Picard A, Delseny M, Demaille J, Van de Peer Y and Moreau H. (2006) Genome analysis of the smallest free-living eukaryote *Ostreococcus tauri* unveils many unique features. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.*, **103**, 11647-11652.

Desai S, Hill J, Trelogan S, Diatchenko L and Siebert PD. (2000) Identification of differentially expressed genes by suppression substractive hybridization. In S. Hunt and F. Livesey (eds.), *Functionnal genomics*. Oxford University Press, Oxford, pp. 81-112.

Desikan R, Reynolds A, Hancock JT and Neill SJ. (1998) Harpin and hydrogen peroxide both initiate programmed cell death but have differential effects on defence gene expression in Arabidopsis suspension cultures. *Biochemical Journal*, **330 (Pt 1)**, 115-120.

Desikan R, Mackerness SA-H, Hancock JT and Neill SJ. (2001) Regulation of the Arabidopsis transcriptome by oxidative stress. *Plant Physiology*, **127**, 159-172.

Despres C, Chubak C, Rochon A, Clark R, Bethune T, Desveaux D and Fobert PR. (2003) The Arabidopsis NPR1 disease resistance protein is a novel cofactor that confers redox regulation of DNA binding activity to the basic domain/leucine zipper transcription factor TGA1. *The Plant Cell*, **15**, 2181-2191.

Desprez T, Amselem J, Caboche M and Hofte H. (1998) Differential gene expression in Arabidopsis monitored using cDNA arrays. *Plant J*, **14**, 643-652.

Diatchenko L, Lau Y-FC, Campbell AP, Chenchik A, Moqadam F, Huang B, Lukyanov SA, Lukyanov K, Gurskaya N, Sverdlov ED and Siebert PD. (1996) Suppression subtractive hybridization: A method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.*, **93**, 6025-6030.

Didier G, Brezellec P, Remy E and Henaut A. (2002) GeneANOVA-gene expression analysis of variance. *Bioinformatics*, **18**, 490-491.

Die JV, Dita MA, Krajinski F, González-Verdejo CI, Rubiales D, Moreno MT and Román B. (2007) Identification by suppression subtractive hybridization and expression analysis of *Medicago truncatula* putative defence genes in response to *Orobanche crenata* parasitization. *Physiological and Molecular Plant Pathology*.

Dietz K-J. (2003) Plant peroxyredoxins. *Annual Review of Plant Biology*, **54**, 93-107.

Dixon DP, Lapthorn A and Edwards R. (2002a) Plant glutathione transferases. *Genome Biology*, **3**, reviews3004.3001-3004.3010.

Dixon RA and Paiva NL. (1995) Stress induced phenylpropanoid metabolism. *The Plant Cell*, **7**, 1085-1097.

Dixon RA, Achnine L, Kota P, Liu C-J, Reddy MSS and Wang L. (2002b) The phenylpropanoid pathway and plant defence : a genomics perspective. *Molecular Plant Pathology*, **3**, 371-390.

Doke N, Miura Y, Sanchez LM, Park HJ, Noritake T, Yoshioka H and Kawakita K. (1996) The oxidative burst protects plants against pathogen attack: Mechanism and role as an emergency signal for plant bio-defence -- a review. *Gene*, **179**, 45-51.

Dow M, Newman M-A and von Roepenack E. (2000) The induction and modulation of plant defense responses by bacterial lipopolysaccharides. *Annual Review of Phytopathology*, **38**, 241-261.

Dring MJ. (2005) Stress resistance and disease resistance in seaweeds: The role of reactive oxygen metabolism. In J. A. Callow (ed.), *Advances in Botanical Research, Incorporating Advances in Plant Pathology*. Academic Press, pp. 175-207.

Durner J and Klessig DF. (1995) Inhibition of ascorbate peroxidase by salicylic scid and 2,6- dichloroisonicotinic dcid, two Inducers of plant pefense responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **92**, 11312-11316.

Durrant WE and Dong X. (2004) Systemic acquired resistance. *Annual Review of Phytopathology*, **42**, 185-209.

Ebel C, Gomez L, Schmit A-C, Neuhaus-Url G and Boller T. (2001) Differential mRNA degradation of two beta-tubulin isoforms correlates with cytosolic Ca^{2+} changes in glucan-elicited soybean cells. *Plant Physiology*, **126**, 87-96.

Ebel J and Mithöfer A. (1998) Early events in the elicitation of plant defence. *Planta*, **206**, 335-348.

Ellertsdottir E and Peters AF. (1997) High prevalence of infection by endophytic brown algae in populations of *Laminaria spp.* (Phaeophyceae). *Marine Ecology Progress Series*, **146**, 135-143.

Engelberth J, Alborn HT, Schmelz EA and Tumlinson JH. (2004) Airborne signals prime plants against insect herbivore attack. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **101**, 1781-1785.

Espartero J, Pintor-Toro JA and Pardo JM. (1994) Differential accumulation of S-adenosylmethionine synthetase transcripts in response to salt stress. *Plant Molecular Biology*, **25**, 217-227.

Eulgem T. (2005) Regulation of the Arabidopsis defense transcriptome. *Trends in Plant Science*, **10**, 71-78.

Fahrendorf T, Ni W, Shorrosh BS and Dixon RA. (1995) Stress responses in alfalfa (*Medicago sativa L.*) XIX. Transcriptional activation of oxidative pentose phosphate pathway genes at the onset of the isoflavonoid phytoalexin response. *Plant Molecular Biology*, **28**, 885-900.

Fernandez D, Santos P, Agostini C, Bon M-C, Petitot A-S, C. Silva M, Guerra-Guimaraes L, Ribeiro A, Argout X and Nicole M. (2004) Coffee (*Coffea arabica* L.) genes early expressed during infection by the rust fungus (*Hemileia vastatrix*). *Molecular Plant Pathology*, **5**, 527-536.

Floc'h J-Y. (1982) Uptake of inorganic ions and their long distance transport in Fucales and Laminariales. In L. M. Srivastava and W. de Gruyter (eds.), *Synthetic and degradative processes in marine macrophytes*, Berlin, pp. 139-166.

Fujita Y, Zenitani B, Nakao Y and Matsubara T. (1972) Bacteriological studies on diseases of cultured laver.II. Bacteria associated with diseased laver. *Bulletin of the Japanese Society of Fisheries Oceanography*.

Funk CD. (2001) Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. *Science*, **294**, 1871-1875.

Gaquerel E. (2005). Bases biochimiques de l'immunité innée de l'algue rouge *Chondrus crispus* : caractérisation et rôle des oxylipines dans les mécanismes précoces de défense.Doctorat de Biologie.*Université de Bretagne Occidentale*.Brest

Gaquerel E, Hervé C, Labriere C, Boyen C, Potin P and Salaün JP. (2007) Evidence for oxylipin synthesis and induction of a new polyunsaturated fatty acid hydroxylase activity in *Chondrus crispus* in response to methyljasmonate. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, **1771**, 565-575.

Garreton V, Carpinelli J, Jordana X and Holuigue L. (2002) The as-1 promoter element is an oxidative stress-responsive eement and salicylic acid activates it via oxidative species. *Plant Physiology*, **130**, 1516-1526.

Gaut JP, Yeh GC, Tran HD, Byun J, Henderson JP, Richter GM, Brennan M-L, Lusis AJ, Belaaouaj A, Hotchkiss RS and Heinecke JW. (2001) Neutrophils employ the myeloperoxidase system to generate antimicrobial brominating and chlorinating oxidants during sepsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **98**, 11961-11966.

Gerwick WH, Roberts MA, Vulpanovici A and Ballantine DL. (1999) Biogenesis and biological function of marine algal oxylipins. In *Lipoxygenases and Their Metabolites*, Vol. 447, pp. 211-218.

Giani S and Breviario D. (1996) Rice beta-tubulins mRNA levels are modulated during flower development and in response to external stimuli. *Plant Science*, **116**, 147-157.

Giani S, Qin X, Faoro F and Breviario D. (1998) In rice, oryzalin and abscisic acid differentially affect tubulin mRNA and protein levels. *Planta*, **205**, 334-341.

Givskov M, de Nys R, Manefield M, Gram L, Maximilien R, Eberl L, Molin S, Steinberg PD and Kjelleberg S. (1996) Eukaryotic interference with homoserine lactone-mediated prokaryotic signalling. *Journal of Bacteriology*, **178**, 6618-6622.

Golkari S, Gilbert J, Prashar S and Procunier JD. (2007) Microarray analysis of *Fusarium graminearum*-induced wheat genes: identification of organ-specific and differentially expressed genes. *Plant Biotechnology Journal*, **5**, 38-49.

Gomez-Gomez L and Boller T. (2002) Flagellin perception: a paradigm for innate immunity. *Trends in Plant Science*, **7**, 251-256.

Gorlach J, Volrath S, HKnauf-Beiter G, Hengy G, beckhove U, Kogel KH, oostendorp M, Staub T, Ward E, Kessmann H and Ryals JA. (1996) Benzothiadiazole, a novel class of inducers of systemic acquired resistance, activates gene expression and disease resistance in wheat. *The Plant Cell*, **8**, 629-643.

Gottardi W. (1999) Iodine and desinfection: theoritical study on mode of actio, efficiency, stability and analytical aspects in the aqueous system. *Archiv der Pharmazie and Pharmaceutical and Medicinal Chemistry*, **332**, 151-157.

Gribble GW. (2003) The diversity of naturally produced organohalogens. *Chemosphere*, **52**, 289-297.

Hamberg M and Gardner HW. (1992) Oxylipin pathway to jasmonates: biochemistry and biological significance. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism*, **1165**, 1-18.

Hamberg M and Gerwick WH. (1993) Biosynthesis of vicinal dihydroxy fatty-acids in the red alga *Gracilariopsis lemaneiformis* - identification of a sodium-dependent 12-lipoxygenase and a hydroperoxide isomerase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **305**, 115-122.

Hammond-Kosack KE and Jones JDG. (1996) Resistance gene-dependent plant pefense responses. *The Plant Cell*, **8**, 1773-1791.

Hampton MB, Kettle AJ and Winterbourn CC. (1998) Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. *Blood*, **92**, 3007-3017.

Harvell CD, Kim K, Burkholder JM, Colwell RR, Epstein PR, Grimes DJ, Hofmann EE, Lipp EK, Osterhaus A, Overstreet RM, Porter JW, Smith GW and Vasta GR. (1999) Review: Marine ecology - Emerging marine diseases - Climate links and anthropogenic factors. *Science*, **285**, 1505-1510.

Harvell CD, Mitchell CE, Ward JR, Altizer S, Dobson AP, Ostfeld RS and Samuel MD. (2002) Ecology - Climate warming and disease risks for terrestrial and marine biota. *Science*, **296**, 2158-2162.

Haug A and Jensen A. (1954) Seasonal variations in the chemical composition of *Alaria esculenta*, *Laminaria saccharina*, *Laminaria hyperborea* and *Laminaria digitata* from northern Norway. In *Norsk Institutt for tang-og tareforskning*, Vol. 4, pp. 1-14.

Hawkins CL and Davies MJ. (1998) Degradation of hyaluronic acid, poly- and mono-saccharides, and model compounds by hypochlorite: evidence for radical intermediates and fragmentation. *Free Radical Biology and Medicine*, **24**, 1396-1410.

Hayes J and McLellan L. (1999) Glutathione and glutathione-dependent enzymes represent a co-ordinately regulated defence against oxidative stress. *Free Radical Research*, **31**, 273-300.

Hervé C. (2006). Bases moléculaires de la réponse au stress et à la défene chez l'algue rouge Chondrus crispus et caractérisation d'une nouvelle classe de glutathion-S-transférases. Doctorat de Biologie.*Université de Rennes 1*.Rennes

Hervé C, Tonon T, Collèn J, Corre E and Boyen C. (2006) NADPH oxidases in Eukaryotes: red algae provide new hints! *Current Genetics*, **49**, 190-204.

