



Étude structurale et fonctionnelle de glycoside hydrolases et d'une iodo-péroxydase de la flavobactérie marine *Zobellia galactanivorans*, impliquées dans l'interaction avec les algues

Etienne Rebuffet

► **To cite this version:**

Etienne Rebuffet. Étude structurale et fonctionnelle de glycoside hydrolases et d'une iodo-péroxydase de la flavobactérie marine *Zobellia galactanivorans*, impliquées dans l'interaction avec les algues. Biochimie, Biologie Moléculaire. Paris 6, 2010. Français. NNT : . tel-01110677

HAL Id: tel-01110677

<https://hal.sorbonne-universite.fr/tel-01110677>

Submitted on 28 Jan 2015

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

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

THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE

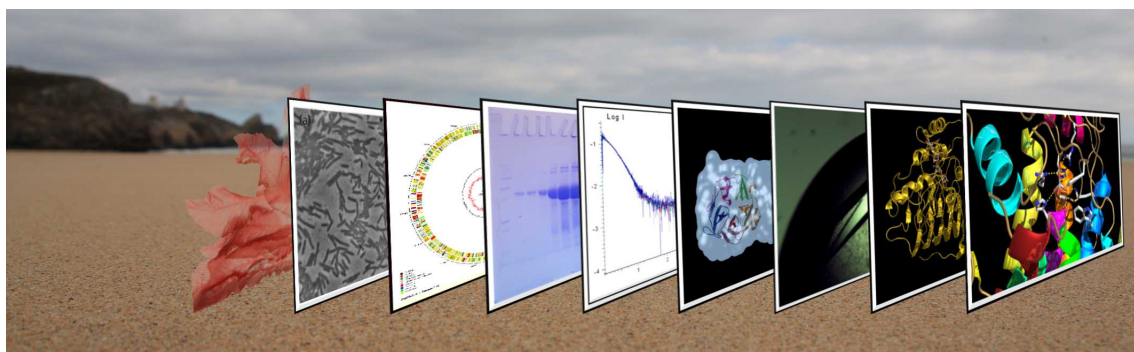
Discipline : Biologie
Ecole doctorale iViv

Présentée par

M. Etienne REBUFFET

Pour obtenir le grade de
DOCTEUR de l'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE

Etude structurale et fonctionnelle de glycoside hydrolases
et d'une iodo-péroxydase de la flavobactérie marine
Zobellia galactanivorans, impliquées dans l'interaction
avec les algues



soutenue le 16 Mars 2010

devant le jury composé de :

M. Germain TRUGNAN
Mme. Anne IMBERTY
Mme. Véronique RECEVEUR-BRECHOT
Mme. Claudine MAYER
Mme. Mirjam CZJZEK
M. Gurvan MICHEL

Président
Rapporteur
Rapporteur
Examinatrice
Directrice de thèse
Co-directeur de thèse

Thèse préparée au sein de l'équipe de Glycobiologie Marine dans l'unité Végétaux
Marins et Biomolécules de la Station Biologique de Roscoff

Pour les nombreuses personnes qui m'ont aidé durant ces trois années, je tiens à dire

Merci à :

- L'ensemble du personnel de la station biologique qui participe à cette bonne ambiance de travail.
- Les personnes avec qui j'ai eu l'occasion de travailler, Dianne qui m'a fait replonger dans le docking, Bianca mon étudiante qui a du avoir des ampoules aux doigts à force de faire des cinétiques, la très discrète mais efficace Maude qui met au point et réalise les tests CRAZY, Diane "mais si elle est active mon enzyme", William pour ces bonnes questions, Sabine, "Je ne suis plus un gamin", Thierry, toujours prêt à me dépanner en informatique.
- Les personnes avec qui nous sommes allés se coucher aux aurores pour raisons professionnelles. Coralie et Zoé de Lille, Christophe de l'IFREMER ainsi que Alain, Nada et Franck d'Orléans. Un remerciement spécial à Franck, toujours de bons conseils sur les lignes synchrotron et qui m'a montré quelques programmes bien utiles.
- Catherine et Ludovic qui m'ont fait confiance pour leur structure.
- Mes collocs de bureau Aude, Stéphanie et Jan-Hendrik, même si la cohabitation n'a pas toujours été facile. Stéphanie, merci pour les photos de l'intro mais surtout merci pour la bonne humeur que tu apportais tous les jours dans ce bureau. Et quand à toi Jan, j'oublierais facilement tes tentatives de colonisation de mon espace de travail en repensant aux bons moments passés ensemble au labo, en congrès, à l'ESRF et ailleurs.
- Mes parents qui même s'ils n'ont jamais vraiment compris ce sur quoi je travaillais, m'ont toujours aidé dans mes projets.
- Tous les joueurs du volley loisir de Santec pour ce moment de sport mais également de bonne rigolade du jeudi soir et dont il sera triste de se passer à l'avenir.
- Le groupe des coureurs de la station, Erwan, Olivier, Thierry et Ludo que je n'ai pas accompagné depuis pas mal de temps.
- L'ensemble des membres présents et passés de l'équipe "Glycobiologie marine", Murielle, Agnès, Justina, Alexandra, Cécile, Mirjam, Tristan, Gurvan, Jan-Hendrik, François, Jérôme, Bernard et Lionel. Avec une spéciale à Murielle, essentielle au bon fonctionnement du labo et qui m'a initiée à la purif de protéine, Tristan qui m'a enseigné un peu de biologie moléculaire et de microbiologie et à qui j'ai squatté la paillasse pendant trois ans et Alexandra, une très

bonne complice de blagues pourries.

- Les membres du jury, qui ont accepté d'évaluer ce travail et de venir visiter Roscoff au mois de mars.

Et je tiens à remercier particulièrement Gurvan et Mirjam qui m'ont donné l'opportunité de réaliser cette thèse sous leur direction. Gurvan, tu auras été une source d'idées intarissable pour faire avancer les différents projets et quant à toi Mirjam, merci pour ton encadrement scientifique mais également pour ton côté humain.

Table des matières

Merci à :	1
Liste des abréviations	9
Lettres grecques	9
Préambule	11
Introduction générale	17

I. Interaction entre les bactéries marines et les algues**17**

I.A. La paroi des algues, une barrière physique	17
I.A.1. Les polysaccharides de la phase squelettique de la paroi des algues.....	18
I.A.2. Les polysaccharides de la phase amorphe de la paroi des algues brunes.....	19
I.A.3. Les polysaccharides de la phase amorphe de la paroi des algues rouges.....	19
I.B. Les réponses de défense des algues, une barrière chimique	22
I.B.1. Reconnaissance du pathogène.....	22
I.B.1.a. <i>Eliciteurs endogènes</i>	22
I.B.1.b. <i>Eliciteurs exogènes</i>	24
I.B.2. Mécanismes de défense de l'algue.....	24
I.B.2.a. <i>Le burst oxydant</i>	26
I.B.2.b. <i>Les métabolites halogénés</i>	26
I.B.3. La résistance bactérienne face aux espèces activées de l'oxygène.....	27
I.C. <i>Zobellia galactanivorans</i> et l'exploitation de son génome	31
I.C.1. <i>Zobellia galactanivorans</i>	31
I.C.2. De l'analyse in silico du génome à l'analyse in vitro.....	34

II. Les iota-carraghénases.....**37**

II.A. Le substrat : Le iota-carraghénane	37
II.B. La découverte	38
II.C. Le gène	38
II.D. La structure tridimensionnelle de la iotase d'“<i>Alteromonas fortis</i>”	39

II.E. Le mode d'action.....	42
-----------------------------	----

III. Les halopéroxydases dépendantes du vanadium....45

III.A. Le rôle des vHPO.....	45
III.B. Classification.....	46
III.C. Cycle catalytique.....	46
III.D. Produits finaux.....	47
III.E. Accumulation de l'iode dans les algues brunes.....	49
III.F. Protection cellulaire.....	50
III.G. Structures.....	50
III.H. Site de fixation de l'ion vanadate.....	53

Présentation du travail.....55

Chapitre I : Identification des résidus catalytiques et étude mécanistique des iota-carraghénases de la famille 82.....59

I. Présentation de l'article.....59

I.A. Nouvelles séquences de glycoside hydrolases de la famille 82.....	59
I.B. Identification des résidus importants pour la réaction catalytique.....	60
I.C. Détermination des paramètres cinétiques.....	60
I.D. Structure de la iotase d'“Alteromonas fortis”.....	61
I.E. Modèle complet de la iotase "d'Alteromonas. Fortis"	62

Chapitre II : Identification et caractérisation d'une nouvelle famille de glycoside hydrolases.....91

I. Introduction.....91

II. Résultats.....	94
II.A. Analyse bio-informatique.....	94
II.B. La protéine Zg-3597.....	100
II.B.1. Purification.....	100
II.B.2. Diffusion de rayons X aux petits angles.....	102
II.B.3. Structure à basse résolution.....	104
II.B.4. Modélisation.....	108
II.B.5. Cristallogenèse.....	109
II.B.6. Cristallographie.....	109
II.B.7. Stabilité en fonction de la température.....	110
II.B.8. Activité.....	113
II.B.9. Analyse des produits terminaux.....	114
II.C. La protéine Zg-4663.....	116
II.C.1. Purification.....	116
II.C.2. Stabilité en fonction de la température.....	116
II.C.3. Cristallogenèse.....	117
II.C.4. Cristallographie.....	118
III. Discussion.....	121
III.A. Nouvelle famille de glycoside hydrolases ?.....	121
III.B. Structure.....	122
III.C. Activités.....	124
III.D. Dans quelle niche écologique est présente cette nouvelle famille de glycoside hydrolases ?.....	128
III.E. Evolution.....	129
IV. Matériel et méthodes.....	130
IV.A. Clonage et surexpression.....	130
IV.B. Purification.....	130
IV.C. Collecte et traitement de données de diffusion de rayons X aux petits angles de la protéine Zg-3597.....	131
IV.D. Modélisation de la protéine Zg-3597.....	132
IV.E. Stabilité à la température.....	132
IV.F. Cristallogenèse.....	132
IV.G. Collecte des données de diffraction de rayons X.....	133
IV.H. Traitement des données de diffraction de rayons X.....	135
IV.I. Préparation de kappa-carraghénane dépourvu de motifs iota-carraghénane.....	135

IV.J. Tests d'activités de la protéine Zg-3597.....	136
IV.K. Électrophorèse d'hydrate de carbone en gel de polyacrylamide (C-PAGE).....	136
IV.L. Production et analyse par RMN des produits de dégradation de la protéine Zg-3597.....	136
IV.M. Phylogénie.....	137

Chapitre III : Caractérisation structurale d'une iodopéroxydase dépendante du vanadium de *Zobellia galactanivorans*.....141

I. Introduction.....141

II. Résultats et discussion.....143

II.A. Résolution de la structure cristallographique.....	143
II.B. La structure de la vIPO1 de <i>Zobellia galactanivorans</i>	149
II.C. Comparaison avec les structures des vHPO d'algues et de champignon	150
II.D. Structures tertiaires et quaternaires des vHPO.....	151
II.E. Site de fixation du vanadate.....	153
II.F. Phylogénie des vHPO.....	159
II.G. Rôle de la boucle entre les hélices 9 et 10.....	162

III. Matériel et méthodes.....166

III.A. Surexpression et purification.....	166
III.B. Cristallisation.....	166
III.C. Collecte des données de diffraction et résolution de la structure.....	166
III.D. Phylogénie.....	167

Conclusions et perspectives.....	171
I. Les iota-carraghénases de la famille GH 82.....	171
II. Identification et caractérisation d'une nouvelle famille de glycoside hydrolases.....	172
III. Une iodo-péroxydase dépendante du vanadium de Zobellia galactanivorans.....	173
IV. Perspectives générales.....	175
Références.....	181

Liste des abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique
ARN : Acide ribonucléique
BSA : Albumine de sérum bovin
C.A.Z.Y.: Enzymes activent sur cabohydrates
CHES : Acide 2-(Cyclohexylamino)ethanesulfonique
COHV : Composés organiques halogénés volatiles
C-PAGE : Electrophorèse de carbohydrates sur gel polyacrylamide
CRAZY : Criblage d'activité enzymatique
CUT loci : loci d'utilisation des carbohydrates qui contiennent des TBDR
DLS : Diffusion dynamique de lumière
EAO : Espèces activées de l'oxygène
EDTA : Acide ethylenedinitrilotetraacetique
GH : Glycoside hydrolase
HCl : Acide chlorhydrique
HEPES : Acide 4-(2-Hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonique
I3C : Acide 5-Amino-2,4,6-triiodoisophthalique
LPS : Lipopolysaccharides
MAD : Dispersion anormale multi-longueurs d'ondes
MIR : Remplacement isomorphe multiple
MPD : (±)-2-Methyl-2,4-pentanediol
NaCl : Chlorure de sodium
PEG : Polyéthylène glycol
RMN : Résonance magnétique nucléaire
SAXS : Diffusion de rayons X aux petits angles
SOD : Superoxyde dismutase
TBDR : Récepteur TonB-dépendant
TCEP : Tris(2-carboxyethyl)phosphine hydrochloride
vBPO : Bromoperoxyase dépendante du vanadium
vCPO : Chloroperoxyase dépendante du vanadium
vHPO : Haloperoxyase dépendante du vanadium
vIPO : Iodoperoxyase dépendante du vanadium

Lettres grecques

α : Alpha
 β : Beta
 ι : Iota
 κ : Kappa
 λ : Lambda
 ν : Nu

Préambule

Prenez une petite poignée de *Chondrus crispus* par quart de litre d lait. Bien rincer les algues. Faites bouillir pendant 5 à 10 minutes dans le lait en remuant. Filtrez le lait chaud dans une passoire ou un écumoire. Remettez le lait à bouillir cinq minutes avec l'arôme souhaité, par exemple chocolat ou vanille. Versez dans des coupes. Laissez refroidir.

Cette recette permet de préparer un flanc sans utiliser d'œufs. Pour comprendre pourquoi le fait de faire bouillir une algue rouge dans un milieu aqueux permet d'obtenir un gel, il faut s'intéresser à la constitution et à la structure chimique des algues.

Lorsque l'on fait bouillir des algues dans une solution aqueuse, on en extrait des polysaccharides solubles qui forment un gel en refroidissant. Ces polysaccharides sont des constituants de la paroi de l'algue. Dans le cas des algues rouges, il s'agit d'agars ou de carraghénanes (Craigie, 1990). Les algues brunes et les algues vertes qui appartiennent à des lignées évolutives différentes (Figure I_1) (Baldauf, 2008) possèdent d'autres types de polysaccharides gélifiants (Alginates et ulvane) dans leurs parois (de Reviers, Bruno, 2002). Chez les plantes terrestres les équivalents structuraux sont la pectine et l'acide pectique (Popper, 2008). Les polysaccharides pariétaux sont une vaste source de carbone pour de nombreuses bactéries qui vivent à la surface des végétaux (Figure I_2). Ces bactéries entretiennent diverses relations trophiques avec leurs hôtes. Ces interactions sont de type symbiotique, commensalisme, saprophytique ou pathogénique. En effet, certaines bactéries sont capables d'attaquer de manière très agressive les végétaux, au point de les tuer. Mais les végétaux sont capables de détecter cette agression et ont développé des systèmes de défenses sophistiqués afin de contrer l'attaque. Ces mécanismes de défense sont relativement bien connus chez les plantes terrestres (Hammond-Kosack and Jones, 1996; Jwa et al., 2006; Garcia-Brugger et al., 2006) et commencent à être étudiés chez les algues depuis une dizaine d'années (Potin et al., 1999; Weinberger et al., 1999). Néanmoins, les mécanismes de défense des végétaux ne sont pas infaillibles, et les bactéries pathogènes ont développé un panel de systèmes capables de contrer les défenses des végétaux. Dans le milieu marin les interactions entre les bactéries et les algues sont beaucoup moins documentées que les interactions entre les plantes terrestres et leur flore bactérienne. De par la constitution originale des parois algales, les bactéries épiphytes des algues doivent être équipées d'enzymes spécifiques

capables de dégrader ces parois de composition très diverses (Michel et al., 2006). De plus, les algues rouges et les algues brunes ont développé des systèmes de défense singuliers qui passent par l'utilisation de composées halogénés (Potin et al., 2002). C'est en partie pour cette raison qu'il est mentionné, dans la recette du flanc, qu'il faut bien rincer les algues avant de les utiliser. Non pas qu'il y ait des molécules toxiques, mais les algues accumulent dans leurs parois des halogénures qui pourraient donner un goût désagréable à votre dessert.

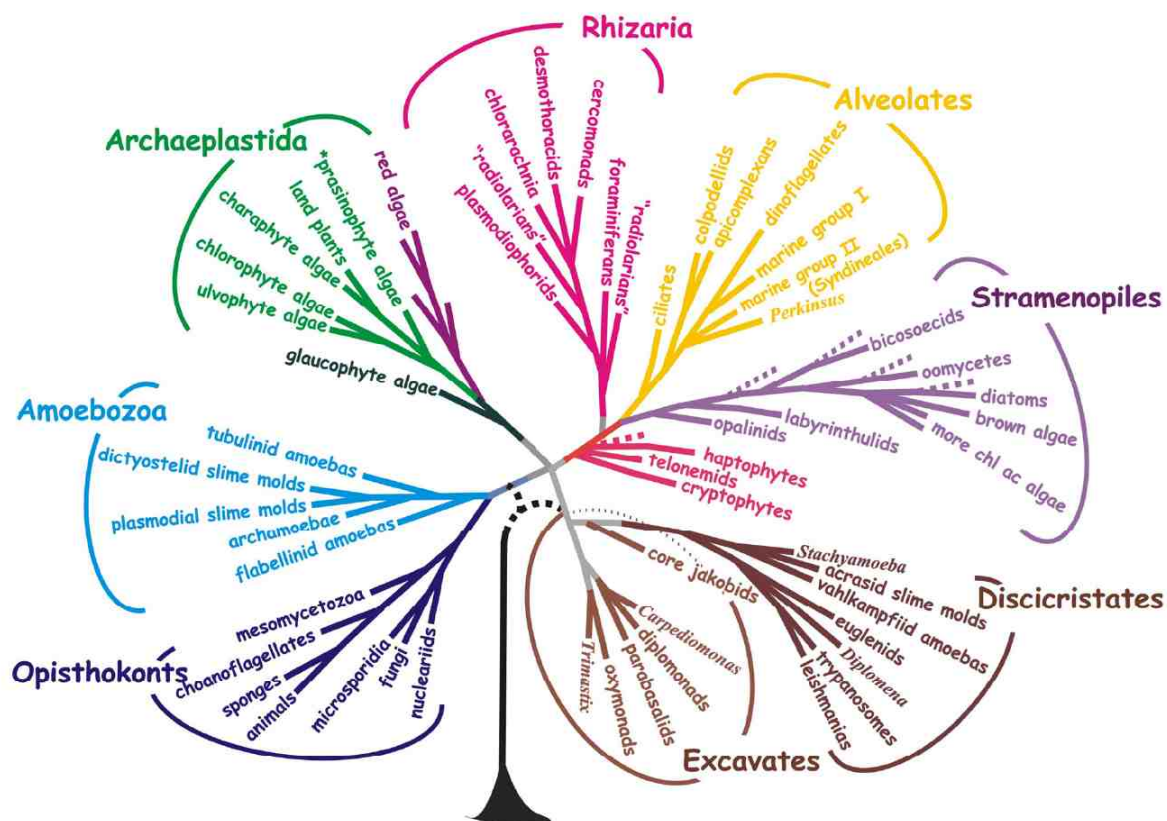


Figure 1.1 : Arbre phylogénétique des groupes majeurs d'eucaryotes (Extrait de Baldauf 2008)

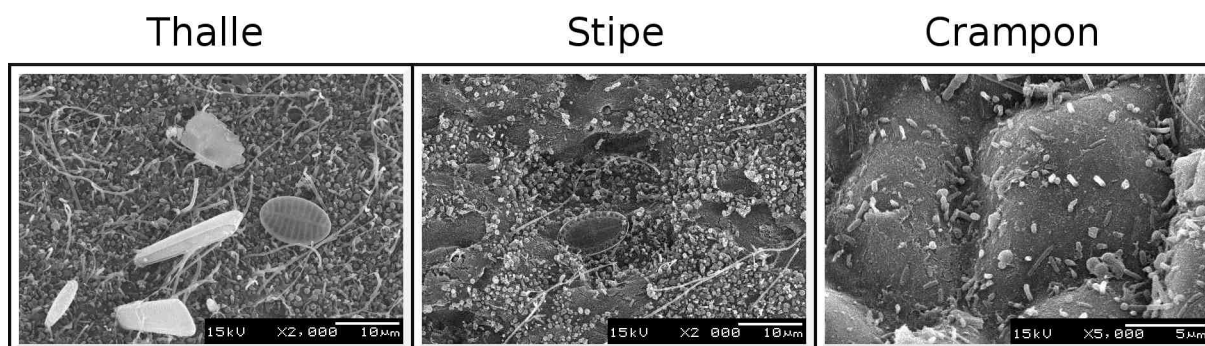


Figure I 2.: Photos en microscopie électronique à balayage de bactéries à différentes positions de la surface de l'algue brune Laminaria digitata. (Photo du Dr S. Salaun)

Plusieurs bactéries spécialisées dans la dégradation de polysaccharides marins ont été identifiées, comme d'«*Alteromonas fortis*» (“ ” car nom non officiel) (Potin, 1992) ou *Pseudoalteromonas carrageenovora*, qui, par exemple, sont capables de dégrader les carraghénanes de la paroi des algues rouges (Akagawa et al., 1992). Cependant, actuellement, aucune étude ne porte sur la présence ou non, chez les bactéries marines, de systèmes de protection face à une réponse défensive de la part d'une algue. Le séquençage du génome de *Zobellia galactanivorans* (Barbeyron et al., en préparation), une flavobactérie marine, a permis d'identifier des systèmes complexes de dégradation de polysaccharides marins, comme trois α -carraghénases de la famille des glycoside hydrolases (GH) 82, dont deux sont uniques de par leurs tailles. Le génome s'est également révélé être d'un grand potentiel de découverte de nouvelles glycoside hydrolases au sein de groupes de gènes possiblement organisés en opérons. Par ailleurs, et de manière surprenante, *Z. galactanivorans* possèdent des gènes qui codent des enzymes similaires aux halopéroxydases d'algues et qui pourraient être impliquées dans les mécanismes de résistance aux systèmes de défense des algues (Barbeyron et al. en préparation).

Dans le but d'apporter de nouvelles informations pour mieux comprendre les mécanismes d'interaction entre les bactéries marines et les macro-algues, j'ai effectué des analyses structurales et fonctionnelles de plusieurs enzymes originales de bactéries marines. En particulier, il s'agissait de mieux comprendre le mode d'action de la α -carraghénase d'«*Alteromonas fortis*», d'identifier définitivement, par mutagenèse dirigée, les résidus clefs du mécanisme catalytique, de comparer cette première enzyme, représentante de la famille GH 82, avec les autres séquences identifiées dans le génome de *Z. galactanivorans*. Un autre

objectif de mes études était la création d'une potentielle nouvelle famille de glycoside hydrolases pour laquelle j'ai entamé la caractérisation biochimique et structurale. Enfin, je me suis intéressé à la relation structure/fonction de la première iodo-péroxydase de bactérie marine, également découverte dans le génome de *Z. galactanivorans*. Pour ces études, j'ai adopté une stratégie combinant des approches de biologie structurale, la cristallographie et la diffusion aux petits angles de rayons X, aux techniques de surexpression hétérologue de protéine, de mutagenèse dirigée et d'enzymologie.

Introduction

générale

Introduction générale

I. Interaction entre les bactéries marines et les algues

Malgré le fait qu'ils ne soient pas visibles à l'œil nu, les procaryotes sont des composants essentiels du biotope terrestre. Il y aurait, à la surface de la planète, entre 4 et $6 \cdot 10^{30}$ bactéries (Whitman et al., 1998). On retrouve donc ce type d'organisme dans tous les milieux, mais également associés à beaucoup d'autres êtres vivants. En effet, une partie de ces bactéries vivent en interactions avec d'autres êtres vivants et entretiennent diverses relations trophiques avec leurs hôtes (symbiose, commensalisme, saprophytisme ou pathogénie). Mais quel que soit le type d'interaction, les bactéries interagissent à un moment avec la matrice extracellulaire ou la paroi de l'hôte. Cette paroi, essentiellement constituée de polysaccharides, peut jouer un rôle de protection physique contre les agresseurs.

I.A. La paroi des algues, une barrière physique

La paroi a un rôle dans la croissance, la forme de l'organisme, la régulation du passage des nutriments et des ions dans la cellule ainsi que la réponse du végétal à son environnement et aux stress induits par les pathogènes (Carpita and Gibeaut, 1993; Peters et al., 2000; Malinowski and Filipecki, 2002; Reiter, 2002). Avec toutes ces fonctions, elle représente une réelle barrière physique isolant le végétal de son environnement. Alors que cette fonction est commune aux végétaux terrestres et aux macro-algues marines, la composition de la paroi est très différente comme le montre le tableau I_1 qui résume la composition en polysaccharides de la paroi des algues et des plantes terrestres. Les polysaccharides qui constituent cette paroi forment deux phases bien distinctes. La phase squelettique est constituée par des polysaccharides cristallins alors que la phase amorphe est moins structurée. Chez les algues, et contrairement aux plantes terrestres, les composants de la phase amorphe de la paroi sont majoritaires au regard des constituants de la phase squelettique. Ces différences sont liées à leurs habitats. Les plantes terrestres ont besoin d'une paroi très rigide afin de compenser la gravité, d'où une forte proportion de polysaccharides squelettiques. Au contraire, les algues vivant dans un milieu beaucoup plus porteur, du à la poussée d'Archimède, doivent faire face

à la dessiccation, à marée basse, et donc retenir un maximum d'eau, d'où une plus grande proportion de la phase amorphe de la paroi. Dans la suite, je m'intéresserai principalement aux algues brunes et aux algues rouges.

		Plantes terrestres	Chlorophyceae	Phaeophyceae	Rhodophyceae
Phase cristalline		Cellulose	Cellulose Xylane Mannane	Cellulose	Cellulose Xylane Mannane
Phase matricielle	Neutre	Hemicelluloses			
	Acide	Pectine		Alginates	
	Sulfaté		Xylogalactoarabinane Glucuronoxylorhammane	Fucanes	Agars Carraghénanes

Tableau I_1 : Résumé des polysaccharides qui composent la paroi des plantes terrestres ainsi que des algues vertes, brunes et rouges.

I.A.1. Les polysaccharides de la phase squelettique de la paroi des algues

La phase squelettique dans la paroi joue essentiellement un rôle structural. Pour la majorité des algues, la partie squelettique est composée de polysaccharides neutres et linéaires. Alors que la cellulose (Figure I_3) est présente chez toutes les plantes terrestres, chez les algues ce polysaccharide est aussi le plus commun mais il peut être absent chez certaines d'entre elles (Kreger, 1962). Chez les végétaux terrestres, le taux de cellulose est d'environ 30 %, alors qu'il est de 1 à 8 % dans les thalles des algues brunes (*Phaeophyceae*) et des algues rouges (*Rhodophyceae*) (Ross, 1953). Cette faible quantité de cellulose est cependant suffisante pour permettre à l'algue de résister à l'hydrodynamisme. Dans certaine famille d'algues, la cellulose est remplacée par des chaînes de mannane ou de xylane (Kloareg and Quatrano, 1988).

I.A.2. Les polysaccharides de la phase amorphe de la paroi des algues brunes

Le composant majeur de la phase amorphe de la paroi des *Pheophyceae* est un hétéropolysaccharide constitué de deux acides uroniques, l'acide alginique. Le polymère est synthétisé sous la forme d'un homo acide poly $\beta(1,4)$ -D-mannuronique et dans un second temps une manuronanase C-5 épimérase convertit une partie des résidus acide mannuronique en acide $\alpha(1,4)$ -L-guluronique. Au final l'acide alginique est formé de blocs de poly $\beta(1,4)$ -D-mannuronate (MM) de blocs de poly $\alpha(1,4)$ -L-guluronate (GG) ainsi que de blocs mixtes (MG) (Figure I_3) (Haug et al., 1966; Haug et al., 1967). Les blocs GG sont éliciteurs de réponse de défense de type "burst oxydant" chez l'algue *Laminaria digitata*; la détection des oligos GG déclenchant une émission de H_2O_2 (Küpper et al., 2001).

Les fucanes sulfatés sont le deuxième type de polysaccharide matriciel des algues brunes et particulièrement des *Fucales*. Bien qu'on les trouve en moins grande quantité que l'acide alginique, ils peuvent représenter chez certaines espèces comme *Pelvetia canaliculata* jusqu'à 40 % du poids sec (Mabeau et al., 1990). Ils sont constitués d'un squelette disaccharidique qui a pour motif : $[4)\text{-}\alpha\text{-L-fucopyranosyle-2,3-disulfate-(1,3)-}\alpha\text{-L-fucopyranosyle-2-sulfate-(1,)]_n$ (Daniel et al., 1999; Daniel et al., 2001; Chevolot et al., 2001; Descamps et al., 2006; Colin et al., 2006). La grande diversité qui existe au sein des fucanes a abouti à une classification en trois familles. Les fucanes hautement ramifiés et sulfatés sont appelés homofucane ou fucoïdane (Mian and Percival, 1973a; 1973b), les fucoglucuronanes (sargassanes ou ascophyllanes) sont ramifiées par de courtes chaînes neutres ou sulfatées de fucose, xylose et galactose (Abdel-Fattah et al., 1974; Medcalf and Larsen, 1977a; 1977b). Et la troisième famille, les glucuronofucoidanes, est très riche en galactose ou glucose (Percival and Young, 1974; Medcalf et al., 1978).

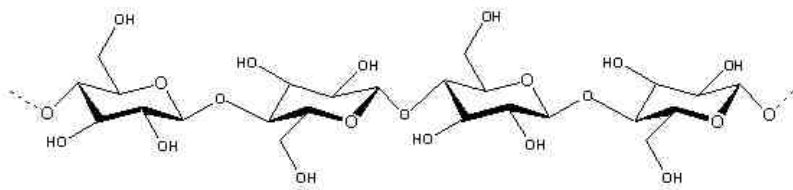
I.A.3. Les polysaccharides de la phase amorphe de la paroi des algues rouges

Les algues rouges fabriquent essentiellement deux types de galactanes sulfatés

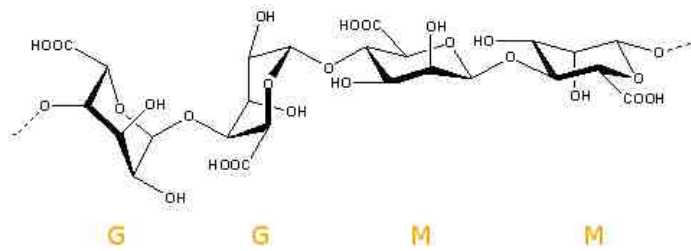
linéaires de haut poids moléculaire (supérieur à 10^6 g.mol⁻¹) (Tong et al., 1980). Il s'agit des agars et des carraghénanes (Figure I_3). Pour les deux types de polysaccharides la base est un galactane composé alternativement de (1,4)- α -galactopyranose et de (1,3)- β -D-galactopyranose. L'unité liée (1,4)- α est de configuration L dans les agars et D dans les carraghénanes. Ce squelette est modifié par la présence de ponts 3,6 anhydro dans l'unité liée en β -(1,3) ainsi que dans les carraghénanes, par la présence de groupement ester-sulfates en 2, 4 ou 6 des deux unités.

Quelques polysaccharides plus rares et plus complexes ont été décrits dans la phase matricielle de différentes algues rouges. Dans l'espèce *Bostrychia montagnei*, par exemple, un xylogalactane sulfaté et méthylé a été décrit (Duarte et al., 2002), chez *Nothogenia fastigiata*, des xylomannans sulfatés ont été identifiés (Kolender et al., 1997) et un galacto-glucurono-xylo-glycan a été trouvé chez *Apophloeia lyalli* (Watt et al., 2002). Les polysaccharides matriciels des parois d'algues rouges n'étant que peu étudiés, nous supposons que, en analogie avec des parois de plantes terrestres, d'autres polysaccharides mineurs peuvent être présents, mais ils ne sont pas encore connus à ce jour.

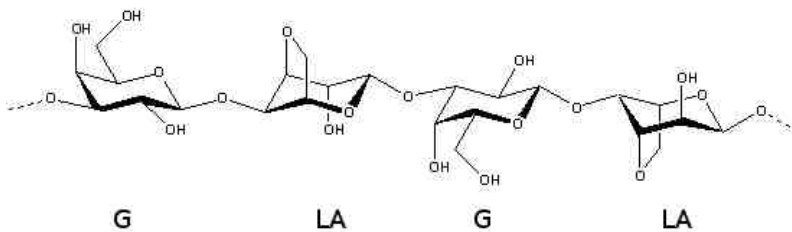
⇒ Figure I_3 : Exemple de polysaccharides algaux. **G** : α -(1,4)-L-guluronate. **M** : β -(1,4)-D-mannuronate. **G** : (1-4) α -D-galactopyranose. **LA** : 3,6 anhydro (1-3) β -L-galactopyranose. **G4S** : (1-4) α -D-galactopyranose 4 sulfate. **DA** : 3,6 anhydro (1-3) β -D-galactopyranose. **DA2S** : 3,6 anhydro (1-3) β -D-galactopyranose 2 sulfate. **G2S** : (1-4) α -D-galactopyranose 2 sulfate. **D2S,6S** : (1-3) β -D-galactopyranose 2,6 sulfate.



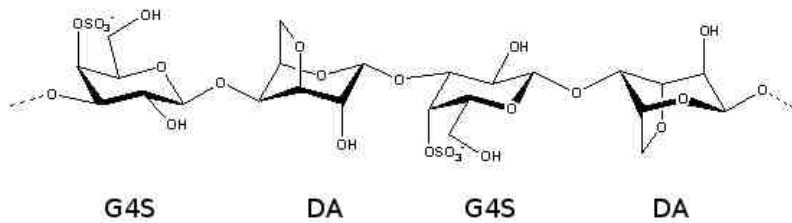
Cellulose



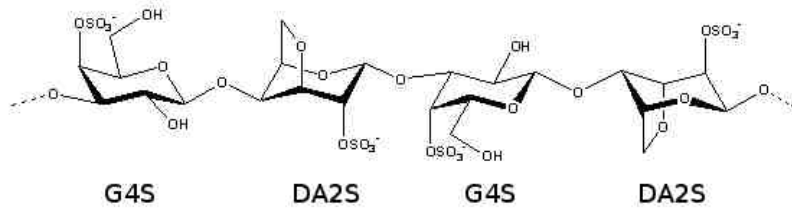
Acide alginique



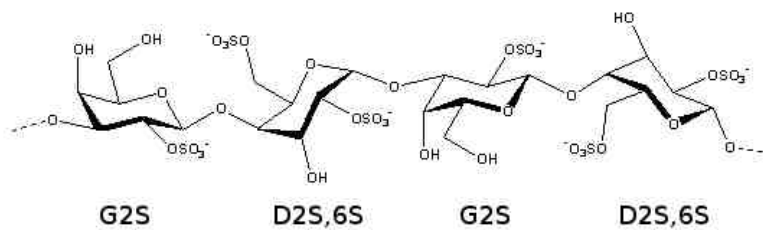
Agarose



Kappa-carraghenane



Iota-carraghenane



Lambda-carraghenane

I.B. Les réponses de défense des algues, une barrière chimique

Dans leur milieu naturel, les algues subissent continuellement des attaques par d'autres organismes. Les agresseurs peuvent être des micro-organismes (Sawabe et al., 1998; Sawabe et al., 2000), des algues endophytes (Ellertsdottir and Peters, 1997), des champignons (Küpper and Müller, 1999) ou des herbivores. Ces organismes pathogènes causent un certain nombre de pathologies sur les cultures d'algues ou les populations naturelles (Andrews 1976; 1977; Correa and Sánchez, 1996). En réponse à ces attaques, les algues ont développé des mécanismes de défense auxquels doivent faire face ces pathogènes. Par exemple, les algues synthétisent un très vaste répertoire de molécules aux propriétés biocides et détergentes pour lutter contre les micro-organismes (de Nys and Steinberg, 2002; Kubanek et al., 2003), mais également aux propriétés astringentes pour se défendre des herbivores (Paul and Puglisi, 2004; Emsley et al., 1996). Compte tenu, des coûts métaboliques des défenses constitutives, la mise en place des systèmes de défense chimique induite, nécessite une première étape indispensable, qui consiste à détecter la présence de l'agresseur.

I.B.1. Reconnaissance du pathogène

Les systèmes de reconnaissance de pathogènes sont relativement bien connus chez les végétaux terrestres (John et al., 1997; Ebel and Mithöfer, 1998; Radman et al., 2003; Tor et al., 2009). En revanche, chez les algues, l'identification de molécules servant d'éliciteur du système de défense est récente et concerne quelques macroalgues rouges (Bouarab et al., 1999; Weinberger et al., 1999; 2005a) et la macroalgue brune *Laminaria digitata* (Potin et al., 1999).

I.B.1.a. Eliciteurs endogènes

Les premiers modèles d'étude sur la perception d'une agression pathogène *via* un éliciteur endogène concernaient *L. digitata* (Potin et al., 1999) et *Gracilaria conferta* (Weinberger et al., 1999).

Comme je l'ai déjà mentionné dans le paragraphe concernant les polysaccharides de la phase amorphe des algues brunes, les oligo-gulonates, qui forment les blocs GG sont éliciteurs d'une réponse défensive chez l'algue brune *L. digitata* (Küpper et al., 2001). Ceux-ci induisent un burst respiratoire et oxydant qui est rapide et transitoire. Suite à une première élicitation l'algue est réfractaire à une seconde élicitation pendant trois heures. Les blocs GG peuvent être naturellement produit au cours de l'agression, notamment par les micro-organismes alginolytiques (Potin et al., 1999). La structure dite en boîte à œufs formée par les blocs GG en présence d'ions calcium est similaire à celle des oligo-saccharides d'acides galacturoniques qui résultent de la dégradation de la pectine. Il semble que ce soit cette structure en boîte à œufs qui soit responsable de l'activité des oligo-saccharides d'acides galacturoniques chez le tabac (Spiro et al., 1998), et le mécanisme serait très similaire chez *L. digitata*.

Chez l'algue rouge *G. conferta* des oligo-saccharides de celluloses induisent des nécroses, mais la réponse de l'algue n'a pas été étudiée plus en détail (Weinberger and Friedlander, 2000). Les oligo-saccharides d'agars, qui sont produits lors de la dégradation de la paroi, déclenchent de manière très efficace un "burst" oxydant. Au bout de quelques heures, ils induisent également, des nécroses (Weinberger et al., 1999). Les oligo-saccharides d'agars présentant la meilleure efficacité d'élicitation, ont une longueur de 6 à 8 sous-unités disaccharidiques. A une concentration de 0,01 à 0,5 μM ils induisent 50 % de la réponse maximale, ce qui est comparable aux concentrations d'oligo acide galacturonique nécessaires chez les végétaux terrestres. La structure en hélice des oligo-saccharides d'agars dans l'eau semble être déterminante dans la reconnaissance par *G. conferta* (Weinberger et al., 2001).