Hervé C, de Franco P-O, Tonon T, Groisillier A and Boyen C. (non publié) Phylogeny, molecular characterization and biochemical properties of glutathione S-transferases from red and brown algae. *The Plant Journal*, **soumis**.

Heyraud A, Gey C, Leonard C, Rochas C, Girond S and 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 *Haliotis tuberculata* alginate lyase. *Carbohydrate Research*, **289**, 11-23.

Higuchi T. (1982) Biosynthesis of lignin. In W. Tanner and F. A. Loewus (eds.), *Plant carbohydrates II. Encyclopedia of plant physiology, NS*. Springer, Berlin Heidelberg New York, Vol. 13B, pp. 194-224.

Huang J, Zhang H, Wang J and Yang J. (2003) Molecular cloning and characterization of rice 6-phosphogluconate dehydrogenase gene that is up-regulated by salt stress. *Molecular Biology Reports*, **30**, 223-227.

Hurtado A, Critchley A, Trespoey A and Lhonneur G. (2006) Occurrence of Polysiphonia epiphytes in Kappaphycus farms at Calaguas Is., Camarines Norte, Phillippines. *Journal of Applied Phycology*, **18**, 301-306.

Ishikawa Y and Saga N. (1989) The diseases of economically valuable seaweeds and pathology in Japan. In S. Miyachi, I. Karube and Y. Ishda (eds.), *Current Topics in Marine Biotechnology*, Tokyo : Fuji Technology Press Ltd, pp. 215-218.

Ishizaki T, Shigemori K, Nakai T, Miyabo S, Ozawa T, W. CS and F. VN. (1995) Leukotoxin, 9,10-epoxy-12-octadeceoate causes edematous lung injury via activation of vascular nitric oxide synthase. *American Journal of Physiology*, **269**, 65-70.

Iwamoto K and Shiraiwa Y. (2005) Salt-regulated mannitol metabolism in algae. *Marine Biotechnology*, **7**, 407-415.

Janssen DB, Pries F and Van der Ploeg JR. (1994) Genetics and biochemistry of dehalogenating enzymes. *Annual Review of Microbiology*, **48**, 163-191.

Jennings DB, Daub ME, Pharr DM and Williamson JD. (2002) Constitutive expression of a celery mannitol dehydrogenase in tobacco enhances resistance to the mannitol-secreting fungal pathogen *Alternaria alternata*. *The Plant Journal*, **32**, 41-49.

Ji SJ, Lu YC, Feng JX, Wei G, Li J, Shi YH, Fu Q, Liu D, Luo JC and Zhu YX. (2003) Isolation and analyses of genes preferentially expressed during early cotton fiber development by subtractive PCR and cDNA array. *Nucleic Acids Research*, **31**, 2534-2543.

Jordan P and Vilter H. (1991) Extraction of proteins from material rich in anionic mucilages: Partition and fractionation of vanadate-dependant bromoperoxidases from the brown algae *Laminaria digitata* and *L. saccharina* in aqueous polymer two-phase systems. *Biochimica Biophysica Acta*, **1073**, 98-106.

Kawalleck P, Plesch G, Hahlbrock K and Somssich IE. (1992) Induction by fungal elicitor of S-adenosyl-L-methionine synthetase and S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase mRNAs in cultured cells and leaves of *Petroselinum crispum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.*, **89**, 4713-4717.

Kende. (1993) Ethylene biosynthesis. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **44**, 283-307.

Kiedrowski S, Kawalleck P, Hahlbrock K, Somssich IE and Dangl JL. (1992) Rapid activation of a novel plant defense gene is strictly dependent on the Arabidopsis RPM1 disease resistance locus. *The EMBO Journal*, **11**, 4677–4684.

Klarzynski O, Plesse B, Joubert J-M, Yvin J-C, Kopp M, Kloareg B and Fritig B. (2000) Linear beta -1,3 glucans are elicitors of defense responses in tobacco. *Plant Physiology*, **124**, 1027-1038.

Klarzynski O and Fritig B. (2001) Stimulation des défenses naturelles des plantes. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences de Paris*, **324**, 953-963.

Krenn BE, Tromp MGM and Wever R. (1989) The brown alga *Ascophyllum nodosum* contains two different vanadium bromoperoxidases. *The Journal of Biological Chemistry*, **32**, 19287-19292.

Krupina MV and Dathe W. (1991) Occurrence of jasmonic acid in the red alga *Gelidium latifolium*. *Zeitschrift für Naturforschung*, **46**, 1127-1259.

Kubanek J, Jensen PR, Keifer PA, Sullards MC, Collins DO and Fenical W. (2003) Seaweed resistance to microbial attack: a targeted chemical defense against marine fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **100**, 6916-6921.

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

Küpper FC and Müller DG. (1999) Massive occurrence of the heterokont and fungal parasites *Anisolpidium*, *Eurychasma* and *Chytridium* in *Pylaiella littoralis* (Ectocarpales, Phaeophyceae). *Nova Hedwigia*, **69**, 381-389.

Küpper FC, Kloareg B, Guern J and Potin P. (2001) Oligoguluronates elicit an oxidative burst in the brown algal kelp *Laminaria digitata*. *Plant Physiology*, **125**, 278-291.

Küpper FC, Muller DG, Peters AF, Kloareg B and Potin P. (2002) Oligoalginate recognition and oxidative burst play a key role in natural and induced resistance of sporophytes of laminariales. *Journal of Chemical Ecology*, **28**, 2057-2081.

Küpper FC, Gaquerel E, Boneberg E-M, Morath S, Salaün J-P and Potin P. (2006) Early events in the perception of lipopolysaccharides in the brown alga *Laminaria digitata* include an oxidative burst and activation of fatty acid oxidation cascades. *Journal of Experimental Botany*, **57**, 1991-1999.

Küpper FC, Gaquerel E, Adas F, Peters AF, Müller DG, Kloareg B, Salaün J-P and Potin P. (non publié) Free fatty acids and methyljasmonate trigger defense reactions in *Laminaria digitata*. *Plant and Cell Physiology*, **soumis**.

Laloi C, Apel K and Danon A. (2004a) Reactive oxygen signalling: the latest news. *Current Opinion in Plant Biology*, **7**, 323-328.

Laloi C, Mestres-Ortega D, Marco Y, Meyer Y and Reichheld J-P. (2004b) The arabidopsis cytosolic thioredoxin h5 gene induction by oxidative stress and its W-box-mediated response to pathogen elicitor. *Plant Physiology*, **134**, 1006-1016.

Lalucque H and Silar P. (2003) NADPH oxidase: an enzyme for multicellularity? *Trends in Microbiology*, **11**, 9-12.

Lamb C and Dixon RA. (1997) The oxidative burst in plant disease resistance. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **48**, 251-275.

Lamb CJ. (1994) Plant disease resistance genes in signal perception and transduction. *Cell*, **76**, 419-422.

Laturnus F, Svensson T, Wiencke C and Öberg G. (2004) Ultraviolet radiation affects emission of ozone-depleting substances by marine macroalgae: results from a laboratory incubation study. *Environmental science & technology*, **38**, 6605-6609.

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

Le Q, Gutierrez-Marcos JF, Costa LM, Meyer S, Dickinson HG, Lorz H, Kranz E and Scholten S. (2005) Construction and screening of subtracted cDNA libraries from limited populations of plant cells: a comparative analysis of gene expression between maize egg cells and central cells. *The Plant Journal*, **44**, 167-178.

Leblanc C, Colin C, Cosse A, Delage L, La Barre S, Morin P, Fiévet B, Voiseux C, Ambroise Y, Verhaeghe E, Amouroux D, Donard O, Tessier E and Potin P. (2006) Iodine transfers in the coastal marine environment : the key role of brown algae and of their vanadium-dependant haloperoxydases. *Biochimie*, **88**, 1773-1785.

Levine A, Tenhaken R, Dixon RA and Lamb C. (1994) H_2O_2 from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell*, **79**, 583-593.

Levine RL, Mosoni L, Berlett BS and Stadtman ER. (1996) Methionine residues as endogenous antioxidants in proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **93**, 15036-15040.

Lion U, Wiesemeier T, Weinberger F, Beltrán J, Flores V, Faugeron S, Correa J and Pohnert G. (2006) Phospholipases and galactolipases trigger oxylipin-mediated wound-activated defence in the red alga *Gracilaria chilensis* against epiphytes. *ChemBioChem*, **7**, 457-462.

Liu QY, Meer JP and Reith ME. (1994) Isolation and characterization of phase-specific complementary DNAs from sporophytes and gametophytes of *Porphyra purpurea* (Rhodophyta) using substracted complementary DNA libraries. *Journal of Phycology*, **30**, 513-520.

Lluisma AO and Ragan MA. (1997) Expressed sequence tags (EST) from the marine red alga *Gracilaria gracilis*. *Journal of Applied Phycology*, **9**, 287-293.

Logemann E, Wu S-C, Schroder J, Schmelzer E, Somssich IE and Hahlbrock K. (1995) Gene activation by UV light, fungal elicitor or fungal infection in *Petroselinum crispum* is correlated with repression of cell cycle-related genes. *The Plant Journal*, **8**, 865-876.

Lu R, Malcuit I, Moffett P, Ruiz MT, Peart J, Wu AJ, Rathjen JP, Bendahmane A, Day L and Baulcombe DC. (2003) High throughput virus-induced gene silencing

implicates heat shock protein 90 in plant disease resistance. *The EMBO Journal*, **22**, 5690-5699.

Mackey D and Mc Fall A. (2006) MAMPs and MIMPs: proposed classifications for inducers of innate immunity. *Molecular Microbiology*, **61**, 1365-1371.

Maheswari U, Montsant A, Goll J, Krishnasamy S, Rajyashri KR, Patell VM and Bowler C. (2005) The Diatom EST Database. *Nucleic Acids Research*, **33**, D344-347.

Malin G, Küpper FC, Carpenter LJ, Baker A, Broadgate W, Kloareg B and Liss PS. (2001) Trace gas production by seaweeds : defense, oxidative stress, signalling and atmospheric significance. *Journal of Phycology*, **37**, 32-33.

Manefield M, de Nys R, Kumar N, Read R, Givskov M, Steinberg P and Kjelleberg S. (1999) Evidence that halogenated furanones from *Delisea pulchra* inhibit acylated homoserine lactone (AHL)-mediated gene expression by displacing the AHL signal from its receptor protein. *Microbiology*, **145**, 283-291.

Manefield M, Welch M, Givskov M, Salmond GP and Kjelleberg S. (2001) Halogenated furanones from the red alga, *Delisea pulchra*, inhibit carbapenem antibiotic synthesis and exoenzyme virulence factor production in the phytopathogen *Erwinia carotovora*. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters*, **205**, 131-138.

Manefield M, Rasmussen TB, Henzter M, Andersen JB, Steinberg P, Kjelleberg S and Givskov M. (2002) Halogenated furanones inhibit quorum sensing through accelerated LuxR turnover. *Microbiology*, **148**, 1119-1127.

Manley SL. (2002) Phytogenesis of halomethanes: A product of selection or a metabolic accident? *Biogeochemistry*, **V60**, 163-180.

Marrs KA. (1996) The functions and regulation of glutahtione S-transferase in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **47**, 127-158.

Martinez C, Montillet JL, Bresson E, Agnel JP, Dai GH, Daniel JF, Geiger JP and Nicole M. (1998) Apoplastic peroxidase generates superoxide anions in cells of cotton cotyledons undergoing the hypersensitive reaction to *Xanthomonas campestris pv. malvacearum* race 18. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **11**, 1038-1047.