Les éliciteurs endogènes identifiés sont donc actuellement uniquement de type oligo-saccharidique. Leurs activités élicitrices sont dépendantes de la taille et de la structure de ces molécules. La spécificité de taille et de structure des oligo-saccharides éliciteurs ainsi que la période réfractaire d'élicitation dans le cas des oligo-gulonates, sont en faveur de l'existence de récepteurs spécifiques. Néanmoins, la nature de ces récepteurs restent pour le moment inconnus.

I.B.1.b. Eliciteurs exogènes

En plus des éliciteurs endogènes il a été montré qu'il peut y avoir des éliciteurs exogènes et notamment des lipopolysaccharides (LPS) bactériens. En effet, les LPS de diverses bactéries pathogènes de mammifères et de bactéries marines induisent chez *L. digitata* un burst oxydant (Küpper et al., 2006). Mais contrairement au burst rapide induit par les oligos guluronates, le burst élicité par les LPS est retardé, tout en restant d'amplitude similaire.

Chez *G. conferta* des peptides bactériens de petite taille (4 à 20 acides aminées) entraînent l'apparition de nécroses (Weinberger and Friedlander, 2000). Cependant, ces peptides n'ont pas été caractérisés et la réponse de type burst oxydant de l'algue n'a pas été étudiée.

I.B.2. Mécanismes de défense de l'algue

L'identification de ces différents éliciteurs, chez les algues, a permis de mettre en évidence les systèmes de défense de l'algue. Le premier à se mettre en place est le burst oxydant que j'ai déjà mentionné. La signalisation intracellulaire conduisant à la production des espèces activées de l'oxygène, ainsi que les enzymes les synthétisant, sont bien décrites (Revue Cosse et al., 2008). D'autres voies métaboliques impliquées dans la défense sont activées suite à l'élicitation. Il s'agit de la voie des phénylpropanoïdes, celle des oxylipines et celle du métabolisme halogéné (Figure I_4). Aucun aspect de cette thèse ne concerne les voies des phénylpropanoïdes et des oxylipines, je me concentrerai donc sur le burst oxydant et la synthèse de composés halogénés.

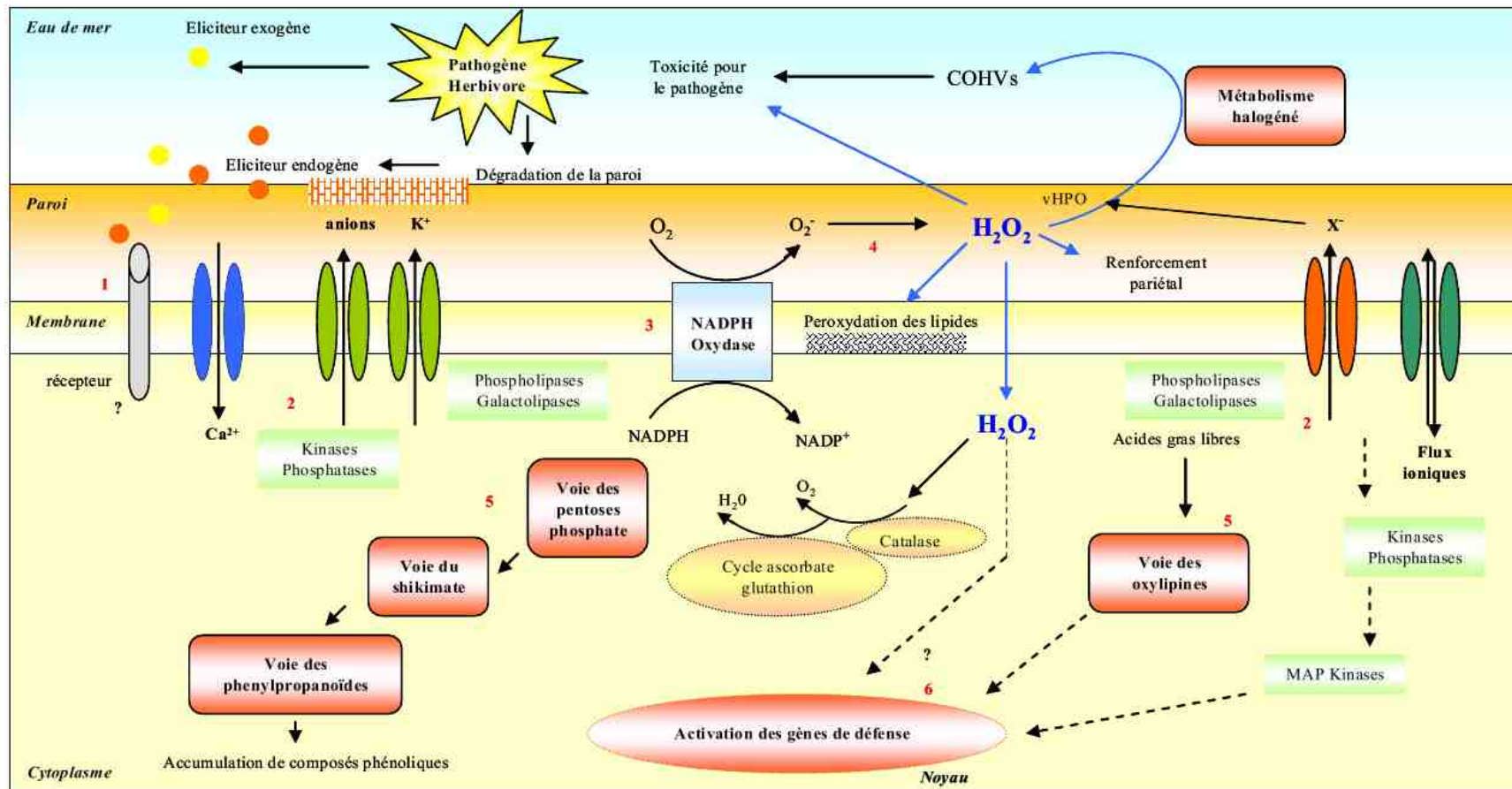


Figure I_4: Modèle de la signalisation et des réponses de défense chez les algues. 1) Perception de l'agression par reconnaissance d'un éliciteur dérivé du pathogène ou de la paroi de l'algue au niveau d'un récepteur membranaire putatif. 2) Flux ioniques accompagnés d'activation de phospholipase et d'une cascade de phosphorylation conduisant à 3) l'activation d'une NADPH oxydase. 4) Dismutation spontanée de l'anion superoxyde d'hydrogène. 5) Activation des voies métaboliques primaires et secondaires. 6) Induction de la transcription de gènes de défense par différentes voies de transduction. (Depuis Cosse, 2007)

I.B.2.a. Le burst oxydant

Le burst oxydant est une réponse de défense précoce qui consiste en une émission rapide, massive et transitoire d'espèces activées de l'oxygène (EAO) comme le peroxyde d'hydrogène, l'anion superoxyde ou le radical hydroxyle. Ce phénomène défensif est retrouvé dans la majorité des êtres vivants comme les mammifères (Baldrige and Gerard, 1932), les plantes (Wojtaszek, 1997) et les algues (Küpper et al., 2001). La production des EAO met généralement en jeu une NADPH oxydase membranaire, néanmoins des oxydases de type différent peuvent être impliquées.

Chez les algues rouges et brunes, il a été montré à plusieurs reprises qu'une NADPH oxydase serait impliquée dans le burst oxydatif (Bouarab, 2000; Küpper et al., 2001; Weinberger et al., 2005a). Le mécanisme d'activation de cette enzyme semble être commun aux plantes supérieures et aux algues rouges et brunes. L'activation de la NADPH oxydase nécessite l'ouverture de canaux ioniques, l'activation de phospholipases et une cascade de phosphorylations (Figure I_4) (Küpper et al., 2001). Mais la NADPH oxydase n'est pas la seule enzyme impliquée dans la production d'EAO. Chez l'algue rouge *Gracilaria chilensis*, le peroxyde d'hydrogène, produit lors du burst oxydant en réponse aux oligo-saccharides d'agars, semble être produit par une oxydase d'oligo-agars (Weinberger et al., 2005a). Et chez *Chondrus crispus*, il a été mis en évidence la présence d'une L-acide-aminé oxydase pariétale qui a pour substrat la L-asparagine (Weinberger et al., 2005b).

I.B.2.b. Les métabolites halogénés

Les algues sont capables de concentrer les halogénures de leur environnement jusqu'à 5 % de leur poids sec en iode chez les jeunes plantules de *L. digitata* (Küpper et al., 1998). Les excès de lumière (Mtolera et al., 1996), les rayonnements UV (Laternus et al., 2004) et les changement de température (Abrahamsson et al., 2003) entraînent chez les algues une augmentation de la production des EAO mais également une production de composés organiques halogénés volatiles (COHV) et d'iode moléculaire. Le métabolisme halogéné des

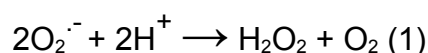
algues marines a particulièrement été étudié en raison de sa contribution au cycle biogéochimique des halogénures. En effet, les COHV et l'I₂ ont un impact sur la destruction de l'ozone et la formation des nuages au-dessus des zones côtières (McFiggans et al., 2004; O'Dowd et al., 2002; Leblanc et al., 2006). Les algues, n'ayant probablement pas pour objectif de faire tomber la pluie sur la Bretagne, ni de détruire la couche d'ozone, produisent ces COHV dans un but qui serait défensif. C'est suite au burst oxydant qu'une seconde réaction de défense impliquant les COHV et l'iode moléculaire se met en place. Il a d'abord été proposé que les COHV étaient des métabolites secondaires de la détoxification des EAO générées au cours du burst oxydant (Pedersén et al., 1996). En effet, à forte concentration les EAO deviennent toxiques non seulement pour le pathogène mais également pour l'algue (Pedersén et al., 1996). C'est pourquoi des halopéroxydases joueraient un rôle important dans la détoxification cellulaire. Mais les études actuelles tentent à prouver que les COHV ne sont pas de simples déchets métaboliques mais qu'ils ont un rôle dans la défense de l'algue de par leurs activités antibiotiques (Manley, 2002). Même si la production de métabolites halogénés constitue une originalité par rapport aux plantes terrestres, ce mécanisme n'est pas spécifique aux algues puisque les leucocytes neutrophiles des mammifères possèdent eux aussi cette stratégie (Sepe and Clark, 1985). La synthèse de ces composés halogénés fait intervenir des enzymes particulières qui sont des halopéroxydases dépendantes du vanadium. Ces enzymes sont largement décrites dans le paragraphe III de cette introduction générale.

I.B.3. La résistance bactérienne face aux espèces activées de l'oxygène

Les EAO produites par les algues lors du burst oxydant, seraient en partie impliquées dans le contrôle de la flore épiphytique potentiellement pathogènes (Kupper et al., 2002). On peut donc imaginer que les bactéries pathogènes ont développé des systèmes pour se protéger des EAO générées par l'algue, comme cela a été décrit pour certains pathogènes humain (Farr and Kogoma, 1991; Seib et al., 2006). Les enzymes bactériennes impliquées dans cette détoxification ont été décrites chez la bactérie modèle *Escherichia coli* (Storz et al., 1990) (Farr and Kogoma, 1991) mais également chez *Neisseria gonorrhoeae*, une bactérie pathogène pour l'homme responsable de la blennorragie (Seib et al., 2006). Des EAO sont naturellement produits au cours de la respiration. Par exemple *E. coli* produit 5 µM/s d'ion

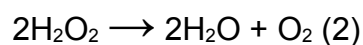
superoxyde (Imlay, 1995) et 14 $\mu\text{M/s}$ de peroxyde d'hydrogène (Seaver and Imlay, 2001). Tous les organismes aérobies possèdent donc des systèmes capables de bloquer ces métabolites qui pourraient causer des dommages sur l'ADN, les protéines et les membranes. Chez *E. coli* plus de 100 enzymes impliquées dans la défense face aux stress oxydatif ont été identifiées (Greenberg and Dimple, 1989; Pomposiello et al., 2001) et les gènes codants ces protéines sont extrêmement régulés (Compan and Touati, 1993; Dubrac and Touati, 2000). Chez *N. gonorrhoeae* un stress oxydatif augmente la transcription de 80 gènes (Stohl et al., 2005), dont plusieurs codent pour des enzymes avec un rôle connu dans la détoxification des EAO. Néanmoins, *N. gonorrhoeae* possèdent un large panel de systèmes de neutralisation des EAO que l'on peut séparer en trois groupes. Le premier est constitué d'enzymes qui ont pour substrat les EAO. Parmi ces enzymes, on retrouve :

Les superoxydes dismutases (SOD) qui catalysent la dismutation de l'ion superoxyde (Réaction 1).



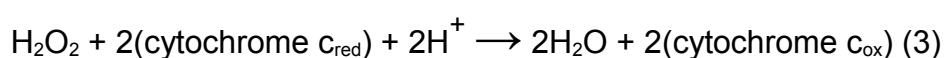
Il existe trois types de SOD, une enzyme cytoplasmique à manganèse, une protéine cytoplasmique à fer et une SOD periplasmique à Cuivre/Zinc. Ces trois types de SOD sont présentes chez *E. coli*, alors qu'il y en a que deux chez *N. meningitidis* et une seule chez *N. gonorrhoeae*. Cette réaction n'est pas la plus intéressante pour detoxifier les EAO car même si elle neutralise l'ion superoxyde qui est extrêmement réactif, elle produit du peroxyde d'hydrogène qui est une autre EAO mais moins réactive. Il semble que, du fait que l'on retrouve une seule SOD chez *N. Gonorrhoeae*, cette bactérie pathogène n'ait pas orienté son système de défense vers l'utilisation de SOD.

Les catalases sont des enzymes à hème qui convertissent le peroxyde d'hydrogène en oxygène et en eau (Réaction 2).



Chez *N. gonorrhoeae* une seule catalase est présente, principalement dans le cytoplasme, et en faible quantité dans la membrane plasmique, mais son niveau d'expression est 100 fois supérieure à celui retrouvé chez *N. meningitidis* (Archibald and Duong, 1986) et *E. coli* (Hassett et al., 1990).

Les peroxydases à cytochrome c sont des enzymes qui ont deux hèmes comme cofacteur. Elles sont responsables de la transformation du peroxyde d'hydrogène en eau, et ce, en oxydant un réducteur qui est la paire de cytochromes c (Réaction 3).

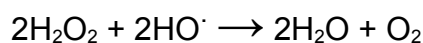
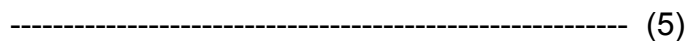
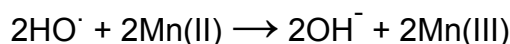
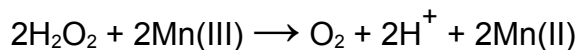
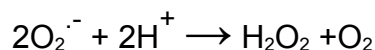
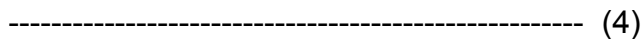
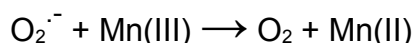
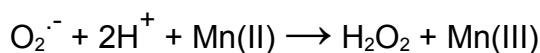


N. meningitidis possède un gène codant une peroxydase à cytochrome c qui est localisée dans le périplasma mais ancrée à la membrane (Turner et al., 2003). Le gène codant cette enzyme a été retrouvé dans d'autres bactéries comme *Pseudomonas aeruginosa* (Fülöp et al., 1995), *Pseudomonas stutzeri* et *Paracoccus denitrificans* (Goodhew et al., 1990), mais son rôle chez ces bactéries n'a pas été déterminé.

La peroxiredoxine possède une cystéine catalytique qui réagit avec le peroxyde d'hydrogène et forme alors un pont disulfure avec une seconde cystéine. Le pont est ensuite réduit par le NADPH pour revenir à l'état de départ.

Le second groupe est constitué par des molécules qui sont capables de neutraliser les EAO :

L'accumulation de manganèse (Mn) : *N. gonorrhoeae* et *Lactobacillus plantarum* sont capables d'accumuler le Mn dans leur cytoplasme via un transporteur ABC, et ce à des concentrations de l'ordre du mM (Archibald and Fridovich, 1981a; 1981b; Archibald and Duong, 1984). Ce Mn est en soit un système de défense contre le peroxyde d'hydrogène. La vitesse de la réaction non catalysée de l'ion Mn^{2+} avec le peroxyde d'hydrogène est suffisante pour fournir un système anti-oxydant efficace (Réactions 4 et 5) (Coassin et al., 1992).



La glutathion-S-tranférase ou GST est retrouvée à une concentration très élevée chez *N. gonorrhoeae* (> 15 mM) ce qui pourrait servir de première ligne de défense de façon très efficace ([Archibald and Duong, 1986](#)).

Le troisième groupe est constitué de protéines qui ne détoxifient pas directement les EAO mais qui réparent les dommages qu'ils peuvent causer. Ce groupe contient les enzymes impliquées dans la réparation de l'ADN. Mais également des enzymes qui réparent les protéines endommagées par les EAO, comme la methionine sulfoxyde réductase qui réduit les methionines oxydées ([Brot and Weissbach, 1983](#)).

Tous ces mécanismes montrent qu'il existe une large gamme de système de défense contre les EAO. Mais c'est la présence ou non dans les bactéries des différents systèmes ainsi que leur niveau d'expression qui donne à certaines bactéries la capacité de résister aux attaques oxydatives extérieures.

I.C. *Zobellia galactanivorans* et l'exploitation de son génome

I.C.1. *Zobellia galactanivorans*

Les bactéries du phylum des *Bacteroidetes* sont retrouvées principalement dans le sol, l'environnement marin, et dans le tube digestif des animaux (Mahowald et al., 2009). Les *Bacteroidetes* marines appartenant au genre *Zobellia* (classe des *Flavobacteria*, famille des *Flavobacteriaceae*) ont été isolées dans différentes zones côtières autour du monde, fréquemment associées à des algues marines (Potin et al., 1991; Matsuo et al., 2003; Nedashkovskaya et al., 2004).

Zobellia galactanivorans, Dsij^T (précédemment appelée *Cytophaga drobachiensis*) (Barbeyron et al., 2001) est une flavobactérie marine isolée depuis la surface de l'algue rouge *Delessaria sanguinea* (Potin et al., 1991). Il s'agit d'une bactérie chimioorganohétérotrophe, Gram-négative qui a une morphologie en bâtonnet de 0,3–0,4 µm de large et 3,0–8,0 µm de long, et qui forme des colonies de couleur jaune/orange due à la production de pigments de type flexirubine (Figure I_5). Son métabolisme est uniquement respiratoire, soit aérobie, soit anaérobie (avec respectivement l'oxygène ou les nitrates comme accepteur d'électron). Les cellules, dépourvues de flagelles, sont capables de se déplacer par glissement (Barbeyron et al., 2001). Cette souche a été étudiée principalement pour ses capacités à dégrader les galactanes sulfatés marins comme les agars et les carraghénanes. De plus, des expériences récentes ont montré que *Z. galactanivorans* est capable d'utiliser une large gamme de polysaccharides comme unique source de carbone dont la plupart sont sulfatés et d'origine marine. Cependant, il est intéressant de noter que la cellulose, le polysaccharide principal des plantes terrestre, ne peut être utilisée comme source de carbone par la bactérie (Barbeyron et al., 2001). *Z. galactanivorans* semble donc être un modèle de la bioconversion des polysaccharides d'algues et c'est pour cette raison que son génome a été séquencé.

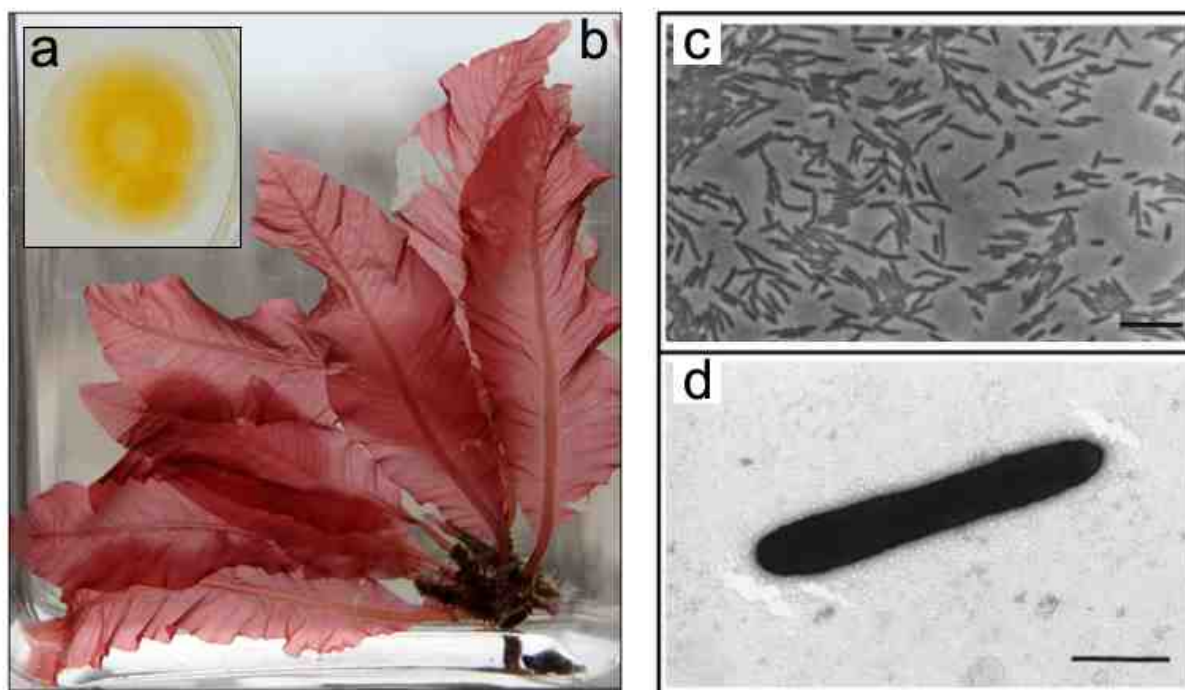


Figure I_5 : La flavobactérie *Zobellia galactanivorans*. **a** : Une colonie de *Z. galactanivorans*. **b** : L'algue *Delessaria sanguinea*. **c** : Photo en microscopie par contraste de phase de *Z. galactanivorans* (10 µm). **d** : Photo en microscopie électronique à transmission de *Z. galactanivorans* (1 µm). (Modifié de [Barbeyron et al., 2001](#))

L'analyse du génome de *Z. galactanivorans* (5,5 Mb, 4738 gènes) a confirmé le potentiel de cette bactérie pour la dégradation de polysaccharides ([Barbeyron et al. en préparation](#)). Il a été identifié 114 glycoside hydrolases, 12 polysaccharides lyases et 17 carbohydrates estérases, ce qui représente 3,2 % des gènes de la bactérie. C'est deux fois plus que le meilleur dégradeur marin séquencé et publié à ce jour, *Pseudoalteromonas atlantica* ([Romanenko et al., 2003](#)). Le génome de *Z. galactanivorans* contient également 72 gènes codants pour des sulfatases (1,5 % des gènes). Seul le génome de la planctomycète marine *Rhodopirellula baltica* ([Glöckner et al., 2003](#)) a montré un nombre de sulfatases aussi important, ce qui laisse supposer que ces bactéries, phylogénétiquement distantes, partagent des niches écologiques similaires. A l'opposé de ces bactéries marines, les bactéries du sol ne contiennent pas ou très peu de sulfatases. La capacité des bactéries à utiliser des polysaccharides requière en plus du système de dégradation, un système de détection et un système d'importation ([Galperin, 2004](#); [Cases and de Lorenzo, 2005](#)). Un grand nombre de

gènes impliqués dans la transduction du signal est caractéristique des bactéries que l'on retrouve dans des environnements complexes ou associées aux plantes (Cases and de Lorenzo, 2005). Ainsi, le génome de *Z. galactanivorans* contient 118 récepteurs TonB-dépendant et 68 systèmes de transduction du signal à un ou deux composants. Les récepteurs TonB-dépendants (TBDR, en anglais) sont des protéines de la membrane externe des bactéries à Gram négatif, surtout connues pour leur rôle dans le transport actif des complexes fer-sidérophore. Mais il a été montré chez *Xanthomonas campestris pathovare campestris* que des TBDR sont capables de transporter des oligo-saccharides et qu'ils peuvent appartenir à des loci potentiellement impliqués dans l'utilisation de carbohydrates végétaux, appelés CUT loci (Carbohydrate Utilization containing TBDR loci) (Blanvillain et al., 2007). L'analyse bioinformatique détaillée du génome de *Z. galactanivorans* montre que l'on retrouve de potentiels CUT loci qui contiennent des gènes codants des enzymes de dégradation, des sulfatases ainsi que des TBDR et des protéines de type SusD/RagB. Enfin, il a été reporté que les CUT loci sont régulièrement connectés à la pathogénicité (Blanvillain et al., 2007). Les CUT loci de *Z. galactanivorans* seraient donc spécialisés dans la dégradation de polysaccharides algaux sulfatés, fournissant à la bactérie la capacité d'utiliser la laminarine, l'agar, le porphyran, l'acide alginique, le κ -, le ι - et le λ -carraghénane comme seule source de carbone (Barbeyron et al. en préparation). Donc ce micro-organisme possède les voies métaboliques complètes pour l'utilisation de tous ces substrats, mais la majeure partie des enzymes impliquées dans ces métabolismes reste inconnue.

Un second aspect de *Z. galactanivorans* relie cette souche aux bactéries pathogènes. Il s'agit de la présence de systèmes de défenses et de résistance face au stress oxydatif (Seib et al., 2006). Pour detoxifier les espèces réactives de l'oxygène, *Z. galactanivorans* possède des enzymes cytoplasmiques (deux catalases, une peroxydase sans hème, une superoxyde dismutase à manganèse, et neuf peroxyredoxines), mais aussi des protéines périplasmiques ou attaché à la membrane externe (une azurine, trois peroxydases cytochrome c di-hème, une superoxyde dismutase [Cu-Zn] dépendante et une peroxyredoxine). On note également la présence de sulfoxyde réductases cytoplasmique et liées à la membrane externe, qui réparent les dommages oxydatifs des protéines. L'oxyde nitrique exogène peut être detoxifié par deux systèmes, un système rubredoxine / rubredoxine réductase et un système oxyde nitrique réductase / oxyde nitreux réductase. Étonnamment, on retrouve également trois

halopéroxydases dépendante du vanadium (vHPO) homologues aux enzymes algales (Colin et al., 2003; Colin et al., 2005), une iodo-tyrosine deiodinase très similaire à l'enzyme humaine qui recycle les hormones thyroïdiennes (Thomas et al., 2009) et un potentiel symporteur Na^+/I^- . Une vHPO de *Z. galactanivorans* fait l'objet d'un chapitre de cette thèse et les formes algales sont détaillées dans le paragraphe qui leur est accordé. La présence de ces enzymes montre qu'il existe, chez cette bactérie, une utilisation de l'iode qui pourrait être liée à des mécanismes de détoxification des EAO ou des composés halogénés produits par les algues (Potin et al., 2002; Cosse et al., 2007).

L'analyse bio-informatique du génome de *Zobellia galactanivorans* confirme que cette bactérie peut être un modèle de la bioconversion de la biomasse algale de par le nombre très important d'enzymes impliquées dans la dégradation de polysaccharides marins. Ce nombre n'est qu'une indication minimum car il est fort probable que l'on trouve chez *Z. galactanivorans* de nouvelles enzymes impliquées dans ce processus. En effet, 39 % des gènes n'ont pas de fonction connue (1847 / 4738 gènes). De plus, cette bactérie peut également être un modèle de l'interaction entre les bactéries marines et les algues. La présence de nombreuses enzymes impliquées dans la détoxification des EAO montre que cette bactérie possède vraisemblablement une résistance accrue face au stress oxydatif et donc face au burst oxydatif généré par l'algue, mais également semble-t-il à d'autres composés. C'est pour l'ensemble de ces raisons que nous nous sommes intéressés à analyser et caractériser biochimiquement et structuralement plusieurs 'acteurs' enzymatiques originaux, identifiés dans ce génome.

I.C.2. De l'analyse *in silico* du génome à l'analyse *in vitro*

Un génome manuellement annoté est une base de travail très riche lorsque l'on cherche à caractériser des enzymes. Les séquences identifiées dans les génomes permettent de proposer des hypothèses en ce qui concerne la fonction d'enzymes mais également le rôle de certains résidus. Plusieurs aspects de recherche peuvent être basés sur les nouvelles séquences présentes dans un génome et ce à trois niveaux de connaissance.

Tous d'abord un génome peut contenir des gènes codant des familles de protéines pour lesquelles peu de séquences sont connues. L'alignement multiple de l'ensemble des séquences peut alors révéler plusieurs formes multi-modulaires dans la famille de protéine mais également indiquer quels sont les résidus strictement conservés et donc les résidus les plus importants. Basé sur cet alignement de séquences, des expériences de mutagenèse dirigée peuvent être réalisées afin, par exemple, d'identifier les résidus catalytiques d'une enzyme. Dans le cadre de cette thèse cette approche a été utilisée en ce qui concerne la famille des glycoside hydrolases 82 (Chapitre I). Le génome de *Z. galactanivorans* a révélé la présence de deux nouveaux membres de la famille 82, ce qui porte le nombre de séquences dans cette famille à quatre. Cet apport de nouvelles séquences est très important pour la compréhension de la voie de dégradation du α -carraghénane mais également pour le mécanisme d'hydrolyse de cette famille d'enzyme.

L'analyse bio-informatique d'un génome peut également révéler la présence de gènes codants des enzymes impliquées dans des métabolismes originaux et inattendus. Il est alors intéressant d'étudier ces enzymes pour comprendre le rôle qu'elles peuvent avoir chez l'organisme que l'on a séquencé. C'est notamment le cas de la iodo-péroxydase dépendante du vanadium étudiée au cours de ma thèse (Chapitre III). Ce type d'enzyme était jusqu'à présent uniquement décrit chez les eucaryotes. La présence, dans le génome de *Z. galactanivorans*, de trois enzymes homologues aux enzymes eucaryotes remet en cause la fonction de ces enzymes ainsi que l'histoire évolutive de cette famille de protéine.

Chaque nouveau génome révèle un grand nombre de protéines ou domaines de protéine pour lesquelles aucune donnée, concernant la fonction, la biochimie ou la structure, n'existe. C'est, comme je l'ai déjà mentionné, le cas pour environ 40 % des gènes chez *Z. galactanivorans*. Ces séquences sont d'un intérêt majeur lorsque l'on cherche à identifier de nouvelles fonctions, de nouvelles classes de protéines ou de nouveaux repliements. Néanmoins, la caractérisation de ces protéines ne peut se faire totalement au hasard. L'analyse bio-informatique détaillée de la séquence ainsi que de son environnement génomique permet parfois de guider la recherche de la fonction de l'enzyme. En effet, par exemple, si l'enzyme est multi-modulaires et que un ou plusieurs modules de cette nouvelle protéine sont déjà décrits, on peut utiliser cette information pour envisager une fonction pour la nouvelle

protéine. L'environnement génomique est très utile quand l'enzyme ne comporte qu'un module unique et que le gène codant cette enzyme est au sein d'un opéron. Le rôle des gènes présents autour du gène de fonction inconnue peut-être une indication de la fonction de ce dernier. Par exemple, au cours de ma thèse j'ai cherché à caractériser de potentielles nouvelles glycoside hydrolases que l'on retrouve dans le génome de *Z. galactanivorans* au sein d'opérons putatifs qui contiennent notamment des récepteurs TonB-dépendant, des sulfatases et des glycoside hydrolases. La présence de nouvelles enzymes, très faiblement similaires à des glycoside hydrolases, dans ces opérons spécialisés dans la dégradation de polysaccharides sulfatés, montre que ce sont de bonnes cibles pour la découverte de nouvelles familles de glycoside hydrolases.

L'étude bio-informatique de séquences contenues dans des génomes permet donc d'ouvrir et de guider des recherches expérimentales dans des domaines plus ou moins explorés auparavant. Mais pour cela, et plus particulièrement pour la caractérisation de nouvelles enzymes, il est essentiel que le génome soit annoté avec la plus grande expertise possible.

II. Les *iota*-carraghénases

II.A. Le substrat : Le *iota*-carraghénane

Le mot carraghénane est dérivé du comté de Carragheen dans le sud de l'Irlande où depuis plus de 600 ans les irlandais utilisent l'algue *Chondrus crispus*, "Irish moss", pour faire de la pommade et des flancs. Ce sont ces carraghénanes qui sont responsables de la gélification du lait dans la recette de flancs proposée dans le préambule. D'un point de vue chimique le ι -carraghénane est une répétition de sous unités disaccharidiques formées de $\alpha(1,3)$ -D-galactopyranosyl-4-sulfate- $\beta(1,4)$ -3,6-anhydro-D-galactose-2-sulfate (Figure I_6). La structure de la fibre de ι -carraghénane en présence de cation divalent (Ca^{2+} et Sr^{2+}) consisterait en une double hélice parallèle de symétrie 3_1 et dont la périodicité est de 26 Å (Anderson et al., 1969; Arnott et al., 1974). Cette observation va dans le sens de la théorie sur la gélification qui veut que les chaînes de carraghénanes forment des hélices doubles avant de s'associer en présence de cations divalents (Anderson et al., 1969; Viebke et al., 1994). Néanmoins, cette théorie a été récemment contesté dans le cas du κ -carraghénane (Figure I_3) qui formerait une simple hélice (Collén et al., 2009). Le cas de la structure secondaire du ι -carraghénane n'est pas tranché actuellement.

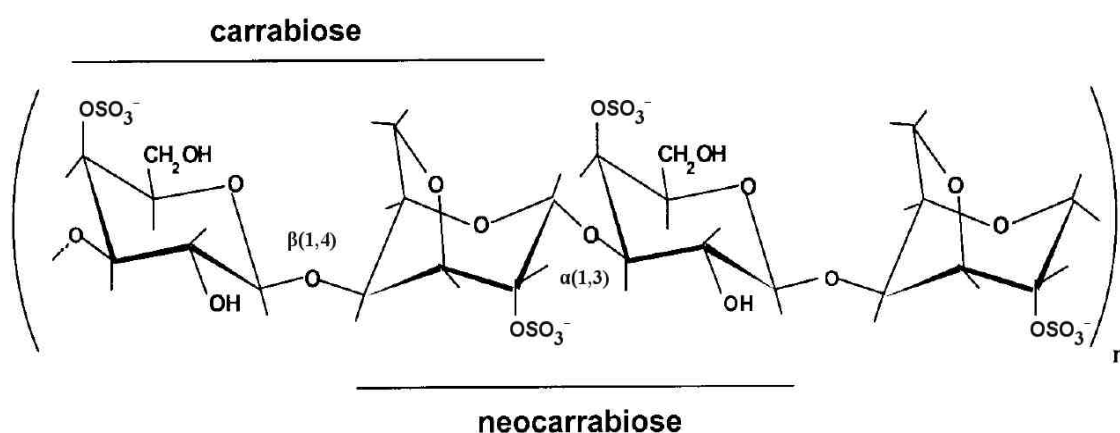


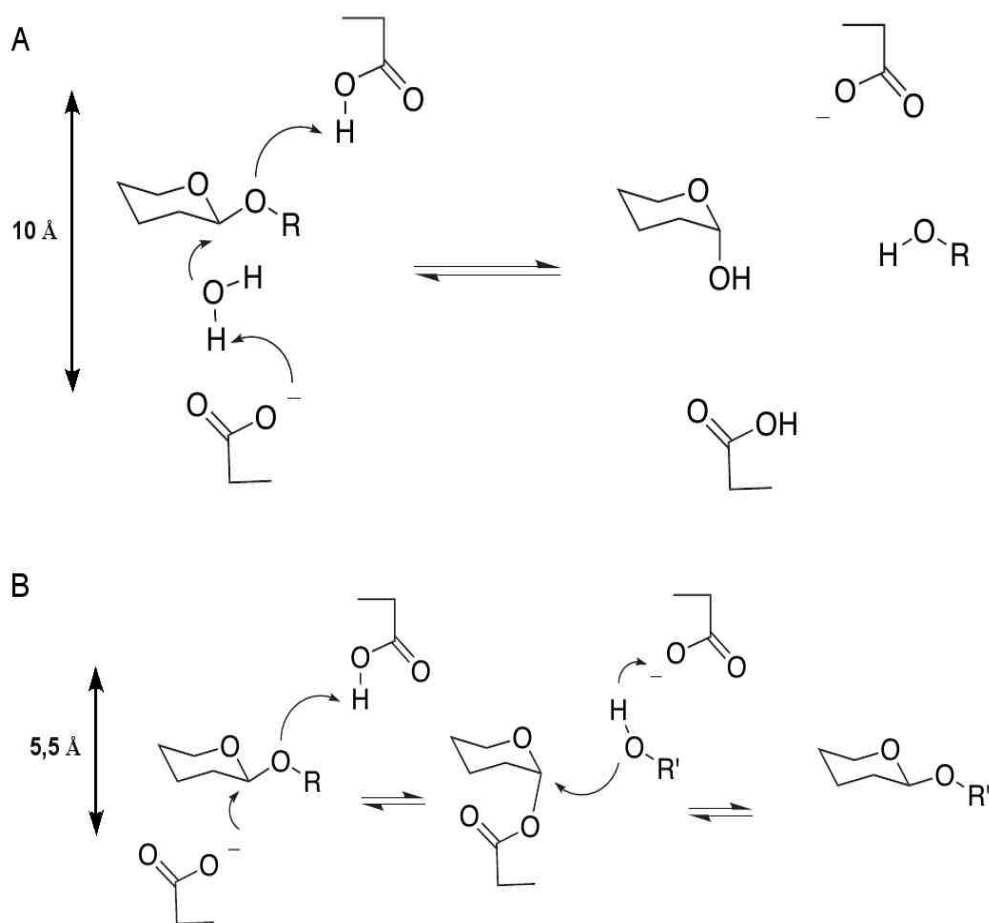
Figure I_6 : Structure chimique du ι -carraghénane.

II.B. La découverte

C'est en 1982 alors que Bellion travaille sur différentes bactéries marines qu'elle isole une bactérie produisant une enzyme capable de dégrader le ι -carraghénane (Bellion et al., 1982). Mais c'est en 1984 que Greer et Yaphe purifient et caractérisent l'activité ι -carraghénase ou iotase (EC 3.2.1.157) (Greer and Yaphe, 1984). Ceux-ci avaient purifié une enzyme à partir du surnageant de la culture, contenant du ι -carraghénane, de la bactérie marine isolée par Bellion deux ans plus tôt. Cette bactérie, appelée à l'époque souche 1 produisait une enzyme d'environ 57 000 Da capable de dégrader spécifiquement le ι -carraghénane en hydrolysant la liaison $\beta(1,4)$ et en générant des ι -neocarratetraoses et des ι -neocarrahexaoses (Greer and Yaphe, 1984).

II.C. Le gène

Cette activité a ensuite été "oubliée" pendant de nombreuses années. En 1991 Potin et al. montrent une activité iotase, depuis le surnageant de culture d'une bactérie, ressemblant à un *Cytophaga* et isolé à la surface de l'algue rouge *Delesseria sanguinea* (Potin et al., 1991). C'est en l'an 2000 que Barbeyron et al. publient la séquence de deux gènes de iotases, celles de la souche 1 appelée depuis "Alteromonas fortis" (Potin, 1992), la bactérie historique qui avait été utilisée par Greer 15 ans plus tôt et celle de *Cytophaga drobachiensis* (Potin et al., 1991) et décrite depuis comme *Zobellia galactanivorans*, une flavobactérie marine isolée à Roscoff (Barbeyron et al., 2001). Les deux gènes de iotases identifiés chez "A. fortis" et *Z. galactanivorans* sont homologues. Les enzymes codées par ces gènes fonctionnent par un mécanisme d'inversion de configuration anomérique (Figure I_7) et elles ont un comportement de type endo-hydrolase. Il est également supposé qu'elles pourraient avoir un caractère processif (Barbeyron et al., 2000). N'ayant aucune similitude de séquences avec d'autres glycoside hydrolases mais possédant 43 % d'identité entre elles, ces deux enzymes ont été classées dans une nouvelle famille de GH, la famille 82. La classification des glycoside hydrolase est basée sur la similarité de séquence et de repliement des séquences d'acide aminés. C.A.Z.Y. (Carbohydrate-Active enZYMes) est la base de données qui regroupe les informations sur les différentes familles. Il existe au jour d'aujourd'hui 115 familles de GH (Cantarel et al., 2009).



*Figure I_7 : Mécanismes d'hydrolyse des glycoside hydrolases.
A : Inversion de la configuration anomérique. B : Rétention de la configuration anomérique.*

II.D. La structure tridimensionnelle de la iotase d'“*Alteromonas fortis*”

Des cristaux de la ι-carraghénase native d'“*A. fortis*” ont été obtenus en 2000 (Michel et al., 2000) et la structure cristallographique résolue en 2001 (Michel et al., 2001). Cette structure a révélé un repliement de type hélice β droite parallèle de dix tours complets avec deux domaines additionnels (A et B) dans la partie C-terminale de l'enzyme (Figure I_8). Le repliement en hélice β a été identifié pour la première fois dans la pectate lyase C de *Erwinia chrysanthemi* (Yoder et al., 1993). Ce type de repliement était retrouvé fréquemment pour des enzymes qui agissent sur des polysaccharide chargé (Tableau I_2).

Année	Fonction	PDB	Auteurs
1995	Pectate lyase C Clive la liaison α -(1,4) de la pectine	2PEC	Yoder et al., 1993
1995	Pectate lyase E Clive la liaison α -(1,4) de la pectine	1PCL	Yoder et al., 1995
1995	Tailspike Hydrolyse la liaison α entre le rhamnose et le galactose de l'O antigène	1TSP	Steinbacher et al., 1994
1997	Pectine lyase A Clive la liaison α -(1,4) de la pectine	1IDK	Mayans et al., 1997
1998	Rhamnogalacturonase Clive la liaison α -(1,2) entre le galactose et le rhamnose dans la pectine	1RMG	Petersen et al., 1997
1999	Pectine lyase B Clive la liaison α -(1,4) de l'acide polygalacturonique	1QCX	Vitali et al., 1998
1999	Polygalacturonase 2 Hydrolyse de façon endo la liaison α -(1,4) dans la pectate	1CZF	Van Santen et al., 1999
1999	P69 Facteur de virulence bactérienne impliquée dans l'adhésion aux cellules de mammifères	1DAB	Emsley et al., 1996
2000	Chondroitinase B Clive la liaison β -(1,4) dans le dermatan sulfate	1DBO	Huang et al., 1999
2000	Pectine méthylesterase Retire les méthyles de la pectine	1QJV	Jenkins et al., 2001
2001	Polygalacturonase Hydrolyse la liaison α -(1,4) dans la pectate	1IB4	Cho et al., 2001
2001	Endopolygalacturonase Hydrolyse de façon endo la liaison α -(1,4) dans la pectate	1HG8	Federici et al., 2001
2001	Iota-carraghénase Hydrolyse de façon endo-possessive la liaison β -(1,4) dans le iota-carraghénane	1H80	Michel et al., 2001
2003	Dextranase Hydrolyse la liaison α -(1,6) dans le dextrane	1OGO	Larson et al., 2003
2004	Filamentous hemagglutinin Adhésine bactérienne	1RWR	Clantin et al., 2003
2004	Pollen allergène Allergène du cèdre	1PXZ	Czerwinski et al., 2005

Tableau I_2 : Résumé des différentes structures cristallographiques de type hélice β .

La différence majeure qui existe entre la structure de la iotase et celle des autres hélices β est la présence, en position C-terminale de deux domaines A et B de 67 résidus chacun. Le domaine A, formé par les résidus 307 à 373 et inséré entre les brins β 32 et β 35, présente un facteur d'agitation thermique supérieur au reste de la structure. Ce domaine A est localisé dans un canal de solvant du cristal et n'interagit avec aucune autre molécule. De plus, la moitié des résidus de ce domaine n'a pu être construite en raison d'une carte de densité peu claire ou inexistante. Ce domaine A interagit avec l'hélice β *via* seulement quatre liaisons

hydrogène. L'ensemble de ces observations montre que le domaine A est relativement mobile. Le domaine B, composé des résidus 387 à 430, est situés entre les brins $\beta 36$ / $\beta 39$ et la partie C terminale de l'enzyme (résidus 469 à 491). Ce domaine est plus stable que le domaine A avec une agitation thermique proche de celle de l'hélice β .

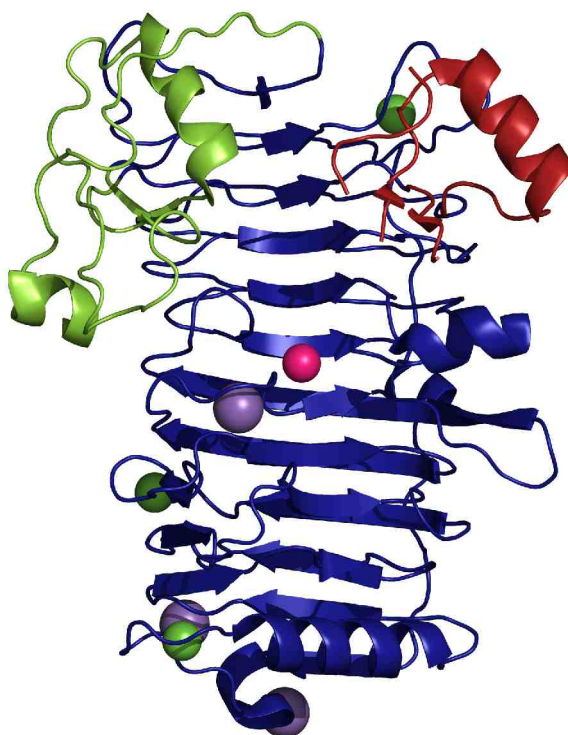


Figure 1 8 : Structure cristallographique de la ι-carraghénase d'“A. fortis”. L'hélice β est représentée en bleu, et les domaines A et B sont respectivement représentés en rouge et vert. Les ions calcium sont en vert, les sodiums en violet et le chlorure en rose.

C'est également dans l'étude de cette structure publiée par Michel et al. en 2001 que, basé sur la structure et l'alignement des deux séquences de iotases, il est proposé que les résidus catalytiques pourraient être l'acide glutamique 245, l'acide aspartique 247 et l'acide glutamique 310. Proche de ces potentiels résidus catalytiques, on retrouve un ion chlorure dans une poche formée par des résidus conservés dans les séquences d'“A. fortis” et de *Z. galactanivorans*. Or, l'activité de la iotase est dépendante de la concentration en chlorure de sodium avec un maximum d'activité à 100 mM. Une concentration supérieure à 500 mM, comme un dessalage complet, résulte en une perte d'activité (Greer and Yaphe, 1984). Une

hypothèse a donc été émise comme quoi cet ion chlorure joue un rôle dans la fonction de la iodase.

II.E. Le mode d'action

En 2003 Michel et al. publient une seconde structure cristallographique de la iodase d'«*A. fortis*» (Michel et al., 2003). Dans cette nouvelle structure, l'enzyme est complexée à un α -neocarratetraose et un α -néocarrabiose respectivement dans les sous-sites de fixation +1 à +4 et -3 à -4 (Figure I_9). Par la même occasion, cette seconde structure de l'enzyme montre la première structure des produits α -carraghénane. Les interactions entre le α -carraghénane et la iodase sont principalement basées sur des interactions électrostatiques impliquant des résidus basiques de l'enzyme (Arg 125, Arg 243, Arg 303, Arg 353, Arg 321 et Lys 394) et les groupements sulfates du substrat. Les résidus impliqués dans ces interactions sont conservés entre les séquences d'«*A. fortis*» et *Z. galactanivorans*. Le sous-site +2 est le seul à interagir par une interaction de type "stacking" et ce via la Tyr 341. Ce type d'interaction est très souvent retrouvé dans les GH qui dégradent un polysaccharide neutre. L'oligo saccharide présent dans les sites +1 à +4 a son extrémité non réductrice (hydroxyde en 4 du DA2S) lié par une liaison hydrogène à la chaîne latérale du résidu Glu 245. Ceci suggère fortement que ce résidu est un des résidus catalytiques et vraisemblablement le donneur de proton. En ce qui concerne le second résidu catalytique, il est plus difficile à identifier. En effet, l'acide aspartique 247 est fortement lié à une molécule d'eau qui elle est liée à l'hydroxyde en 4 du DA2S. Néanmoins, la distance entre les résidus 245 et 247 (5 Å) est très inférieure à 10 Å, la distance généralement constaté pour les enzymes agissant par inversion de configuration (Figure I_7A). Cependant, dans les familles 28, 49 et 91 (Armand et al., 2000; Larsson et al., 2003; Steinbacher et al., 1997), qui ont également un mécanisme par inversion de configuration anomérique, la distance est nettement plus courte, soit environ 5 Å (Figure I_7B). En revanche, l'acide glutamique 310 est à une distance de 8 Å du donneur de proton et est orienté de façon perpendiculaire au α -carraghénane, soit de façon quasi optimale. Finalement, les auteurs proposent comme résidus catalytiques l'acide glutamique 245 et l'acide aspartique 247 comme respectivement le donneur de proton et la base.

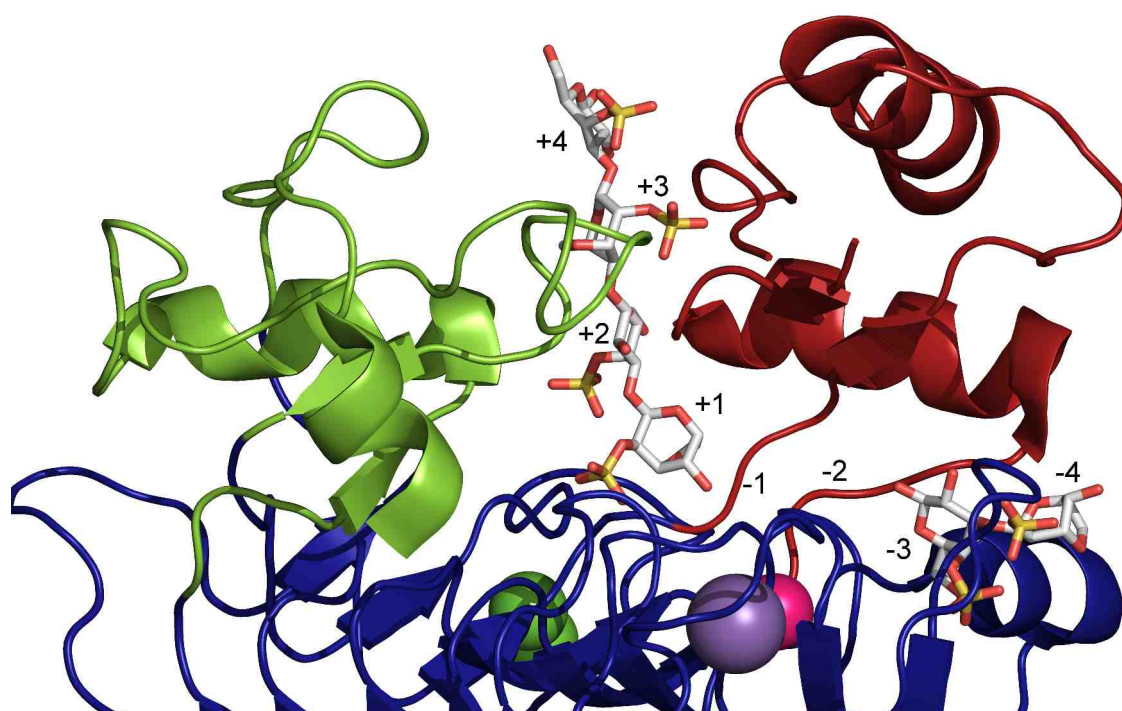


Figure I 9 : sous-sites de fixation du ι-carraghénane dans la structure de la iotase d'“A. fortis”.

La structure en complexe obtenu, montre que la fixation du substrat induit le basculement du domaine A d'environ 16° autour de sa base (Gly 307 - Gly 373) pour créer une topologie du site actif de type tunnel. Les GH qui ont un site actif avec ce type de topologie ont un caractère processif. La processivité a été montrée dans le cas des cellulases (GH 6) (Rouvinen et al., 1990), des exo chitinase (GH 18) (van Aalten et al., 2000) et des κ-carraghénases (GH 16) (Michel et al., 2001). C'est également le cas pour la ι-carraghénase d'“A. fortis”. L'étude par microscopie électronique en coloration négative des fibres de ι-carraghénane, dans un gel après traitement par la iotase, montre une diminution du diamètre des fibres, ce qui tend à montrer que l'enzyme agit de manière processive en "rabotant" la fibre et non en hydrolysant de façon aléatoire. La présence du tetrasaccharide indique la position des sous-sites plus et moins. Il est donc possible de dire que l'enzyme dégrade la fibre de ι-carraghénane de l'extrémité non réductrice vers l'extrémité réductrice.

Dans la structure en complexe avec le iota-carraghénane, le domaine A est stabilisé par son interaction avec le tetrasaccharide et est ainsi mieux défini dans la carte de densité, que dans la structure native. Seule une boucle formée par les résidus 343 à 349 n'a pu être modélisée.

La structure connue la plus proche de ce domaine A est la protéine ribosomale L23 de *Haloarcula marismortui* (1PB7) (Ban et al., 2000). La protéine L23 est présente dans la grande sous unité du ribosome. Cette protéine de 78 résidus est fonctionnelle seule et interagit avec l'ARN ribosomal 23S. Il est donc proposé que l'hélice β ancestrale de la ι -carraghénase ait recruté une protéine similaire à L23, capable de lier un polymère anionique comme l'ADN ou l'ARN, afin de lier un polysaccharide anionique.

Depuis la publication de cette structure en complexe aucune autre publication concernant directement les *iotases* n'a été faite. Par contre cette enzyme a été utilisée pour étudier la structure des fibres de carraghénanes au sein de la paroi des algues (Guibet et al., 2008; Jouanneau, 2010). Il reste pourtant un certain nombre de questions relatives au fonctionnement de cette enzyme. Avoir une preuve expérimentale des résidus catalytiques, connaître exactement le mouvement du domaine A lors de la fixation du substrat et expliquer le rôle de l'ion chlorure proche du site actif, s'il y en a un, en sont les plus importantes.

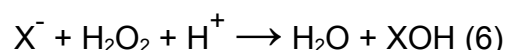
Les glycoside hydrolases de la famille 82, soit actuellement deux enzymes, sont les seules enzymes connues capables de dégrader le ι -carraghénane. Même en supposant que seules des GH de la famille 82 sont capables de dégrader le ι -carraghénane, les oligosaccharides générés doivent être dégradés en unités plus petites avant de pouvoir être utilisés par la cellule. Il existe donc d'autres enzymes impliquées dans la dégradation du ι -carraghénane. Pour le moment, il n'existe aucune piste à ce sujet. La compréhension de la voie complète de dégradation du ι -carraghénane est donc loin d'être élucidé. Il s'agit pourtant là d'un catabolisme très important car, sans lui, l'océan ne serait qu'un immense gel de ι -carraghénane!

III. Les halopéroxydases dépendantes du vanadium

C'est au début des années 80 que la première halopéroxydase dépendante du vanadium (vHPO) a été identifiée chez l'algue brune *Ascophyllum nodosum* (Vilter, 1983; Vilter, 1984). Depuis, plusieurs vHPO ont été isolées à partir d'autres algues brunes (Almeida et al., 2001), des algues rouges (Itoh et al., 1986), des algues vertes (Ohshiro et al., 1999), des lichens (Plat H et al., 1987), des champignons (van Schijndel et al., 1993) et dans les bactéries (Winter et al., 2007), certains gènes ont été identifiés comme pouvant coder des halopéroxydases dépendantes du vanadium.

III.A. Le rôle des vHPO

Les vHPO catalysent l'oxydation des halogénures par le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) (Réaction 6, X représentant un halogénure).



La fonction de ces enzymes est multiple. La synthèse de composés halogénés, l'accumulation d'iode dans les *Laminaires* (Küpper et al., 1998) ainsi que la protection font parties de leurs fonctions potentielles (Brisson et al., 1994). Les métabolites halogénés marins possèdent des propriétés pharmacologiques intéressantes comme le fait d'être anticancéreux, antifongiques, antiviraux et anti-inflammatoires. La synthèse de ces composés intéresse donc les scientifiques et les industries pharmaceutiques depuis plusieurs décennies. En plus de ces propriétés pharmacologiques, les vHPO sont tolérantes aux solvants organiques (acétone, méthanol, isopropanol) (de Boer et al., 1987), aux températures relativement élevées (de Boer et al., 1987; Ohshiro et al., 2002; van Schijndel et al., 1993; Sheffield et al., 1993) et à l'inhibition par le produit (Ernie Liu et al., 1987; van Schijndel et al., 1993). Ceci fait que ces enzymes ont des applications industrielles potentielles.

III.B. Classification

Les vHPO sont classées en fonction de l'halogénure le plus électronégatif qu'elles sont capables d'oxyder. C'est-à-dire que les chloro-péroxydases (vCPO) sont capables d'oxyder aussi bien le chlorure que le bromure que l'iodure, les bromo-péroxydases (vBPO) oxydent le bromure et l'iodure et les iodo-péroxydases (vIPO) sont spécifiques de l'iodure (Wever and Hemrika, 2001). Cependant, le peroxyde d'hydrogène n'a pas la force motrice nécessaire pour oxyder le fluor, qui est donc oxydé par un autre système impliquant une fluorinase (O'Hagan et al., 2002).

III.C. Cycle catalytique

D'un point de vue cinétique, ces enzymes ont un mécanisme de type "Bi Bi ping-pong" (Figure I_10) dans lequel l'halogénure est un substrat inhibant de façon non compétitive, la fixation du peroxyde d'hydrogène (de Boer and Wever, 1988; Everett et al., 1990). La première étape de la réaction est la fixation du peroxyde d'hydrogène au vanadate qui est sous une forme di-protoné (Raugei and Carloni, 2006). Ceci forme un intermédiaire réactionnel de type peroxovanadate. L'halogénure réalise alors une attaque nucléophile sur l'oxygène partiellement chargé positivement, au sein de l'intermédiaire peroxovanadate. Il y a alors coupure de la liaison peroxyde et libération de l'oxoacide XO^- (Réaction 6) (Everett et al., 1990; Hemrika et al., 1999; Raugei and Carloni, 2006).

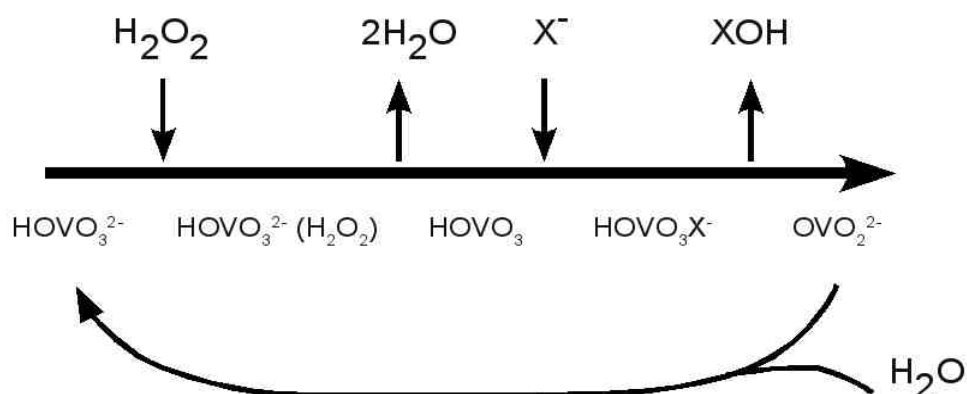
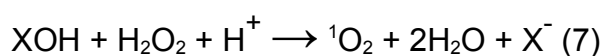


Figure I_10 : Schéma du mécanisme catalytique des vHPO.

Pour la vBPO de *A. nodosum*, l'inhibition par le substrat (bromure) n'est observée que pour un pH compris entre 4 et 6 et pour une concentration en brome relativement élevée. De plus, une haute concentration en H₂O₂ (100 mM) à un pH compris entre 5,5 et 8 inactive l'enzyme de façon réversible alors qu'à un pH de 4-5 l'inactivation est irréversible et résulte en la formation de 2-oxo-histidine (Soedjak et al., 1995; Meister Winter and Butler, 1996).

L'oxo-acide généré par l'enzyme peut halogéner un substrat organique ou réagir avec une seconde molécule de peroxyde d'hydrogène et former ainsi du dioxygène dans un état de singlet excité (Everett and Butler, 1989) (Réaction 7).



III.D. Produits finaux

L'halogénéation d'un substrat organique par les vHPO est encore très mal connue. Initialement, il était supposé que le substrat organique n'avait aucune spécificité du fait que de très nombreux composés pouvaient être produits. Certains composés sont halogénés très efficacement en respectant la stœchiométrie de un équivalent de H₂O₂ pour un équivalent de composé halogéné produit (Réaction 6). Avec d'autres substrats organiques, il y a un déséquilibre entre la consommation de H₂O₂ et la quantité de composé halogéné produit ce qui indique qu'une partie de l'oxoacide OX⁻ réagit selon la réaction 7. Il existe une compétition pour la bromation par la vBPO de *A. nodosum* entre l'indole et le phénol rouge et l'indole est bromé de manière régiosélective par cette enzyme. Ceci tant à montrer que la bromination a lieu au sein d'un site actif. L'obtention récente de la structure du complexe entre la vBPO mutante (R397W) de *C. pilulifera* et deux substrats organiques (Le rouge de phénol, et la phloroglucinol), montre que ces substrats se fixent à une zone hydrophobe dans la cavité du site actif (Littlechild et al., 2009). Néanmoins, les taux d'occupation de ces substrats dans la structure sont inférieurs à 50 %, il faut donc faire très attention à ce résultat qui pourrait être lié à une interaction non spécifique.

Il a été montré que la vBPO d'algue rouge était capable de réagir avec le geraniol, un monoterpène et induit la cyclisation de celui ci (Figure I_11 A) (Carter-Franklin et al., 2003). Les produits ainsi synthétisés ressemblent aux α- et β-snyderol (Figure I_11 B), isolés à partir

respectivement de *Laurencia obtusa* et de *Laurencia snyderae* (Howard and Fenical, 1976). Il a également été montré que la vBPO était capable de synthétiser des bromoether à partir d'un monoterpène, le nérol (Figure I_12 A) (Carter-Franklin et al., 2003). Le produit de cette réaction est proche de la laurencine (Figure I_12 B), un C15 acétogénine isolé chez *Laurencia glandulifera* (Irie et al., 1965).

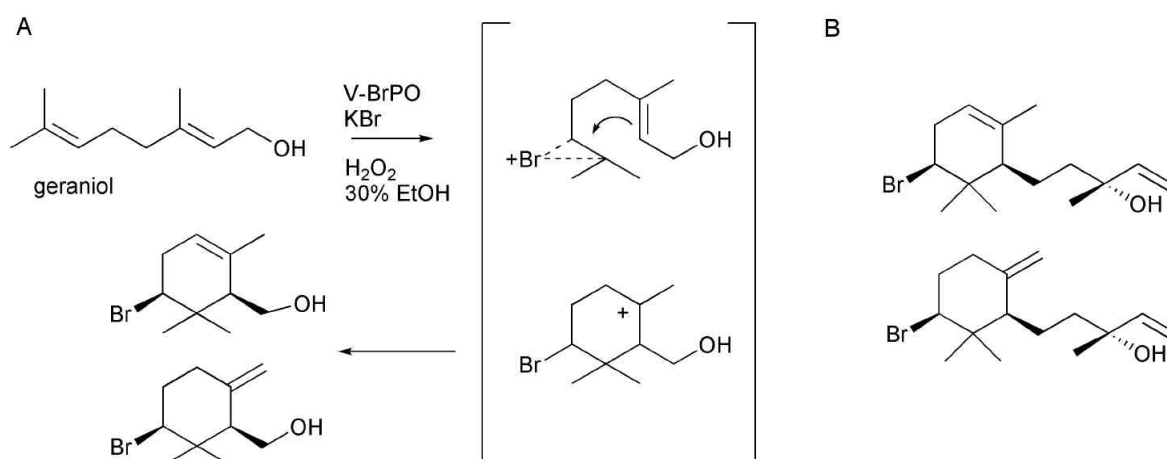


Figure I_11: A : Séquence de la réaction de bromo-cyclisation du geraniol catalysée par la vBPO. B : Structure chimique de l' α -snyderol (haut) et β -snyderol (bas).

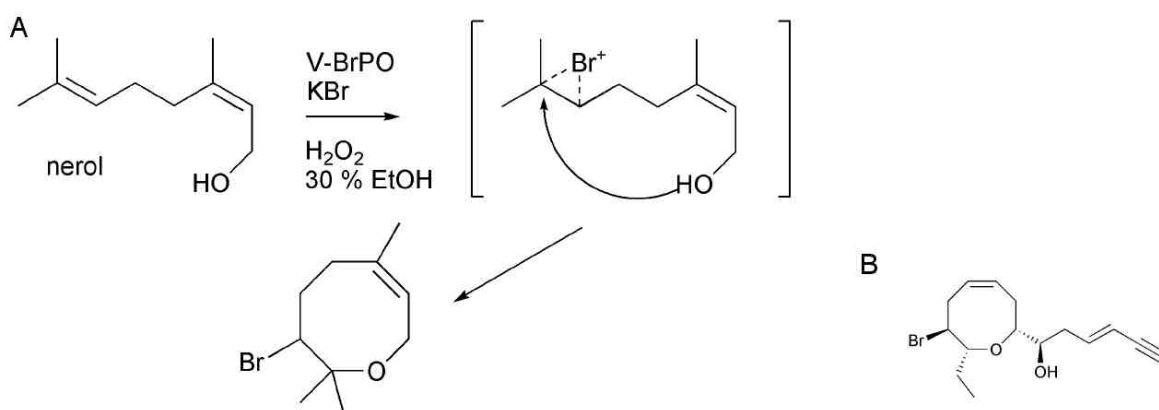


Figure I_12: A : Séquence de la réaction de bromo-cyclisation du nérol catalysée par la vBPO. B : Structure chimique de la laurencine.

Le rôle des différents métabolites halogénés chez les algues est pour le moment relativement mal connu. L'halogénéation de composés organiques semblerait être un système de défense chimique développé par les algues afin de réguler la colonisation bactérienne à leur surface en perturbant le *quorum sensing* des bactéries (Manefield et al., 1999; Rasmussen et al., 2000). Le *quorum sensing* est le mécanisme par lequel les bactéries ressentent la densité cellulaire et régulent leurs mécanismes de formation de biofilm, de virulence ou de mobilité. Pour ce faire, beaucoup de bactéries utilisent des acyl homoserines lactones comme molécules signaux (Conway and Greenberg, 2002; Miller and Bassler, 2001). Or les 3-oxo-acyl homoserine lactones sont sensibles à l'halogénéation en C2 par les vBPO de *Laminaria digitata*. Les produits bromés ainsi synthétisés, perturbent l'efficacité du *quorum sensing* chez *Agrobacterium tumefaciens* et *Chromobacterium violaceum* (Borchardt et al., 2001). La présence d'halopéroxydases chez les algues permettrait donc l'halogénéation de substances issues du métabolisme bactérien dans le but de réguler la population bactérienne à leur surface.

III.E. Accumulation de l'iode dans les algues brunes

Le second rôle supposé des halopéroxydases algales est de participer à l'accumulation d'halogène dans l'algue et notamment d'iode chez les *Laminaires* (Küpper et al., 1998). Depuis la découverte de la présence d'iode dans les algues brunes par Courtois en 1813, il était supposé que cette accumulation d'iode se faisait au sein de la cellule. Mais en 2008, il a été montré que l'iode était accumulé dans l'apoplasme (espace entre la paroi et la membrane cellulaire) (Verhaeghe et al., 2008). Le mécanisme d'accumulation de l'iode a donc été révisé mais il fait toujours intervenir les vIPO des algues brunes (Figure I_13).

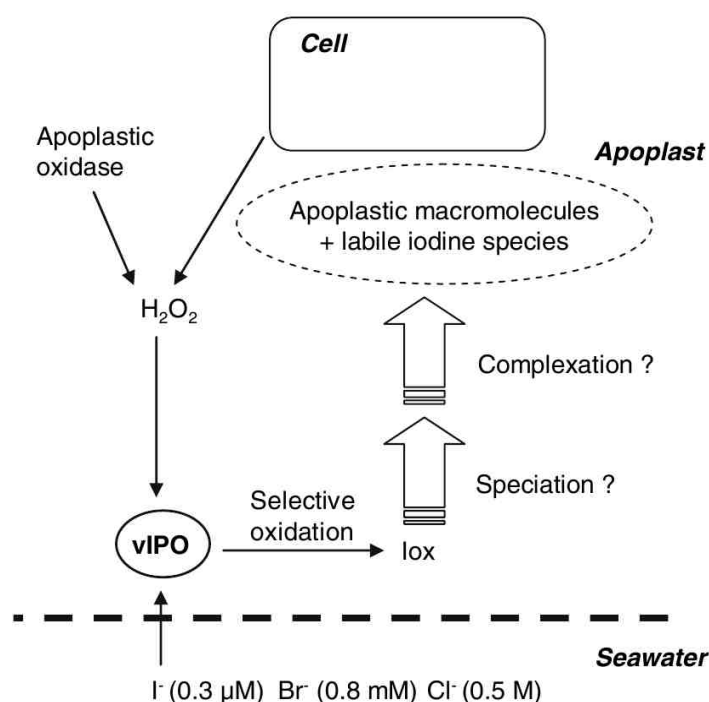


Figure I_13: Mécanisme d'accumulation de l'iode chez *Laminaria digitata*, proposé par [Verghaeghe et al., 2008](#).

III.F. Protection cellulaire

In vitro, les vHPO sont capables de réaliser le pontage oxydatif de polyphénols ([Berglin et al., 2004](#)). Il est donc possible que chez les algues brunes, les vIPO assurent le pontage oxydatif des polyphénols. Lors du burst oxydant, l'augmentation de l'activité des vHPO augmenterait cette activité de pontage ce qui entrainerait un renforcement de la paroi qui serait ainsi plus résistante à la dégradation par l'agresseur.

III.G. Structures

La première structure de vHPO a été celle de la vCPO du champignon *Curvularia inaequalis* (Figure I_14 A) ([Messerschmidt and Wever, 1996](#)). Le repliement est principalement en hélice α avec, comme motif principal, deux fagots de cinq hélices. Cette structure contient le site de fixation du cofacteur vanadate. Par la suite, plusieurs structures cristallographiques de vHPO d'algues ont été résolues et contrairement à *C. inaequalis* toutes possèdent une forme multimérique (Figure I_14) (Tableau I_3).

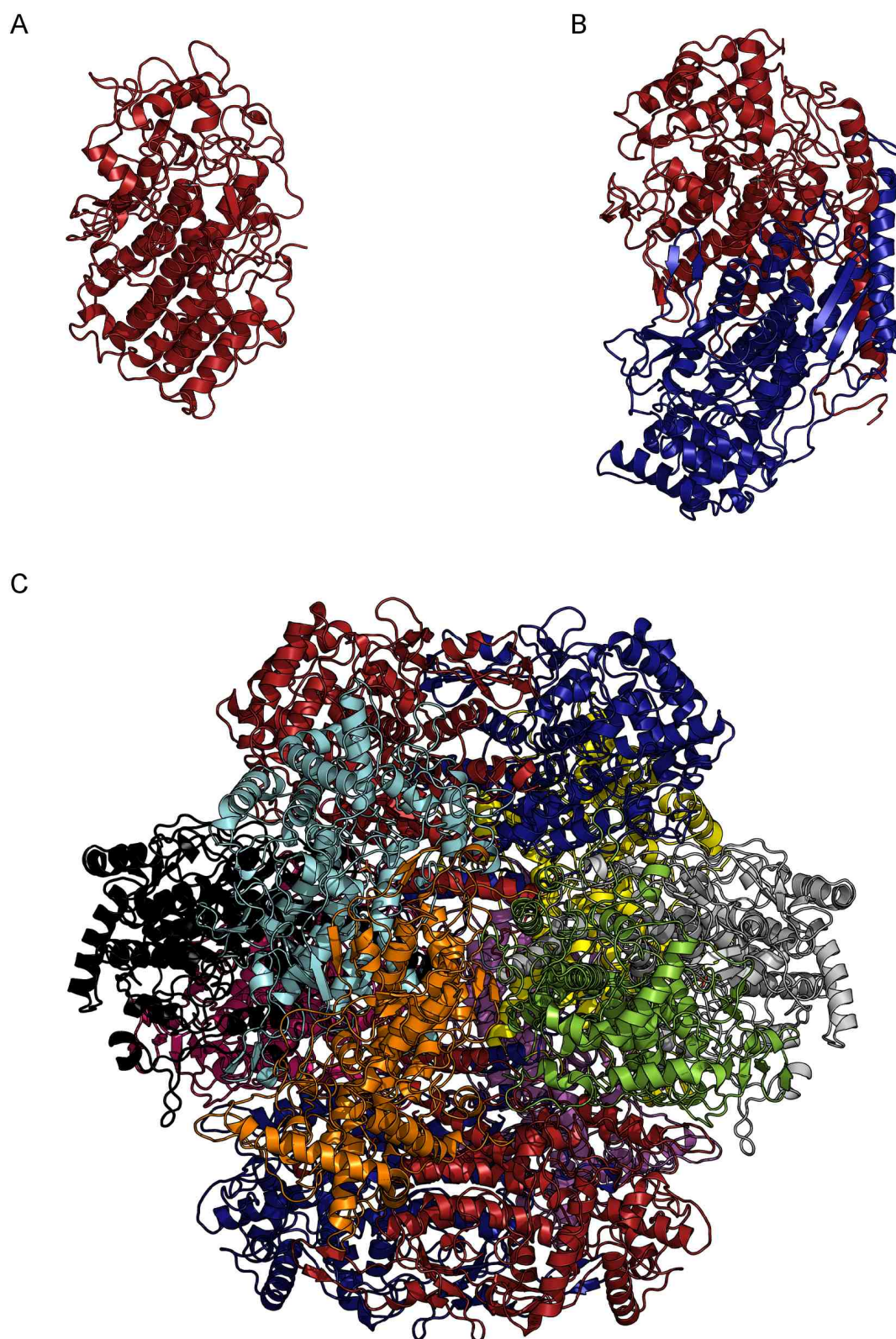


Figure I_14 : Structures tridimensionnelles de vHPO. A : Monomère de vCPO de *Curvularia inaequalis* (1VNC). B : Dimère de vBPO d'*Ascophylum nodosum* (1QI9). C : Dodécamère de *Coralina officinalis* (1QHB).

Enzyme	Organisme	Nombre de résidus	Forme multimérique biologique	Auteur
vCPO	<i>Curvularia inaequalis</i> (Champignon)	609	Monomérique	Messerschmidt et al., 1996
vBPO	<i>Ascophyllum nodosum</i> (Algue brune)	556	Dimère	Weyand et al., 1999
vBPO	<i>Corallina officinalis</i> (Algue rouge)	595	Dodécamère	Isupov et al., 2000
vBPO	<i>Corallina pilulifera</i> (Algue rouge)	597	Dodécamère	Garcia-Rodriguez et al., 2005

Tableau I_3: Résumé des différentes structures de vHPO.

L'originalité du dimère des vBPO des algues brunes *A. nodosum*, *L. digitata* et *Fucus distichus* est que les deux sous unités sont liées par deux ponts disulfures (Figure I_14 B) (Weyand et al., 1999). En revanche, on ne trouve pas de liaisons covalentes entre les sous unités du dodécamère des vBPO d'algues rouges qui est formé par un hexamère de dimères. Ce dodécamère (diamètre de 150 Å) est arrangé avec 23 symétries locales autour d'une cavité de 26 Å de diamètre (Figure I_14 C). Cette symétrie n'est pas spécifique aux vBPO d'algues rouges. Même si elle est assez rare, elle a déjà été observée dans plusieurs enzymes comme par exemple dans la protéine de protection de l'ADN Dps de *E. coli* (Grant et al., 1998), dans une dehydrokinase de type II de *Streptomyces coelicolor* (Roszak et al., 2002) et dans une urease de *Helicobacter pylori* (Ha et al., 2001). Chaque monomère contribue à la formation de la cavité *via* une seule hélice α . La cavité centrale ne semble pas avoir de rôle spécifique. La stabilité des vHPO aux hautes concentrations en solvant organique et au relativement haute température pourrait être due au fait qu'elles interagissent entre elles *via* des surfaces importantes. Au sein des dimères les surfaces d'interaction sont de 33 % pour la vBPO de *C. officinalis* et de 46 % dans la vBPO d'*A. nodosum*. Au sein du dodécamère des vBPO d'algues rouges, la surface exposée au solvant, par sous unité, n'est que de 12 % (Weyand et al., 1999; Littlechild et al., 2002).

Un dimère de vBPO d'algue peut être superposé à un monomère de la vCPO de *C. inaequalis* qui est une enzyme à deux domaines. Les hélices des deux domaines de la vCPO se superposent aux hélices des deux sous unités des vBPO. La différence majeure entre les deux enzymes réside dans les hélices périphériques qui sont beaucoup moins nombreuses chez *C. inaequalis*. On retrouve dans la structure dimérique des vBPO d'algues les deux fagots de cinq hélices mais chacun provient d'un monomère de vBPO. Cette observation a

conduit à l'hypothèse qu'une duplication d'un gène ancestral proche des vBPO algales, fusionné au gène ancestral, aurait abouti à une structure monomérique à deux domaines. En revanche, l'enzyme fongique vCPO ne contient qu'un seul site de fixation du vanadium. Le second site aurait été perdu et la région où il aurait dû être présent est maintenant à la surface de l'enzyme (Littlechild et al., 2002).

III.H. Site de fixation de l'ion vanadate

Le site de fixation du vanadium sous sa forme oxydé +V, se situe au fond d'une cavité d'environ 15 à 20 Å de profondeur. Cet ion est lié, dans une géométrie bi-pyramidale à base triangulaire, *via* trois liaisons avec des oxygènes qui forment la base, une liaison avec un hydroxyle en position apicale et une liaison covalente avec l'azote Nε2 d'une histidine (Figure I_15) (Messerschmidt and Wever, 1996; Weyand et al., 1999; Garcia-Rodriguez et al., 2005).