Matsuzaki M, Misumi O, Shin IT, Maruyama S, Takahara M, Miyagishima SY, Mori T, Nishida K, Yagisawa F, Yoshida Y, Nishimura Y, Nakao S, Kobayashi T, Momoyama Y, Higashiyama T, Minoda A, Sano M, Nomoto H, Oishi K, Hayashi H, Ohta F, Nishizaka S, Haga S, Miura S, Morishita T, Kabeya Y, Terasawa K, Suzuki Y, Ishii Y, Asakawa S, Takano H, Ohta N, Kuroiwa H, Tanaka K, Shimizu N, Sugano S, Sato N, Nozaki H, Ogasawara N, Kohara Y and Kuroiwa T. (2004) Genome sequence of the ultrasmall unicellular red alga *Cyanidioschyzon merolae* 10D. *Nature*, **428**, 653-657.

Maximilien R, de Nys R, Holmström C, Gram L, Givskov M, Crass K, Kjelleberg S and Steinberg PD. (1998) Chemical mediation of bacterial surface colonisation by secondary metabolites from the red alga *Delisea pulchra*. *Aquatic Microbial Ecology*, **15**, 233-246.

Mazurais D, Montfort J, Delalande C and Gac FL. (2005) Transcriptional analysis of testis maturation using trout cDNA macroarrays. *General and Comparative Endocrinology*, **142**, 143-154.

McFiggans G, Coe H, Burgess R, Allan J, Cubison M, Alfarra MR, Saunders R, Saiz-Lopez A, Plane JMC, Wevill D, Carpenter LJ, Rickard AR and Monks PS. (2004) Direct evidence for coastal iodine particles from *Laminaria* macroalgae – linkage to emissions of molecular iodine. *Atmospheric Chemistry and Physics*, **4**, 701–713.

Meyer Y, Verdoucq L and Vignols Fl. (1999) Plant thioredoxins and glutaredoxins: identity and putative roles. *Trends in Plant Science*, **4**, 388-394.

Meyer Y, Reichheld JP and Vignols FI. (2005) Thioredoxins in Arabidopsis and other plants. *Photosynthesis Research*, **86**, 419-433.

Mittler R, Feng X and Cohen M. (1998) Post-transcriptional suppression of cytosolic ascorbate peroxidase expression duringpathogen-induced programmed cell death in tobacco. *The Plant Cell*, **10**, 461-474.

Mittler R, Herr EH, Orvar BL, van Camp W, Willekens H, Inze D and Ellis BE. (1999) Transgenic tobacco plants with reduced capability to detoxify reactive oxygen intermediates are hyperresponsive to pathogen infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **96**, 14165-14170.

Mittler R. (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science*, **7**, 405-410.

Moore RM, Webb M, Tokarczyk R and Wever R. (1996) Bromoperoxidase and iodoperoxidase enzymes and production of halogenated methanes in marine diatom cultures. *Journal of Geophysical Research*, **101**, 20899-20908.

Mou Z, Fan W and Dong X. (2003) Inducers of plant systemic acquired resistance regulate NPR1 function through redox changes. *Cell*, **113**, 935-944.

Moulin P, Crépineau F, Kloareg B and Boyen C. (1999) Isolation and characterization of six cDNAs involved in carbon metabolism in *Laminaria digitata* (Phaeophyceae). *Journal of Phycology*, **35**, 1237-1245.

Mtolera MSP, Collén J, Pedersén M, Ekdahl A, Abrahamsson K and Semesi AK. (1996) Stress-induced production of volatile halogenated organic compounds in *Eucheuma denticulatum* (Rhodophyta) caused by elevated pH and high light intensities. *European Journal of Phycology*, **31**, 89-93.

Müller DG, Kapp M and Knippers R. (1998) Viruses in marine brown algae. *Advances in Virus Research*, **50**, 49-67.

Müller EG. (1991) Thioredoxin deficiency in yeast prolongs S phase and shortens the G1 interval of the cell cycle. *The Journal of Biological Chemistry*, **266**, 9194-9202.

Murphy CD, Moore RM and White RL. (2000) Peroxidases from marine microalgae. *Journal of Applied Phycology*, **12**, 507-513.

Mydlarz LD, Jones LE and Harvell CD. (2006) Innate immunity, environmental drivers, and disease ecology of marine and freshwater invertebrates. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, **37**, 251-288.

Ndamukong I, Abdallat AA, Thurow C, Fode B, Zander M, Weigel R and Gatz C. (2007) SA-inducible Arabidopsis glutaredoxin interacts with TGA factors and suppresses JA-responsive PDF1.2 transcription. *The Plant Journal*, **50**, 128-139.

Nemoto Y and Sasakuma T. (2000) Specific expression of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) gene by salt stress in wheat (*Triticum aestivum L.*). *Plant Science*, **158**, 53-60.

Nikaido I, Asamizu E, Nakajima M, Nakamura Y, Saga N and Tabata S. (2000) Generation of 10,154 expressed sequence tags from a leafy gametophyte of a marine red alga, *Porphyra yezoensis*. *DNA Research*, **7**, 223-227.

Nimchuk Z, Eulgem T, Holt III BF and Dangl JL. (2003) Recognition and response in the plant immune system. *Annual Review of Genetics*, **37**, 579-609.

Noguchi T, Matsui T, Miyazawa K, Asakawa M, Iijima N, Shida Y, Fuse M, Hosaka Y, Kirigaya C and Watabe K. (1994) Poisoining by the red alga 'ogonori' (*Gracilaria verrucosa*) on the Nojima Coast, Yokohama, Kanagawa Prefecture. *Toxicon*, **32**, 1533-1538.

Nordberg J and Arner ESJ. (2001) Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radical Biology and Medicine*, **31**, 1287-1312.

Nurnberger T, Brunner F, Kemmerling B and Piater L. (2004) Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences. *Immunological Reviews*, **198**, 249-266.

O'Dowd CD, Jimenez JL, Bahreini R, Flagan RC, Seinfeld JH, Hämeri K, Pirjola L, Kulmala M, Jennings GS and Hoffmann T. (2002) Marine aerosol formation from biogenic iodine emissions. *Nature*, **417**, 632-636.

Ohsawa N, Ogata Y, Okada N and Itoh N. (2001) Physiological function of bromoperoxidase in the red marine alga, *Corallina pilulifera*: production of bromoform as an allelochemical and the simultaneous elimination of hydrogen peroxide. *Phytochemistry*, **58**, 683-692.

Orozco-Cardenas ML and Ryan CA. (1999) Hydrogen peroxide is generated systemically in plant leaves by wounding and systemin via the octadecanoid pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **96**, 6553-6557.

Orozco-Cardenas ML, Narvaez-Vasquez J and Ryan CA. (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. *The Plant Cell*, **13**, 179-191.

Palmer CJ, Anders TL, Carpenter LJ, Küpper FC and McFiggans G. (2005) Iodine and halocarbon response of *Laminaria digitata* to oxidative stress and links to atmospheric new particle production. *Environmental Chemistry*, **2**, 282-290.

Pandolfi PP, Sonati F, Rivi R, Mason P, Grosveld F and Luzzatto L. (1995) Targeted disruption of the housekeeping gene encoding glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PD): G6PD is dispensable for pentose synthesis but essential for defense against oxidative stress. *The EMBO Journal*, **14**, 5209–5215.

Pare PW and Tumlinson JH. (1999) Plant volatiles as a defense against insect herbivores. *Plant Physiology*, **121**, 325-332.

Paul NA, De Nys R and Steinberg PD. (2006a) Chemical defence against bacteria in the red alga *Asparagopsis armata*: linking structure with function. *Marine Ecology Progress Series*, **306**, 87-101.

Paul NA, de Nys R and Steinberg PD. (2006b) Seaweed-herbivore interactions at a small scale: direct tests of feedingdeterrence by filamentous algae. *Marine Ecology Progress Series*, **323**, 1-9.

Paul VJ and Puglisi MP. (2004) Chemical mediation of interactions among marine organisms. *Natural Product Reports*, **21**, 189-209.

Paul VJ, Puglisi MP and Ritson-Williams R. (2006c) Marine chemical ecology. *Natural Product Reports*, **23**, 153-180.

Pearson G, Serrao EA and Cancela ML. (2001) Suppression subtractive hybridization for studying gene expression during aerial exposure and desiccation in fucoid algae. *European Journal of Phycology*, **36**, 359-366.

Pedersen M, Collèn J, Abrahamsson K and Ekdahl A. (1996) Production of halocarbons from seaweeds: an oxidative stress reaction ? *Scientia Marina*, **60**, 257-263.

Peters AF and Schaffelke B. (1996) Streblonema (Ectocarpales, Phaeophyceae) infection in the kelp *Laminaria saccharina* (Laminariales, Phaeophyceae) in the western Baltic. *Hydrobiologia*, **326-327**, 111-116.

Peters AF, Marie D, Scornet D, Kloareg B and Cock MJ. (2004) Proposal of *Ectocarpus siliculosus* (Ectocarpales, Phaeophyceae) as a model organism for brown algal genetics and genomics. *Journal of Phycology*, **40**, 1079-1088.

Pohnert G. (2004) Chemical defense strategies of marine organisms. In *Chemistry of Pheromones and Other Semiochemicals I*, Vol. 239, pp. 179-219.

Pompe-Novak M, Gruden K, Baebler S, Krecic-Stres H, Kovac M, Jongsma M and Ravnikar M. (2006) Potato virus Y induced changes in the gene expression of potato (*Solanum tuberosum L.*). *Physiological and Molecular Plant Pathology*, **67**, 237-247.

Potin P, Bouarab K, Küpper FC and Kloareg B. (1999) Oligosaccharide recognition signals and defence reactions in marine plant-microbe interactions. *Current Opinion in Microbioly*, **2**, 276-283.

Potin P, Bouarab K, Salaün J-P, Pohnert G and Kloareg B. (2002) Biotic interactions of marine algae. *Current Opinion in Plant Biology*, **5**, 308-317.

Prabhavathi V and Rajam MV. (2007) Mannitol-accumulating transgenic eggplants exhibit enhanced resistance to fungal wilts. *Plant Science*, **173**, 50-54.

Pugin A, Frachisse JM, Tavernier E, Bligny R, Gout E, Douce R and Guern J. (1997) Early events induced by the elicitor cryptogein in tobacco cells: involvement of a plasma membrane NADPH oxidase and activation of glycolysis and the pentose phosphate pathway. *The Plant Cell*, **9**, 2077-2091.

Rajasekaran K, Cary JW, Jacks TJ, Stromberg KD and Cleveland TE. (2000) Inhibition of fungal growth in planta and in vitro by transgenic tobacco expressing a bacterial nonheme chloroperoxidase gene. *Plant Cell Reports*, **19**, 333-338.

Rasmussen TB, Manefield M, Andersen JB, Eberl L, Anthoni U, Christophersen C, Steinberg P, Kjelleberg S and Givskov M. (2000) How *Delisea pulchra* furanones affect quorum sensing and swarming motility in *Serratia liquefaciens* MG1. *Microbiology*, **146**, 3237-3244.

Rea G, Metoui O, Infantino A, Federico R and Angelini R. (2002) Copper amine oxidase expression in defense responses to wounding and *Ascochyta rabiei* invasion. *Plant Physiology*, **128**, 865-875.

Redinbaugh MG and Campbell HW. (1998) Nitrate regulation of the oxidative pentose phosphate pathway in maize (*Zea mays L.*) root plastids: induction of 6-phosphogluconate dehydrogenase activity, protein and transcript levels. *Plant Science*, **134**, 129-140.

Reed RH and Stewart WDP. (1985) Osmotic adjustment and organic solute accumulation in unicellular cyanobacteria from freshwater and marine habitats. *Marine Biology*, **88**, 1-9.

Reichheld J-P, Mestres-Ortega D, Laloi C and Meyer Y. (2002) The multigenic family of thioredoxin h in *Arabidopsis thaliana*: specific expression and stress response. *Plant Physiology and Biochemistry*, **40**, 685-690.

Ritz D, Patel H, Doan B, Zheng M, Aslund F, Storz G and Beckwith J. (2000) Thioredoxin 2 Is Involved in the Oxidative Stress Response in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, **275**, 2505-2512.

Rizhsky L, Hallak-Herr E, Van Breusegem F, Rachmilevitch S, Barr JE, Rodermel 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. *The Plant Journal*, **32**, 329-342.