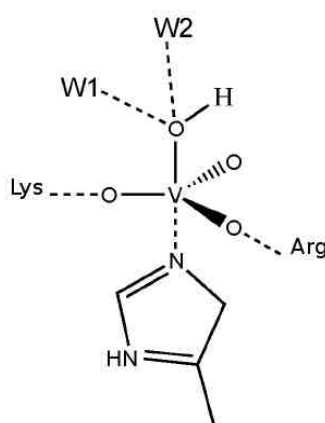


Figure I_15: Structure du vanadate dans le site actif des vHPO.

La géométrie et les résidus de ce site de fixation sont très conservés, nonobstant la grande divergence qui existe entre les différentes structures de vCPO et de vBPO. Le groupement vanadate (HOVO_3^{2-}) est stabilisé *via* un réseau de liaisons hydrogènes avec cinq résidus conservés (deux arginines, une histidine, une glycine et une lysine). Ces résidus jouent le rôle de donneur de proton afin de neutraliser la charge négative du vanadate. Une serine fait également une liaison hydrogène avec le groupement vanadate et celle-ci est conservée dans les structures des vBPO et de la vCPO. Cependant, dans la séquence de la vIPO de l'algue

brune *Laminaria digitata*, ce résidu est remplacé par une alanine (Colin et al., 2005). Il a donc été émis l'hypothèse que c'est ce résidu qui donne à la vIPO de *L. digitata* sa spécificité pour l'iodure (Tanaka et al., 2003). La mutation de cette sérine en alanine dans la vCPO de *C. inaequalis* diminue fortement l'activité pour le chlorure, soit l'halogénure le plus électronégatif, mais ne modifie que très peu l'activité sur le bromure. La sélectivité pour l'halogénure n'est donc que partiellement liée au pouvoir oxydant du cofacteur vanadate. D'autres résidus entourant ce site vanadate ainsi que ceux formant la cavité participent à cette spécificité. Le modèle de la vIPO de *L. digitata* montre un élargissement du diamètre de la cavité. Cette augmentation du diamètre de la cavité expliquerait que le bromure se fixe à la vIPO et l'inhibe l'enzyme, mais que cette interaction soit trop faible pour que le bromure soit oxydé (Colin et al., 2005). L'obtention récente de la structure de la vBPO de *C. pilulifera* complexée à un ion bromure apporte de nouvelles informations sur le site de fixation de cet ion (Littlechild et al., 2009). Dans cette structure, l'ion bromure est positionné à la distance d'une liaison hydrogène du vanadate (3,6 Å). Il fait également une liaison hydrogène avec un azote de la chaîne latérale d'une arginine. Les autres résidus qui forment la poche de fixation du bromure sont hydrophobes.

Présentation du travail

Lors de la colonisation des surfaces algales par des bactéries marines hétérotrophes un grand nombre de mécanismes d'attaques et de défenses se mettent en place de la part à la fois de l'algue et de la bactérie. Les réponses algales ont fait l'objet de plusieurs études chez les chlorophycées (Dalisay et al., 2006), rodophycées (Burke et al., 2009) et phéophycées (Salaun, 2009). En revanche, du point de vue bactérien, peu de choses sont connues. Pourtant, les bactéries marines semblent posséder des systèmes de dégradation de la paroi algales très sophistiqués ainsi que de nombreux mécanismes impliqués dans la résistance aux attaques des algues. Je me suis donc intéressé aux aspects moléculaires de ces métabolismes en utilisant comme modèle la flavobactérie *Zobellia galactanivorans*.

Une première partie de mon travail a porté sur la famille des glycoside hydrolases de la famille 82. Actuellement cette famille d'enzymes ne contient, dans les banques de données, que deux membres qui ont une fonction ι -carraghénase. Le séquençage du génome de *Z. galactanivorans* a révélé la présence de deux nouvelles GH 82 originales de par leurs tailles plus courtes. Basé sur l'alignement de l'ensemble des séquences de GH 82, j'ai réalisé des expériences de mutagenèse dirigée sur la séquence d'"*Alteromonas fortis*" (Enzyme modèle de cette famille) afin d'identifier les résidus importants dans la catalyse. Je me suis également intéressé au rôle d'un ion chlorure proche du site actif pour lequel les résidus formant son site de fixation sont strictement conservés dans l'ensemble des séquences. Pour cela, j'ai déterminé les paramètres cinétiques de la iotase native d'"*A. fortis*" ainsi que de différents mutants et résolu la structure cristallographique de l'enzyme native d'"*A. fortis*" dans laquelle l'ion chlorure proche du site actif est absent.

Une seconde partie de mon travail a consisté à caractériser biochimiquement et structuralement une potentielle nouvelle famille de glycoside hydrolases. Nous avons identifié dans le génome de *Z. galactanivorans* cinq protéines qui sont similaires entre elles mais qui ne ressemblent à aucune autre protéine déjà décrite. Ces protéines, très faiblement similaires aux GH 32 et 43, sont retrouvées au sein d'opérons putatifs impliqués dans la dégradation de

polysaccharides sulfatés. Nous avons donc utilisé les techniques de clonage et de surexpression en système hétérologue pour produire ces enzymes en grande quantité. Les enzymes purifiées ont été utilisées pour réaliser des tests d'activités sur un grand nombre de substrats mais également des expériences de diffusion de rayon X aux petits angles et de cristallographie.

Dans une troisième partie je me suis intéressé à une iodo-péroxydase dépendante du vanadium présente chez *Z. galactanivorans*. La présence de cette enzyme dans un génome bactérien est assez surprenante et nous pensons qu'elle pourrait être impliquée dans la résistance aux mécanismes de défense des algues. Cette étude a été réalisée en collaboration avec L. Delage et C. Leblanc de l'équipe de défense des algues de notre UMR. Pour ma part, je me suis intéressé à la résolution de la structure cristallographique et à l'analyse de cette structure qui est la première structure d'une iodo-péroxydase, mais également la première structure d'une halo-péroxydase dépendante du vanadium bactérienne.

Chapitre I

*Identification des résidus catalytiques et étude
mécanistique des iota-carraghénases de la famille 82*

Chapitre I : Identification des résidus catalytiques et étude mécanistique des iota-carraghénases de la famille 82

I. Présentation de l'article

Lors des précédents travaux sur la iota-carraghénase d'“*Alteromonas fortis*”, la question de l'identité des résidus catalytiques ainsi que l'implication de l'ion chlorure dans la réaction catalytique ou encore les possibles interactions du domaine A avec le substrat fixé dans la totalité du sillon catalytique restaient en suspens. Une première partie de mon travail de thèse était d'apporter, par mutagenèse dirigée et par cristallographie, de nouvelles données expérimentales pour mieux comprendre les détails du mécanisme catalytique de cette classe d'enzymes.

I.A. Nouvelles séquences de glycoside hydrolases de la famille 82

Trois nouvelles séquences de GH 82 ont récemment été identifiées. Une provenant d'un metagénome marin au large de l'île Fernandina dans les Galápagos (CgiA1_Fi) et deux dans le génome de *Z. galactanivorans* (CgiA2_Zg et CgiA3_Zg). CgiA1_Fi est similaire aux deux séquences CgiA1_Af et CgiA1_Zg déjà présentes dans les bases de données. En revanche, CgiA2_Zg ne possède pas le domaine A et CgiA3_Zg ne possède ni le domaine A ni le domaine B (Figure 3). J'ai surexprimé CgiA3_Zg et j'ai montré que cette forme tronquée de GH 82 est active sur ι-carraghénane (Figure 1). Or, le domaine A, absent de cette enzyme, est impliqué dans la formation du tunnel et confère ainsi à l'enzyme son caractère processif (Michel et al., 2003). Il est donc vraisemblable que les enzymes CgiA2_Zg et CgiA3_Zg n'aient pas un mécanisme processif. Il sera nécessaire de produire et surtout de purifier une quantité plus importante de ces enzymes pour analyser en détail leurs modes d'actions. La purification de ces deux enzymes n'a pour l'instant pas été menée à terme. Malgré, les différents plasmides utilisés et souches d'expression de *Escherichia coli* testé, la protéine

CgiA2_Zg n'est pas exprimée. Quand à la protéine CgiA3_Zg, nous arrivons à l'exprimer avec un tag GST, mais la purification sur colonne de glutathion-sépharose semble impossible. Nous pensons que cela est dû au fait que la iotase, essentiellement chargée positivement, se "colle" à la protéine GST, qui elle, porte un grand nombre de charges négatives. C'est cette interaction qui empêcherait la fixation de la GST à la colonne de purification.

I.B. Identification des résidus importants pour la réaction catalytique

L'alignement multiple de l'ensemble des séquences de iotases ainsi que la structure complexée aux oligos ι-carraghénanes (Michel et al., 2003) ont servi de base afin d'établir une liste des résidus catalytiques potentiels. Nous avons réalisé des mutants de ces résidus à partir de la iotase d'"*A. fortis*" dans le but d'identifier expérimentalement la machinerie catalytique, et comprendre le rôle de chacun des résidus dans la réaction. Trois résidus conservés dans toutes les séquences ont été mutés. La glutamine 222 en lysine (Q222K) et en acide glutamique (Q222E), l'histidine 281 en alanine (H281A) et l'acide glutamique 245 en glutamine (E245Q). En plus des trois mutants précédents deux autres résidus intéressants ont été mutés; l'acide aspartique 247 en alanine (D247A) qui n'est pas conservé dans la séquence de CgiA2_Zg et l'acide glutamique 310 en glutamine (E310Q), conservé dans seulement les domaines A (Figure 3).

I.C. Détermination des paramètres cinétiques

Afin de mieux comprendre le rôle de chacun des résidus mutés j'ai déterminé les paramètres cinétiques de l'enzyme native et des mutants avec un ι-carraghénane qui contient 20 % de motif nu-carraghénane (Tableau 3). L'enzyme native exhibe un K_m de 12.3 mM et un k_{cat} de 317 s⁻¹. Les résultats des tests d'activités montrent que les mutants E245Q et D247A perdent toute activité (Figure 1). Les deux résidus catalytiques de la famille 82 sont donc l'acide glutamique 245 (Donneur de proton) et l'acide aspartique 247 (Base).

E310Q est actif mais son activité est beaucoup plus faible, avec une constante catalytique (k_{cat}) 24 fois inférieures à celui de l'enzyme native. L'acide glutamique 310 fait une liaison hydrogène avec la tyrosine 341, qui interagit par "stacking" avec le substrat; Le fait de muter ce résidu permettrait à la tyrosine, plus labile, de mieux s'adapter au substrat et donc

d'interagir plus fortement avec le ι-carraghénane, ce qui expliquerait la diminution de la constante d'affinité (K_m) d'un facteur quatre.

On observe également une diminution d'un facteur quatre du K_m dans le mutant H281A, alors que le k_{cat} diminue d'un facteur d'environ 1000. Cette histidine fait une liaison hydrogène avec le donneur de proton E245 et est dans une conformation d'hélice epsilon, une zone particulière du diagramme de Ramachandran. Ce résidu est probablement impliqué dans la régulation du pKa du donneur de proton, l'acide glutamique 245.

Dans la iotase d'«*A. fortis*», la glutamine 222 fait un pont entre la molécule d'eau catalytique et un ion chlorure dont le site de fixation est relativement bien conservé entre les différentes iotases. Il a déjà été montré dans les GH 8, 19 et 46, qui concernent des enzymes fonctionnant inversion de configuration du carbone anomérique, qu'un troisième résidu, en plus des deux catalytiques, était présent afin de positionner de façon optimale la molécule d'eau catalytique (Hart et al., 1995; Collins et al., 2005; Kezuka et al., 2006; Lacombe-Harvey et al., 2009). Mais il n'a jamais été observé un résidu de ce type lié en plus à un ion. Le mutant Q222K, qui permet de conserver une fonction amine à la même position mais sans avoir de fonction carboxyle, perd toute activité (Tableau 3). Nous pensons que cette perte d'activité est liée au fait que la fonction amine de la lysine vient neutraliser la charge négative de la base, D247. La lysine a une chaîne latérale plus longue que la glutamine et elle pourrait donc induire un encombrement stérique lors de la fixation du substrat, resulterait en la perte d'activité. Le mutant Q222E permet de substituer la fonction amine liée au chlorure par une fonction hydroxyle, et ainsi empêcher la fixation de l'ion chlorure. Ce mutant, actif, semble néanmoins être moins actif que l'enzyme native. En revanche, il n'est que très faiblement surexprimé, c'est pourquoi la quantité d'enzyme purifiée n'a pas permis de déterminer les paramètres cinétiques de celui-ci.

I.D. Structure de la iotase d'«Alteromonas fortis»

Afin d'approfondir l'étude du rôle de l'ion chlorure, j'ai résolu la structure de la iotase d'«*A. fortis*» dans une condition dépourvue de chlore. Pour cela, un cristal natif a été trempé dans une solution où les ions chlorures ont été remplacés par des ions bromures. D'un point de vue générale, la iotase cristallise dans un nouveau groupe d'espace dans lequel le domaine A de l'une des deux molécules de l'unité asymétrique est stabilisée par contact cristallin, et est

visible dans son intégralité (Figure 4). Dans cette structure l'ion chlorure n'est pas présent et son absence entraîne une perte du réseau d'eau au sein du site catalytique (Figure 6). Le rôle de cet ion chlorure est donc d'orienter la glutamine 222 qui, elle, participe au positionnement de la molécule d'eau catalytique. Son action est donc indirecte, contrairement à celui présent dans les α -amylase (GH 13) où le chlorure polarise la molécule d'eau catalytique afin qu'elle soit plus réactive (Feller et al., 1996; Aghajari et al., 2002; Numao et al., 2002).

I.E. Modèle complet de la iotase "d'*Alteromonas. fortis*"

Dans la structure décrite dans le paragraphe précédent, le domaine A d'une des deux molécules de l'unité asymétrique a pu être reconstruit intégralement. J'ai donc combiné la structure complète du domaine A à la structure de la iotase d'"*A. fortis*" complexée aux oligos ι -carraghénanes (Michel et al., 2003) pour créer un modèle de la iotase avec le domaine A complet en position fermée et contenant un octa ι -carraghénane qui couvre l'ensemble des sous-sites de fixation +4 à -4. Sur ce modèle l'arginine 343, qui jusqu'à présent était restée invisible, se retrouve entre les groupements sulfates du G4S et du DA2S, des sous-sites -1 et -2 respectivement (Figure 5). Il est donc vraisemblable que l'arginine 343 participe à l'interaction avec le substrat lors de la réaction, mais peut-être également au cours du relargage du produit et / ou du glissement du substrat entre deux hydrolyses. En revanche l'arginine 349, que l'on ne trouve que dans la iotase d'"*A. fortis*" (Figure 3), ne semble pas être positionnée de façon à pouvoir interagir avec le substrat.

Article

*Identification of catalytic residues and mechanistic
analysis of family GH82 iota-carrageenases*

Identification of catalytic residues and mechanistic analysis of family GH82 iota-carrageenases

Etienne Rebuffet^{1,2}, Tristan Barbeyron^{1,2}, Alexandra Jeudy^{1,2}, Mirjam Czjzek^{1,2§} and Gurvan Michel^{1,2}

¹Université Pierre et Marie Curie, Paris 6, Marine Plants and Biomolecules UMR 7139, Station Biologique, 29682 Roscoff, France

²Centre National de la Recherche Scientifique, Marine Plants and Biomolecules UMR 7139, Station Biologique, 29682, Roscoff, France

§Corresponding author

Keywords: kinetic study, site directed mutagenesis, catalytic residues, glycoside hydrolase family GH82, iota-carrageenase, *Alteromonas fortis*

Short title : mechanistic study of GH82 iota-carrageenase

Synopsis

Marine polysaccharide degrading enzymes, and iota-carrageenases in particular, have received little attention in the past, although their substrate specificity is of interest for biotechnological applications. This is mostly a consequence of the lack of data about their occurrence in the marine environment. Recent metagenomic data mining and the genome sequencing of a marine bacterium, *Zobellia galactanivorans*, led to the identification of three new iota-carrageenase genes belonging to the glycoside hydrolase family GH82. The additional sequences helped identify potential candidate residues as catalytic proton donor and nucleophile. We have identified the catalytic key residues experimentally by site directed mutagenesis and subsequent kinetic analysis for the iota-carrageenase from *Alteromonas*

fortis CgiA1_Af. The kinetic analyses of the purified mutant enzymes confirm that E245 plays the role of the catalytic proton donor and D247 the general base that activates the catalytic water molecule. The point mutations of three other residues, namely Q222, H281 and Q310 in *A. fortis*, located in proximity of the active site also affect the enzyme activity. Our results indicate that glutamate 310 plays a role in stabilizing the substrate intermediate conformation, while histidine 281 is involved in substrate binding and appears crucial for maintaining the protonation state of the catalytic nucleophile D247. The third residue, Q222 that bridges the catalytic water molecule and a chloride ion, plays a crucial role in structuring the water network in the active site of *A. fortis* iota-carrageenase.

Introduction

The major matrix polysaccharides produced in the cell wall of carrageenophyte red algae (Rhodophyta) are sulfated polygalactans named carrageenans, which display key roles in important biologic processes, such as structuration or signalling [1]. They consist of a linear backbone of D-galactose residues linked by alternating $\alpha(1-3)$ and $\beta(1-4)$ linkages. A further layer of complexity is the occurrence of a 3,6-anhydro bridge of the $\beta(1-4)$ -linked galactose residue in kappa- and iota-carrageenan and the number of ester-sulfate substituents per di-galactose repeating unit, which varies from one in kappa-carrageenan to two in iota-carrageenan and three in lambda-carrageenan [2]. Industrially extracted kappa- and iota-carrageenans form thermoreversible gels in aqueous solution [3], a property that is exploited in many applications for food [4] or biomedical conditionings [5].

In the ocean carrageenans represent an important carbon source for heterotrophic marine bacteria, which participate in this way to the recycling of red algal biomass [6]. Bacteria are able to degrade fibres of carrageenans by enzymatic attack through glycoside hydrolases (GHs) that are secreted into the external medium and/or attached to the bacterial cell wall. Interestingly, although the various carrageenans are chemically rather close, the respective GHs that degrade different types of carrageenans do not belong to the same family. Indeed the kappa-carrageenase is a member of family GH16 [7], the iota-carrageenase (iotase) belongs to family GH82 [8] while the lambda-carrageenase is currently not classified [9].

While the first iotase activity has been described in 1984 by Greer et al [10], to date only two iotase sequences have been reported in literature, i.e the first from the marine bacteria

Alteromonas fortis and the second from *Zobellia galactanivorans* [8]. While for the second enzyme only sequence data are available, the iotase of *A. fortis* has been studied more in detail and the 3D crystal structure was solved in 2001 [11]. The structure consists of a beta helix of ten complete turns, flanked by two domains (A and B) in the C-terminal region. The crystallographic structure of this enzyme was also solved in presence of substrate oligo-carrageenans, where a tetra-saccharide and a di-saccharide have been located in subsites +4 to +1 and -3 to -4 respectively [12]. Moreover, the complexed structure has highlighted that the catalytic cleft of the iotase adopts two conformations due to rigid body movement of the domain A: an open one, which allows for an initial endo-attack of the carrageenan fibres, and a substrate-induced tunnel conformation, which accounts for the highly processive character of this enzyme [12]. The *A. fortis* iotase hydrolyses the $\beta(1-4)$ bond by an inverting mechanism and produces neo-i-carratetraose and neo-i-carrahexaose as end products. It is generally admitted that inverting glycoside hydrolases catalyse the hydrolysis of the glycosidic bond via a single displacement reaction [13]. One of the catalytic residues, acting as a general acid, provides protonic assistance to the departing glycosidic oxygen, whereas the second, acting as a general base, activates a water molecule that effects a direct displacement at the anomeric centre [13]. However, the precise identity of these two catalytic actors for the enzymes belonging to family GH82 remains to be determined. The structural analysis has revealed that only three residues are strictly conserved in both sequence of *A. fortis* and *Z. galactanivorans* and located in the catalytic groove of the enzyme. For this reason it has been proposed that the catalytic residues are two among E245, D247 or E310 [12].

Notably, recent genome sequencing projects, such as that of *Z. galactanivorans*, provides us with sequences of new members of family GH82 enzymes (Barbeyron et al. in preparation). Taking into account this new information and based on multiple sequence alignments of the various GH82 members, we have designed a site directed mutagenesis study that, combined with the kinetic analysis, helps define the roles of various residues that are key actors in the catalytic mechanism of this enzyme family.

Experimental

Molecular biology and enzymatic assay of CgiA2_Zg and CgiA3_Zg

The coding region of the mature iotases CgiA2_Zg and CgiA3_Zg, *i.e.* without the N-terminal signal peptide, was amplified by the polymerase chain reaction (PCR) from the *Z. galactanivorans* DNA. The PCR products were inserted in pGEX and pET20b expression vectors, which were used to transform different expression strains of *E. coli* (Origami (DE3) pLysS, BL21 (DE3), C41 (DE3) and C43 (DE3)). Expression was tested and observed only in *E. coli* Origami (DE3) pLysS for the CgiA2_Zg/pEt20b and CgiA3_Zg/pGEX constructions (data not shown). Recombinant *E. coli* cells were grown in ZYP medium [14] at 20°C during 3 days. Then the cultures were centrifuged and pellets were resuspended in 50 mM Tris pH8, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA and 10 % glycerol buffer.

Since *E. coli* does not have any activity on iota-carrageenan, we could directly use the crude cell extract to test for the presence of enzyme activity within these two cell lines (**Figure 1A**). The cells were lysed with a French press and the extract centrifuged at 15000 rpm for 1h. Twenty μ L of the supernatant was added to 80 μ L of reagent solution to obtain a final composition of 0.3% iota/nu-carrageenan, 10 mM Tris pH 8 and 200 mM NaCl. The substrate degradation was monitored by carbohydrate polyacrylamide gel electrophoresis (C-PAGE) using 6% (w/v) polyacrylamide for the stacking gel and 27% polyacrylamide for the running gel. The electrophoresis was performed at 200V in 50 mM Tris-HCL and 1 mM EDTA buffer. The gel was stained in a 0.5% (w/v) Alcian blue solution for 10 min, subsequently with 0.4% (w/v) silver nitrate during 10 min. The revelation was made with 1.75 g Na_2CO_3 , 20 μ L formaldehyde and 25 mL of H_2O mq.

Site-directed mutagenesis

The CgiA1_Af gene was mutagenized using the Quikchange® site-directed mutagenesis kit (Stratagene). The primers used to generate the mutations are as indicated in **Table 1**. In all cases, we sequenced the resulting DNA to confirm that the mutations have occurred at the correct, desired position.

Expression and purification of CgiA1_Af and mutants

Full details of the expression of wild-type *A. fortis* iotase have been described previously [15]. Briefly, CgiA1_Af was expressed in M9 medium at 12°C, by the pET20b vector (Novagen) as a C-terminal His-tagged fusion protein in the periplasm of *E. coli*(DE3) strain. In case of the recombinant mutant proteins, recombinant *E. coli*(DE3) cells were incubated at 288 K in ZYP medium. The culture was stopped when the cell growth has reached the stationary phase. For both the wild-type and the mutant proteins, the cells were resuspended in a buffer composed of 50 mM HEPES pH 7.5, 500 mM NaCl and 100 mM imidazole (Buffer A). The cells were lysed in a French press. After centrifugation at 15000 rpm for 2h, the supernatant was loaded onto a 10 mL Chelating Fast Flow, NiSO₄ charged Sepharose column (GE healthcare) and equilibrated with buffer A. The column was washed with buffer A and then eluted with 60 mL of a linear gradient of imidazole (100-500 mM). Fractions that showed the presence of iotase on sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) were pooled, concentrated and the buffer was exchanged against 50mM HEPES pH 7.5 and 100 mM NaCl buffer (Buffer B). In a second step, the sample was loaded onto a 3 mL Source 15S (GE healthcare) column, previously equilibrated with buffer B. The column was washed with buffer B and then eluted with 30 mL of a linear gradient of NaCl (100-500 mM). The fractions that showed the presence of iotase on SDS-PAGE were pooled, concentrated and dialysed again 25 mM HEPES pH 7.5 and 200 mM NaCl. The final purified mutant enzymes are shown in **Figure 2A, B**. The concentrations of wild-type, E245Q, D247A, E310Q and H281A were 0.45, 0.23, 0,58, 0.14 and 1.0 respectively.

Enzyme kinetics.

To be able to perform the enzymatic kinetic measurements in solution, an iota-carrageenan composed of 80% of iota- and 20% of nu-carrageenan motif was used as substrate [16]. This substrate is closer to the natural polysaccharide found in red algal cell walls, and the presence of nu-carrageenan blocks significantly decreases the gelling properties of the polymer, hence it was possible to obtain solutions with relative high concentration.

Kinetic parameters were determined with a reaction mixture of 1 mL at 40 °C in 10 mM Tris pH 8 and 100 mM NaCl. All experiments were performed in quadruplicate. The amount of released sugars was estimated by the ferricyanide reducing sugar assay [17]. For

all samples five substrate concentrations in the range from 1.5 to 0.15% (w/v) were tested, and for each concentration at least 8 timepoints were measured during a total reaction period of 20 minutes (wild-type), 16 minutes (E310Q) and 90 minutes for the different samples respectively. In all cases the reaction/ferricyanide mixture was maintained in boiling water during at least 10 minutes and cooled down to room temperature, before the absorbance was measured at 420 nm. The Hanes plot function of Hyper32, a hyperbolic regression programme for the analysis of enzyme kinetic data (<http://homepage.ntlworld.com/john.easterby/software.html>) was used to determine the respective kinetic constants.

Oligosaccharide production and detection by C-PAGE

One hundred μL of a 0.3% of hybrid iota-nu-carrageenan solution with 10 mM Tris pH 8 and 200 mM NaCl was incubated with 1 μg of enzyme at 40°C during 6 hours, and subsequently boiled to stop the reaction. Substrate degradation of the different mutant enzymes are analysed on C-PAGE gel as described for the *Z. galactanivorans* CgiA enzymes (Figure 1B).

Crystallization and structure refinement

Crystals of wild-type *A. fortis* iotase were grown in hanging drops composed of 1 μL of enzyme and with 1 μL of reservoir solution containing 10% PEG 5000 MME, 100 mM sodium acetate pH 5.5, 250 mM sodium nitrate, 2% MPD and 0,02% iota-carrageenan. The crystals that appeared under these conditions were used for macro seeding in hanging drops composed of 1 μL of enzyme and with 1 μL of reservoir containing 7% PEG 3350, 100 mM sodium acetate pH 5.5, 250 mM sodium nitrate, 10% glycerol. With the aim of structurally replacing the chloride ion in the crystals, they were soaked for 5 min in 10% PEG 3350, 100 mM sodium acetate pH 5.5, 250 mM sodium nitrate and containing 100 mM sodium bromide. Crystals were then quickly soaked in a crystallization solution supplemented with 30% of glycerol and flash cooled at 100K. Data were collected on a Bruker X8 proteum equipped with a PLATINUM 135 CCD Detector. Data were integrated and scaled with the PROTEUM Crystallographic Software Suite. The intensity data were converted to amplitudes using XPREP (as implemented in Bruker-AXS software [18]). The structure was determined by

molecular replacement (PHASER) [19] using the coordinates of the native iota-carrageenase [11] as model, for which the A domain was deleted. The initial molecular replacement solution was further refined with the program REFMAC5 (implemented within the CCP4 suite, [20]), alternating with cycles of manual rebuilding in COOT [21]. Data collection and refinement parameters are presented in **Table 2**. The refined coordinates and structure factors have been deposited at the Protein Data Bank with accession code (XXXXX is actually under way).

Molecular modeling

In a first step, the domain A (residues 307 to 374) of the three iota carrageenase structures, i.e. the native structure (idcode 1H80), the closed conformation (idcode 1KTW) and the one obtained in this study, were superimposed. The next step consisted in replacing the incomplete domain A of the complex structure by the complete one obtained in this study. This positioned the missing loop of domain A (residues 343 to 349) that covers the catalytic site in the closed conformation. Then we completed the iota-carrageenan chain, between the tetra- and the disaccharide units of the complex structure (1KTW), by adding the missing sugar units in the -2 and -1 binding sites such that a coherent octasaccharide with correct stereochemistry was obtained, spanning the entire binding site cleft. A final step by energy minimisation led to a structural model that reveals the close contacts between the iota-carrageenase domain A with bound carrageenan-units in the -1 and -2 sub sites.

Results

Sequence alignment and analysis of new members of family GH82

enzymes

The recent success of marine genomic and metagenomic sequencing projects has provided us with new members of family GH82 enzymes. By regular blast searches against the newly deposited metagenomic flow of sequences, we have recently identified the sequence of a third, previously undescribed and incomplete iota-carrageenase in the meta-genome Sorcerer II global ocean sampling [22]. Moreover, our own project on the complete

genome sequencing of the marine polysaccharide degrading Flavobacteria *Zobellia galactanivorans* (Barbeyron et al, in preparation), revealed the presence of two more sequences of family GH82 iotases in addition to the previously described and isolated one [8].

A multiple sequences alignment performed with Multalin [23] and Esprict [24] of all actually available iotase genes and including the structural information from *A. fortis* is represented in **Figure 3**. The alignment reveals strong similarity in the core of the beta-helix for CgiA1_Af, CgiA1_Zg and JCVI_PEP which are particularly well conserved and besides having the same overall 3D-fold also have the same domain architecture. Indeed, in these three sequences even the different domains are easily recognizable, since the beta helix core displays highest conservation, while the two insertion domains A and B in the C-terminal region of the enzyme (highlighted by red and green structural elements in **Figure 3**) are significantly less conserved. Interestingly, the two new sequences from *Z. galactanivorans* display sequence identity lower than 30% to the other three sequences. Moreover, they are significantly shorter with 429 and 329 amino acids for CgiA2_Zg and CgiA3_Zg respectively, compared to CgiA1_Zg, which contains 491 residues. The difference in length is explained by the absence of domain A in CgiA2_Zg and the absence of both domains A and B in CgiA3_Zg.

Although the sequence alignment shows that most of the putative catalytic residues are indeed present in both CgiA2_Zg and CgiA3_Zg, the total absence of domains A and B raised the question whether these truncated variants of family GH82 iota-carrageenases still encode active enzymes. To answer this question, we have cloned the respective genes into *E. coli* expression strains, to produce the recombinant proteins. After interaction with iota-carrageenan polymer, the analysis of the supernatant of the carrageenase expressing *E. coli* strains (Lanes 1 and 3 in **Figure 1A**) clearly showed the production of oligosaccharides, demonstrating that these two new sequences indeed encode active iota-carrageenase enzymes.

Identification of the catalytic residues in the sequence alignment

The multiple sequence alignment shows that among the three expected catalytic residues, namely E245, D247 and E310, only one, the glutamic acid 245, is conserved in all five sequences. The analysis of the complexed crystal structure indicated that this residue is ideally positioned to be the proton donor and has been pointed out to be the most probable

catalytic residue [12]. Surprisingly both the other candidates are absent in at least one other sequence: D247 is not present in the sequence of CgiA2_Zg and E310 is absent in CgiA2_Zg and CgiA3_Zg. Two putative other candidates, close to E245, are highly conserved throughout the five sequences. This is the case of Q222, which is linked to a chloride ion through the side chain amine group, as revealed by the crystal structure. The second one is H281, which is involved in a hydrogen bond with E245 and moreover is in a particular epsilon helix conformation in the crystal structure (“generously allowed” region of the Ramachandran plot). The kinetic analyses of point mutants (Q222, E245Q, D247A H281A, and E310Q) of these highly conserved residues, located at the heart of the catalytic active site, are described in the following paragraph, identifying them as the key residues involved in the catalytic machinery in GH82 enzymes.

Kinetic parameters of point mutants of catalytic candidate residues in

CgiA1_Af

In the lab, pure iota-carrageenan polymer is not a convenient substrate for kinetic studies of iotase, since it forms gels rapidly and at low concentrations. However the hybrid iota/nu-carrageenan polymer [16], which in addition is closer to the natural substrate found in algal cell walls, can be used as soluble substrate for kinetic measurements of the enzyme. Indeed, the iota-block structures, present in the polymer are the substrate of the enzyme, while the nu-blocks decrease the gelling properties of the polymer by preventing the formation of iota-carrageenan double helix structure.

The kinetic parameters obtained with the wild-type and various mutants of the *A. fortis* iotase are listed in **Table 3**. Our measurements of the kinetic parameters provide evidence that all five conserved residues do indeed have essential roles in catalysis. The K_m and k_{cat} values of the wild-type iotase are 12.3 mM and 317 s⁻¹, respectively. This results in an overall catalytic efficiency of 25 804 M⁻¹ s⁻¹ for the wild-type CgiA1_Af iotase.

For two of the catalytic candidate mutants, E245Q and D247A, the enzymatic activity was completely abolished. No residual activity was measurable by the reducing sugar assay, nor was the formation of oligosaccharides observed on the C-PAGE gel; all the substrate was stained in the stacking gel. In agreement with their position revealed in the crystal structure [11], we experimentally identify residues E245 and D247 (CgiA1_Af numbering) as the

catalytic residues in GH82 iotase enzymes. From their position relative to the substrate, we can further deduce that E245 is the catalytic proton donor and D247 the nucleophile activating the hydrolytic water molecule.

In the case of the mutant E310Q, the K_m value is divided by a factor of about 4, indicating that apparently the enzyme binds better to the substrate. But the reduction in k_{cat} by 24 fold resulted in a substantial decrease in the overall enzyme efficiency (8 fold). We conclude that E310 is not a residue directly involved in catalysis but the 8-fold decrease of efficiency indicates that it does participate indirectly to the catalytic reaction.

The mutant enzyme H281A decreases the K_m in a similar manner as E310Q by 4-fold, but the decrease in k_{cat} by 933-fold is even more pronounced. Consequently, the enzyme efficiency is also strongly affected by this mutation. Indeed, H281 is involved in a tight hydrogen bond with the nucleophile E245, N ϵ^2 of the histidine side chain forms a hydrogen bond (2.57 Å) to one carboxyl oxygen (O ϵ^2) of E245.

Two mutations of Q222 were successfully expressed in *E. coli* strains, namely Q222K and Q222E. However, for both mutated enzymes no kinetic measurements were possible. The *E. coli* strain expressing the Q222E-iotase did show activity when growing on iota-carrageenan gel containing plates, since the bacterial colonies dug the characteristic hole in the gel, indicative of hydrolytic activity. Unfortunately the quantity of enzyme expressed was so low that purification of the enzyme failed to provide a suitable sample for kinetic analysis. In contrast, the mutant Q222K-iotase was expressed soluble in sufficient amounts to perform the complete purification steps (**Figure 2B**), indicating that the protein is correctly folded, but the enzymatic activity for this mutant was not measurable by the applied activity tests. Moreover no iota-carrageenan degradation was observed, as revealed by a C-PAGE gel (not shown).

Description of the iotase structure in the novel crystal form

The crystal structure of CgiA1_Af in a new crystal form of space group $P2_1$ was determined to a resolution of 2.48 Å (unit cell parameters in **Table 2**). Two enzyme molecules are found per asymmetric unit, leading to a V_M of 2.34 Å/Da and a solvent content of 47.5%. The refinement of 7302 protein atoms that cover residues 28 to 499, including residues 343 to 349 (only for molecule A) that were disordered in the previous structures, 9 ions (Na $^+$, Ca $^{2+}$, Ni $^{2+}$

and NO_3^-) and 345 water molecules led to an overall R-factor of 19.8% and a R_{free} -factor of 26.0%. Furthermore, the close inspection of the chloride position, observed previously in the iota-carrageenase crystal structures [11] revealed that in the here obtained crystal form this position was empty in molecule A and displayed weak electron in molecule B. Moreover, the conserved water network filling the active site cleft was affected and many water molecules appeared to be excluded by the absence of the negative charge at the chloride ion position.

As expected, the overall crystal structure (**Figure 4A**) is highly similar to those already described in the native and complexed form by Michel et al [11, 12], however, domain A clearly takes a different position from the two described earlier (**Figure 4B**). In molecule A this domain is stabilized through crystal packing contacts in a position even more open than in the other two structures (**Figure 4B**). As a consequence all residues of domain A are ordered in molecule A and the construction of the complete domain A, including the missing loop from residues 343 to 349, was possible.

Having access to various structural conformations as well as a partial substrate-complex of the iota-carrageenase, we have modelled, by subsequent superimposition and replacement, the closed domain A conformation onto the substrate complex, in which we have connected the two product molecules, present in 1KTW, by a iota-carrabiose to obtain a continuous iota-carrageenan chain spanning the active site cleft. Possible protein-substrate interactions could be inferred from this model. Indeed, two arginine residues (R343 and R349) present in the disordered part of the loop come to lie in close contact with the sulphate-ester groups of the iota-carrabiose units bound in sub-sites -1 and -2 (**Figure 5**).

Discussion

We have performed a site directed mutagenesis study in combination with a crystal structure in absence of chloride ions, to experimentally probe the role of specific residues and the chloride ion in the catalytic mechanism of a family GH82 iota-carrageenase. The complete inactivity of soluble expressed mutants E245Q and D247A, together with the relative position of these residues in the crystal structure, unambiguously identify E245 as being the proton donor and D247 as the general base that activates the catalytic water molecule. Interestingly, D247 is not present in the sequence of CgiA2_Zg, where it is replaced by a glycine. The following residue, however, is a glutamate that might take over the role of the water activating

base in the catalytic process. Indeed, our preliminary activity tests indicate that CgiA2_Zg is perfectly active on iota-carrageenan gels. In GH82 iota-carrageenases the catalytic residues are all carried by the same β -strand, and the residue insertion might be compensated by a special structural feature, such as a β -bulge. Together with the longer side chain of a glutamate residue replacing an aspartate, the CgiA2_Zg might display a modified activity or substrate specificity. However, further structural and enzymatic analyses of CgiA2_Zg are necessary to conclude on the consequences of the difference in positioning of the general base residue in this enzyme. Generally, it is rather rare that one of the two crucial catalytic carboxylic acids is absent in active glycoside hydrolases. But in some cases such replacements do take place. For example, in family GH1 myrosinases, the catalytic proton donor is replaced by a glutamine residue and the leaving group activation is assisted by an ascorbate cofactor [25]. Another interesting recent example, where the catalytic machinery is not conserved within a family, are the GH97 enzymes, but in this case the change of position of the general base transforms an inverting enzyme into a retaining one [26]. Noteworthy, a third type of enzymes where the exact position of the catalytic machinery is not strictly conserved, can be found in retaining enzymes of family GH16. Indeed, the catalytic residues are carried by a conserved motif EID[I,V](X)E, where in some members (β -agarases, κ -carrageenases) the motif contains a β -bulge, whereas other members (XET and lichenases) display a regular β -strand [27]. This places the conserved acid/base in the former enzymes at a position one amino-acid more distant than in the other family members. This situation perhaps mostly resembles the one encountered here, for the iota-carrageenase CgiA2_Zg, where the catalytic residue is shifted by one position in the sequence and a particular structural feature might compensate for the difference in location.

The fact that the mutation of H281 strongly affects the catalytic efficiency clearly indicates that this residue is also important for the catalytic cycle. Such tight hydrogen bonds, formed by a histidine residue with the catalytic residues, have also been observed in family GH16 and GH7 glycoside hydrolases ([27, 28]. The histidine is thought to be involved in proton trafficking, thus ensuring regeneration of the correct protonated states of the catalytic residues. Interestingly, this histidine is not present in CgiA3_Zg, where it is replaced by a tryptophan residue. Depending on the conformation of a tryptophan residue in this position, the amine group present in the tryptophan side chain could as well provide an equivalent hydrogen bond.

The first crystal structure of the iotase from *A. fortis* has revealed the presence of a chloride ion in the proximity of the catalytic active site [11]. The chloride ion is bound to Q222 that in turn is hydrogen bonding the catalytic water molecule. Our results show that mutation of Q222 into a lysine leads to an inactive enzyme, while in the case of replacement with a glutamic acid, activity still is measurable. This behaviour might well be interpreted by an indirect role of both Q222 and the chloride ion in the catalytic cycle; their role might be the activation and replacement and/or turn over of the water molecule that is hydrolyzing the glycosidic bond. The lysine replacing the glutamine residue would still bind the chloride ion, but cannot establish a further hydrogen bond activating or positioning the catalytic water molecule. A glutamic acid at this position, due to its charged character, possibly impairs the binding of a chloride ion, leading to a more instable enzyme, but the charged side chain may still activate the catalytic water molecule.

Indeed, residues with hydroxyl groups, that might be equivalents of the chloride/glutamine pair in CgiA1_Af, were found in the close environment of the general base in several other inverting glycoside hydrolases. Their respective roles are to orientate the catalytic water molecule in a position for optimal catalysis. This is the case of Thr45 in chitosanase (GH46) from *Streptomyces sp.* [29], Tyr203 in xylanase (GH8) from *Pseudoalteromonas haloplanktis* [30], Ser190 in chitinase (GH19) ChiC from *Pseudomyces griseus* [31] and Ser120 in chitinase (GH19) in barley seeds [32]. In CgiA1_Af, the side chain of Q222 together with the more distant chloride ion may well influence the exact positioning of the catalytic water and the complete water-network, necessary to provide the reaction with a new hydrolytic agent. Interestingly, this residue is strictly conserved in all known iotase sequences (**Figure 3**), indicative of a relative important role of this residue. Moreover, Greer and Yaphe [10] have shown that the activity of the enzyme is dependant of NaCl. Optimal iota-carrageenase activity is obtained when the concentration of NaCl is between 100 mM and 500 mM. We have also tried to performed activity in absence of chloride ions, by dialyzing the enzyme extensively against de-ionized water. In most experiments we noticed a two third loss of activity of the enzyme under these conditions (data not shown). Interestingly, when soaking the crystals of CgiA1_Af in 200mM sodium bromide containing solution, the subsequent crystal structure showed the absence of any ion at the corresponding position. Our chloride-free conditions allowed removing the chloride ion, but the bromide ion could not replace it. Apparently the ion binding pocket is highly specific for chloride. Discrimination might be

obtained by the Van-der-Waals radius of the ions, explaining that the larger bromide does not replace a chloride ion. A remarkable consequence of the unoccupied chloride pocket is the disappearance of the conserved water network, including the catalytic water molecule, in the close vicinity to the active site (**Figure 6A, B**). The absence of electron density that can be modelled as water molecules does not mean that no water molecules are present, but most probably that the water molecules are much more labile and have undefined positions. Consequently, the catalytic water orientation is not optimal and the enzyme less efficient. A somewhat similar role of a chloride ion, although much more direct, has been observed in the active site of some GH13 α -amylases. In these enzymes the chloride ion is directly involved in polarizing the hydrolytic water molecule and enhances the rate of the second step in the catalytic reaction [33-35].

The decrease of catalytic efficiency, provoked by the E310Q mutation, may be explained by a role of this residue in stabilizing tyrosine 341. Both in the native and complexed structures ([11, 12] and this study), Glu310 is involved (through the carboxylic group) in a hydrogen bond with the hydroxyl group of Y341. The side chain of this latter residue therefore has no conformational freedom. Changing Glu310 into a glutamine removes this hydrogen bond and the side chain of Y341 may be more flexible and therefore adapts better to the substrate in subsite +2. Through the higher flexibility, Y341 might bind tighter to the substrate, which would explain the decrease of the K_m value. In contrast, the decrease of k_{cat} would be the consequence of a bad positioning of the glycosidic bond and/or a diminished ability of the enzyme to slide along iota-carrageenan chain. Interestingly, E310 is absent in both CgiA2_Zg and CgiA3_Zg for which we speculate that they might not display a processive mode of action (see below). As already proposed by Michel et al [12], this residue, together with Y341 may represent key actors for the processive sliding along the substrate chain and therefore be determinant for the mode of action. Noteworthy, the single point mutation of one aromatic residue, responsible for tight binding of the substrate in the +1 sub-binding site in the processive chitinase led to an almost complete abolished processivity, while the enzymes stayed active on soluble substrates [36].

Another interesting feature encountered in the two new iota-carrageenase sequences in *Z. galactanivorans* is the absence of domain A in both enzymes (**Figure 3**). Michel et al. [12], have shown that domain A is involved in the formation of a tunnel, a movement and character that most probably confers the processive mode of action to the enzyme, the absence of this

domain in CgiA2 and CgiA3 therefore may confer a different mode of action to these enzymes. Thus we believe that the iotas of the type of CgiA2 and CgiA3 might display a non processive mode of action. Furthermore, in the case of CgiA3 type enzymes the absence of domain B (involved in substrate recognition and binding at subsite +1, +2 and +3) might lower the stretch of iota-carrageenan blocks necessary for the enzyme to be active, by reducing the numbers of sub-sites from 8 to 6 or less. Consequently, and in analogy to other complex polysaccharide degrading systems [37], we expect the three paralogous enzymes present in *Z. galactanivorans* to work in synergy to efficiently degrade iota-carrageenan in its solid state. A highly efficient degradation system would represent a net advantage for the bacteria when associated to carrageenophyte algae. However, at this stage the case of *Z. galactanivorans* having three paralogous GH82 enzymes still is unique.

The sequence of the iotase-like gene JCVI_PEP, identified in a metagenome data set taken in the ocean close to Fernandina Island [22], is not complete, but from the part of the identified sequence that is present, we can deduce that the enzyme is of type CgiA1. Overall, resulting from our data mining analysis, this type of iotase appears therefore to be the most common form. The complete genome sequencing of several more marine bacteria will be necessary to conclude on the frequency and occurrence of this type of enzymes in the marine environment. Furthermore, the production of recombinant protein of CgiA2 and CgiA3 from *Z. galactanivorans* in sufficient quantity and quality to perform further enzymatic and structural studies will provide us with more information about the variation of mode of action within GH82 enzymes. This work is currently ongoing.

Acknowledgments

This work was supported by the French region ‘Bretagne’ and the ‘Centre National de la Recherche Scientifique’ (CNRS). The fellowship of E.R. was jointly funded by the two listed parties.

References

- 1 Potin, P., Bouarab, K., Kupper, F. and Kloareg, B. (1999) Oligosaccharide recognition signals and defence reactions in marine plant-microbe interactions *Curr Opin Microbiol* 2, 276-83
- 2 Kloareg, B. and Quatrano, R. (1988) Structure of the cell walls of marine algae and ecophysiological functions of the matrix polysaccharides.

Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev. 26, 259-315

3 Rees, D. (1969) Structure, conformation, and mechanism in the formation of polysaccharide gels and networks Adv. Carbohydr. Chem. Biochem. 24, 267-332

4 de Ruiter, G. and Rudolph, B. (1997) Carrageenan biotechnology Trends in Food Science and Technology 8, 389-395

5 Carlucci, M., Pujol, C., Cancia, M., Nosedà, M., Matulewicz, M., Damonte, E. and Cerezo, A. (1997) Antiherpetic and anticoagulant properties of carrageenans from the red seaweed *Gigartina skottsbergii* and their cyclized derivatives: correlation between structure and biological activity International Journal of Biological Macromolecules 20, 97-105

6 Michel, G., Nyval-Collen, P., Barbeyron, T., Czjzek, M. and Helbert, W. (2006) Bioconversion of red seaweed galactans: a focus on bacterial agarases and carrageenases Applied Microbiology and Biotechnology 71, 23-33

7 Barbeyron, T., Henrissat, B. and Kloareg, B. (1994) The gene encoding the kappa-carrageenase of *Alteromonas carrageenovora* is related to beta-1,3-1,4-glucanases Gene 139, 105-109

8 Barbeyron, T., Michel, G., Potin, P., Henrissat, B. and Kloareg, B. (2000) Iota-carrageenases constitute a novel family of glycoside hydrolases, unrelated to that of kappa-carrageenases Journal of Biological Chemistry 275, 35499-35505

9 Colin, S. (2005), pp. 356, Université de Technologie de Compiègne, Compiègne

10 Greer, C. W. and Yaphe, W. (1984) Purification and properties of iota-carrageenase from a marine bacterium Canadian Journal of Microbiology 30, 1500-1506

11 Michel, G., Chantalat, L., Fanchon, E., Henrissat, B., Kloareg, B. and Dideberg, O. (2001) The iota-carrageenase of *Alteromonas fortis*. A beta-helix fold-containing enzyme for the degradation of a highly polyanionic polysaccharide Journal of Biological Chemistry 276, 40202-40209

12 Michel, G., Helbert, W., Kahn, R., Dideberg, O. and Kloareg, B. (2003) The structural bases of the processive degradation of iota-carrageenan, a main cell wall polysaccharide of red algae Journal of Molecular Biology 334, 421-433

13 Sinnott, M. L. (1990) Catalytic mechanisms of glycosyl transfer Chemical Reviews 90, 1171-1202

14 Studier, F. W. (2005) Protein production by auto-induction in high density shaking cultures Protein Expression and Purification 41, 207-234

15 Michel, G., Flament, D., Barbeyron, T., Vernet, T., Kloareg, B. and Dideberg, O. (2000) Expression, purification, crystallization and preliminary X-ray analysis of the iota-carrageenase from *Alteromonas fortis* Acta Crystallographica. Section D, Biological Crystallography 56, 766-768

16 Guibet, M., Boulenguer, P., Mazoyer, J., Kervarec, N., Antonopoulos, A., Lafosse, M. and Helbert, W. (2008) Composition and distribution of carrabiose moieties in hybrid kappa-/iota-carrageenans using carrageenases Biomacromolecules 9, 408-15

- 17 Kidby, D. K. and Davidson, D. J. (1973) A convenient ferricyanide estimation of reducing sugars in the nanomole range *Anal. Biochem.* 55, 321-325
- 18 Sheldrick, G. M. (2008) A short history of SHELX *Acta Crystallogr A* 64, 112-22
- 19 McCoy, A. J., Grosse-Kunstleve, R. W., Adams, P. D., Winn, M. D., Storoni, L. C. and Read, R. J. (2007) Phaser crystallographic software *J Appl Crystallogr* 40, 658-674
- 20 Collaborative Computational Project Number 4. (1994) The CCP4 suite: programs for protein crystallography *Acta Crystallographica. Section D, Biological Crystallography* 50, 760-763
- 21 Emsley, P. and Cowtan, K. (2004) Coot: model-building tools for molecular graphics *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 60, 2126-32
- 22 Rusch, D. B., Halpern, A. L., Sutton, G., Heidelberg, K. B., Williamson, S., Yooseph, S., Wu, D., Eisen, J. A., Hoffman, J. M., Remington, K., Beeson, K., Tran, B., Smith, H., Baden-Tillson, H., Stewart, C., Thorpe, J., Freeman, J., Andrews-Pfannkoch, C., Venter, J. E., Li, K., Kravitz, S., Heidelberg, J. F., Utterback, T., Rogers, Y. H., Falcon, L. I., Souza, V., Bonilla-Rosso, G., Eguiarte, L. E., Karl, D. M., Sathyendranath, S., Platt, T., Birmingham, E., Gallardo, V., Tamayo-Castillo, G., Ferrari, M. R., Strausberg, R. L., Neilson, K., Friedman, R., Frazier, M. and Venter, J. C. (2007) The Sorcerer II Global Ocean Sampling expedition: northwest Atlantic through eastern tropical Pacific *PLoS Biol* 5, e77
- 23 Corpet, F. (1988) Multiple sequence alignment with hierarchical clustering *Nucleic Acids Research* 16, 10881-10890
- 24 Gouet, P., Robert, X. and Courcelle, E. (2003) ESPript/ENDscript: Extracting and rendering sequence and 3D information from atomic structures of proteins *Nucleic Acids Res* 31, 3320-3
- 25 Burmeister, W. P., Cottaz, S., Rollin, P., Vasella, A. and Henrissat, B. J. B. C., 39385-39393. (2000) High resolution X-ray crystallography shows that ascorbate is a cofactor for myrosinase and substitutes for the function of the catalytic base. *J. Biol. Chem.* 275, 39385-39393
- 26 Gloster, T. M., Turkenburg, J. P., Potts, J. R., Henrissat, B. and Davies, G. J. (2008) Divergence of catalytic mechanism within a glycosidase family provides insight into evolution of carbohydrate metabolism by human gut flora *Chem Biol* 15, 1058-67
- 27 Michel, G., Chantalat, L., Duee, E., Barbeyron, T., Henrissat, B., Kloareg, B. and Dideberg, O. (2001) The kappa-carrageenase of *P. carrageenovora* features a tunnel-shaped active site: a novel insight in the evolution of Clan-B glycoside hydrolases *Structure* 9, 513-525
- 28 Kleywegt, G. J., Zou, J. Y., Divne, C., Davies, G. J., Sinning, I., Stahlberg, J., Reinikainen, T., Srisodsuk, M., Teeri, T. T. and Jones, T. A. (1997) The crystal structure of the catalytic core domain of endoglucanase I from *Trichoderma reesei* at 3.6 Å resolution, and a comparison with related enzymes *Journal of Molecular Biology* 272, 383-397
- 29 Lacombe-Harvey, M. E., Fukamizo, T., Gagnon, J., Ghinet, M. G.,

- Dennhart, N., Letzel, T. and Brzezinski, R. (2009) Accessory active site residues of *Streptomyces* sp. N174 chitosanase: variations on a common theme in the lysozyme superfamily *Febs J* 276, 857-69
- 30 Collins, T., De Vos, D., Hoyoux, A., Savvides, S. N., Gerday, C., Van Beeumen, J. and Feller, G. (2005) Study of the active site residues of a glycoside hydrolase family 8 xylanase *J Mol Biol* 354, 425-35
- 31 Kezuka, Y., Ohishi, M., Itoh, Y., Watanabe, J., Mitsutomi, M., Watanabe, T. and Nonaka, T. (2006) Structural studies of a two-domain chitinase from *Streptomyces griseus* HUT6037 *J Mol Biol* 358, 472-84
- 32 Hart, P. J., Pfluger, H. D., Monzingo, A. F., Hollis, T. and Robertus, J. D. (1995) The refined crystal structure of an endochitinase from *Hordeum vulgare* L. seeds at 1.8 Å resolution *J Mol Biol* 248, 402-13
- 33 Aghajari, N., Feller, G., Gerday, C. and Haser, R. (2002) Structural basis of alpha-amylase activation by chloride *Protein Sci* 11, 1435-41
- 34 Feller, G., Narinx, E., Arpigny, J. L., Aittaleb, M., Baise, E., Genicot, S. and Gerday, C. (1996) Enzymes from psychrophilic organisms *FEMS Microbiol. Rev.* 18, 189-202
- 35 Numao, S., Maurus, R., Sidhu, G., Wang, Y., Overall, C. M., Brayer, G. D. and Withers, S. G. (2002) Probing the role of the chloride ion in the mechanism of human pancreatic alpha-amylase *Biochemistry* 41, 215-25
- 36 Horn, S. J., Sikorski, P., Cederkvist, J. B., Vaaje-Kolstad, G., Sørli, M., Synstad, B., Vriend, G., Vårum, K. M. and Eijsink, V. G. H. (2006) Costs and benefits of processivity in enzymatic degradation of recalcitrant polysaccharides *Proc Natl Acad Sci U S A* 103
- 37 Teeri, T. T. (1997) Crystalline cellulose degradation: new insight into the function of cellobiohydrolases. *Trends Biotechnol.* 15, 160–167

Tables

Table 1. Oligonucleotides used to mutagenize the iota-carrageenase from *A. fortis*. In each case, the mutated nucleotides are highlighted in bold.

Mutant		Primers 5' --> 3'
E245Q	sense	GGAATTGCGTTACGGATGC AG ACTGACAACCTTACTTATG
	antisense	TAAGTAAGTTGTCAGT CTGC ATCCGTAACGCAATTCCGC
D247A	sense	GCGTTACGGATGGAAACT GCG AACCTTACTTATG
	antisense	CATAAGTAAGTT GCG CAGTTTCCATCCGTAACGC
E310Q	sense	GATAGTGGATTTGTCC AG CTCTTTAGCCCCGACAG
	antisense	CTGTCGGGCTAAAGAG CTG GACAAATCCACTATC
H281A	sense	GCGGCGGTCATGTTTGGCCC AGCT TTTATGAAGAATGG
	antisense	CCATTCTTCATAAA AGCT GGGCCAAACATGACCGCCGC
Q222E	sense	GTTGCGCTACGGCCTTATT GAA ACCTATGGCGCAGATA
	antisense	TATCTGCGCCATAGGTT TTCA ATAAGGCCGTAGCCGAAC
Q222K	sense	GTTGCGCTACGGCCTTATT AAA ACCTATGGCGCAGATA
	antisense	TATCTGCGCCATAGGTT TTTA AATAAGGCCGTAGCCGAAC

Table 2. Data collection and refinement statistics of the inhouse data set of CgiA1_Af without chloride.

Wavelength (Å)	1.5418
Space group	P2 ₁
Unit cell parameters (Å)	a=54.91, b=101.19, c=95.65; β =101.01°
Resolution range (Å)	68.83-2.48 (2.53-2.48)
No. of observations	250587 (3290)
No of. Unique reflections	34408 (1773)
Completeness (%)	92.1 (58.6)
Mean I/sigma(I)	14.3 (2.1)
Rmerge (%)	6.7 (37.9)
Redundancy	6.2 (2.2)
Refinement	
Resolution range	69.0 – 2.48
No of unique reflections	31339
R factor (R _{free} on 5%)	19.1 (26.0)
RMSD Bond lengths (Å)	0.015
RMSD Bond angles (°)	1.55
Mean overall B factor (Å ²)	20.26
Ramachan plot, most favoured region (%)	83.0
Ramachan plot, additional allowed region (%)	14.8

Table 3. Steady-state kinetic parameters for hydrolysis of hybrid carrageenan by recombinant wild-type and mutant iota-carrageenase from *Alteromonas fortis*. The experiments were carried out at five different substrate concentrations and the parameters were calculated using Hyper32.

Enzyme	K_m (mM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m	Relative efficiency
Wild-type	12.3	317.4	25804.9	100%
E245Q	NA	NA	NA	NA
D247A	NA	NA	NA	NA
E310Q	2.3	13	5652.2	22%
H281A	2.6	0.34	130.8	0.5%
Q222E	ND	ND	ND	ND
Q222K	NA	NA	NA	NA

Figure Legends

Figure 1. C-PAGE gels showing the degradation products of family GH82 iotases. **A)** Degradation products of crude extracts of *E.coli* strains expressing CgiA1_Zg (lane 1), CgiA2_Zg (lane 2) and CgiA3_Zg genes (lane 3). **B)** Degradation products of purified wild-type and mutant enzymes of CgiA1_Af. Lanes 1 to 5 show the wild-type and mutants E245Q, E247A, E310Q and H281A, respectively.

Figure 2. SDS-Page gel of purified mutant enzymes. **A)** Lanes 1 to 5 show the M_w markers, wild type CgiA1_Af, E245Q, 247A and E310Q respectively. **B)** Lane 1 shows M_w markers, lane 2 Q222K.

Figure 3. Multiple sequence alignment of all five members of GH82 iotase enzymes. The secondary structure elements above the sequences correspond to those observed in the crystal structure of CgiA1_Af. The different domains are coloured in blue (beta-helix core structure), red (domain A) and green (domain B), respectively. Pink stars below the sequences indicate the catalytic proton donor (E245), the general base (D247) and E310; the light blue circles below the sequences mark the disordered loop of domain A, while the green triangles mark

Q222 and H281. CgiA1_Fi designates the combined sequence of two peptides JCVI_gs031_1105100132297 and JCVI_gs031_1105100129569 that have been identified in the global ocean meta-genome data set [22].

Figure 4. Crystal structure of CgiA1_Af in absence of chloride ions. **A)** Ribbon representation of the beta-helical structure in blue, domains A and B are coloured in red and green respectively. **B)** Superimposition of the different structures of CgiA1_Af highlighting the mobility of domain A. Red: First crystal structure (1H80); blue: crystal structure of CgiA1_Af in complex with oligo-iotacarrageenan (1KTW); yellow: Molecule A of this crystal structure in absence of chloride ions.

Figure 5. Ribbon representation of the model obtained of CgiA1_Af showing the complete domain A in the presence of an iota-carrageenan chain spanning the entire active site cleft. Two well conserved arginine residues of domain A (R343 and R349) that are in positions to interact with the substrate molecule are highlighted.

Figure 6. A) Surface representation of CgiA1_Af (1H80) showing the network of conserved water molecules that fill the active site cleft [11]. **B)** Surface representation of CgiA1_Af in absence of chloride ions (this study) showing that most of the conserved waters are disordered or excluded at the active site.

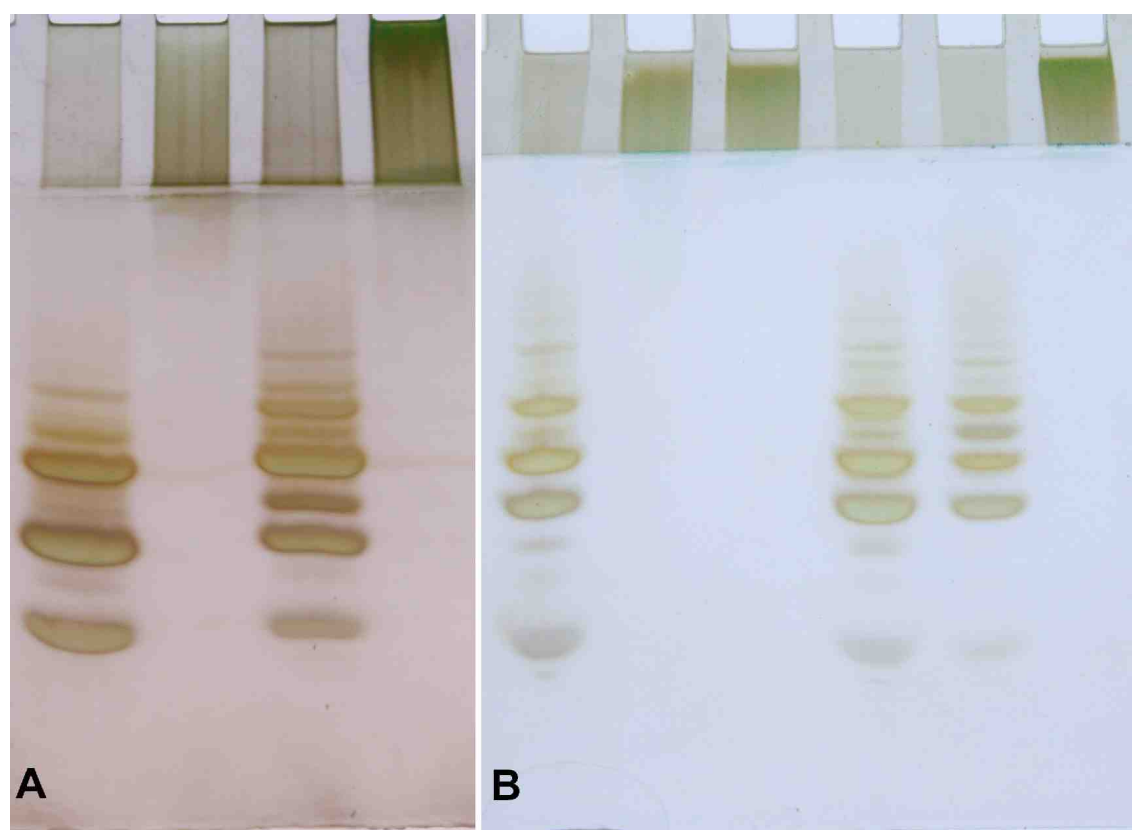


Figure 1

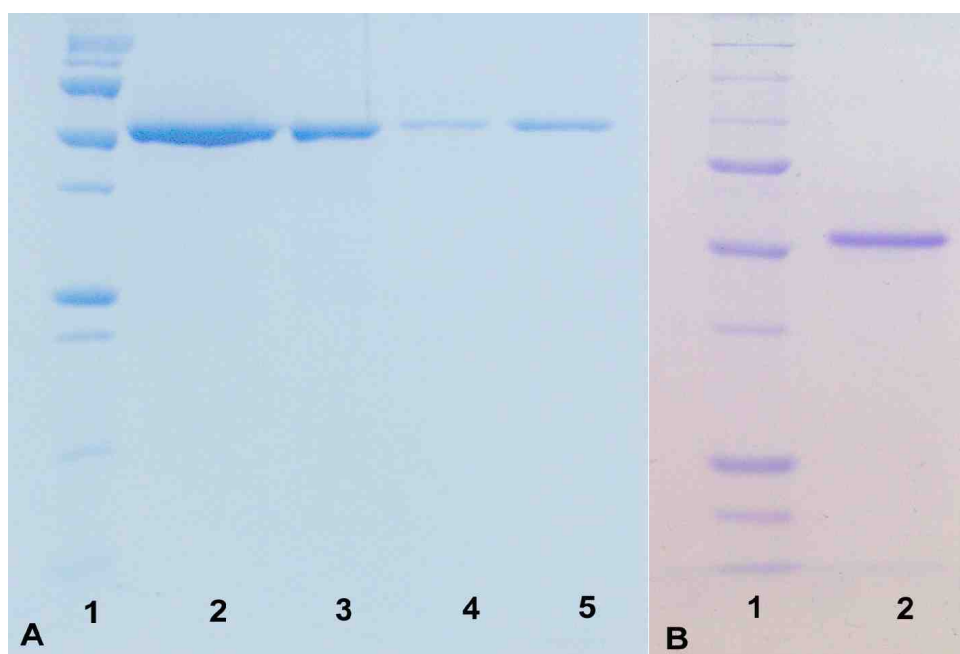


Figure 2

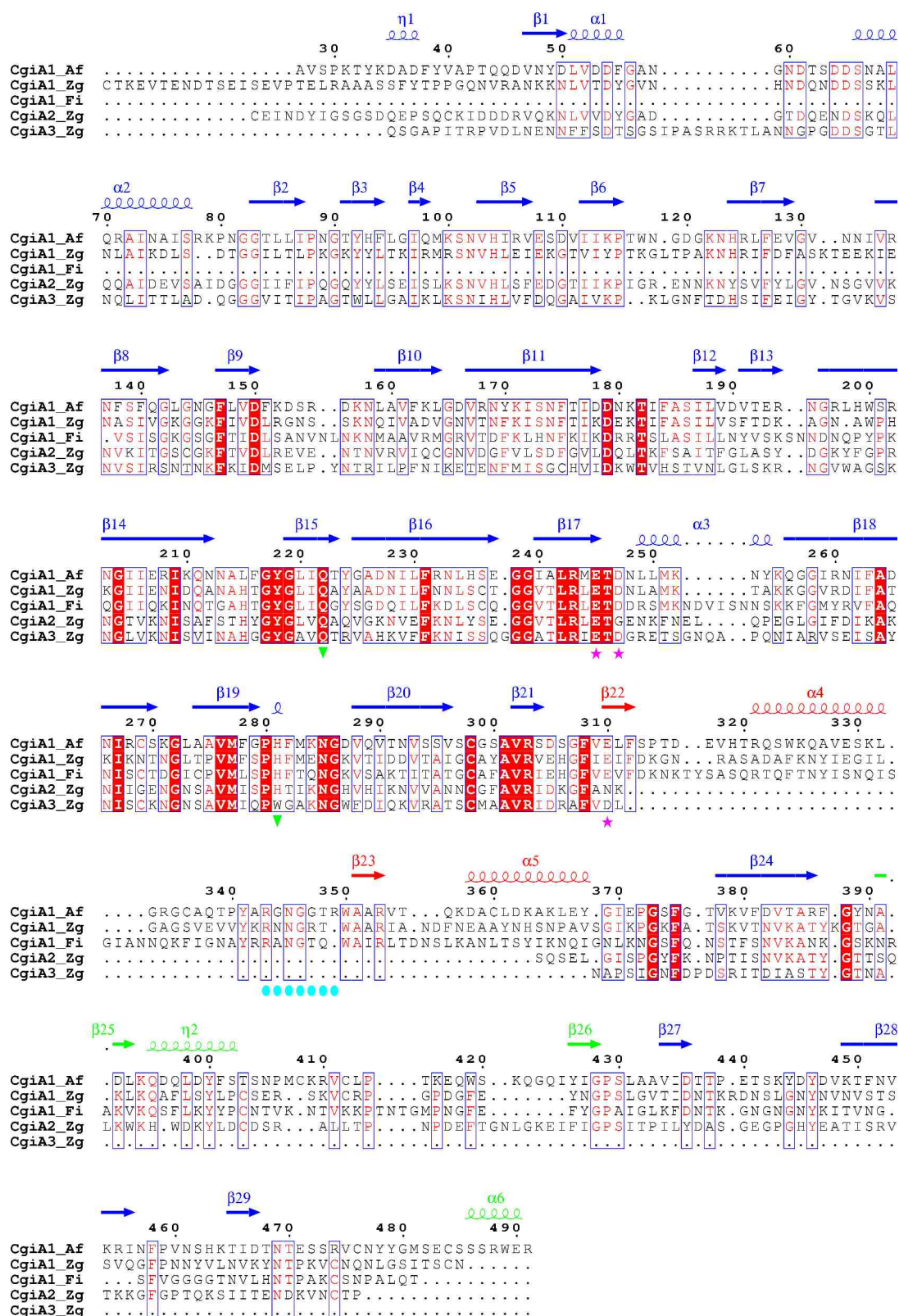


Figure 3

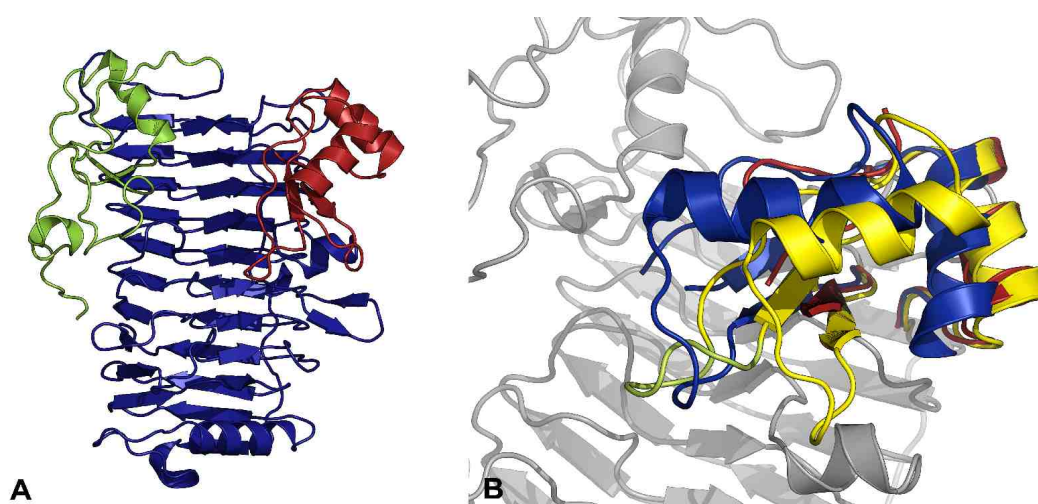


Figure 4

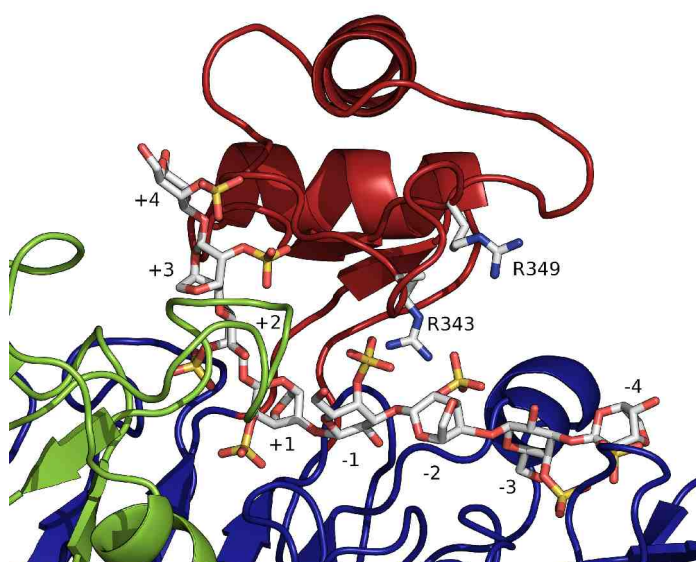


Figure 5

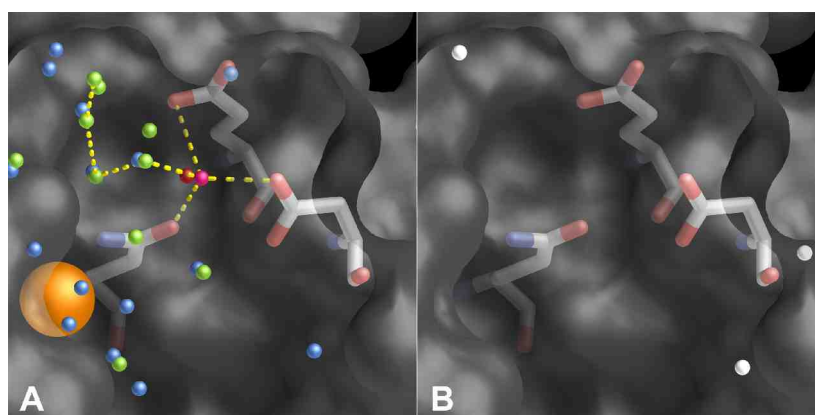


Figure 6

Chapitre II

*Identification et caractérisation d'une nouvelle
famille de glycoside hydrolases*

Chapitre II : Identification et caractérisation d'une nouvelle famille de glycoside hydrolases

I. Introduction

La découverte de nouvelles enzymes impliquées dans la dégradation de longues chaînes de polysaccharides ou de petits oligo-saccharides, est essentielle pour la compréhension d'une voie de dégradation dans son ensemble. En effet, la dégradation d'un polysaccharide complexe nécessite, pour le dégradeur, d'utiliser une batterie d'enzymes de spécificités différentes qui vont travailler de façon synergique afin de dégrader le substrat. Ce travail collaboratif est très bien connu et décrit en ce qui concerne l'hydrolyse de la cellulose. La cellulose est un homopolymère linéaire composé de sous unités D-glucose liées par des liaisons $\beta(1,4)$. Pour dégrader ce polysaccharide relativement simple mais insoluble, trois classes d'enzymes sont impliquées (Goyal et al., 1991; Rabinovich et al., 2002a; 2002b). Les cellulases qui attaquent, de façon endo, la fibre amorphe de cellulose et créent ainsi des sites d'hydrolyse accessibles aux cellobiohydrolases. Ces dernières retirent alors des monomères et des dimères à partir de l'extrémité de la fibre. Les cellobiohydrolases sont les composants majeurs du système de dégradation et représentent 40 à 70 % de la quantité totale d'hydrolases et sont capables d'hydrolyser la cellulose hautement cristalline (Esterbauer et al., 1991; Rowell, 1990). Enfin, les petits oligo-saccharides sont ensuite hydrolysés en glucose par des β -glucosidases.

En ce qui concerne les polysaccharides purement marins, l'état des connaissances est plus réduit. Ceci vient probablement du fait que, premièrement le milieu marin est moins étudié que le milieu terrestre. En effet, la cellulose est très étudiée du fait que ce polysaccharide est utilisé pour fabriquer du papier depuis l'antiquité. Deuxièmement, les polysaccharides marins étant plus divers et plus complexes, sont plus difficiles à étudier. L'agar est celui dont l'hydrolyse est la mieux décrite. Chez *Pseudomonas atlantica*, la fibre d'agar est dans un premier temps, dépolymérisée en tetra- et hexa-saccharides par des

β -agarases. Les β -agarases appartiennent aux familles 16, 50 et 86 des glycoside hydrolases. Ces tetra- et hexa-saccharides sont ensuite clivés en di-saccharides par une néoagarotetraose hydrolase (van der Meulen et al., 1974; Day and Yaphe, 1975; Vattuone et al., 1975; Jam et al., 2005) et les disaccharides clivés en oses simples par une α -galactosidase afin d'être utilisés comme source de carbone (Morrice et al., 1983b; 1983a). Chez *Vibrio spp.*, ces tetra- et hexa-néoagaroses sont hydrolysés par des α -L-galactosidases (Sugano et al., 1994).

Pour les autres polysaccharides marins, les connaissances concernant leur dégradation sont beaucoup plus limitées. Par exemple, pour les carraghénanes, seules trois enzymes sont connues. Il s'agit d'une $\beta(1,4)$ κ -carraghénase (GH 16) (Barbeyron et al., 1994), d'une $\beta(1,4)$ ι -carraghénase (GH 82) (Barbeyron et al., 2000) et d'une $\beta(1,4)$ λ -carraghénase (Colin et al., 2005). Ces trois enzymes génèrent respectivement des tetra- et di-saccharides, des hexa- et tetra-saccharides et enfin des tetra-saccharides. Le devenir de ces différents produits est pour le moment totalement inconnu. Or, ils doivent logiquement, être dépolymérisés et désulfatés avant d'être utilisés comme source de carbone. Toutes les enzymes qui effectuent ces étapes ne sont actuellement pas connues. Donc, pour comprendre l'intégralité d'une voie de dégradation du carraghénane, la recherche, l'identification et la caractérisation fine de nouvelles activités hydrolases sont indispensables.

Pour réaliser cette recherche, il est possible de purifier les enzymes à partir du milieu naturel c'est-à-dire à partir d'une culture bactérienne, de tissus cellulaires ou d'un champignon, etc... Les activités peuvent alors être identifiées et décrites. Cependant, pour approfondir l'étude des enzymes jusqu'aux étapes de caractérisation structurale et enzymatique, il faut pouvoir les produire en grande quantité et passer par le clonage des gènes d'intérêts. Il existe, Pour cela, deux approches.