Roeder V, Collèn J, Rousvoal S, Corre E, Leblanc C and Boyen C. (2005) Identification of stress gene transcripts in *Laminaria digitata* (Phaeophyceae) protoplast cultures by Expressed Sequence Tag analysis. *Journal of Phycology*, **41**, 1227-1235.

Roeder V. (2006). Recherche et étude de marqueurs moléculaires de la réponse au stress chez l'algue brune *Laminaria digitata*.Doctorat de Biologie.*Université de Rennes 1*.Rennes

Ross C, Küpper FC, Vreeland V, Waite JH and Jacobs RS. (2005a) Evidence of a latent oxidative burst in relation to wound repair in the giant unicellular chlorophyte *Dasycladus vermicrularis*. *Journal of Phycology*, **41**, 531-541.

Ross C, Vreeland V, Waite JH and Jacobs RS. (2005b) Rapid assembly af a wound plug: Stage one of a two-stage wound repair mechanism in the giant unicellular chlorophyte *Dasycladus vermicularis* (Chlorophyceae). *Journal of Phycology*, **41**, 46-54.

Ross C, Küpper FC and Jacobs RtS. (2006) Involvement of reactive oxygen species and reactive nitrogen species in the wound response of *Dasycladus vermicularis*. *Chemistry & Biology*, **13**, 353-364.

Rouhier N, Gelhaye E and Jacquot J-P. (2004) Plant glutaredoxins: still mysterious reducing systems. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **61**, 1266-1277.

Saenko GN, Kravtsova YY, Ivanenko VV and Sheludko SI. (1978) Concentration of iodine and bromine by plants in the Seas of Japan and Okhotsk. *Marine Biology*, **47**, 243-250.

Sánchez-Aguayo I, Rodríguez-Galán JM, García R, Torreblanca J and Manuel Pardo J. (2004) Salt stress enhances xylem development and expression of S-adenosyl-l-methionine synthase in lignifying tissues of tomato plants. *Planta*, **220**, 278-285.

Sappl P, Onate-Sanchez L, Singh K and Millar A. (2004) Proteomic analysis of glutathione S-transferases of *Arabidopsis thaliana* reveals differential salicylic scid-induced expression of the plant-specific phi and tau classes. *Plant Molecular Biology*, **54**, 205-219.

Sasabe M, Toyoda K, Shiraishi T, Inagaki Y and Ichinose Y. (2002) cDNA cloning and characterization of tobacco ABC transporter: NtPDR1 is a novel elicitor-responsive gene. *FEBS Letters*, **518**, 164-168.

Sauvageau C. (1918) Recherche sur les laminaires des côtes de France. *Memoire de l'Académie des Sciences, Paris*, **1**, 1-240.

Sawabe T, Makino H, Tatsumi M, Nakano K, Tajima K, Iqbal MM, Yumoto I, Ezura Y and Christen R. (1998) *Pseudoalteromonas bacteriolytica* sp. nov., a marine bacterium that is the causative agent of red spot disease of *Laminaria japonica*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, **48**, 769-774.

Sawabe T, Tanaka R, Iqbal MM, Tajima K, Ezura Y, Ivanova EP and Christen R. (2000) Assignment of *Alteromonas elyakovii* KMM 162(T) and five strains isolated from spot-wounded fronds of *Laminaria japonica* to *Pseudoalteromonas elyakovii* comb. nov and the extended description of the species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **50**, 265-271.

Scala S, Carels N, Falciatore A, Chiusano ML and Bowler C. (2002) Genome properties of the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Plant Physiology*, **129**, 993-1002.

Schilmiller AL and Howe GA. (2005) Systemic signaling in the wound response. *Current Opinion in Plant Biology*, **8**, 369-377.

Schmitz K and Lobban CS. (1979) A survey of translocation in laminariales (Phaeophyceae). *Marine Biology*, **36**, 207-216.

Schröder G, Eichel J, Breinig S and Schröder J. (1997) Three differentially expressed S-adenosylmethionine synthetases from *Catharanthus roseus*: molecular and functional characterization. *Plant Molecular Biology*, **33**, 211-222.

Shah M, Wuilloud RG, Kannamkumaratha SS and Caruso JA. (2005) Iodine speciation studies in commercially available seaweed by coupling different chromatographic techniques with UV and ICP-MS detection. *Journal of analytical atomic spectrometry*, **20**, 176–182.

Sharma YK, Leon J, Raskin I and Davis KR. (1996) Ozone-induced responses in *Arabidopsis thaliana*: The role of salicylic acid in the accumulation of defense-related transcripts and induced resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **93**, 5099-5104.

Shaw TI. (1959) The mechanism of iodide accumulation by the brown seaweed *Laminaria digitata*.The uptake of ^{131}I. *Proceedings of the Royal Society of London Serie B*, **150**, 356-371.

Shen B, Jensen RG and Bohnert HJ. (1997a) Increased resistance to oxidative stress in transgenic plants by targeting mannitol biosynthesis to chloroplasts. *Plant Physiology*, **113**, 1177-1183.

Shen B, Jensen RG and Bohnert HJ. (1997b) Mannitol protects against oxidation by hydroxyl radicals. *Plant Physiology*, **115**, 527-532.

Shi C, Ingvardsen C, Thümmler F, Melchinger A, Wenzel G and Lüberstedt T. (2005) Identification by suppression subtractive hybridization of genes that are differentially expressed between near-isogenic maize lines in association with sugarcane mosaic virus resistance. *Molecular Genetics and Genomics*, **273**, 450-461.

Somssich IE and Hahlbrock K. (1998) Pathogen defence in plants -- a paradigm of biological complexity. *Trends in Plant Science*, **3**, 86-90.

Spiro MD, Ridley BL, Eberhard S, Kates KA, Mathieu Y, O'Neill MA, Mohnen D, Guern J, Darvill AG and Albersheim P. (1998) Biological activity of reducing-end-derivatized oligogalacturonides in tobacco tissue cultures. *Plant Physiology*, **116**, 1289-1298.

Stanley MS, Perry RM and Callow JA. (2005) Analysis of Expressed Sequence Tags from the green alga *Ulva linza* (Chlorophyta). *Journal of Phycology*, **41**, 1219-1226.

Starr RC and Zeikus JA. (1987) UTEX-The culture collection at the University of Texas. *Journal of Phycology*, **23(suppl.)**, S1-S27.

Stoop JMH, Williamson JD and Mason Pharr D. (1996) Mannitol metabolism in plants: a method for coping with stress. *Trends in Plant Science*, **1**, 139-144.

Stukkens Y, Bultreys A, Grec S, Trombik T, Vanham D and Boutry M. (2005) NpPDR1, a pleiotropic drug resistance-type ATP-binding cassette transporter from *Nicotiana plumbaginifolia*, plays a major role in plant pathogen defense. *Plant Physiology*, **139**, 341-352.

Sun X, Yang GP, Mao YX, Zhang XC and Sui ZH. (2002) Analysis of expressed sequence tags of a marine red alga, *Gracilaria lemaneiformis*. *Progress in Natural Science*, **12**, 518-523.

Suzuki K, Nishiuchi T, Nakayama Y, Ito M and Shinshi H. (2006) Elicitor-induced down-regulation of cell cycle-related genes in tobacco cells. *Plant, Cell & Environment*, **29**, 183-191.

Suzuki K, Yano A, Nishiuchi T, Nakano T, Kodama H, Yamaguchi K and Shinshi H. (2007) Comprehensive analysis of early response genes to two different microbial elicitors in tobacco cells. *Plant Science*, **In Press, Corrected Proof**.

Tabor CW and Tabor H. (1984a) Polyamines. *Annual Review of Biochemistry*, **53**, 749-790.

Tabor CW and Tabor H. (1984b) Methionine adenosyl transferase (S-adenosylmethionine synthetase) and S-adenosylmethionine decarboxylase. *Advances in Enzymology*, **56**, 251-282.

Takahashi A, Casais C, Ichimura K and Shirasu K. (2003) HSP90 interacts with RAR1 and SGT1 and is essential for RPS2-mediated disease resistance in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **100**, 11777-11782.

Taki N, Sasaki-Sekimoto Y, Obayashi T, Kikuta A, Kobayashi K, Ainai T, Yagi K, Sakurai N, Suzuki H, Masuda T, Takamiya K, Shibata D, Kobayashi Y and Ohta H. (2005) 12-Oxo-Phytodienoic Acid Triggers Expression of a Distinct Set of Genes and Plays a Role in Wound-Induced Gene Expression in Arabidopsis. *Plant Physiol.*, **139**, 1268-1283.

Tao Y, Xie Z, Chen W, Glazebrook J, Chang H-S, Han B, Zhu T, Zou G and Katagiri F. (2003) Quantitative nature of Arabidopsis responses during compatible and incompatible interactions with the bacterial pathogen *Pseudomonas syringae*. *The Plant Cell*, **15**, 317-330.

Teas J, Pino S, Critchley A and Braverman LE. (2004) Variability of iodine content in common commercially available edible seaweeds. *Thyroid*, **14**, 836-841.

Teo S-S, Ho C-L, Teoh S, Lee W-W, Tee J-M, Rahim RA and Phang S-M. (2007) Analyses of expressed sequence tags from an agarophyte *Gracilaria changii* (Gracilariales, Rhodophyta). *European Journal of Phycology*, **42**, 41 - 46.

Teplitski M, Robinson JB and Bauer WD. (2000) Plants secrete substances that mimic bacterial N-acyl homoserine lactone signal activities and affect population density-dependent behaviors in associated bacteria. *Molecular Plant Microbe Interaction*, 637-648.

Thomas EL, Bozeman PM, Jefferson MM and King CC. (1995) Oxidation of bromide by the human leukocyte enzymes myeloperoxidase and eosinophil peroxidase. *The Journal of Biological Chemistry*, **270**, 2906-2913.

Thulke O and Conrath U. (1998) Salicylic acid has a dual role in the activation of defence related genes in parsley. *The Plant Journal*, **14**, 35-42.

Toledano MB, Delaunay A, Monceau L and Tacnet F. (2004) Microbial H_2O_2 sensors as archetypical redox signaling modules. *Trends in Biochemical Sciences*, **29**, 351-357.

Torres MA, Jones JD and Dangl JL. (2006) Reactive oxygen species signaling in response to pathogens. *Plant Physiology*, **141**, 373-378.

Toth GB and Pavia H. (2000) Water-borne cues induce chemical defense in a marine alga (*Ascophyllum nodosum*). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **97**, 14418-14420.

Vairappan CS, Daitoh M, Suzuki M, Abe T and Masuda M. (2001) Antibacterial halogenated metabolites from the Malaysian Laurencia species. *Phytochemistry*, **58**, 291-297.

Vairappan CS. (2003) Potent antibacterial activity of halogenated metabolites from Malaysian red algae, *Laurencia majuscula* (Rhodomelaceae, Ceramiales). *Biomolecular Engineering*, **20**, 255-259.

Verhaeghe E, Fraysse A, Guerquin-Kern J-L, Wu T-D, Devès G, Mioskowski C, Leblanc C, Ortega R, Ambroise Y and Potin P. (non publié) Micro-chemical imaging of iodine distribution in the brown alga Laminaria digitata suggests a new mechanism for its accumulation. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, **soumis**.

Voiblet C, Duplessis S, Encelot N and Martin F. (2001) Identification of symbiosis-regulated genes in *Eucalyptus globulus-Pisolithus tinctorius* ectomycorrhiza by differential hybridization of arrayed cDNAs. *The Plant Journal*, **25**, 181-191.

von Rad U, Mueller MJ and Durner J. (2005) Evaluation of natural and synthetic stimulants of plant immunity by microarray technology. *New Phytologist*, **165**, 191-202.

Wagner U, Edwards R, Dixon DP and Mauch F. (2002) Probing the diversity of the arabidopsis glutathione S-transferase genefamily. *Plant Molecular Biology*, **49**, 515-532.