La première consiste à identifier un être vivant (bactéries, champignon, ...) ou un tissu dans lequel les activités à caractériser, sont présentes. Il faut ensuite générer une banque d'ADNc si les activités sont identifiées chez un eucaryote, ou pour les procaryotes, fragmenter le génome en morceau d'environ 10 kb et les insérer dans un plasmide d'expression. L'ensemble des clones est ensuite testé pour les activités recherchées. Il est ensuite possible de séquencer le plasmide du clone qui exprime l'enzyme que d'intérêt et ainsi obtenir la séquence de son gène. La seconde approche peut être utilisée s'il existe des données génomiques sur l'organisme

dans lequel on a identifié l'activité recherchée. Pour cela, l'enzyme purifiée, est séquencée en partie. A partir de cette séquence protéique, le gène correspondant est alors trouvé dans le génome. Mais quelle que soit l'approche la dernière étape consiste à cloner le gène dans un système de surexpression hétérologue qui peut-être bactérien (*Escherichia coli*), fongique (levure) ou en cellules d'insecte.

Néanmoins, ces deux approches peuvent être longues et nécessitent d'avoir un test d'activité relativement simple, afin d'identifier, parmi les clones, celui ou ceux qui possèdent l'activité recherchée. Ce qui a été le cas, par exemple, de la ι -carraghénase d'“*Alteromonas fortis*” dont l'activité a été décrite en 1984 par Greer. En effet, le gène correspondant a été cloné par Barbeyron et al. en 2000 à partir d'une banque d'environ 6000 clones testés pour leur capacité à dégrader un gel de ι -carraghénane. La structure cristallographique a été résolue en 2001 par Michel. L'identification et le rôle des résidus catalytiques étaient le sujet du premier chapitre de cette thèse. Il a donc fallu 25 ans pour passer de l'identification d'une activité ι -carraghénane hydrolase à la caractérisation complète de l'enzyme.

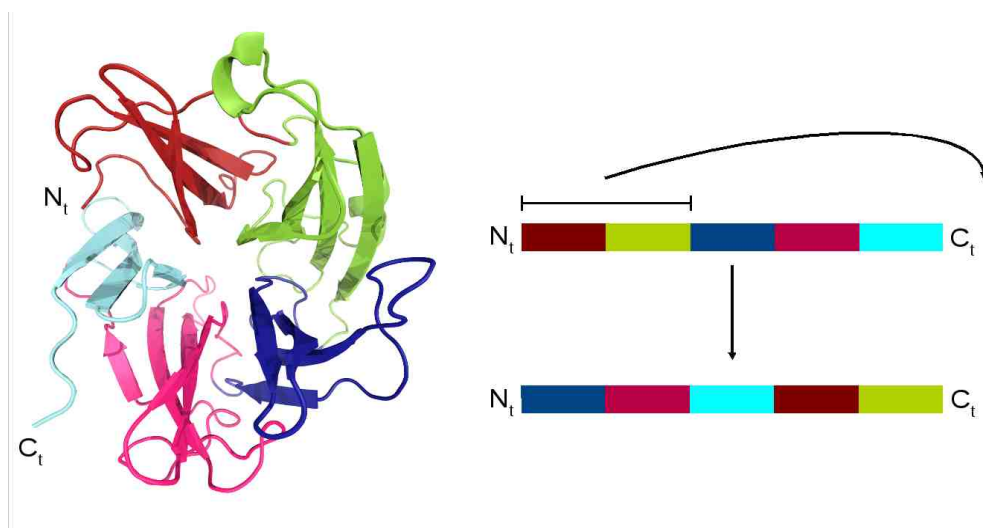
De nos jours, l'identification de nouvelles activités glycoside hydrolases peut être menée dans le sens inverse, c'est-à-dire qu'on identifie dans un génome un gène qui a des ressemblances plus ou moins fortes avec d'autres glycoside hydrolases et l'on cherche à caractériser l'enzyme codée par ce gène. Par exemple, dans le génome de *Zobellia galactanivorans*, un gène relativement proche de ceux qui codent pour des β -agarases de la famille 16 a été identifié. Ce gène a été cloné et l'enzyme surexprimée. Les études enzymologiques ont montrées que cette enzyme n'était pas une β -agarase mais une β -porphyranase (Hehemann, 2009). Le clonage et la caractérisation enzymologique et structurale de cette nouvelle fonction, jusque là inconnue, a été réalisée en moins de deux ans. Ceci montre à quelle vitesse il est possible d'identifier de nouvelles fonctions glycoside hydrolases quand les données génomiques existent et qu'une nouvelle fonction est soupçonnée par analyse bioinformatique. Même si, dans ce cas, l'identification du substrat a pu être fortement guidé par la ressemblance avec les β -agarases.

La même démarche peut être appliquée sur des enzymes qui sont beaucoup plus éloignées de séquences déjà décrites. Et c'est par cette approche que nous nous sommes intéressés aux enzymes, Zg-3597 et Zg-4663, dont traite ce chapitre.

II. Résultats

II.A. Analyse bio-informatique

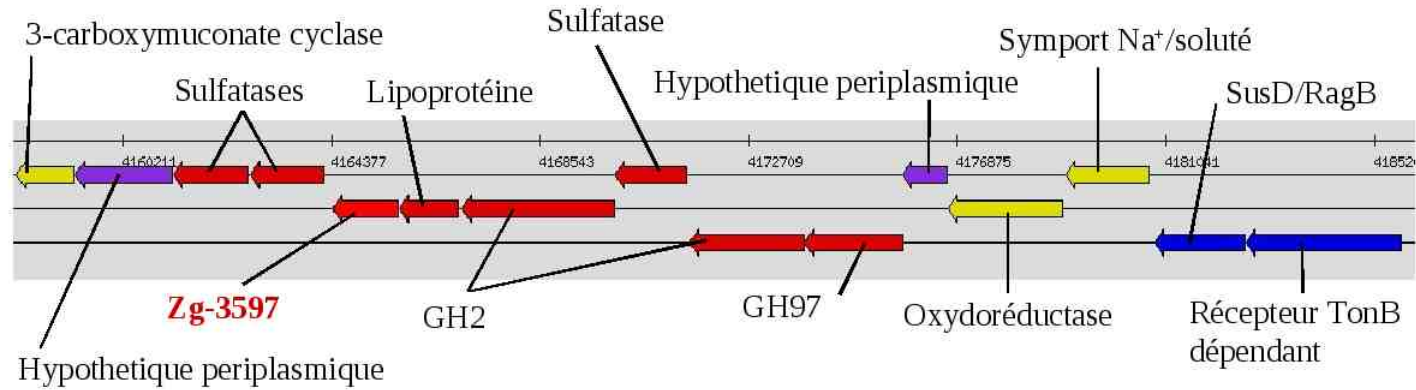
Au cours de l'annotation du génome de *Z. galactanivorans* (Barbeyron et al. en préparation), un groupe de cinq protéines a été annoté comme étant de potentielles glycoside hydrolases. Ces protéines, similaires entre elles, n'ont pu être alignées avec une séquence de protéine déjà décrite. Néanmoins, ces séquences présentent de très faibles similarités avec les familles GH 32 et 43, et ce, sur une longueur de séquence limitée. Les familles 32 et 43 ont un repliement de type "β-propeller". Ce type de structures fait penser à une hélice de bateau dans laquelle un feuillet β forme une pale. Ici, l'hélice est formée de cinq pales. La particularité des enzymes de *Z. galactanivorans* est une permutation dans la séquence. C'est-à-dire qu'une partie de la séquence, normalement en N-terminale dans la famille GH 43, se retrouve ici en partie C-terminale. La structure tridimensionnelle générale ne devrait être que très peu affectée (Figure III_1). En revanche, la structure du site actif pourrait être totalement bouleversée.



*Figure III_1 : Schéma explicatif de la permutation circulaire observée dans les cinq potentielles GH identifiées chez *Z. galactanivorans*.*

Dans le but de caractériser ces nouvelles protéines, nous nous sommes intéressés à deux membres parmi les cinq. Les deux séquences choisies sont codées par les gènes *zg-3597* et *zg-4663*. Ces deux gènes sont trouvés au sein d'opérons potentiels qui contiennent chacun un récepteur TonB-dépendant, un système SusD/RagB, des sulfatases et des glycoside hydrolases. Ces groupes de gènes pourraient donc coder des systèmes complets de détection, de dégradation et d'importation de polysaccharides sulfatés. Les glycoside hydrolases présentes dans l'opéron potentiel qui contient le gène *zg-3597* sont deux β -galactosidases (GH 2) et une α -galactosidase (GH 97) (Figure III_2A). Le groupe de gène contenant *zg-4663* ne possède qu'une seule GH de la famille 2, dont la fonction n'est pas définie, mais ce groupe contient plusieurs enzymes impliquées dans le métabolisme du galactose (Figure III_2B). De par leur faible similarité avec les GH 32 et 43 ainsi que leurs présences dans des opérons putatifs de dégradation de polysaccharides, nous pensons que ces enzymes pourraient former une nouvelle famille de glycoside hydrolases. D'un point de vue structurale, l'analyse des diagrammes HCA montre la présence de nombreux brins β (Figure III_3). Cette observation tend à confirmer le repliement de type β -propeller. Par contre, Zg-3597 possède environ 30 acides aminés de plus que Zg-4663. Ces résidus se trouvent en C-terminale et semblent être structurés.

A



B

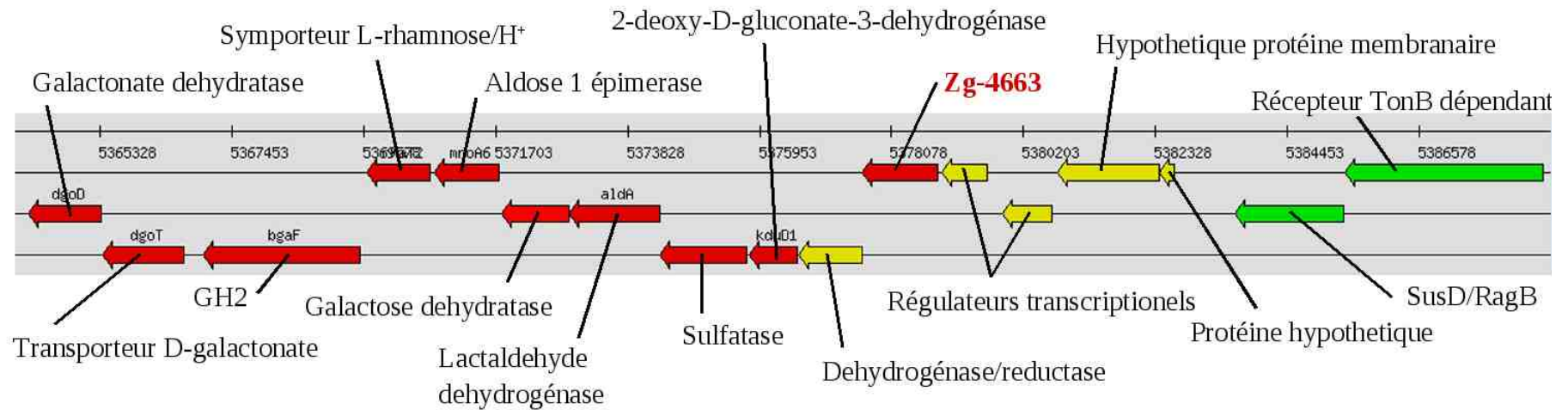


Figure III 2: Environnements génomiques des gènes *zg-3597* (A) et *zg-4663* (B).

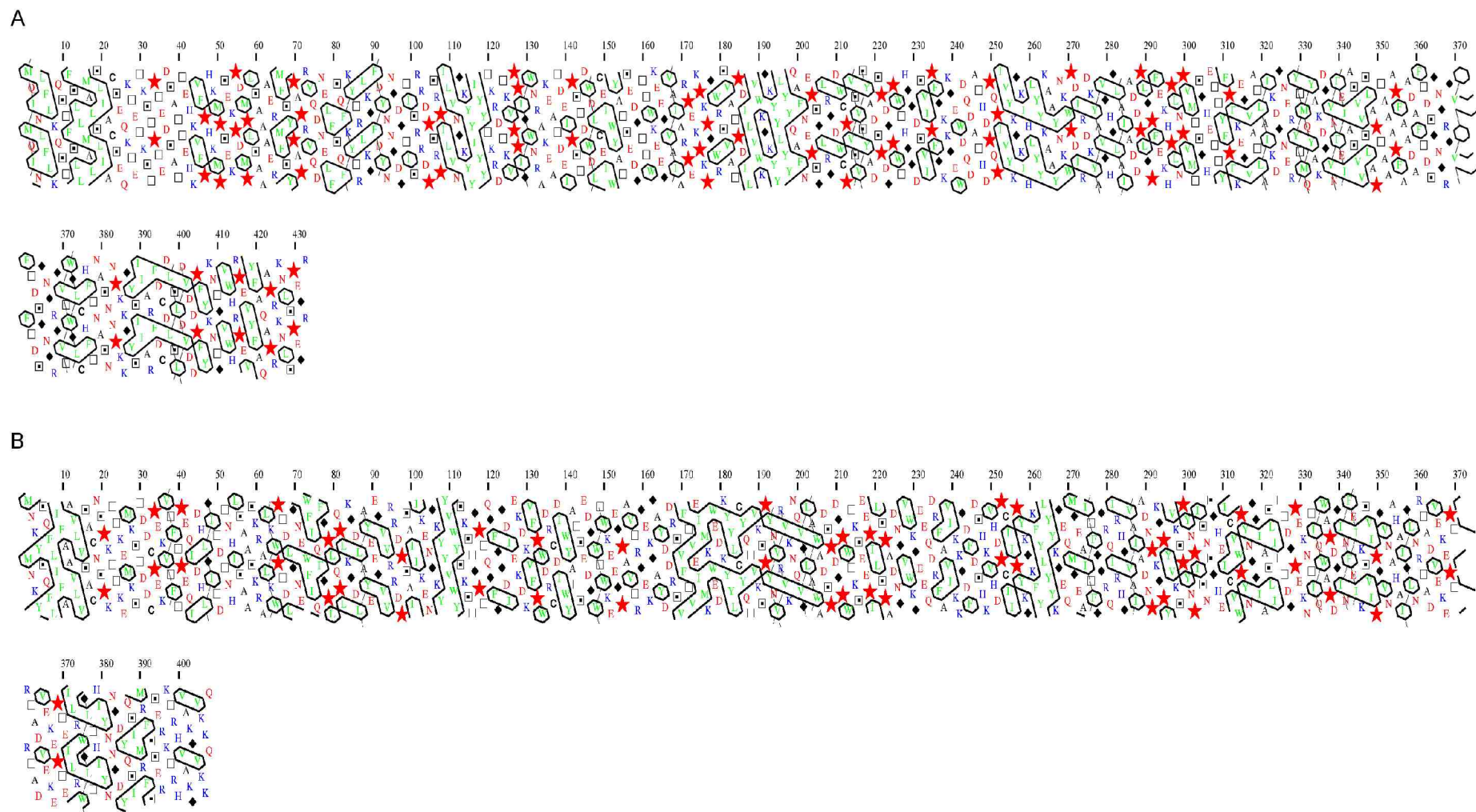


Figure III_3: Diagrammes HCA des protéines Zg-3597 (A) et Zg-4663 (B). ★ : Proline. □ : Thréonine. ◻ : Serine. ◆ : Glycine.

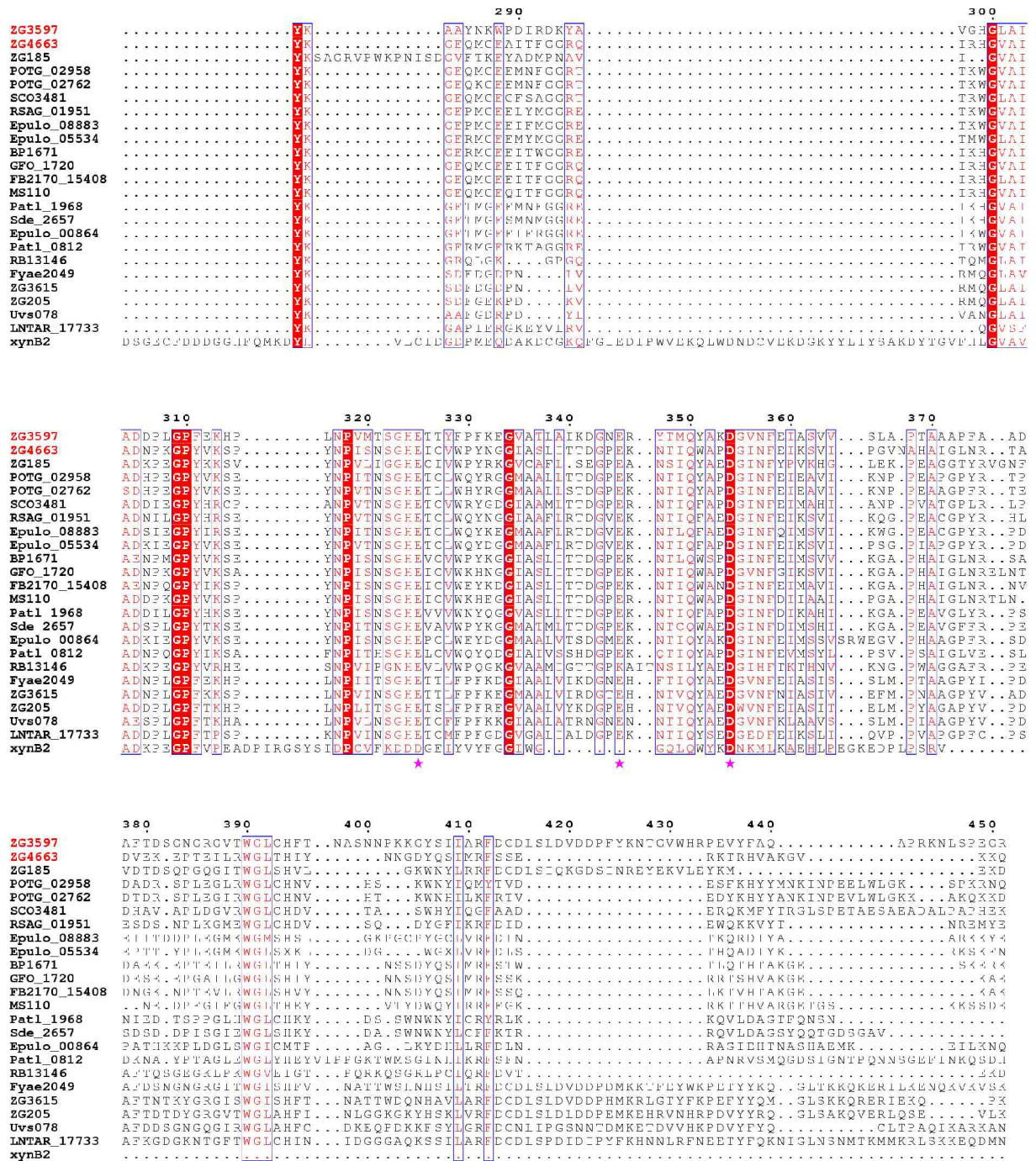


Figure III_4 : Alignement multiple des cinq séquences de *Z. galactanivorans* et des orthologues. Les ★ représentent les résidus catalytiques putatifs.

Dans le but d'obtenir de grandes quantités de protéine pour réaliser une caractérisation biochimique et structurale de ces nouvelles enzymes, nous avons cloné leurs gènes dans un plasmide de surexpression. L'intérêt de travailler sur deux enzymes similaires est que cela permet de multiplier les chances d'identifier un substrat pour cette nouvelle famille de GH. La probabilité de résoudre une structure cristallographique d'un membre de cette nouvelle famille de GH est également augmentée.

II.B. La protéine Zg-3597

II.B.1. Purification

Il est très important de purifier l'enzyme après l'étape de surexpression pour deux raisons. La première est qu'il faut se débarrasser des enzymes de *E. coli* qui pourraient donner des faux positifs lors des tests d'activité. La seconde est que les études structurales en diffusion de rayons X aux petits angles ainsi que la cristallographie nécessitent des échantillons purs et mono-disperses. La protéine Zg-3597 a été obtenue relativement pure (9 mL à 6 mg.mL⁻¹) après la première étape de chromatographie par affinité sur colonne de sepharose chargée avec du nickel (Figure III_5 A et B). Pour augmenter le degré de pureté de l'échantillon une seconde chromatographie par exclusion de taille a été réalisée. Cette seconde étape a révélé la présence de 2 formes multimériques correspondant au pic 1 et 2 sur la figure III_5 C. L'estimation des masses moléculaires par cette technique montre que le pic 1 serait vraisemblablement un dimère (97 kDa) et que le pic 2 serait un tétramère (194 kDa). Ces deux formes multimériques ont été isolées et concentrées à 12,0 mg.mL⁻¹ et 8,8 mg.mL⁻¹ pour respectivement, le pic 1 et le pic 2.

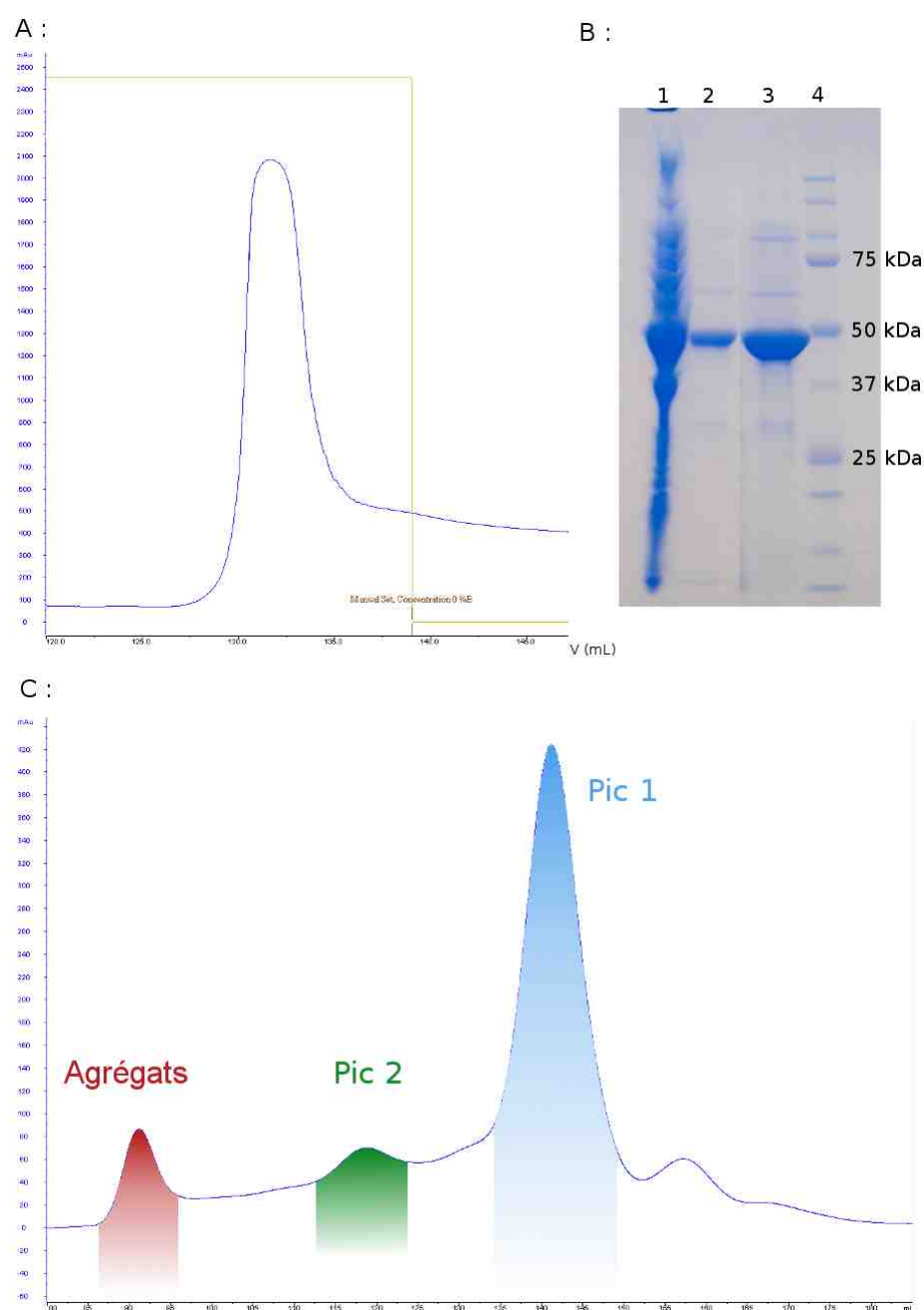


Figure III 5 : Purification de Zg-3597. A : Profil d'élution de la protéine Zg-3597 sur colonne d'affinité au nickel. B : Gel SDS-PAGE de l'extrait soluble (1), du lavage de la colonne (2) et du pic d'élution (3). C : Profil d'élution de la purification par exclusion de taille après deux colonnes Superdex 200.

II.B.2. Diffusion de rayons X aux petits angles

Le comportement de la protéine en solution ainsi que les difficultés rencontrées pour la cristalliser, nous ont amenés à utiliser une méthode structurale complémentaire et d'enregistrer des données de diffusion de rayons X aux petits angles (SAXS) pour cette protéine. En effet, en l'absence de cristaux, les données de SAXS nous ont permis d'obtenir des informations concernant la taille et la forme des objets en solution. Ainsi, j'ai pu obtenir un rayon de giration et une estimation indépendante de la masse moléculaire des deux différentes formes multimériques, observées en chromatographie d'exclusion de taille (Figure III_6).

Pour ce qui est de la forme qui correspond au pic 2, les résultats obtenus par SAXS sont relativement variables d'une concentration à l'autre (Figure III_6, Pic 2). L'estimation de la masse moléculaire, obtenue par cette technique indique que l'enzyme serait sous une forme dimérique (118 KDa à 2,11 mg.mL⁻¹) ou trimérique (131 KDa à 8,78 mg.mL⁻¹). Le simple fait d'avoir des différences significatives pour cette valeur, montre qu'il s'agit d'un mélange de formes. Ces résultats ne sont donc pas en accord avec ceux obtenus par chromatographie d'exclusion de taille, puisque cette forme a une masse plus faible que celle observée en chromatographie d'exclusion de taille. La représentation de Kratky des données obtenues pour cette forme à la concentration de 8,78 mg.ml⁻¹ (Figure III_7 courbe verte), donne une courbe qui atteint un plateau qui est typique d'une protéine dépliée / dénaturée.

En ce qui concerne l'échantillon du pic 1 (Figure III_6, Pic 1), ces premiers résultats obtenus à partir des données SAXS montre que la protéine est sous une forme dimérique, comme cela avait été estimé par chromatographie d'exclusion de taille. De plus, en traçant le graphique de Kratky (Figure III_7 courbe bleu), à partir des données SAXS à 4,8 mg.mL⁻¹, nous obtenons une gaussienne qui montre que la protéine est bien compacte, donc vraisemblablement correctement repliée.

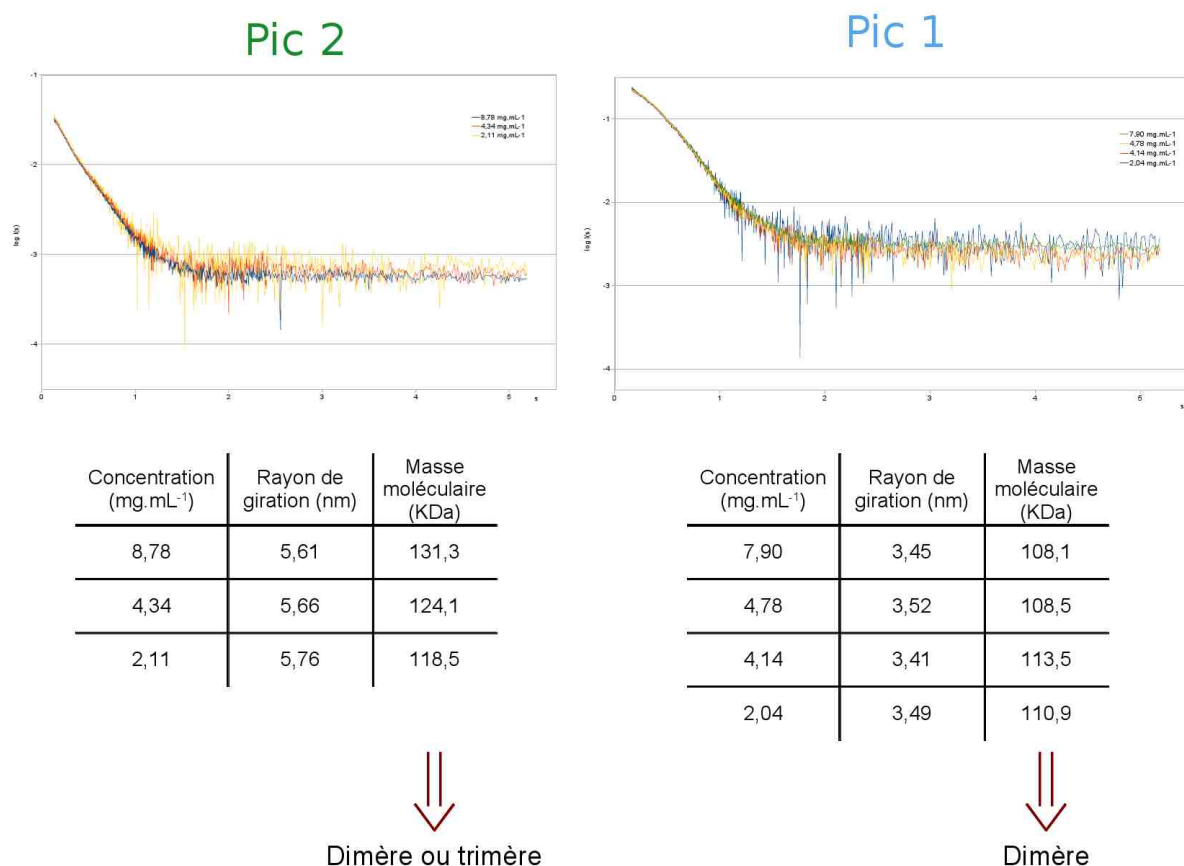


Figure III 6 : Courbes de diffusion des rayons X aux petits angles et approximation du rayon de giration et de la masse moléculaire de la protéine Zg-3597 sous deux formes multimériques. La colonne de gauche représente les données obtenues pour la forme de plus haut poids moléculaire. La colonne de droite présente les données pour la forme dimérique.

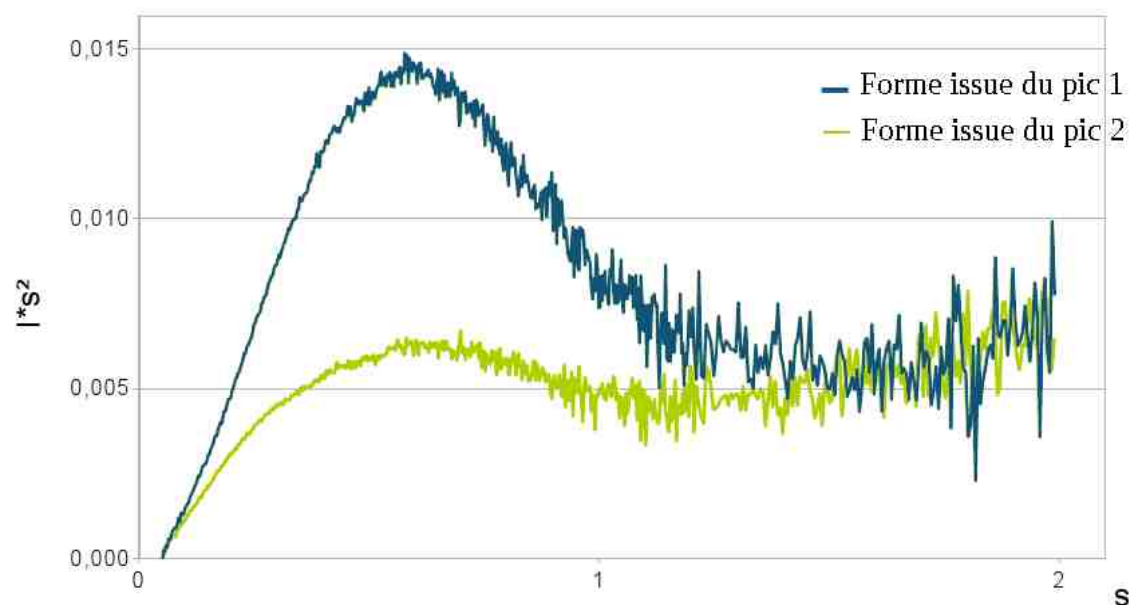


Figure III_7 : Graphique de Kratky obtenu à partir des données de diffusion de rayons aux petits angles de la protéine Zg-3597, pour la forme issue du pic 1 concentrée à $4,78 \text{ mg.mL}^{-1}$ (bleu) et pour la forme issue du pic 2 concentrée à $8,78 \text{ mg.mL}^{-1}$ (vert).

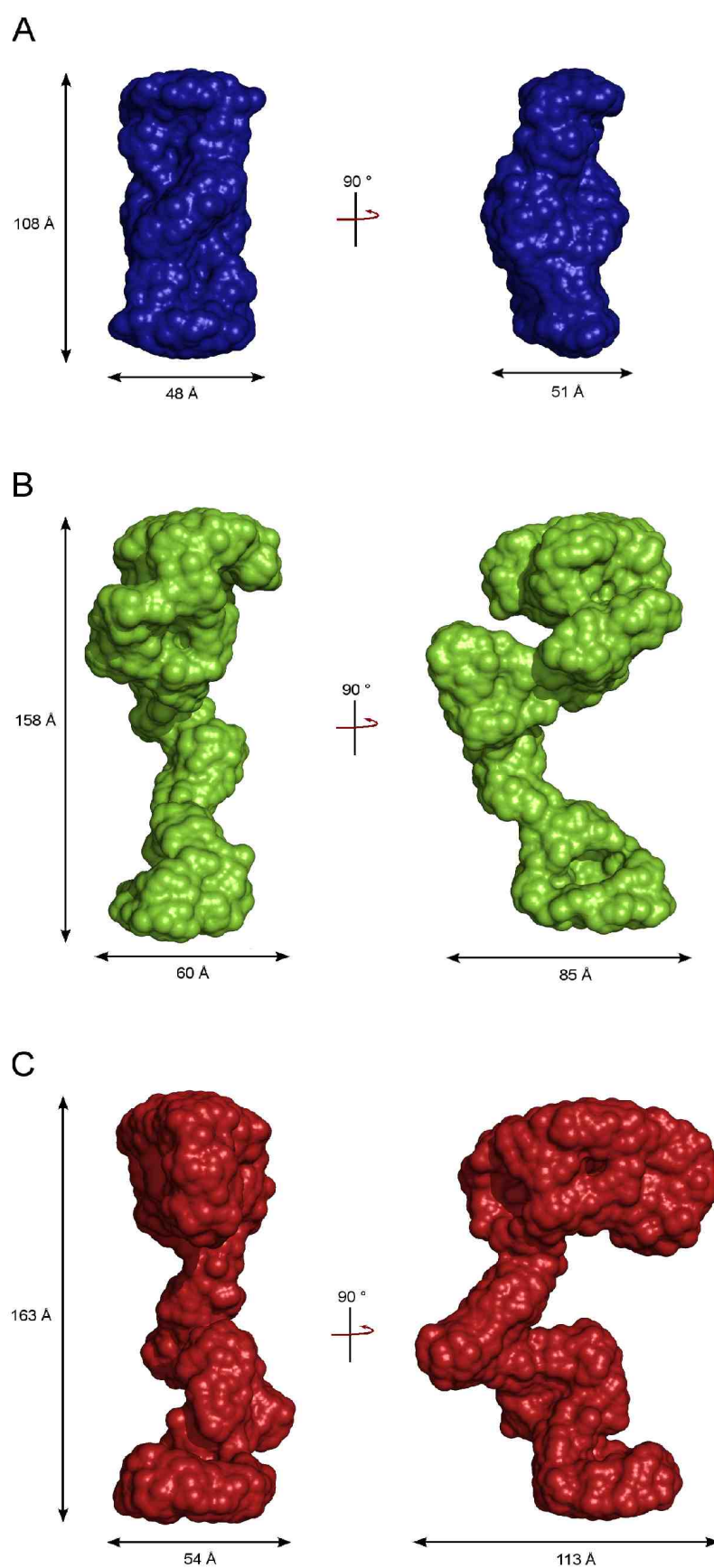
II.B.3. Structure à basse résolution

Les données SAXS ont été utilisées afin de déterminer la structure à basse résolution du dimère. La structure, ainsi obtenue à partir de la courbe de diffusion de la protéine dimérique à $4,78 \text{ mg.mL}^{-1}$, est cohérente avec une structure de protéine correctement repliée (Figure III_8 A).

J'ai également cherché à déterminer des enveloppes pour la forme issue du pic 2. Pour cela, j'ai utilisé la courbe de diffusion de la protéine concentrée à $4,31 \text{ mg.mL}^{-1}$ et recherché des objets de taille supérieure à un dimère du fait que cette forme semble être de masse supérieure. C'est pourquoi ont été recherchés un trimère (Figure III_8 B) ou un tétramère (Figure III_8 C). Les structures obtenues sont totalement incohérentes avec une structure de protéine repliée. En effet, les enveloppes sont relativement allongées et celles-ci contiennent des parties linéaires et d'autres plus compactes. Les enveloppes obtenues suggèrent que la protéine n'est pas repliée, ou seulement partiellement.

Les résultats obtenus par SAXS, montrent donc bien que la forme majoritaire (Pic 1) de la protéine Zg-3597 est dimérique et repliée, alors que la forme issue du pic 2 n'est en fait qu'une forme agrégée soluble constituée par des parties compactes et des parties linéaires.

⇒ Figure III_8: Structures à basse résolution obtenues avec le programme GASBOR à partir des données de diffusion de rayons X aux petits angles. L'enveloppe du dimère (A) a été obtenue en utilisant la courbe de diffusion de la protéine Zg-3597 sous forme dimérique à $4,78 \text{ mg.mL}^{-1}$ et en utilisant 866 résidus. Les enveloppes B et C ont été obtenues en utilisant la courbe de diffusion de la protéine Zg-3597 sous la forme de plus haut poids moléculaire à $4,34 \text{ mg.mL}^{-1}$ ainsi que 1299 et 1732 pour respectivement B et C.



II.B.4. Modélisation

Afin de savoir si la structure du dimère, à basse résolution, était compatible avec un repliement de type " β -propeller", j'ai cherché à placer manuellement, dans cette enveloppe, une protéine possédant ce type de repliement l'arabinase de *Bascillus subtilis* (GH 43). Les deux copies du " β -propeller" à cinq pales de cette protéine, remplissent très bien les deux extrémités de la structure (Figure III_9). Les deux " β -propeller" sont orientés selon un axe décalé d'environ 45° . Le dimère d'arabinase placé dans l'enveloppe, a une masse moléculaire de 68 kDa, alors qu'un dimère de la protéine Zg-3597 a une masse moléculaire de 97 kDa. Le dimère d'arabinase ne représente donc que les deux tiers du dimère de Zg-3597 d'où la présence d'un espace vide entre les deux copies du " β -propeller" placées dans l'enveloppe (Figure III_9). Cet espace correspondrait à la zone d'interaction entre les deux monomères.