Walters D. (2003) Resistance to plant pathogens : possible roles for freee polyamines and polyamine catabolism. *New Phytologist*, **159**, 109-115.

Wang W, Vinocur B, Shoseyov O and Altman A. (2004) Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. *Trends in Plant Science*, **9**, 244-252.

Wawrzynska A, Lewandowska M, Hawkesford MJ and Sirko A. (2005) Using a suppression subtractive library-based approach to identify tobacco genes regulated in response to short-term sulphur deficit. *Journal of Experimental Botany*, **56**, 1575-1590.

Weaver LM and Herrmann KM. (1997) Dynamics of the shikimate pathway in plants. *Trends in Plant Science*, **2**, 346-351.

Weinberger F, Friedlander M and Hoppe H-G. (1999) Oligoagars elicit a physiological response in *Gracilaria conferta* (Rhodophyta). *Journal of Phycology*, **35**, 747-755.

Weinberger F and Friedlander M. (2000a) Endogenous and exogenous elicitors of a hypersensitive response in *Gracilaria conferta* (Rhodophyta). *Journal of Applied Phycology*, **12**, 139-145.

Weinberger F and Friedlander M. (2000b) Response of *Gracilaria conferta* (Rhodophyta) to oligoagars results in defense against agar-degrading epiphytes. *Journal of Phycology*, **36**, 1079-1086.

Weinberger F, Richard C, Kloareg B, Kashman Y, Hoppe H-G and Friedlander M. (2001) Structure-activity relationship of oligoagar elicitors toxard *Gracilaria conferta* (Rhodophyta). *Journal of Phycology*, **37**, 418-426.

Weinberger F, Pohnert G, Kloareg B and Potin P. (2002) A signal released by an endophytic attacker acts as a substrate for a rapid defensive reaction of the red alga *Chondrus crispus*. *ChemBioChem*, **3**, 1260-1263.

Weinberger F, Leonardi P, Miravalles A, Correa JA, Lion U, Kloareg B and Potin P. (2005a) Dissection of two distinct defense-related responses to agar oligosaccharides in *Gracilaria chilensis* (Rhodophyta) and *Gracilaria conferta* (Rhodophyta). *Journal of Phycology*, **41**, 863-873.

Weinberger F, Pohnert G, Berndt ML, Bouarab K, Kloareg B and Potin P. (2005b) Apoplastic oxidation of L-asparagine is involved in the control of the green algal endophyte *Acrochaete operculata* Correa & Nielsen by the red seaweed *Chondrus crispus* Stackhouse. *Journal of Experimental Botany*, **56**, 1317-1326.

Weinberger F, Cocquempot B, Forner S, Morin P, Kloareg B and Potin P. (non publié) Different regualtion of haloperoxidation during agar oligosaccahride activated defense mechanisms in two related, *Hydropuntia sp*. and *Gracilaria chilensis*. *Journal of Experimental Botany*, **soumis**.

Wendt UK, Wenderoth I, Tegeler A and von Schaewen A. (2000) Molecular characterization of a novel glucose-6-phosphate dehydrogenase from potato (*Solanum tuberosum L.*). *The Plant Journal*, **23**, 723-733.

Wichard T and Pohnert G. (2006) Formation of halogenated medium chain hydrocarbons by a lipoxygenase/hydroperoxide halolyase-mediated transformation in planktonic microalgae. *Journal of the American Chemical Society*, **128**, 7114-7115.

Williamson JD, Stoop JMH, Massel MO, Conkling MA and Pharr DM. (1995) Sequence analysis of a mannitoldehydrogenase cDNA from plants reveals a function for the pathogenesis-relatedprotein ELI3. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **92**, 7148-7152.

Wise RP, Moscou MJ, Bogdanove AJ and Whitham SA. (2007) Transcritp profiling in host-pathogen interactions. *Annual Review of Phytopathology*, **45**, 329-369.

Witte S, Villalba M, Bi K, Liu Y, Isakov N and Altman A. (2000) Inhibition of the c-jun N-terminal jinase/AP-1 and NF-kappa B pathways by PICOT, a novel protein kinase C-interacting protein with a thioredoxin homology domain. *The Journal of Biological Chemistry*, **275**, 1902-1909.

Wojtaszek P. (1997) Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection. *Biochem J*, **322**, 681-692.

Wong TK-M, Ho C-L, Lee W-W, Rahim RA and Phang S-M. (2007) Analyses of expressed sequence tags from *Sargassum binder*i (Phaeophyta). *Journal of Phycology*, **43**, 528-534.

Yang B, Srivastava S, Deyholos MlK and Kav NNV. (2007) Transcriptional profiling of canola (*Brassica napus L.*) responses to the fungal pathogen *Sclerotinia sclerotiorum*. *Plant Science*, **173**, 156-171.

Zeng H-C, Deng L-H and Zhang C-F. (2006) Cloning of salt tolerance-related cDNAs from the mangrove plant *Sesuvium portulacastrum* L. *Journal of Integrative Plant Biology*, **48**, 952-957.

Zhang Z, Collinge DB and Thordal-Christensen H. (1995) Germin-like oxalate oxidase, a H_2O_2-producing enzyme, accumulates in barley attacked by the powdery mildew fungus. *The Plant Journal*, **8**, 139-145.

Zhao J, Davis LC and Verpoorte R. (2005) Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnology Advances*, **23**, 283-333.

Zheng J, Zhao J, Tao Y, Wang J, Liu Y, Fu J, Jin Y, Gao P, Zhang J, Bai Y and Wang G. (2004) Isolation and analysis of water stress induced genes in maize seedlings by subtractive PCR and cDNA macroarray. *Plant Molecular Biology*, **55**, 807-823.

Zipfel C and Felix G. (2005) Plants and animals: a different taste for microbes ? *Current Opinion in Plant Biology*, **8**.

Zipfel C, Kunze G, Chinchilla D, Caniard A, Jones JDG, Boller T and Felix G. (2006) Perception of the bacterial PAMP EF-Tu by the receptor EFR restricts Agrobacterium-mediated transformation. *Cell*, **125**, 749-760.

ANNEXES

Annexes

- Les annexes 1 à 5 correspondent à des protocoles détaillés des principales techniques développées au cours de mon travail. Elles sont volontairement **présentées sous la forme de 'protocole de paillasse'** pour être directement utilisées par les futurs expérimentateurs. Elles contiennent entre autres quelques commentaires d'ordre pratique.

- L'annexe 5 correspond aux détails des résultats obtenus quant à l'analyse des ADNc présents dans la banque soustractive d'ADNc de sporophyte élicité

- L'annexe 6 replace les résultats obtenus quant à l'expression des gènes étudiés par macroarray en fonction de leur profil d'expression.

Annexe 1 :

Hybridation des macroarrays, marquage de la sonde au ^{32}P à l'aide du kit Megaprime Labelling (GE Healthcare)

Il est préférable d'utiliser des ADNc fraichement obtenus par transcription inverse à partir de 100 µg d'ARN total

Avant de commencer à préparer la sonde : Penser à allumer le four à hybridation et les bains marie (stabilisation aux bonnes températures) et mettre les membranes à préhybrider.

I. Préparation de la sonde

A. Marquage de la sonde : kit Megaprime Labelling Kit (GE Healthcare)

Allumer le bain marie à 100 °C et le bain à sec à 37 °c en salle de radioactivité

- Pool d'ADNc récent obtenu à partir de 100 µg d'ARN total (volume < ou = à 21 µL)
- Ajuster le volume à 21 µL avec H_2O RNase free
- Ajouter 5 µL de random primer
- Dénaturer 5 min à 100 °C puis poser immédiatement sur glace
- Centrifuger brièvement pour éliminer la condensation et éviter les microprojections
- Ajouter 10 µL de labelling buffer (il contient du tampon et les dNTP sauf le dCTP)
- Ajuster le volume à 43 µL avec H_2O RNase free (soit 7 µL)
- Ajouter 2 µL d'enzyme Klenow
- Centrifuger
- Ajouter 5 µL de dCTP marqué au ^{32}P **en salle de radioactivité**
- Mettre des cavaliers sur les eppendorfs pour des raisons de sécurité !
- Incuber à 37 °C pendant 45 min
- Arrêter la réaction avec 2 µL d'EDTA 0,5 M

B. Purification de la sonde :Kit microspin TM S-200 HR Columns (GE Healthcare).

Les colonnes sont conservées dans du TE. Les plus grands ADNc sont élués en premier, les oligonucléotides non incorporés restent dans la colonne. Elles s'adaptent sur les eppendorfs.

- Vortexer 1 min
- Casser l'embout
- Léger spin pour éliminer le TE de conservation

- Ajouter la sonde et 50 µL de TE
- Spin = fraction 0
- Ajouter 100 µL de TE et spin : récolter ainsi 6 à 7 fractions successivement.

C. Comptage au compteur à scintillation

- 2 mL de liquide scintillant + 1 µL de chaque fraction.
- Renverser les tubes pour homogénéiser
- Choisir le bon programme pour le comptage !
  - ✓ Prendre en compte la durée de comptage (2 min pour le ^{32}P)
  - ✓ L'énergie libérée par le radioélément
- Tracer la courbe f(n° fraction)=cpm. Elle doit être de type gaussienne
- Pooler les fractions d'intérêt (celles qui correspondent aux ADNc les plus long)
- = sonde ADNc marquée

II. Préhybridation et hybridation

Tampon d'hybridation	Stock	Volume pour 20 mL final
6X SSC	20 X	6 mL
5X Denhardt réactif	50 X	2 mL
SDS 0,1 %	20 %	100 µL
ADN sperme de poisson dénaturé 100 µg/mL	10mg/mL	200 µL
H_2O qsp = 20 mL		11,7 mL

Le tampon de préhybridation et d'hybridation est le même. Ces deux étapes sont réalisées à la même température (65 °C)

Préchauffer le tampon avant de commencer.

Mettre la membrane et le dot à préhybrider dans les tubes à hybridation avant de commencer à préparer la sonde. En profiter pour vérifier la bonne rotation des tubes et l'absence de fuite (risque de contamination radioactive par la suite)

- Eliminer le tampon de préhybridation et remettre du tampon neuf (7 mL)
- Préparer la sonde comme indiqué ci après
- Dénaturer la sonde 5 min à 100 °C, puis directement sur glace. Ne pas oublier les cavaliers !
- Ajouter la sonde au fond du tube à hybridation sans toucher directement la membrane.
- Hybrider sur la nuit (au moins 16H)

III. Lavage

Les premiers lavages se font avec des grands volumes de lavage directement dans les tubes à hybridation afin d'éliminer la plus importante quantité de radioactivité, puis dans une boite (sous agitation)

Solutions Stock	**SSC 2X - SDS 0,5 % (Vf= 1 L)**	**SSC 1X-SDS 0,1% (Vf= 200 mL)**	**SSC 0,2X – SDS 0,1% (Vf = 200 mL)**
20 X SSC	100 mL	10 mL	2 mL
20 % SDS	25 mL	1 mL	1 mL
H_2O qsp	875 mL	189 mL	197 mL

- Rinçage dans le tube avec le tampon 2X SSC - 0,5 % SDS
- Lavage dans le tube 5 min 2X SSC - 0,5 % SDS
- Lavage dans le tube 5 min 2X SSC - 0,5 % SDS
- Lavage dans la boîte 10 min 2X SSC - 0,5 % SDS
- Lavage dans la boîte 10 min 1X SSC - 0,1 % SDS
- Lavage dans la boîte 15 min 0,2X SSC - 0,1 % SDS

IV. Exposition

- Découper un papier Whattman de la taille de la membrane
- Imbiber avec le dernier tampon de lavage (SSC 0,1 X – SDS 0,1 %)
- Déposer la membrane sur ce papier
- Sceller dans du saran ou sac à hybridation
- Bien lisser pour éliminer les plis
- Apposer l'écran phosphore du scanner
- Exposer à l'obscurité, dans une cassette, au moins sur la nuit
- Scanner l'écran (et ne pas oublier de les desactiver ensuite par exposition sur l'écran lumineux !)

Note :
La durée d'exposition dépend de l'intensité du signal
La lumière dégrade le signal !

V. Déshybridation de la membrane

Cela n'est possible que si la membrane n'a pas séché, d'où l'importance que le sac soit bien scellé.
Déposer les membranes à deshybrider dans une boîte.

Tampon de déshybridation	Solutions Stock	500 mL de tampon
0,05 X SSC	20 X	1,25 mL
0,01 M EDTA, pH 8	0,5 M	10 mL
Chauffer jusqu'à ébullition		
Ajouter 0,1 % SDS	20 %	1,5 mL

- Verser le tampon bouillant sur les filtres et laisser refroidir sur la paillasse
- Eliminer le tampon et répéter l'opération
- Rincer les filtres avec du 0,01X SSC
- Laisser sécher sur papier Whattman, puis conserver sous aluminium

Note :
SSC 20X = 3 M NaCl, 0,3 M Citrate de sodium

Annexe 2

Hybridation radioactive des macroarrays nylon
Hybridation vecteur

L'hybridation vecteur sert à estimer le taux d'ADN de chaque dépôt de la membrane afin d'effectuer une correction des valeurs obtenues avec l'échantillon marqué. Cela permet de rendre l'intensité du signal indépendant de la quantité déposée. (Voir le Matériels & Methodes)

Sur notre membrane il y a trois types de plasmides :

- Le pBK-CMV (Stratagene), plasmide ayant servi à construire la banque de protoplastes de *L. digitata*
- Le pBlueScript SK^+ (Stratagene), plasmide ayant servi à construire la banque de sprophytes de *L. digitata*
- Le pCR2.1-TOPO® (Invitrogen), plasmide ayant servi à construire la banque la soustractive de sporophyte de *L. digitata* élicité par les oligoguluronates.

Ces trois vecteurs possèdent la séquence T7 qui va être utilisée comme 'oligo vecteur' pour évaluer la qualité et la quantité des dépôts.

T7 **5'**GTAATACGACTCACTATAGGGCGAA **3'**

I. Marquage de l'oligonucléotide T7

- 1 µL d'oligo T7 à 1 µg/µL
- 5 µL de tampon 5X Forward Reaction Buffer (tampon de l'enzyme)
- 3 µL de [γ-^{33}P] ATP (5000Ci/mmol) (GE Healthcare)
- 1 µL de T4 Polynucleotide Kinase (10 U/µL) (Invitrogen)
- 15 µL H_2O (qsp = 25 µL)

Incuber 30 min à 37 °C, puis

Incuber 20 min à 65 °C, pour désactiver l'enzyme

Ajuster le volume à 100 µL (soit ajouter 75 µL H_2O)

II. Purification de l'oligonuclétotide T7 marqué

Les colonnes Micospin G25 (GE Healthcare) permettent d'éliminer les radionucléotides et nucléotides non incorporés. La taille d'exclusion est de 10 mères. Les conditions optimales d'utilisation sont de 50 µL et 10 µCi. Les colonnes sont conditionnées dans de l'eau additionnée de

0,05 % de Kathon. Il n'est pas nécessaire de rééquilibrer la colonne avant utilisation, car l'oligonucléotide marqué est essentiellement dans l'eau. Elles s'adaptent sur les eppendorfs.

- Vortexer la colonne 1 min
- Casser l'embout et placer sur un eppendorf
- Centrifuger 1 min à 735 *g*
- Eliminer le flow through
- Placer la colonne sur un nouvel eppendorf
- Déposer l'échantillon (max 100 µl) au centre
- Centrifuger 2 min à 735 *g*
- Récupérer le flow through qui contient l'oligonucléotide marqué.

Note : Kathon, ou isothiazolinone, est en fait un mélange de deux thiazolinones (chlorée 75% et non chlorée 25 %). C'est un conservateur biocide avec un effet bactériostatique et fongistatique.

III. <u>Comptage de l'oligo marqué</u>

2 mL de liquide scintillant et 1 µL d'oligonucléotide marqué
Programme ^{33}P : Région A : .0-249.0 Région B : 2.0-249.0

Note : avec 1 µg d'oligonucléotide T7, on obtient de l'ordre de 10^6 cpm, c'est à dire de quoi marquer 10 membranes (5.10^6 cpm d'oligo/10 mL de volume d'hybridation/membrane)

IV. <u>Préhybridation – Hybridation</u>

<u>*Tampon d'hybridation*</u>: 5X SSC, 5X Denhardt's, 0,5 % SDS, 100 µg/mL ADN dénaturé de sperme de poisson

- 25 mL SSC 20X
- 10 mL Denhardt's 50X
- 2,5 mL SDS 20 %
- 1 mL d'ADN dénaturé de sperme de poisson
- qsp = 100 mL

- Préhybrider les filtres dans 10 mL de tampon pendant 4 heures à 42 °C
- Hybrider les filtres sur la nuit à 42 °C dans 10 mL de tampon avec 5.10^6 cpm d'oligonucléotide marqué (soit 500 000 cpm/mL de tampon)

V. Lavage

Les lavages se font dans une grande boîte avec 500 mL de tampon pour 10 filtres.

Tampon de lavage : *2X SSC, 0,1 % SDS*

- 100 mL de 20X SSC
- 5 mL SDS 20 %
- qsp = 1 L

- 10 min à température ambiante dans le tampon préchauffée à 42 °C
- 5 min à 42 °C avec le même tampon
- Rincer les filtres dans du tampon 2X SSC
- Laisser sécher sur papier Whattman
- Exposer les filtres secs contre un écran phosphore toute la nuit.

Note : Les temps de lavage sont critiques. Si on lave trop longtemps, même à la bonne température, l'oligonucléotide se décroche.

VI. Déshybridation

Mettre les filtres dans une grande boîte contenant 300 à 500 mL de tampon dans un bain marie à 65 °C pendant 3 heures en changeant le tampon toutes les heures.

Tampon de déshybridation 0,1X SSC 0,2 % SDS

- 10 mL SSC 20X
- 20 mL SDS 20%
- qsp = 2 L

Rincer les filtres dans du tampon 2X SSC et contrôler la déshybridation par une exposition contre écran sur la nuit. Si nécessaire, renouveler l'étape de déshybridation.

***REMARQUES* :**

Il est important de **laisser sécher les filtres** et **de ne pas les exposer humides.** En effet, les rayonnements β du ^{33}P (0,249 Mev) sont arrêtés très rapidement : 49 cm d'air et 0,6 mm d'eau. Ainsi l'humidité de la membrane, enveloppée de surcroît dans du Saran empêche les rayonnements de marquer l'écran photosensible du Storm.

La **demie vie du ^{33}P** est de **25, 4 jours.**

Annexe 3

Hybridation radioactive des macroarrays nylon
Hybridation cible complexe

Il faut nécessairement contrôler la qualité des ARN sur gel d'agarose (idéalement par un northern et une hybridation 28s) ainsi que la quantité des ARN, traités DNAse, par dosage au spectrophotomètre (éventuellement dilution au 1/10ème en triplicat) à 260 nm.

Note : Penser à mettre les filtres à préhybrider avant de commencer le marquage de la cible (un minimum de 4 h)

I. Marquage de l'ARN

A. Annealing

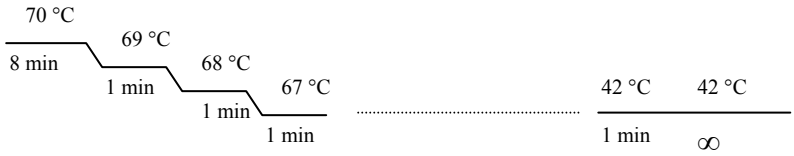
Il est nécessaire de réaliser une première étape à 70 °C afin d'éliminer la structure secondaire des ARN. L'annealing selon un gradient de température décroissant permet de saturer les queues polyA des ARNm avec l'oligo dT. Un large excès d'oligo dT est utilisé pour que la transcription inverse commence juste après le début de la queue polyA.

Pour chaque échantillon

- 10 µg d'ARN, traité à la DNase
- 8 µg NdT18 (8µg/µL), soit 1 µL
- qsp H_2O = 13 µL

Dans un thermocycler : **8 min à 70 °C**, puis **un gradient sur 30 min de 70 °C à 42 °C**. Laisser le tube à 42 °C

Remarque : pas de gradient possible avec nos machines, donc programmer un cycle



B. Transcription inverse et marquage

Cette étape sert à synthétiser et marquer simultanément l'ADNc simple brin à partir des ARNm présents dans les 10 µg d'ARN total. La quantité d'ARN peut être estimée entre 200 et 500 ng dans le cas de *L. digitata*.

Il est préférable de faire un mélange pour l'ensemble des échantillons sachant que pour 1 échantillon, il faut ajouter

- 1 µL de RnasInh (Ribonuclesase inhibiteur Promega 40 U/µL)
- 6 µL de tampon premier brin 5X de l'enzyme
- 2 µL de DTT 0.1 M (Sigma)
- 0,6 µL de dATG 20 mM chacun, 125 µM dCTP
- 3 µL de [α^{33}P] dCTP 10 µCi/µL (GE Healthcare)
- 1 µL de Superscript RNase-H free (Invitrogen 200 U/µL)
- 3,4 µL d'eau stérile, soit qsp = 30 µL

- Ce qui revient à **ajouter 17 µL du mélange** à l'échantillon d'ARN (13 µL)
- Incuber **1 H à 42 °C**
- Rajouter 1 µL de transcriptase inverse
- Incuber à nouveau **1 H à 42 °C**

C. Dégradation des ARNm et des ARNr et Obtention d'une sonde simple brin

- Ajouter successivement (ne pas faire de mélange !)
  - 1µL de SDS 10 %
  - 1 µL d'EDTA 0,5 M
  - 3 µL de NaOH 3 M
- Incuber ensuite 30 min à 68 °C
- Puis 15 min à température ambiante
- Ajouter successivement
  - 10 µL de Tris 1 M, pH 8
  - 3 µL d'HCl 2N
- Dénaturer toute la cible complexe 5 min à 100 °C
- Ajouter 0,5 mL de tampon d'hybridation préchauffé à 65 °C
- Ajouter 2 µg de poly(dA80)
- Incuber 2H30 à 65 °C (cette étape permet de saturer les séquencs polydT)

II. Hybridation cible complexe marquée

A. Préhybridation / Hybridation

Les filtres sont préhybridés pendant **6 heures** et hybridés **20 à 24 heures** dans 10 mL de tampon à 65 °C.

Tampon d'hybridation : 5X SSC, 5X Denhardt's, 0,5 % SDS, 100 µg/mL d'ADN dénaturé de sperme de poisson.

Pour 100 mL

- 25 mL de 20X SSC
- 10 mL de Denhardt's 50X
- 2,5 mL de SDS 20 %
- 1 mL d'ADN dénaturé de sperme de poisson 10mg/mL

Il convient **d'ajouter l'intégralité de la cible complexe sans comptage**, afin de ne pas modifier la concentration et les ratios d'ADNc.