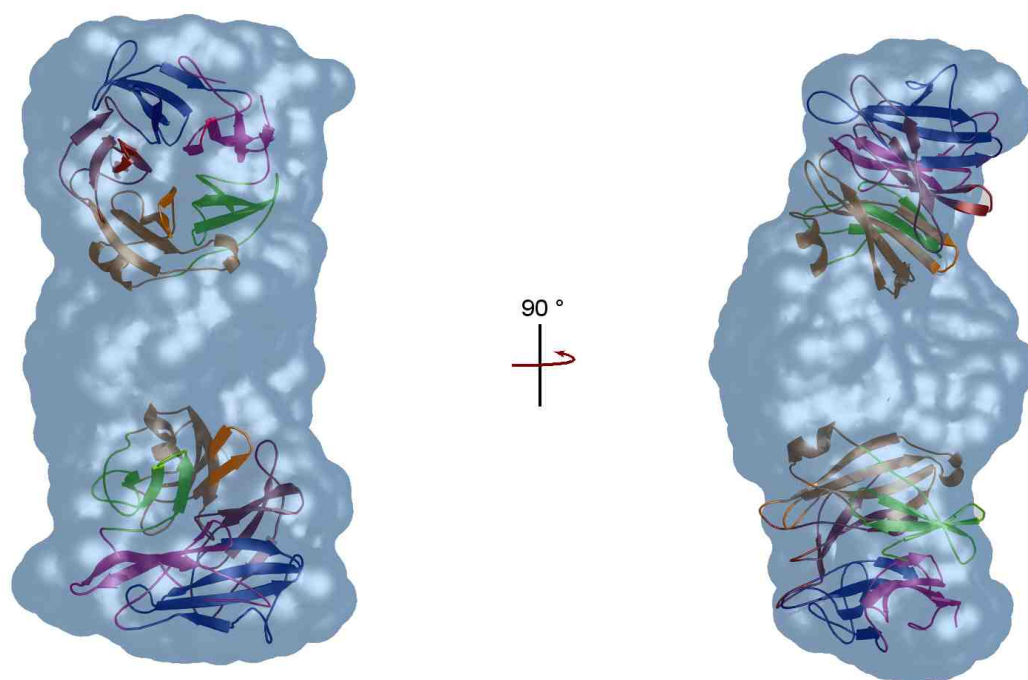


Figure III_9 : Modélisation de la structure de la protéine Zg-3597. Deux copies de l'arabinase (code PDB : 1UV4) ont été manuellement placées dans l'enveloppe calculée pour le dimère de la protéine Zg-3597.

II.B.5. Cristallogénèse

Après plus d'un an et demi, nous avons obtenu les premiers cristaux. Dans un premier temps, trois conditions de cristallisation ont été identifiées en utilisant des cribles commerciaux, dispensées avec un robot "nano-gouttes" (Figure III_10 A et B). La condition de cristallisation optimisée est constitué de 20 % PEG 3350 et 200 mM d'acétate de calcium. Pour accélérer la cinétique d'équilibration et de cristallisation, le volume du réservoir a été réduit à 50 μ L. Dans ce cas les cristaux apparaissent en 10 jours (Figure III_10 C).

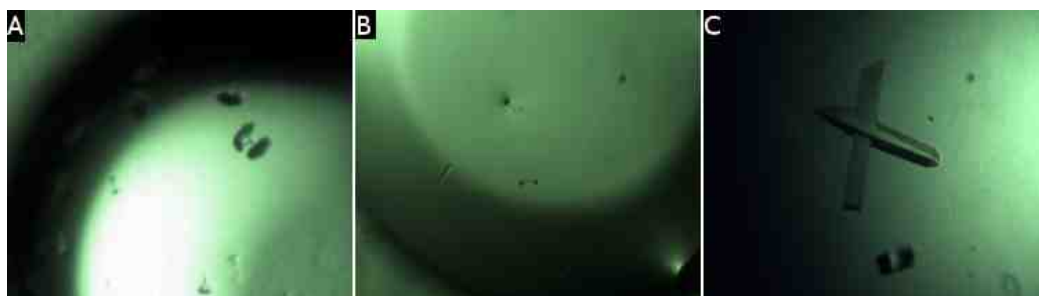


Figure III_10: Cristaux de la protéine Zg-3597. A et B : Cristaux obtenus via les criblages robotisés. C : Cristaux typiques de la protéine Zg-3597 utilisés pour l'enregistrement des données de diffraction de rayons X.

II.B.6. Cristallographie

Je visais une étude structure/fonction de cette protéine nouvelle et la détermination structurale par cristallographie était donc un but majeur. Ayant le protocole de la production recombinante de la protéine ainsi que des premiers cristaux, j'ai d'abord envisagé de faire la résolution structurale en utilisant la protéine recombinante marquée à la sélénométhionine. En utilisant le milieu de culture PASM 5052 (Studer, 2005), j'ai obtenu une protéine marquée, cependant la solubilité était fortement réduite et la protéine a précipité lorsque j'ai cherché à la concentrer. Pour cette raison, j'ai essayé la méthode basée sur des dérivées d'atomes lourds introduits au sein du cristal par trempage.

Les cristaux de protéine obtenus ont été utilisés pour l'enregistrement de données de diffraction de rayons X sous la forme native ainsi qu'en complexe avec différents atomes

lourds. L'ensemble des statistiques des différents jeux de données sont rassemblés dans le tableau III_1. Les différents cristaux sont fortement polymorphes. L'ajout de ligands (atome lourd, hexa iota-carraghénane) semble avoir une forte influence sur l'empilement cristallin et au minimum, seuls les paramètres de mailles sont affectés (en présence d'erbium). Pour les autres cristaux, le groupe d'espace avait complètement changé. Ce manque d'isomorphisme rendait la résolution structurale de cette protéine extrêmement complexe et j'ai décidé de me concentrer, en ce qui concerne la détermination structurale, sur la protéine homologue Zg-4663.

	Natif	Erbium	Europium	Hexa iota
Source	ESRF ID23-EH1	ESRF ID23-EH1	ESRF ID23-EH1	ESRF ID23-EH1
Longueur d'onde (Å)	0,9794	0,8994	0,8996	0,9790
Groupe d'espace	P 4 ₂ 2 ₁ 2	P 4 ₂ 2 ₁ 2	C 2 2 2	F 2 2 2
Paramètres de maille	a = 226,81 ; b = 226,81 ; c = 94,57 $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$	a = 159,01 ; b = 159,01 ; c = 187,89 $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$	a = 187,13 ; b = 222,65 ; c = 224,46 $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$	a = 186,58 ; b = 223,83 ; c = 226,02 $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$
Résolution (Å)	20 – 2,8 (2,87 – 2,8)	20 – 2,9 (2,98 – 2,9)	20 – 2,78 (2,85 – 2,78)	48,33 – 2,50 (2,56 – 2,5)
Nombre de réflexions / uniques	293837 / 21882	366004 / 28092	382506 / 28773	364990 / 80314
Complétude (%)	99,5 (99,7)	97,9 (98,9)	97,2 (98,8)	98,9 (99,7)
Multiplécité	4,83 (4,93)	3,67 (3,76)	1,73 (1,72)	4,54 (4,58)
I / σ	21,51 (3,43)	10,90 (2,94)	9,29 (1,94)	21,11 (3,79)
R_{sym}	5,5 (50,0)	8,5 (47,5)	6,1 (42,9)	4,7 (38,9)
Nombre de molécules dans l'unité asymétrique	6	6	6	6

Tableau III_1 : Statistiques des données de diffraction de rayons X des cristaux natifs et complexés de l'enzyme Zg-3597.

II.B.7. Stabilité en fonction de la température

Avant d'effectuer les tests d'activité, l'étude de la stabilité de la protéine en fonction de la température a été réalisée. Pour cela, le rayon hydrodynamique de la protéine à température croissante a été suivi en diffusion dynamique de lumière (DLS). De même, la stabilité de l'enzyme dans le temps, à différentes températures, a été étudiée. Les courbes obtenues montrent que la température de dénaturation de l'enzyme se situe entre 35 et 40 °C (Figure

III_11 A). Néanmoins, la stabilité de l'enzyme à 30 °C est relativement faible. La Figure III_11 B qui représente le rayon hydrodynamique en fonction du temps et à température constante montre que l'enzyme est stable pendant 24 heures à 15, 20 °C et 25 °C. Par contre à 30 °C, la protéine se dénature assez rapidement et en 8 heures l'intégralité de l'échantillon est dénaturé. Cela montre qu'à partir d'une température d'environ 30 °C, la protéine devient relativement instable. Par conséquent les tests d'activité ne peuvent être effectués à des températures supérieures à 30 °C.

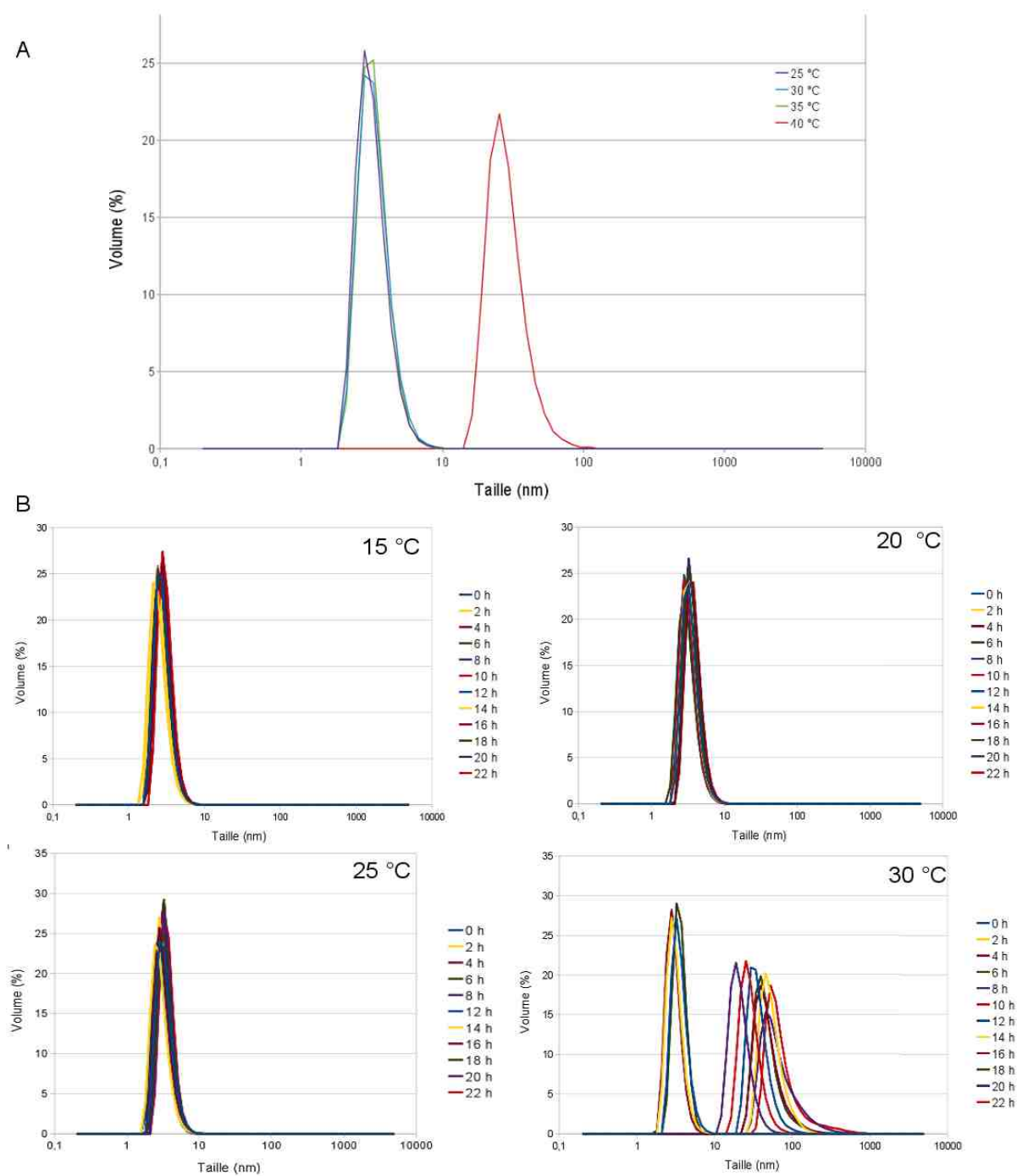


Figure III_11: A : Taille des particules diffusant en DLS à différentes températures d'un échantillon de Zg-3597. B : Taille des particules diffusant en DLS à différentes températures durant 22 heures.

II.B.8. Activité

Afin d'identifier l'activité de la protéine Zg-3597, des tests avec différents galactanes sulfatés, couramment utilisés au laboratoire, ont été effectués.

Comme le montre la figure III_12 A, la présence d'oligo-saccharides signifie que l'enzyme est active sur le κ -, le ι - et le λ -carraghénane. Néanmoins, l'enzyme semble plus active sur le ι - et le κ -carraghénane. L'activité sur le λ -carraghénane est relativement faible. De plus, les plus petits oligo-saccharides générés sont de la même taille que ceux produits par la iotase d'*Alteromonas fortis*. Ils correspondraient donc à des tetra- et des hexa-saccharides. Il est intéressant de noter que la forme agrégée de l'enzyme Zg-3597 est également active. Il se peut que cette forme, partiellement ou totalement dénaturée, garde un peu d'activité mais cela semble peu probable. Il est plus vraisemblable que l'échantillon ait été contaminé par de l'enzyme dimérique. Même en très faible quantité, les molécules contaminantes pourraient générer suffisamment d'oligo-saccharides pour être observés sur C-PAGE. Une autre possibilité expliquant l'activité faible de cet échantillon serait que, par un effet de dilution ou du fait de la présence du substrat, une faible quantité d'enzyme dénaturée se replie et devienne active.

Dans un deuxième temps, et afin d'identifier l'activité réelle de l'enzyme, du κ -carraghénane pré-hydrolysé avec la ι -carraghénase d'*A. fortis* a été utilisé comme substrat. Avec ce substrat κ -carraghénane "pure", c'est-à-dire dépourvu de quasiment l'ensemble des motifs iota-carraghénane, l'activité de l'enzyme Zg-3597 est nulle (Figure III_12 B). Sur le même gel, la iotase d'*A. fortis* dégrade encore, mais en faible quantité, le κ -carraghénane "pure". Vraisemblablement, on peut émettre l'hypothèse qu'il restait encore, au sein du κ -carraghénane, des motifs ι -carraghénane que la iotase d'*A. fortis* a pu hydrolyser en contraste avec l'enzyme Zg-3597. Ceci montre que l'enzyme Zg-3597 n'a pas d'activité sur le κ -carraghénane. Les oligo-saccharides que nous observons dans la figure III_12 A piste 7, ne sont donc que le résultat de l'hydrolyse de motifs ι -carraghénane présents dans le κ -carraghénane.

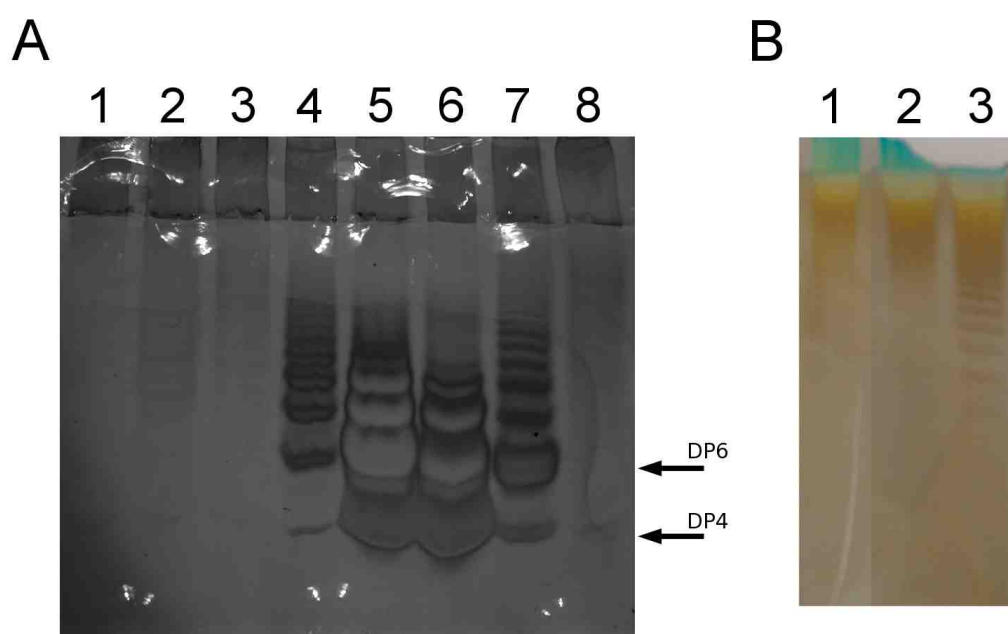


Figure III_12. A : Analyse par C-PAGE des produits de dégradation de différents carraghénanes par l'enzyme Zg-3597. 1 : Contrôle lambda. 2 : λ-carraghénane incubé avec Zg-3597 dimérique. 3 : Contrôle iota. 4 : ι-carraghénane incubé avec Zg-3597 sous forme agrégée. 5 : ι-carraghénane incubé avec Zg-3597 dimérique. 6 : ι-carraghénane incubé avec la GH 82 d'"A. fortis". 7 : κ-carraghénane incubé avec Zg-3597 dimérique. 8 : Contrôle kappa. B : Analyse par C-PAGE des milieux réactionnels de dégradation de κ-carraghénane pré hydrolysé par la iotase d'"A. fortis".

II.B.9. Analyse des produits terminaux

Dans le but de déterminer quelle est la liaison hydrolysée par l'enzyme Zg-3597, nous avons analysé par RMN les produits de dégradation de cette enzyme. Sur le spectre ^1H -RMN ont été observés les déplacements chimiques typiques d'extrémités réductrices du G4S et du DA (Figure III_13). Ceci montre que l'enzyme clive la liaison $\beta(1,4)$ entre un G4S et un DA2S présente dans du ι-carraghénane. Plus surprenant, l'enzyme clive également la liaison $\beta(1,4)$ entre le G4S et le DA, présent dans le κ-carraghénane. En intégrant les pics du DA2Snr-H5 (1,00) et du DANr-H5 (2,88), nous avons calculé le rapport entre les liaisons $\beta(1,4)$ clivés dans le ι- et dans le κ-carraghénane. Ce rapport est de 35 % de liaisons $\beta(1,4)$ κ-carraghénane clivées.

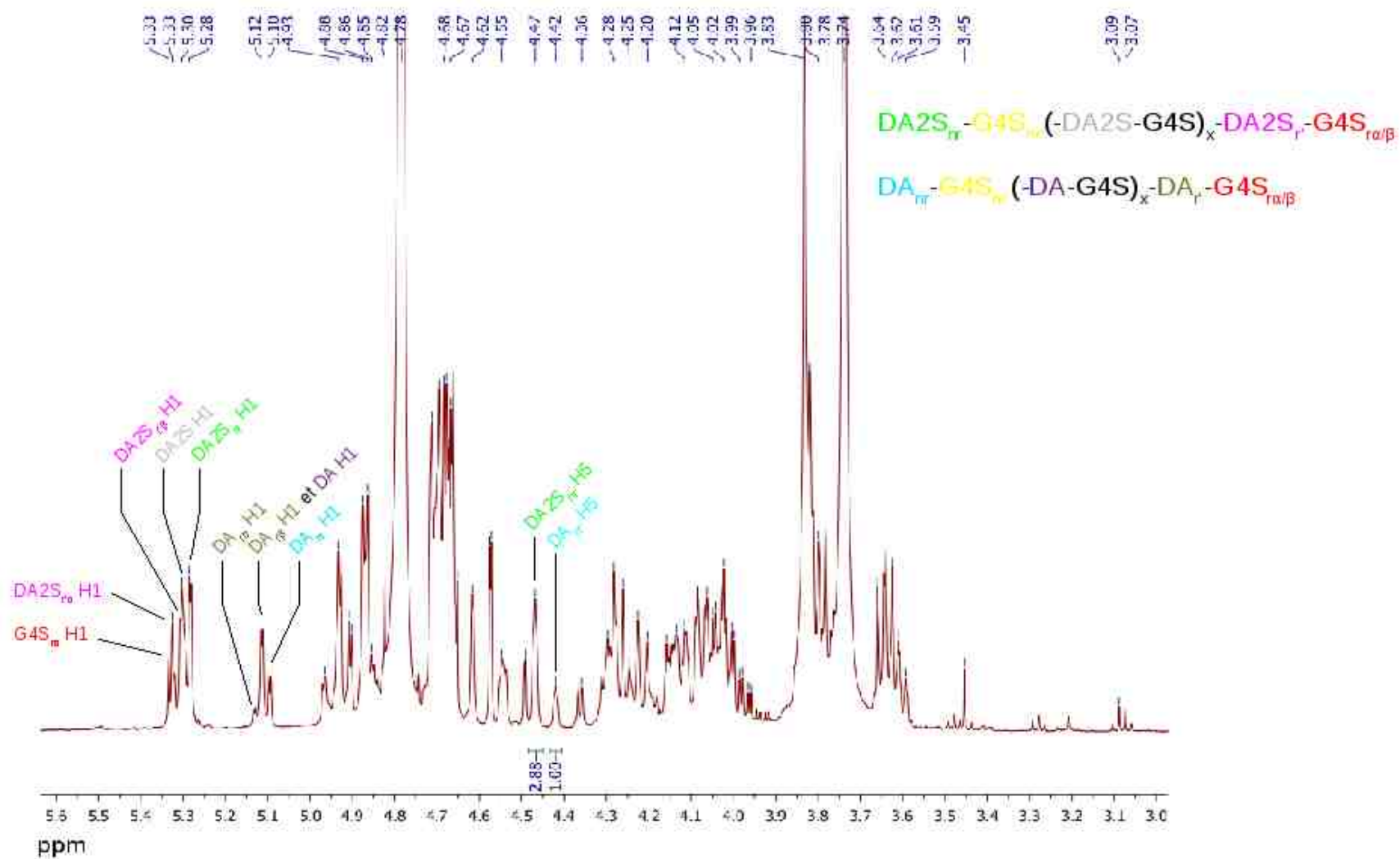


Figure III_13: Spectre 1H-RMN des produits de dégradation de l'enzyme Zg-3597.

II.C. La protéine Zg-4663

II.C.1. Purification

Comme pour la protéine Zg-3597, il est important de purifier l'enzyme avant de réaliser des tests d'activité et des études structurales. La protéine Zg-4663, qui est très fortement surexprimée, est purifiée en une seule étape sur colonne d'affinité au nickel (Figure III_14). Après concentration, nous avons obtenu 4 mL de protéine à 8,5 mg.mL⁻¹.

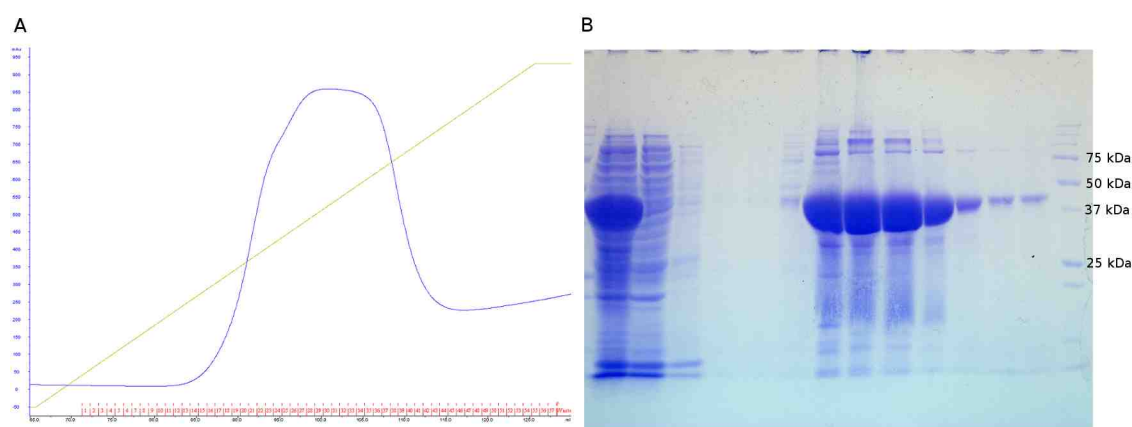


Figure III_14 : Purification de la protéine Zg-4663. A : Profil d'élution de la protéine Zg-3597 sur colonne d'affinité au nickel. B : Gel SDS-PAGE de l'extrait soluble. De gauche à droite les pistes correspondent à : protéines non fixées, lavage et des fractions 1, 9, 14, 23, 29, 34, 38, 43, 50 et 57.

II.C.2. Stabilité en fonction de la température

Avant d'entreprendre des tests d'activité, j'ai cherché à déterminer la température de dénaturation de la protéine. La figure III_15 qui représente le rayon hydrodynamique des particules en solution à température croissante, mesuré par diffusion dynamique de la lumière, montre que la protéine est monomérique et qu'elle se dénature à une température comprise entre 35 et 40 °C, comme cela avait été observé pour la protéine Zg-3597.

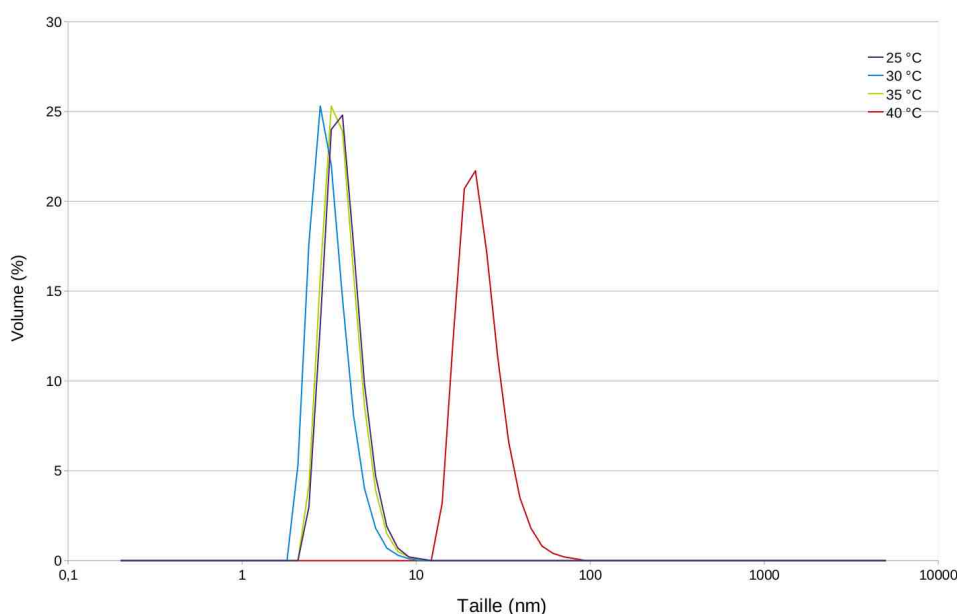


Figure III_15 : Taille des particules diffusant en DLS d'un échantillon de Zg-4663 à différentes températures.

II.C.3. Cristallogénèse

En raison de la complexité des formes cristallines de la protéine homologue Zg-3597, j'ai également entrepris de cristalliser Zg-4663, en espérant avoir un système moins complexe à traiter. J'ai donc réalisé un crible de 480 conditions (Cribles commerciaux), avec un robot dispenseur de nano-gouttes. Ces premiers tests nous ont permis d'identifier plusieurs conditions favorables à la cristallisation de la protéine. Toutes ces conditions avaient pour points communs l'utilisation de PEG comme précipitant et un tampon acide. Deux conditions en gouttes suspendues ont été reproduites (gouttes composées de 1 μ L de solution de précipitation et 1 μ L de protéine). La meilleure condition obtenue était, 20 % (p/v) PEG 1150, 100 mM acétate de sodium pH 5 et 10 % (v/v) de glycérol. Les cristaux obtenus dans cette condition ont permis de collecter les jeux de la protéine native et du dérivé iodé (Paragraphe VII.C.4). Mais après trois mois la protéine n'a plus cristallisé dans cette condition. Une nouvelle condition a été identifiée suite à un nouveau crible de conditions de cristallisation. Après optimisation cette nouvelle condition est constituée de 14 % (p/v) PEG 6000, 100 mM cacodylate de sodium pH 5,5, 4 mM chlorure de zinc et 2 % (v/v) de MPD. Les cristaux ainsi

obtenus (Figure III_16) ont été utilisés pour les expériences de diffraction de rayons X du dérivé ytterbium (Paragraphe VII.C.4).

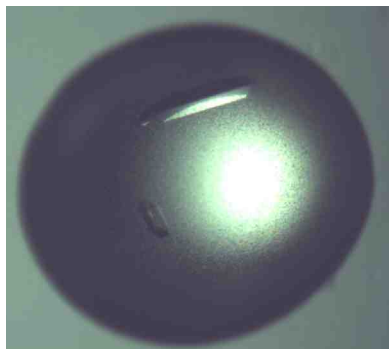


Figure III_16.: Cristaux typiques de la protéine Zg-4663.

II.C.4. Cristallographie

Comme pour la protéine Zg-3597, j'ai dans un premier temps envisagé de résoudre la structure cristallographique en utilisant la protéine recombinante marquée à la sélénométhionine. L'utilisation du milieu PASM 5052 m'a permis d'obtenir de la protéine sélénée, mais comme pour la protéine Zg-3597, la solubilité était fortement réduite, provoquant la précipitation de l'enzyme. J'ai donc utilisé une approche basée sur l'addition, par trempage des cristaux, de dérivées d'atomes lourds. J'ai alors exploré deux stratégies pour résoudre la structure de la protéine Zg-4663. La première a consisté à insérer dans le cristal un composé qui contient de l'iode, un diffuseur anomal, dans le but de résoudre la structure par remplacement isomorphe unique (SIR). Les données issues de ce dérivé (Tableau III_2, colonne I3C) présentent un fort signal anomal (Figure III_17) ce qui a permis d'identifier la position de deux atomes d'iodes. En revanche les cartes obtenues après le calcul des phases se sont avérées ininterprétables.

La seconde approche a été d'introduire, dans un cristal natif de la protéine Zg-4663, un dérivé possédant un diffuseur anomal, l'ytterbium, pour lequel le seuil L III (8.944 keV / 1.3862 Å) peut-être atteint sur les lignes de lumière synchrotron. Ceci a permis de mettre en place une stratégie de collecte MAD (Multiwavelength anomalous dispersion). Les

statistiques des jeux de données aux trois longueurs d'onde choisies sont présentées dans le tableau III_2, colonne Yb-HPDO3. La première et la seconde dérivée du spectre de fluorescence, mesuré sur le cristal de Zg-4663 trempé dans l'Yb-HPDO3, montre très clairement la présence d'ytterbium dans le cristal (Figure III_18 A). En revanche, le signal anomal est presque inexistant dans le jeu collecté au pic d'absorption, alors qu'il devrait être maximal dans ce jeu (Figure III_18 B). Cette observation indique que le dérivé ne s'est pas fixé à la protéine dans le cristal. Il n'est donc pas possible d'utiliser ces données pour résoudre la structure de la protéine Zg-4663.

	Natif	I3C	Yb-HPDO3A		
Source	ESRF ID14-EH2	ESRF ID14-EH2	ESRF BM30A		
Longueur d'onde (Å)	0,9330	0,9330	1,3864	1,3869	1,3845
Groupe d'espace	P 21 21 21	P 21 21 21	P 21 21 21	P 21 21 21	P 21 21 21
Paramètres de maille	a = 72,99, b = 96,80, c = 126,84	a = 72,44, b = 96,94, c = 126,24	A = 74,57, b = 105,50, c = 125,14	A = 74,57, b = 105,50, c = 125,14	A = 74,57, b = 105,50, c = 125,14
	$\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$	$\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$	$\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$	$\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$	$\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$
Résolution (Å)	50 – 2,20 (2,26 – 2,20)	50 – 3,00 (3,08 – 3,00)	50,0 – 2,3 (2,36 – 2,30)	50,0 – 2,3 (2,36 – 2,30)	50,0 – 2,3 (2,36 – 2,30)
Nombre de réflexions / uniques	296901 / 45236 (17364 / 3129)	143326 / 34360 (10764 / 2527)	244048 / 83916 (16582 / 6024)	237912 / 83081 (16236 / 5985)	216272 / 82112 (15156 / 6016)
Complétude (%)	97,6 (93,1)	100,0 (100,0)	99,0 (96,4)	96,9 (96,3)	98,0 (95,8)
Multiplicité	6,6 (5,5)	4,2 (4,3)	2,9 (2,8)	2,9 (2,7)	2,6 (2,5)
I / σ I	24,50 (7,15)	21,19 (11,33)	13,46 (2,99)	14,69 (3,32)	14,98 (3,60)
Nombre de molécules dans l'unité asymétrique	6,2 (24,8)	11,9 (5,9)	7,1 (41,5)	6,7 (40,0)	5,2 (26,9)
	2	2	2	2	2

Tableau III_2 : Statistiques des données de diffraction de rayons X du cristal natif, d'un cristal complexé avec de l'I3C et d'un cristal complexé au dérivé Yb-HPDO3A de l'enzyme Zg-4663.

```

ResL.   Inf  = 8.0 = 6.0 = 5.0 = 4.4 = 4.2 = 4.0 = 3.8 = 3.6 = 3.4 = 3.2 = 3.00
N(data) 1067 1396 1718 1876 876 1070 1290 1608 1988 2493 2915
Chi-sq   0.94 0.90 0.93 0.93 0.95 0.98 1.08 1.04 1.04 1.01 1.00
<I/sig>  52.3 38.0 35.4 37.8 34.0 30.5 25.7 21.4 17.5 14.1 10.0
%Complete 97.4 99.5 99.7 99.8 99.7 99.9 99.8 99.9 99.8 99.9 92.4
<d'/sig> 26.03 16.63 16.17 18.36 17.71 16.18 13.86 12.29 10.29 8.40 6.84
R(isom)  0.686 0.571 0.583 0.659 0.679 0.691 0.688 0.662 0.636 0.627 0.651

```

For zero signal <d'/sig> and <d''/sig> should be about 0.80

Figure III_17 : Intensité du signal anomal du jeu de données enregistré sur le cristal de Zg-4663 complexé avec de l'I3C.

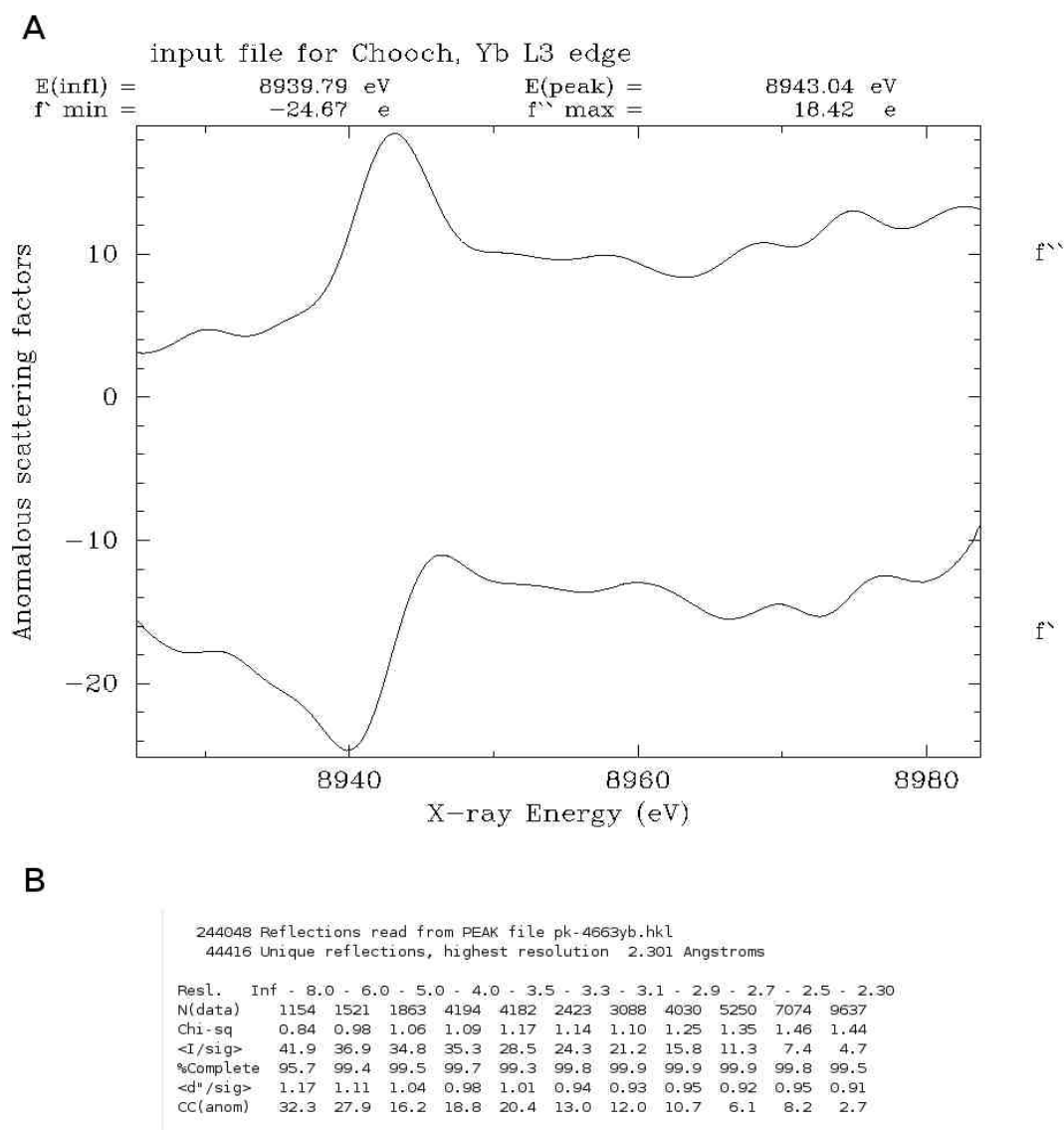


Figure III_18 : Signal anomal sur le cristal de Zg-4663 complexé à l'I3C. **A** : Première et deuxième dérivée du spectre expérimentale de fluorescence pour déterminer la position exacte du seuil et du point d'inflexion, ainsi que la force du signal (f' et f''), calculé avec CHOOCH (Evans and Pettifer, 2001). **B** : Intensité du signal anomal du jeu de données enregistré au pic d'absorption en fonction de la résolution.

III. Discussion

III.A. Nouvelle famille de glycoside hydrolases ?

Les cinq protéines nouvellement identifiées dans le génome de *Z. galactanivorans* n'ont aucune similarité, sur l'ensemble de leurs séquences, avec des enzymes déjà décrites et caractérisées. La phylogénie de ces protéines (Figure III_19) montre qu'elles forment un groupe solide entre elles et sont très éloignées des séquences les plus proches, c'est-à-dire les GH 32 et 43. Un résultat identique a été observé lorsque nous créons une séquence chimérique manuellement inversée d'une GH 32 et 43. Ces enzymes forment donc une nouvelle famille. Afin de caractériser biochimiquement et structuralement cette nouvelle famille de GH, nous nous sommes intéressés à deux de ces membres codées par les gènes *zg-3597* et *zg-4663* de *Z. galactanivorans*. Ces deux protéines ont été choisies du fait qu'elles appartiennent à deux sous famille différentes et parce qu'elles ont montré un fort taux de surexpression suite à la campagne de clonage à moyen débit, ceci donnant l'avantage de fournir une grande quantité de matériel afin de réaliser les études fonctionnelles et structurales.