B. Lavages

Préparer les tampons de lavage suivants et les mettre à préchauffer à 65 °C

Solutions Stock	SSC 2X - SDS 0,5 % (Vf= 1 L)	SSC 1X-SDS 0,1% (Vf= 500 mL)	SSC 0,2X – SDS 0,1% (Vf = 500 mL)	SSC 0.1X –SDS 0.1% Vf = 500 mL
20 X SSC	100 mL	25 mL	5 mL	2,5 mL
20 % SDS	25 mL	2.5 mL	2,5 mL	2,5 mL
H_2O qsp	875 mL	472,5 mL	492,5 mL	450 mL

- Rinçage dans les tubes avec du 2X SSC 0,5 % SDS
- Lavage dans la boîte à 65 °C sous agitation (tous les filtres en même temps)
  - 500 mL de 2X SSC 0,5 % SDS, 30 min
  - puis 500 mL de 1X SSC 0,1 % SDS, 30 min
  - puis 500 mL de 0,2X SSC 0,1 % SDS, 30 min
  - puis 500 mL de 0,1X SSC 0.1 % SDS, 15 min

- Rincer rapidement les filtres dans du 2X SSC.
- **Laisser sécher les filtres** et **exposer** contre un écran **20 heures.**
- Scanner à **50 µm** de résolution

III. Déshybridation de la cible complexe

- Préparer 1 L de solution 0,5 % SDS 1 mM EDTA et faire préchauffer à 85 °C
  - 25 mL de SDS 20 %
  - 2 mL d'EDTA 0,5 M pH 8

- Déshybrider les filters dans une boîte avec 1 L de tampon pendant 5 heures au bain marie à 85 °C.
- Rincer quelques minutes les filtres dans un tampon 2X SSC à température ambiante
- Laisser sécher
- Exposer les filtres contre un écran pour contrôler la déshybridation

Si la déshybridation ne s'effectue pas correctement, laisser les membranes en décroissance 2 à 3 mois avant de renouveler l'étape de déshybridation. Ceci a un double effet :

- la radiolyse des cibles complexes, qui se fragmentent, ce qui favorise leur déshybridation ultérieure
- la diminution du signal radioactif lié aux cibles qui resteront hybridées après déshybridation. L'hybridation résiduelle ne gène pas une seconde hybridation car les produits de PCR ou les plasmides sont toujours spottés en excès.

Annexe 4

Synthèse d'ADNc de *L. digitata* pour mener les expériences de PCR Quantitative

Il est nécessaire d'utiliser des ARN totalement dépourvus d'ADN : traiter les ARN à la DNAse.

Pour vérifier l'absence d'ADN, faire une PCR sur 35 cycles sur les échantillons d'ARN en utilisant un couple d'amorce correspondant préférentiellement à un gène fortement exprimé.

Note: L'expérience a montré que les différentes DNAse testées sont inactivées par des contaminants présents dans les ARN n'ayant pas subi de purification par des extractions au phénol/chloroforme ! Il est donc inutile d'essayer de gagner du temps en réalisant la DNAse directement après l'étape de précipitation des ARN sur la nuit dans le chlorure de lithium, β-mercaptoéthanol (voir Matériels & Méthodes paragraphe II.A.1-Extraction d'ARN).

Réaliser une synthèse à **10 ng/µL eq ARN** dans **40 µL** de volume réactionnel.

1- <u>En tube PCR, réaliser le mélange suivant pour chaque échantillon</u>

- 400 ng ARN
- 2 µL oligodT (NdT18) 100 µM
- 2 µL dNTP 10 mM
- qsp H_2O = 20 µL

2- <u>Préparer le mélange pour la RT, réalisée avec l'Improm II(Promega)</u>

Tampon 5X	8	µL
$MgCl_2$ 25 mM	4,8	µL
RNAse Inh (Promega) 40U/µL	1	µL
qsp H_2O = 18 µL	4,2	µL

On rajoutera en dernier après avoir amené les échantillons à 42 °C, **2 µL** d'enzyme, soit Vf = 40 µL (voir ci-dessous)

3- La réaction de RT est comme suit

ARN + oligodT+ dNTP
↓
5 min à 70 °C
5 min à 4 °C
↓
Ajouter le mélange de RT
↓
2 min à 42 °C
↓
Ajouter 2 µL de RT Improm II
↓
60 min à 42 °C
15 min à 70 °C
10 min à 4 °C
↓
Ajouter 0,5 µL de RNAse H (2U/µL)
↓
20 min à 37 °C
10 min à 4 °C

4- Diluer les ADNc à 1ng/µL (soit dilution au 1/10ième)

C'est la concentration maximale à laquelle les ADNc sont utilisés pour la PCR Q.

Il est inutile de déposer les ADNc sur gel d'agarose car il n'y en a pas assez pour qu'ils soient détectables sur le gel !

6- Faire une PCR classique avec un gène de normalisation (RPL36, Actine, Tubuline) sur les ADNc obtenus

Utiliser 10 ng eq ARN d'ADNc, comme pour la PCR Quantitative.

- Mélange de PCR

- Tampon 5X 5 µL
- dNTP 10 mM 0,5 µL
- Amorce sens 5 µM 1 µL
- Amorce antisens 5 µM 1 µL
- GoTaq polymerase (Promega) 0,25 µL
- H_2O 7,25 µL
- Matrice ADNc 1 ng/µL 10 µL
- Vf= 25 µL

- *Cycle de PCR*

94 °C 5 min

94 °C	30s	X 35
58 °C	30s	
72 °C	30s	

72 °C 5 min

4 °C

- Déposer 15 µL de PCR sur gel d'agarose **2 %** contentant du BET (2µL/100 mL de gel) avec 2 µL PCR Marker (BioLabs) comme marqueur de taille (50 à 800 pb). (La coloration d'un gel d'agarose à 2 % est trop longue dans un bain de BET)

Cette PCR permet de vérifier l'efficacité et l'homogénéité de la réaction de transcription inverse

Remarques

Quantité la plus grande d'ADNc utilisée en PCR Q = 10 ng/eq ARN puits. Comme chaque échantillon est déposé deux fois (duplicat technique PCR Q), on peut passer au moins 20 plaques de PCR Q (gamme d'ADNg comprise) avec la quantité d'ADNc ainsi synthétisée.

N° ADNc	Nom du clone SSH représentatif	Nb clones	Protoplastes		Sporophyte		Gamétophyte		NCBI Database			Identification putative	Catégorie fonctionnelle
			N° accession de la séquence présentant la meilleure homologie	*E-value*	*N° accession de la séquence présentant la meilleure homologie*	*E-value*	*N° accession de la séquence présentant la meilleure homologie*	*E-value*	*N° accession de la séquence présentant la meilleure homologie*	*Meilleure e-value (Blast X)*	*Source de la séquence*		
1	CL5	33	CN466812	6,E-131	AW400835	1,E-58	AW401229	8,E-80	AF226862	8,E-106	*Laminaria saccharina*	LHCF6	Energie
2	CL8	30	CN466698	0,E+00	-	-	-	-	-	-	-	Inconnue	Inconnue
3	CL41	23	CN467641	1,E-179	AW400472	3,E-166			CAD37192	0.0	*Laminaria digitata*	BPO 2	Stress et Défense
4	CL29	17	CN466971	5,E-177	-	-	-	-	-	-	-	Inconnue	Inconnue
5	CL14	8	CN467667	2,E-84	-	-	-	-	-	-	-	Inconnue	Inconnue
6	CL35	7	CN467500	2,E-129	-	-	-	-	CAB61332	0.0	*Laminaria digitata*	6PGDH 2	Métabolisme
7	Bslde 4C06	1	CN466563	1,E-153	-	-	-	-	-	-	-	6PGDH 1	Métabolisme
8	CL11	6	CN467645	1,E-121	-	-	AW401036	2,E-174	ABA00716	4,E-173	*Phytophthora parasitica*	EF1α	Synthèse protéique
9	CL34	6	CN467326	1,E-172	-	-	AW401316	2,E-100	AAR21576	0.0	*Phytophthora nicotianae*	HSP 70	Stress et Défense
10	CL6	6	-	-	-	-	AW400996	4,E-53	-	-	-	Inconnue	Inconnue
11	CL12	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Inconnue	Inconnue
12	CL15	4	CN467750	3,E-132	AW400429	0.0	AW400982	0.0	AAR17783	4,E-148	*Lycopersicon esculentum*	RPL3	Synthèse protéique
13	CL38	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Inconnue	Inconnue
14	CL4	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Inconnue	Inconnue
15	CL19	3	CN466965	2,E-104	AW400486	3,E-43	-	-	ABA28987	4,E-18	*Symbiodinium sp*	HSP90	Stress et Défense
16	CL27	3	CN466843	0.0	AW400450	3,E-154	AW401125	7,E-170	CAB61333	3,E-56	*Laminaria digitata*	G6PD	Métabolisme
17	CL16	3	CN467942	2,E-148	-	-	-	-	-	-	-	Inconnue	Inconnue
18	CL3	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Inconnue	Inconnue
19	CL33	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Inconnue	Inconnue
20	CL1	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Inconnue	Inconnue
21	Bslde 2B11	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Inconnue	Inconnue
22	CL20	2	CN466878	2,E-107	-	-	-	-	-	-	-	Inconnue	Inconnue
23	CL24	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Inconnue	Inconnue
24	CL26	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Inconnue	Inconnue
25	CL31	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Inconnue	Inconnue
26	CL37	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Inconnue	Inconnue
27	Bslde 4E11	1	CN467083	2,E-96	-	-	-	-	-	-	-	Inconnue	Inconnue
28	Bslde 3F04	1	CN467670	3,E-125	-	-	-	-	-	-	-	Inconnue	Inconnue
29	Bslde 2C12	1	CN467474	4,E-100	AW400641	1,E-50	-	-	-	-	-	Inconnue	Inconnue
30	Bslde 4H10	1	CN467528	2,E-118	AW400734	1,E-130	-	-	EAK88428	6,E-12	*Cryptosporidium parvum*	RPL36	Synthèse protéique
31	Bslde 4B06	1	CN466570	2,E-146	-	-	-	-	-	-	-	Inconnue	Inconnue
32	Bslde 2G11	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Inconnue	Inconnue
33	Bslde 3E12	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Inconnue	Inconnue
34	Bslde 4C02	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Inconnue	Inconnue
35	Bslde 4F05	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Inconnue	Inconnue
36	Bslde 2C02	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Inconnue	Inconnue
37	Bslde 2A06	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Inconnue	Inconnue
38	Bslde 2G03	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Inconnue	Inconnue
39	Bslde 2F12	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Inconnue	Inconnue
40	Bslde 2H02	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Inconnue	Inconnue
41	Bslde 2H11	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Inconnue	Inconnue
42	Bslde 3C08	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Inconnue	Inconnue
43	Bslde 3D04	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Inconnue	Inconnue
44	Bslde 3D10	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Inconnue	Inconnue
45	Bslde 3E08	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Inconnue	Inconnue
46	Bslde 3F09	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Inconnue	Inconnue
47	Bslde 3H04	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Inconnue	Inconnue
48	Bslde 4E03	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Inconnue	Inconnue
49	Bslde 4F09	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Inconnue	Inconnue

Annexe 5

Annotation des 49 ADNc identifiés dans la banque soustractive

Les 49 ADNc identifiés dans la banque soustractive, numérotés arbitrairement de 1 à 49, sont décrits dans le tableau ci contre. Les résultats de la recherche d'identité de séquence par blast N dans les autres banques d'ADNc de *L. digitata* (protoplaste, sporophyte et gamétophyte) sont indiqués, de même que la recherche d'identité de séquences par tBlastX sur les banques de données de NCBI. L'identification putative finale et la catégorie fonctionnelle sont également indiquées.

Annexe 6

Expression de l'ensemble des gènes étudiés par *macroarray* regroupés par profils d'expression

Gènes strictement surexprimées au cours du temps en réponse aux GG

Clone	N° accession	Identification	Heures après élicitation 6	12	24	
Pld 19H08	CN468073	Mannitol-1-phosphate deshydrogenase	55,1	17,4	3,8	
Bslde 3D04	-	Inconnue	5,4	6,0	22,5	*
Pld 22E08	CN468294	Mercuric reductase	3,0	3,3	3,4	*
Bslde 4E03	-	Inconnue	2,7	20,7	7,1	
Bslde 2A04	-	Inconnue	2,2	6,1	2,4	
Pld 21B03	CN468174	ATP synthase delta chain	16,1	2,6	0,9	
Pld 21G06	CN468232	Inconnue	6,3	4,3	2,0	
Sest280	AW400695	Asparaginyl-tRNA synthétase	4,9	4,1	0,7	
Pld9B06	CN467138	Phytoene desaturase	3,7	6,3	2,8	
Bslde 3H04	-	Inconnue	2,2	3,0	1,1	
Pld 12B04	CN467393	Adenylate kinase	27,1	4,4	1,1	
Bslde 3E08	-	Inconnue	18,5	0,8	7,5	
Sest256	AW400670	Arginine kinase	17,3	2,5	1,1	
Sest327	AW400744	Arginyl tRNA synthétase	8,3	5,2	1,1	
Sest024	AW400526	6-PGDH	8,3	2,0	1,6	
Pld 3E10	CN466691	Tubuline alpha	7,5	0,8	0,6	
Pld 2H01	CN466641	Inconnue	6,9	2,9	1,8	*
Sest481	AW400894	Isopropylmalate dehydratase	6,2	1,0	0,8	*
Pld 19D03	CN468023	Putative Acyl-CoA-binding protein	4,8	1,6	0,7	
Bslde 2C02	-	Inconnue	3,7	1,2	1,1	*
Bslde 3F09	-	Inconnue	3,4	21,4	1,1	*
Pld 12G09	CN467455	Glutathione S-transferase	3,3	2,6	0,7	
Pld 9A08	CN467128	Glutathione transferase	2,9	1,8	0,6	*
Pld 2E01	CN466610	Malate deshydrogenase	2,3	0,8	0,8	
Bslde 3H01	-	Inconnue	1,0	24,1	1,0	
Pld 5F10	CN466889	Thiorédoxine like 5	2,6	15,9	2,5	
Pld 2F07	CN466626	Heat Shock Protein, HSP90	2,3	7,9	1,6	
Pld 11B10	CN467315	Phospholipase	1,5	5,2	1,1	
Bslde 4F09	-	Inconnue	4,6	3,2	1,2	
Pld 15B12	CN467667	Inconnue	1,1	13,9	3,6	*
VBPO3	-	VBPO3	4,1	5,6	3,6	
Pld 13C09	CN467500	6PGDH	12,7	4,5	7,0	
Pld 4E07	CN466780	Light harvesting protein 4	1,9	4,1	8,9	*
Bslde 2H11	-	Inconnue	3,6	1,4	55,6	*
Pld 2H09	CN466644	Inconnue	1,3	2,6	12,2	
Pld 4E09	CN466782	Inconnue	1,4	1,7	8,2	
Pld 18B10	CN467921	Heat Shock Protein, HSP70	0,9	0,6	6,3	*
Bslde 3F10	-	Inconnue	0,8	7,0	5,4	*
Bslde 4B06	-	Inconnue	1,6	4,9	4,9	
Pld 4C10	CN466759	PyroP fructose 6 phosphotransferase	1,1	1,1	4,7	
Bslde 2G03	-	Inconnue	0,6	0,9	2,5	*
Bslde 2G11	-	Inconnue	1,2	1,2	2,5	*
Pld 16A01	CN467727	Inconnue	1,8	14,9	2,5	
Bslde 3D06	-	Inconnue	0,8	35,7	2,1	

Les valeurs donnent le facteur d'induction correspondant à la moyenne de l'intensité relative stressée/témoin des triplicats biologiques. Elles sont classées par ordre décroissant. Les cellules en fond plein représentent les profils d'expression vérifiés pour au moins deux des réplicats biologiques, en rouge pour la surexpression, en jaune pour le caractère stable. * indique si l'expression de l'EST considérée a été validée par ANOVA.

Gènes strictement réprimés au cours du temps en réponse aux GG

Clone	N° accession	Identification	Heures après élicitation 6	12	24	
Pld 22B07	CN468265	Protéine ribosomale L14	0,2	0,7	11,7	
Bslde 3A07	-	Inconnue	0,2	0,8	0,8	
Pld 4B07	CN466744	Light harvesting protein 6	0,3	25,5	1,1	*
S135	AJ496449	C5 épimérase E1	0,3	0,9	0,7	*
Bslde 2E05	-	Inconnue	0,4	0,9	1,9	
Pld 22C01	CN468270	Nucleoside-diphosphate kinase	0,5	1,1	1,4	
Pld 5A07	CN466828	Glutathione S-transferase	0,3	0,5	0,7	*
Pld 2B09	CN466593	Inconnue	0,5	0,2	0,4	*
Pld 14F03	CN467617	Facteur d'élongation 1 alpha	0,9	0,3	1,5	
Bslde 2B11	-	Inconnue	1,4	0,4	1,0	*
Pld 6G05	CN466957	AhpC/TSA family protein	0,7	0,4	0,8	*
Bslde 3C08	-	Inconnue	1,1	0,8	0,4	*
Bslde 3D10	-	Inconnue	5,9	0,7	0,4	
Pld 13G08	CN467545	Guanylate kinase 1	1,5	20,2	0,4	
Pld 8D09	CN467083	Inconnue	17,0	0,8	0,5	*

Les valeurs donnent le facteur répression correspondant à la moyenne de l'intensité relative stressée/témoin des triplicats biologiques. Elles sont classées par ordre décroissant. Les cellules en fond plein représentent les profils d'expression vérifiés pour au moins deux des réplicats biologiques, en vert pour la répression, en jaune pour le caractère stable. * indique si l'expression de l'EST considérée a été validée par ANOVA.

Gènes présentant des variations d'expression à la fois positive et négative au cours du temps en réponse aux GG

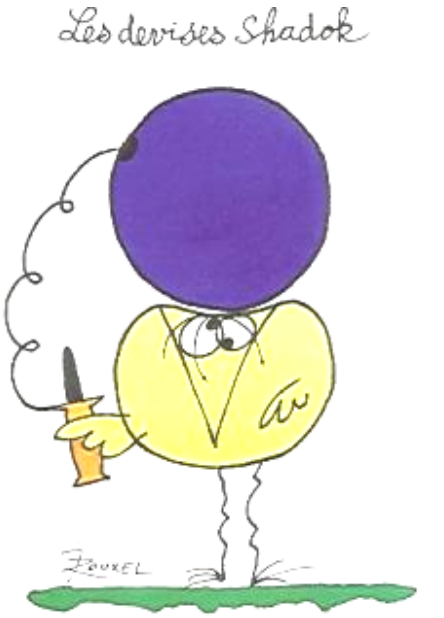
Clone	N° accession	Identification	Heures après élicitation 6	12	24	
Pld 18E06	CN467950	ATP binding protein family	75,7	0,5	3,9	*
Bslde 2B06	-	Inconnue	25,1	0,3	0,9	
Sest435	AW400851	Inconnue	8,2	0,5	0,4	
Bslde 2H02	-	Inconnue	3,1	0,4	0,3	*
Sest330	AW400747	S-adénosyl méthionine synthétase	2,6	23,8	0,5	
Pld 5B01	AJ496454	C5 epimérase E6	0,3	0,5	6,5	
Bslde 2F12	-	Inconnue	0,1	2,0	11,4	*
Pld 14G06	CN467630	Facteur de transcription BTF3	0,5	1,1	3,9	

Gènes ne présentant pas de variation d'expression au cours du temps en réponse aux GG

Clone	N° accession	Identification	Heures après élicitation			
			6	12	24	
Pld 2A10	AJ496451	C5 épimérase E3	0,7	0,9	0,9	*
Pld 16D10	CN467769	RNA polymerase I, ss unité alpha	1,2	1,2	0,7	
Pld 17B08	CN467830	Protéine ribosomale L36	0,8	1,2	0,9	
Bslde 4C02	-	Inconnue	1,1	1,1	0,7	
Bslde 3E12	-	Inconnue	0,7	0,8	1,6	*
VBPO1	AJ491786	VBPO1	1,0	1,3	1,7	
Sest185	AW400490	Phosphoribulokinase precursor	0,9	0,8	1,0	
Bslde 4F05	-	Inconnue	1,5	1,6	1,9	
Pld 16H06	CN467804	Actine beta	1,1	3,3	1,3	
Pld 15F03	CN467699	Proteine G, sous unité beta	1,4	1,0	1,1	*
Pld 1F10	CN466563	6PGDH	1,4	5,6	1,6	
Pld 20D03	CN468112	Tubuline beta	1,0	0,6	1,1	
Pld 25A10	CN468422	Histone H2A/H2B/H3/H4	1,2	1,7	1,5	
Pld 23C06	CN468352	drug resistance ABC transporter	2,0	1,2	1,3	
Pld 3F05	CN466698	Inconnue	1,6	0,9	0,7	
Bslde 4A07	-	Inconnue	1,5	1,0	1,2	
Sest316	AW400732	NADP glutamate deshydrogenase	281,2	1,0	1,6	*
Pld 7H05	CN467037	Inconnue	2,6	56,3	1,3	
vBPO7	-	v-BPO7	1,1	2,0	1,0	
Pld 12F06	CN467441	Serine/threonine phosphatase	2,0	4,6	0,8	
Pld 14E07	CN467610	SAMS	564,8	0,5	0,7	
Pld 22D12	CN468288	Méthionine sulfoxide reductase	0,9	3,0	3,0	
VBPO4	-	VBPO4	0,6	0,9	1,2	
Pld 2G11	CN466640	Thiorédoxine putative	1,5	0,9	1,4	*
Pld 5B11	CN466843	G6PDH	0,9	1,5	1,5	
vIPO1	AJ619804	vIPO1	0,8	0,7	2,1	
Sest21	AW400523	Inconnue	1,1	1,5	2,2	*
Bslde 2D03	-	Inconnue	1,5	1,9	1,5	*
Bslde 2E02	-	Inconnue	8,2	1,0	0,6	

Gènes identifiés à partir de la banque soustractive et validés par macroarrays quant à leur surexpression suite à l'élicitation par les GG

N° ADNc SSH	Clone	N° accession	Identification	Heures après élicitation 6	12	24	
3	vBPO3	-	v-BPO3	4,1	5,6	3,6	
4	Pld 4E09	CN466782	Inconnue	1,4	1,7	8,2	
5	Pld 15B12	CN467667	Inconnue	1,1	13,9	3,6	*
6	Pld 13C09	CN467500	6PGDH	12,7	4,5	7,0	
9	Pld 18B10	CN467921	Heat Shock Protein, HSP70	0,9	0,6	6,3	*
15	Pld 2F07	CN466626	Heat Shock Protein, HSP90	2,3	7,9	1,6	
17	Pld 21G06	CN468232	Inconnue	6,3	4,3	2,0	
20	Bslde 2A04	-	Inconnue	2,2	6,1	2,4	
22	Pld 2H01	CN466641	Inconnue	6,9	2,9	1,8	*
23	Bslde 3F10	-	Inconnue	0,8	7,0	5,4	*
24	Bslde 3H01	-	Inconnue	1,0	24,1	1,0	
25	Bslde 2B06	-	Inconnue	25,1	0,3	0,9	
26	Bslde 3D06	-	Inconnue	0,8	35,7	2,1	
31	Bslde 4B06	-	Inconnue	1,6	4,9	4,9	
32	Bslde 2G11	-	Inconnue	1,2	1,2	2,5	*
36	Bslde 2C02	-	Inconnue	3,7	1,2	1,1	*
38	Bslde 2G03	-	Inconnue	0,6	0,9	2,5	*
39	Bslde 2F12	-	Inconnue	0,1	2,0	11,4	*
40	Bslde 2H02	-	Inconnue	3,1	0,4	0,3	*
41	Bslde 2H11	-	Inconnue	3,6	1,4	55,6	*
43	Bslde 3D04	-	Inconnue	5,4	6,0	22,5	*
45	Bslde 3E08	-	Inconnue	18,5	0,8	7,5	
46	Bslde 3F09	-	Inconnue	3,4	21,4	1,1	*
47	Bslde 3H04	-	Inconnue	2,2	3,0	1,1	
48	Bslde 4E03	-	Inconnue	2,7	20,7	7,1	
49	Bslde 4F09	-	Inconnue	4,6	3,2	1,2	



EN ESSAYANT CONTINUELLEMENT
ON FINIT PAR RÉUSSIR. DONC:
PLUS ÇA RATE, PLUS ON A
DE CHANCES QUE ÇA MARCHE.

Merci à tous !