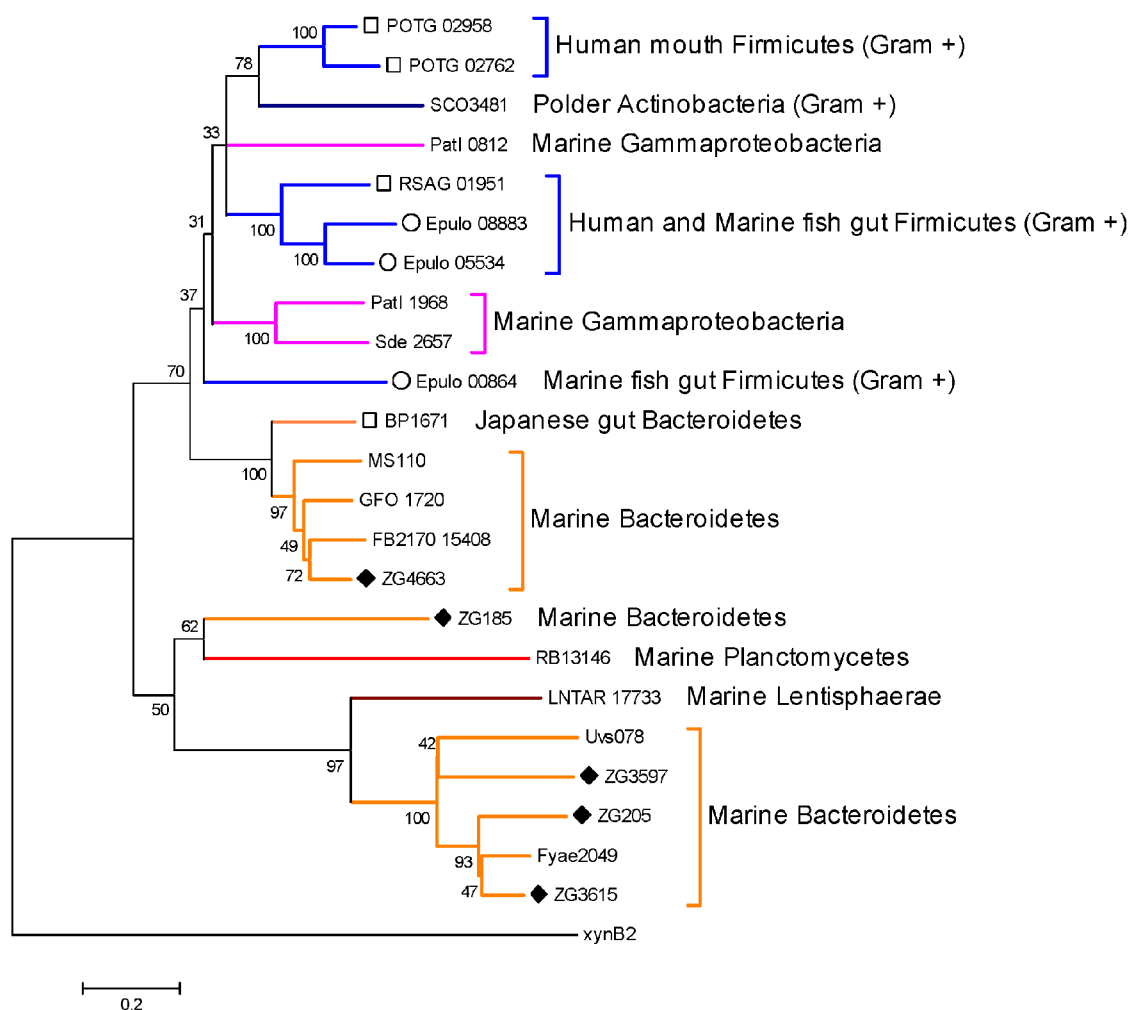


Figure III_19 : Arbre phylogénétique de la nouvelle famille de glycoside hydrolases. ♦ : Protéines de *Z. galactanivorans*. □ : Protéines de bactéries du tube digestif humain. ○ : Protéines de bactéries du tube digestif de poissons. XynB2 : Chimère artificielle (avec une permutation circulaire) de la protéine xynB2 (GH 43).

III.B. Structure

Pour les deux protéines Zg-3597 et Zg-4663, l'analyse des diagrammes HCA (Figure III_3) montre très clairement la présence de nombreux brins β , ce qui serait en accord avec un repliement de types "β-propeller". Malgré une permutation circulaire, ce repliement semble être similaire à celui adopté par les GH 32 et 43. Le modèle réalisé à partir de la structure à basse résolution (Figure III_9), montre l'arrangement que pourraient avoir des deux "β-propeller", au sein du dimère. Dans ce même modèle, l'espace entre les deux "β-propeller" est lié au fait qu'une partie de la molécule est impliquée dans la dimérisation. Il existe, chez

les glycoside hydrolases à repliement identique (famille 32 et 43), certains membres qui ont une structure quaternaire tétramérique correspondant à un dimère de dimère. Ceci est rendu possible par la présence d'un domaine supplémentaire impliqué dans la dimérisation chez ces enzymes (Brüx et al., 2006; Brunzelle et al., 2008). Or ce domaine ni aucun autre domaine qui pourrait être impliqué dans la formation de structure quaternaire, n'est retrouvé dans les séquences de Zg-3597 et Zg-4663. Le fait que la protéine Zg-3597 ait une structure quaternaire dimérique est donc assez surprenant. L'interaction entre les deux "β-propeller" serait donc d'un nouveau type. La résolution de la structure cristallographique permettra d'expliquer le mécanisme de dimérisation. En revanche, la forme agrégée que nous avons observée en chromatographie d'exclusion de taille pour l'enzyme Zg-3597 (Figure III_5 Pic 2), ne correspond en fait qu'à un agrégat de faible taille, que nous sommes arrivés à isoler et concentrer. Ces agrégats sont probablement produits au cours de la surexpression, car, comme le montre la figure III_5 B, l'enzyme Zg-3597 est très fortement exprimée. Nous pensons que la quantité d'enzyme dans la cellule est telle qu'une partie de l'enzyme ne se replierait pas correctement. Le fait de ne pas observer le même phénomène avec la protéine Zg-4663, également très fortement surexprimée, indiquerait que la formation des agrégats soit liée à la dimérisation de l'enzyme. En effet, la protéine Zg-4663 semble être monomérique en solution. De plus, Zg-4663 possède environ 30 résidus de moins dans la partie N-terminale. Donc, il se peut que ces résidus soient responsables (totalement ou partiellement) de la dimérisation de Zg-3597. En outre, il est intéressant de noter que le diagramme HCA de la protéine Zg-3597 (Figure III_3 A) semble indiquer que ces résidus sont vraisemblablement structurés.

Il serait donc très intéressant d'obtenir les structures cristallographiques de ces deux enzymes, non seulement pour confirmer le type de repliement, mais également afin de comprendre pourquoi Zg-3597 dimérise alors que Zg-4663 reste monomérique en solution. Or, jusqu'à présent, il n'a pas été possible de résoudre le problème des phases, inhérent à la technique de diffraction de rayons X. Pour les deux protéines, le remplacement des méthionines par des séléno-méthionines (Hendrickson et al., 1990), plaçant ainsi dans le cristal des atomes lourds, a abouti à la précipitation des protéines à faible concentration. Il n'a donc pas été possible de les cristalliser. C'est pourquoi nous avons essayé d'obtenir des cristaux contenant des atomes lourds comme, l'erbium et l'euporium, par trempage des cristaux de protéine. Or l'incorporation de ces métaux dans le cristal change son groupe d'espace. La méthode de remplacements multiples sur cristaux isomorphes ne peut donc pas être utilisée pour estimer

les phases.

Le dérivé iodé des cristaux de Zg-4663 est beaucoup plus prometteur. En effet, deux sites d'atomes d'iodes ont été identifiés et utilisés pour calculer une estimation des phases des facteurs de structure. Cependant, malgré l'utilisation d'autres atomes lourds (Au, Hg, Er, Yb, Eu) aucun autre cristal contenant des atomes lourds n'a pu être obtenu. Le fait de n'avoir qu'un seul dérivé lourd de la protéine ne permet pas de lever l'ambiguïté sur la phase, ce qui amène à des cartes de densité ininterprétables. L'obtention d'un nouveau dérivé permettrait de lever cette ambiguïté, et ainsi, de résoudre la structure des deux enzymes.

III.C. Activités

Lorsque j'ai commencé à travailler sur les enzymes Zg-3597 et Zg-4663, nous n'avions aucune idée du substrat potentiel de ces deux enzymes. J'ai commencé par tester si l'enzyme Zg-3597 avait une quelconque activité sur les différents polysaccharides couramment utilisés au laboratoire. Il s'est avéré que l'enzyme hydrolysait le λ -, le ι - et le κ -carraghénane (Figure III_12 A). Or, ces polysaccharides, extraits des algues, ne sont pas idéaux. Le carraghénane est une chaîne mixte formée par des blocs ι -, λ - et κ -carraghénanes (Guibet et al., 2008). L'enzyme Zg-3597 est majoritairement active sur le ι - et le κ -carraghénane. Ainsi, le substrat de cette enzyme semble plutôt être un de ces deux polysaccharides. C'est pourquoi, j'ai produit du κ -carraghénane dépourvu de motif iota en réalisant une pré-hydrolyse de ce polysaccharide avec la ι -carraghénase d' "*Alteromonas fortis*", très spécifique du ι -carraghénane (Barbeyron et al., 2000; Guibet, 2007). L'activité de l'enzyme Zg-3597, sur ce κ -carraghénane "idéal", est nulle (Figure III_12 B), ce qui montre que cette enzyme n'est pas une κ -carraghénase. Le fait que la iotase d' "*A. fortis*" puisse encore dégrader des motifs ι -carraghénane dans le κ -carraghénane "pure", est probablement lié au fait que l'enzyme, qui est endo-processive, est capable d'accéder à l'ensemble des liaisons. Il est intéressant de constater que l'enzyme Zg-3597 ne semble pas posséder cette capacité. Zg-3597 ne serait donc pas une enzyme de type endo. Elle aurait donc une activité de type exo, sur l'extrémité de la fibre ou sur des oses.

J'ai alors produit en grande quantité les oligo-saccharides générés par Zg-3597, afin d'identifier la liaison hydrolysée. Le spectre RMN de ces oligo-saccharides montre que l'enzyme clive la liaison $\beta(1,4)$ entre un G4S et un DA2S (Figure I_3) mais également entre le

G4S et le DA, et ce, avec un rapport de 2 pour 1. Ceci suggère que l'enzyme fixe strictement un G4S en +1 ou -1, selon que l'enzyme fonctionne par inversion ou rétention de configuration anomérique. En revanche, l'enzyme est moins spécifique en ce qui concerne le groupe partant. Il est donc possible que l'enzyme ne soit pas très spécifique quant à son substrat ou que la spécificité se fasse sur des sous-sites plus distants du site actif, c'est-à-dire les sous-sites +2 et supérieurs et/ou -2 et inférieurs. La seconde hypothèse est que les substrats utilisés ne soient pas les substrats réels de l'enzyme. En effet, il nous a fallu une très grande quantité d'enzyme (plusieurs mg) pour pouvoir produire ces oligo-saccharides. De plus, il n'a jamais été possible de détecter la production d'extrémités réductrices, et de suivre une cinétique de dégradation du carraghénane par l'enzyme Zg-3597. Cette enzyme est donc très faiblement active sur le ι-carraghénane. La dernière hypothèse est que l'échantillon de protéine de Zg-3597 ait été contaminé par de la iotase d'"*A. fortis*". Cependant, la iotase d'"*A. fortis*" est connue pour être très spécifique du ι-carraghénane et n'accepte pas de motif DA dans ses sous-sites +1, +3, -2 et -4. (Guibet et al., 2008). Les produits de dégradation de CgiA1_Af sont donc totalement différents de ceux observés sur le spectre RMN de la figure III_13. Il est donc raisonnable d'écarter l'hypothèse de la contamination.

Il est plus vraisemblable que le substrat de cette enzyme ne soit pas du ι-carraghénane, et ce, pour plusieurs raisons. La première est que l'activité sur ι-carraghénane est trop faible pour que celui-ci soit son substrat. La seconde est que *Z. galactanivorans* possède déjà trois iotases de la famille 82 (Voir chapitre 1), un nombre d'enzymes suffisant pour dégrader ce substrat. Le fait que les oligo-saccharides produits, par Zg-3597 soient de taille similaire à ceux produits par les iotases GH 82, montre que Zg-3597 n'est pas impliquée dans la dégradation des oligo-saccharides issus de l'hydrolyse du ι-carraghénane par les GH 82.

Il paraît donc évident que nous n'avons pas identifié le vrai substrat de cette enzyme. Néanmoins, l'activité observée, mais également le contexte génomique de l'enzyme, peut nous guider vers le véritable substrat. En effet, comme on le voit sur la figure III_2 A, l'enzyme Zg-3597 se trouve dans un groupe de gènes qui sont tous sur le même brin d'ADN, et qui sont, pour une partie, impliqués dans la détection (SusD/RagB) et la dégradation d'un polysaccharide sulfaté (GH 2, GH 97 et sulfatases). L'enzyme Zg-3597 fait peut-être partie d'un "CUT loci" impliqué dans la dégradation d'un polysaccharide sulfaté. Les GH de la famille 2 ont une activité de type β-galactosidase, β-mannosidase, β-glucuronidase, mannosylglycoprotéine, endo-β-mannosidase ou exo-β-glucosaminidase. Quant à la famille

97, les activités décrites sont de type α -glucosidase ou α -galactosidase. Dans le groupe de gène où se situe Zg-3597, une des GH 2 est une β -galactosidase et quant à la GH 97, il s'agit d'une α -galactosidase. Zg-3597 est donc une enzyme ayant une faible activité sur un galactane sulfaté et est au sein d'un opéron putatif dans lequel il existe des activités α - et β -galactosidase. Le substrat de l'enzyme Zg-3597 est donc logiquement un galactane sulfaté qui ne serait pas du λ -, ι - ou κ -carraghénane. Il a été décrit, chez les algues rouges, en plus des carraghénanes précédemment mentionnés, d'autre type de carraghénanes (Tableau III_). De plus, la diversité des galactanes sulfatés dans le milieu marin ne s'arrête pas à ceux présents chez les algues rouge. En effet, il existe chez deux espèces d'algue verte du genre *Codium*, un polysaccharide dont la chaîne principale est composée principalement de 3- β -D-Galp-1. Le galactose est sulfaté en 4 chez *C. isthmocladum* (Farias et al., 2008), alors que chez *C. Yezoense*, ce polysaccharide est majoritairement sulfaté en 4, avec en plus des structures mineurs (Bilan et al., 2007). Il a été rapporté la présence d'un galactane sulfaté chez l'angiosperme marine, *Rupia maritima*. La structure de ce polysaccharide consiste en la répétition d'une sous unité tétramérique de structure : $[3\text{-}\beta\text{-D-Galp-2(OSO}_3^-)\text{-1,4-}\alpha\text{-D-Galp-1,4-}\alpha\text{-D-Galp-1,3-}\beta\text{-D-Galp-4(OSO}_3^-)\text{-1}]_n$ (Aquino et al., 2005). Mais les galactanes sulfatés n'existent pas que chez les plantes. Par exemple, chez les oursin *Echinometra lucunter* et *Glyptocidaris crenularis* a été identifié respectivement un 2-sulfate $\alpha(1,3)$ -L-galactane et un 2-sulfate (aléatoire) $\beta(1,3)$ -D-galactane (Castro et al., 2009). Chez les ascidies, l'espèce *Herdmania monus* contient un 3-sulphate $\alpha(1,4)$ -L-galactopyranose (Santos et al., 1992). Pour élargir encore l'éventail de substrats potentiels, il faut noter que les carraghénanes sont très ressemblants aux glycosaminoglycanes animaux (Chondroïtines sulfates et dermatane sulfate) qui sont donc également des substrats potentiels. A tous les polysaccharides sulfatés précédemment cités, il faut ajouter ceux inconnus à l'heure actuelle. Il y a donc un grand nombre de substrats potentiels pour Zg-3597 et l'identification de celui ci ne sera probablement pas évident.

Famille	Lettre grecque	Lié en 1,3	Lié en 1,4
Bêta			
	γ (gamma)	G	D6S
	β (bêta)	G	DA
	δ (delta)	G	D2S,6S
	α (alpha)	G	DA2S
Lambda			
	λ (lambda)	G2S	D2S,6S
	θ (thêta)	G2S	DA2S
	ξ (Xi)	G2S	D2S
	π (Pi)	G2S	DP,2S
Kappa			
	μ (Mu)	G4S	D6S
	κ (Kappa)	G4S	DA
	ν (Nu)	G4S	D2S,6S
	ι (Iota)	G4S	DA2S
	$\omicron$ (omicron)	G4S	D2S
Oméga			
	Ψ (Psi)	G6S	D6S
	ω (Oméga)	G6S	DA

Tableau III_3 : Résumé des différents carraghénanes identifiés chez les algues rouges.

Pour la protéine Zg-4663, nous n'avons pour le moment détecté aucune activité sur agars et carraghénanes. Mais comme pour l'enzyme Zg-3597, nous pouvons nous servir du contexte génomique afin de guider l'identification de celui ci. Comme on le voit sur la figure III_2B, le gène qui code pour l'enzyme Zg-4663 est lui aussi au sein d'un groupe de gènes. On trouve les gènes codant pour les protéines impliquées dans la détection du substrat (SusD/RagB), puis suivent des gènes impliqués dans la dégradation de polysaccharides sulfatés (sulfatase, GH 2, ...). Il y a également dans ce groupe de gènes plusieurs enzymes impliquées dans la voie métabolique du galactose. Le substrat de cette enzyme est donc très vraisemblablement un polysaccharide composé totalement ou partiellement de galactose.

L'identification des substrats des enzymes Zg-3597 et Zg-4663 se poursuit actuellement *via* un projet de criblage à moyen débit, développé dans l'unité, sous la direction du Dr W. Helbert et qui porte le nom de CRAZY (CRiblage d'Activité enZYmatique).

III.D. Dans quelle niche écologique est présente cette nouvelle famille de glycoside hydrolases ?

La recherche de séquences de protéines similaires, dans les banques de données, montre que des séquences orthologues sont trouvées le long des côtes océaniques (Figure III_20). Les enzymes de cette famille sont donc actives sur des substrats uniquement marins qui proviennent de plantes ou d'animaux qui vivent le long des côtes.



Figure III_20: Carte mondiale représentant les sites où des séquences orthologues de la nouvelle famille ont été trouvées.

Une chose intéressante à noter, est que des séquences similaires sont présentes dans les génomes bactériens du tube digestif humain (Figure III_19). De par la forte identité de séquence entre les enzymes marines et symbiotiques humaines nous supposons que les séquences issues des bactéries de la flore intestinale humaine ont été acquise par transfert latéral à partir de bactéries marines. De plus, cette forte similarité entre les séquences des deux niches écologiques montre que le substrat pourrait être le même dans les océans et dans le tube digestif de l'homme. Ceci implique que si les bactéries symbiotiques humaines ont conservé ces enzymes, c'est qu'elles les utilisent relativement régulièrement pour dégrader un polysaccharide marin qui se retrouve dans l'alimentation humaine. Cela a déjà été démontré pour le cas particulier de la porphyranase de *Bacteroidetes plebeius* dans le tube digestif des japonais (Hehemann, 2009). Ceci est lié au fait que l'alimentation des japonais contient des algues rouges de genre *Porphyra* (sushi), riche en porphyrane (agar sulfaté). Dans le cas de

Zg-3597 et Zg-4663, le transfert latéral ne semble pas spécifique à certaine population, mais est relativement généralisé. Le transfert latéral de gènes, entre des bactéries marines et des bactéries du tube digestif de consommateur de produit de la mer ne serait donc pas un fait rare mais quelque chose de relativement répandu. Ces observations peuvent également être utilisées pour guider la recherche de nouveaux substrats, puisqu'il s'agit de polysaccharides sulfatés marins consommés par une grande partie des humains. Ces polysaccharides ne proviennent donc probablement pas d'algues mais plutôt d'animaux comme les poissons ou les mollusques.

III.E. Evolution

D'un point de vue évolutif, le groupe de protéines nouvellement identifié, est relié aux familles GH 32 et GH 43 par ce que nous avons appelé une permutation circulaire. Ces différentes enzymes semblent donc avoir évolué séparément depuis un ancêtre commun. Les GH 32 ont des activités sur le levane, l'inuline ou le saccharose et les GH 43 possèdent des activités sur le xylane ou l'arabinane. Il s'agit donc de polysaccharides de plantes terrestres et fongiques. Or les enzymes de *Z. galactanivorans*, appartenant à la nouvelle famille de GH, semblent avoir une activité sur des polysaccharides d'origine marine. On trouve donc dans les océans les trois familles de GH (La nouvelle famille, GH 32 et GH 43) mais seulement deux (GH 32 et GH 43) dans le milieu terrestre. La vie s'est développée en milieu marin avant de conquérir l'environnement terrestre et cette nouvelle famille de glycoside hydrolases n'est présente que dans le milieu marin. Nous supposons que les familles GH 32 et GH 43, sont le résultat d'une permutation circulaire, acquise par l'ancêtre commun des GH 32 et GH 43 issu de la nouvelle famille de GH. Ceci aurait permis l'apparition de nouvelles activités afin de dégrader les polysaccharides des plantes terrestres impliquant en conséquence que la nouvelle famille d'enzyme identifiée ici soit plus proche de la forme ancestrale que les GH 32 et 43.

IV. Matériel et méthodes

IV.A. Clonage et surexpression

Les gènes codant les protéines Zg-3597 et Zg-4663 ont été clonés dans le vecteur pFO4 qui a été inséré dans la souche d'expression BL21 (DE3) de *Escherichia coli*, au cours d'une campagne de clonage à moyen débit du programme européen de génomique marine "Marine express". Les gènes ont été amplifiés à partir de l'ADN génomique de *Z. galactanivorans* par PCR en utilisant comme amorces Zg-3597f : GGGGGGGGATCCTGTTCCGAACAAAAACGGAAACCA, Zg-3597r : CCCCCCGAATTCTTATCGTCCTTCGGGACTTAGGTTTTT et Zg-4663f : GGGGGGGGATCCTGCAATTCTCCCAAACTACAAAAGA, Zg-4663r : CCCCCCGAATTCTTATTGTTTTTTTACTCCTTTAGCTACGTG. Les produits de PCR ont ensuite été insérés entre les sites de restriction BamH1 et EcoR1 du plasmide PFO4. L'expression des enzymes natives a été réalisée dans le milieu auto-inducteur ZYP (Studier, 2005) contenant 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ d'ampicilline à 20 °C pendant 3 jours. La surexpression des protéines sélénées a été réalisées dans 200 mL de milieu auto-inducteur PASM-5052 (Studier, 2005) à 20 °C pendant 10 jours.

IV.B. Purification

Zg-3597 : Les cellules ont été resuspendues dans un tampon 50 mM CHES pH 9,5, 500 mM NaCl et 100 mM imidazole. Les cellules ont été lysées à l'aide d'une presse de French. Le lysat bactérien a été centrifugé 1h30 à 15000 rpm et le surnageant chargé sur une colonne Chelating fast flow sepharose (GE healthcare) précédemment chargée avec des ions Ni^{2+} et équilibrée avec le même tampon que ci-dessus. La protéine était ensuite éluée en utilisant un tampon 50 mM CHES pH 9,5, 500 mM NaCl et 1 M imidazole. Les fractions montrant la présence de la protéine par électrophorèse en gel d'acrylamide dénaturant (SDS-PAGE) ont été mélangées, concentrées et chargées sur deux colonnes d'exclusion de taille Superdex 200 mises l'une à la suite de l'autre. Les différentes formes ont été concentrées jusqu'à 12 mg.mL^{-1} pour le pic 1 (dimère) et 8,78 mg.mL^{-1} pour le pic 2 (forme agrégée)

Zg-4663 : Le culot bactérien a été resuspendu dans 20 mL de tampon Tris-HCl 50 mM pH 7,5, 500 mM NaCl et 50 mM imidazole (Tampon A). Un cocktail d'antiprotéase (Complet

EDTA free, Roche) et du lysozyme à la concentration finale de 1 mg mL⁻¹ ont été ajoutés. L'échantillon a été placé sous agitation à 4°C pendant 1 heure puis centrifugé deux heures à 20000 rpm. Le surnageant a été chargé sur une colonne Chelating fast flow sepharose (GE healthcare) précédemment chargée avec des ions Ni²⁺ et équilibrée avec le tampon A. La protéine a été éluée *via* un gradient d'imidazole de 50 mM à 1 M. Les fractions montrant la présence de protéine par électrophorèse en gel dénaturant d'acrylamide ont été regroupées et concentrées avant d'échanger le tampon contre 50 mM Tris-HCl pH 7,5 et 50 mM NaCl. La concentration finale de la protéine était de 8,5 mg mL⁻¹.

Pour les enzymes sélénées, les protocoles de purification furent identiques à ceux utilisés pour l'enzyme native, excepté qu'il a été ajouté 5 mM d'antioxydant TCEP (Tris(2-carboxyethyl)phosphine hydrochloride) à chacun des différents tampons utilisés aux cours des purifications. Les concentrations finales utilisées pour la cristallisation étaient de 14,7 mg mL⁻¹ et 5 mg mL⁻¹ pour Zg-3597 et Zg-4663 respectivement.

IV.C. Collecte et traitement de données de diffusion de rayons X aux petits angles de la protéine Zg-3597

Les données ont été collectées au synchrotron DESY (Hambourg, Allemagne) sur la ligne X33. Une solution d'albumine de sérum bovin (BSA) à 4,36 mg mL⁻¹ a été utilisée pour la calibration. Les clichés de diffusion ont été enregistrés avec un temps d'exposition de 30 secondes. La longueur d'onde était de 1.5 Å. La distance entre l'échantillon et le détecteur était de 2,7 m. Les courbes de diffusion de la protéine dimérique ont été enregistrées aux concentrations de 7,9; 4,78; 4,14 et 2,04 mg mL⁻¹. Pour la forme agrégée, les données ont été enregistrées pour des concentrations de 8,78; 4,34 et 2,11 mg mL⁻¹. Les valeurs de rayon de giration ont été obtenues en utilisant la fonction d'approximation de Guinier du logiciel GNOM. L'estimation des masses moléculaires est calculée en utilisant l'équation (8) qui relie la masse moléculaire (MM) et l'intensité diffusée à l'angle 0° (I₀).

$$MM_{(ech)} = MM_{(BSA)} \cdot (I_{0(ech)}/I_{0(BSA)}) \quad (8)$$

Les structures de protéines à basse résolution ont été calculées avec le logiciel GASBOR (Svergun et al., 2001). Pour les formes dimériques et agrégées, nous avons utilisé

les courbes de diffusion obtenues avec l'enzyme diluée à 4,78 mg.mL⁻¹ et 4,34 mg.mL⁻¹ respectivement.

IV.D. Modélisation de la protéine Zg-3597

Afin de voir si la structure obtenue était cohérente avec un dimère de "β-propeller", deux copies de l'arabinase (GH 43) de *Bacillus subtilis* (code PDB : 1UV4) ont été placées manuellement à l'intérieur de l'enveloppe protéique de la forme dimérique, obtenue par SAXS. La structure de l'arabinase est un "β-propeller" à cinq pales.

IV.E. Stabilité à la température

25 µL d'enzyme ont été utilisés pour mesurer, par diffusion dynamique de la lumière (DLS), le rayon hydrodynamique de l'enzyme en solution. Les mesures ont été réalisées entre 10 et 65 °C, par incréments de 5 °C et avec deux minutes d'équilibration par température. Pour l'enzyme Zg-3597, un suivi de la stabilité sur 23 heures a été réalisé en enregistrant toutes les heures le rayon hydrodynamique aux températures de 15, 20, 25 et 30 °C.

IV.F. Cristallogénèse

Des conditions de cristallisation des deux enzymes ont été recherchées *via* l'utilisation d'un robot (Honeybee, Genomic Solutions) en utilisant différents cribles commerciaux (Qiagen PACT, JCSG+, PEG I, PEG II, Ammonium sulfate.)

Pour Zg-3597 native, suite à l'optimisation, la cristallisation en goutte suspendue a été obtenue en mélangeant 1 µL de protéine avec 1 µL de la solution du réservoir. Celui-ci contenait 50 µL d'une solution de 15 % (p/v) PEG 3350 et 200 mM d'acétate de calcium. En présence d'atomes lourds, les cristaux ont été produits dans les mêmes conditions et en ajoutant 0,5 µL d'une solution à 0,125 mM nitrate d'erbium ou d'acétate d'euporium, dans la goutte de cristallisation. Pour le complexe entre la protéine Zg-3597 et l'hexa ι-carraghénane, 0,5 µL d'une solution d'hexa ι-carraghénane à 20 mM a été ajouté directement à la goutte de cristallisation.

Dans le cas de la protéine Zg-4663 native, une première condition de cristallisation en

goutte suspendue a été obtenue. Celle-ci consistait à mélanger 1 μL de solution de protéine avec 1 μL d'une solution de 20 % (p/v) PEG 1150; 100 mM acétate de sodium pH 5 et 10 % (v/v) de glycérol contenu dans le réservoir (500 μL). Les cristaux obtenus à partir de cette condition ont été utilisés pour la collecte de l'enzyme native et du dérivé iodé.

Pour le dérivé iodé (I3C : Acide 5-Amino-2,4,6-triiodoisophthalique) (Beck et al, 2008) (Sigma-Aldrich), des cristaux natifs ont été plongés, 24 heures, dans une solution identique à la solution de cristallisation, avec en plus 10 mM d'I3C.

Après environ 1 mois, la protéine ne cristallisait plus dans cette condition. Une seule des conditions identifiées préalablement, à partir des cribles robotisés, permettait encore de cristalliser la protéine. Après optimisation, cette condition, en gouttes suspendues, consistait à mélanger 1 μL de solution de protéine avec 1 μL de la solution du réservoir qui contenait 500 μL de 14 % (p/v) PEG 6000; 100 mM cacodylate de sodium pH 5,5; 4 mM chlorure de zinc et 2 % (v/v) de MPD.

Pour obtenir le dérivé contenant l'Yb-HPDO3A, les conditions optimisées précédemment citées ont été utilisées en ajoutant 0,5 μL d'une solution à 25 mM de Yb-HPDO3A (NatX-ray, Grenoble, France) (Figure III_21) dans la goutte de cristallisation.

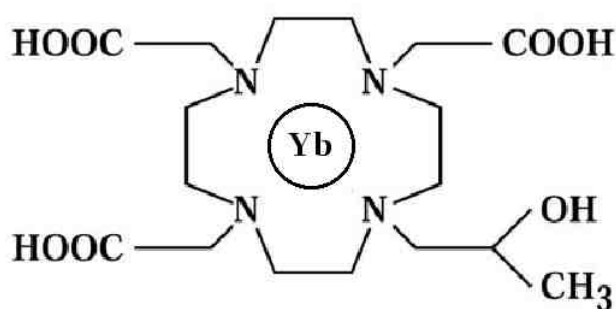


Figure III_21 : Structure chimique de la molécule Yb-HPDO3A (HPDO3A : Acide 10-(2-hydroxypropyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7-triacétique).

IV.G. Collecte des données de diffraction de rayons X

Pour la protéine Zg-3597, les cristaux ont été brièvement plongés dans une solution cryoprotectante composée de 15 % (p/v) PEG 3350; 200 mM d'acétate de calcium et 10 %

(v/v) MPD. Les cristaux ont alors été congelés à 100 K. Les données de diffractions ont été enregistrées à l'ESRF (Grenoble, France) sur la ligne ID23-EH1 sur un détecteur ADSC Quantum Q315r. Les paramètres utilisés pour l'ensemble des collectes effectuées sur des cristaux de la protéine Zg-3597 sont présentés dans le tableau III_3.

	Natif	Erbium	Europium	Hexa iota-carraghénane
Longueur d'onde (Å)	0,97935	0,89940	0,89960	0,97900
Nombre d'images	600	180	160	220
Temps d'exposition par image (s)	0,5	0,5	1	0,5
Oscillation du cristal par image (°)	0,3	0,5	0,5	0,5

Tableau III_4 : Résumé des paramètres de collecte, des cristaux de la protéine Zg-3597.

Pour la protéine Zg-4663, les cristaux natifs et contenant l'iode, ont été brièvement plongés dans une solution cryoprotectante contenant 20 % (p/v) de PEG 1150; 100 mM d'acétate de sodium pH 5 et 10 % (v/v) de MPD. Ils ont alors été congelés à 100 K. Les données de diffractions ont été enregistrées à l'ESRF (Grenoble, France) sur la ligne ID14-EH2, via un détecteur ADSC Quantum 4. Les paramètres de collecte sont résumés dans le tableau III_5.

Pour le dérivé ytterbium, un cristal de la protéine Zg-4663, a été congelé à 100 K, en utilisant comme solution cryoprotectante 14 % (p/v) PEG 6000; 100 mM cacodylate de sodium pH 5,5; 4 mM chlorure de zinc et 15 % (v/v) de MPD. Les données de diffractions ont été enregistrées à l'ESRF (Grenoble, France) sur la ligne BM30A, via un détecteur ADSC Q315r.

	Natif	I3C	Pic	Europium Inflexion	Eloigné du seuil
Longueur d'onde (Å)	0,933	0,933	1,3864	1,3869	1,3845
Nombre d'images	180	200	140	140	140
Temps d'exposition par image (s)	5	6	120	120	120
Oscillation du cristal par image (°)	1	1	1	1	1

Tableau III_5 : Résumé des paramètres de collecte des cristaux de la protéine Zg-4663.

IV.H. Traitement des données de diffraction de rayons X

Les jeux de données ont été indexées, intégrées et mis à l'échelle *via* la suite de logiciels XDS (Kabsch, 1993).

Pour la protéine Zg-4663, les deux jeux de données obtenus, c'est-à-dire natif et co-cristallisé avec l'I3C, ont été considérés comme étant deux jeux de données de cristaux isomorphes. La technique de remplacement isomorphe simple (SIR : Single isomorphous replacement) a donc été utilisée afin de résoudre le problème des phases. Pour cela, le logiciel SHARP (de La Fortelle and Bricogne, 1997) a été utilisé en prenant les positions d'atomes d'iodes obtenus à partir du logiciel SHELXD (Sheldrick, 2008).

IV.I. Préparation de kappa-carraghénane dépourvu de motifs iota-carraghénane

Une solution de 10 mL de κ -carraghénane à 0,3 % (p/v) dans un tampon Tris-HCl 100 mM pH 8 et 200 mM NaCl, a été incubée 24 heures à 37 °C avec la ι -carraghénase d'*Alteromonas fortis*. La solution a ensuite été diluée dans l'H₂O puis re-concentrée par ultra filtration sous pression d'azote. Ceci a été répétée plusieurs fois afin d'éliminer l'ensemble des oligo-saccharides générés.

IV.J. Tests d'activités de la protéine Zg-3597

L'activité de la protéine Zg-3597 a été testée sur κ -, ι - et λ -carraghénanes en mélangeant l'enzyme avec une solution de 0,2 % (p/v) ι -carraghénane dans 100 mM Tris pH 8, 200 mM NaCl. Le mélange réactionnel a été incubé à 37 °C pendant deux heures. Les produits de dégradation ont été analysés par électrophorèse en gel de polyacrylamide. La même expérience a été répétée avec le κ -carraghénane dépourvu de motifs ι -carraghénane.

IV.K. Électrophorèse d'hydrate de carbone en gel de polyacrylamide (C-PAGE)

Les gels utilisés avaient une concentration en polyacrylamide de 6 % pour le gel de concentration et 27 % pour le gel de séparation. Leurs épaisseurs étaient de 0,75 mm. A 5 μ L de produit d'hydrolyse, ont été ajoutés 15 μ L de tampon de charge (saccharose 10 % (p/v) et rouge de phénol), et 5 μ L de ce mélange ont ensuite été chargés sur le gel. La migration a été effectuée à température ambiante, à 200 V et dans un tampon de migration composé de 50 mM Tris-HCl et 1 mM EDTA. Les oses présents dans le gel et séparés selon leur taille et leur charge, ont été colorés au bleu d'Alcian 0,5 % (p/v) pendant 10 minutes, puis au nitrate d'argent 0,4 % (p/v) pendant 10 minutes. La révélation a été réalisée par une solution de 1,75 g NaCO₃ et 20 μ L de formaldéhyde dans 25 mL d'H₂O.

IV.L. Production et analyse par RMN des produits de dégradation de la protéine Zg-3597

Une solution de 100 mL à 1 % (p/v) ι -carraghénane dans un tampon Tris-HCl 100 mM pH 8 et 200 mM NaCl a été incubée à 37 °C durant une semaine. Tout les deux jours, 150 μ L d'enzyme (7,5 mg.mL⁻¹) purifiée en une seule étape sur colonne d'affinité au Ni²⁺ ont été ajoutés à la solution de ι -carraghénane. Les oligo-carraghénanes ont ensuite été séparés de la fraction résistante par ultrafiltration sous pression d'azote à 3,0 kg.cm⁻² sur membrane 3 000 MWCO, en ajoutant périodiquement de l'eau. Le filtrat (250 mL) a ensuite été concentré par évaporation rotative jusqu'à environ 50 mL avant d'être lyophilisé. Les oligo-carraghénanes ont été échangés trois fois dans du D₂O et finalement re-dissous à 1 mg mL⁻¹ dans du D₂O. Le spectre 500 MHz ¹H-RMN a été enregistré sur un spectromètre BRUCKER Advance DRX

500 équipé d'une sonde inverse 5 mm triple résonance TXI $^1\text{H}/^{13}\text{C}/^{31}\text{P}$ avec gradient Z. L'enregistrement a été effectué à 25 °C en utilisant 64 000 points. Les paramètres étaient les suivants : angle d'impulsion, 30°; fenêtre spectrale, 7 485 Hz; temps d'acquisition, 1,58 s, temps de relaxation, 2 s. Les déplacements chimiques sont exprimés en ppm par rapport à la référence externe TSP (trimethylsilylpropionic acid) (van de Velde et al., 2004).

IV.M. Phylogénie

Les séquences des protéines de *Zobellia galactanivorans* ont été alignées avec leurs homologues ainsi qu'une chimère de GH 43 (xynB2 : β -xylosidase de *Bifidobacterium longum*) en utilisant MAFFT, via une méthode d'affinement itérative et une matrice d'évaluation des scores Blosom62 (Kato et al., 2002). L'arbre phylogénétique est dérivé de cet alignement par une méthode basée sur le maximum de vraisemblance en utilisant le programme PhyML (Guindon & Gascuel, 2003). La fiabilité de l'arbre a été testée par une analyse statistique "bootstrap" avec 100 re-échantillonnages des données. L'arbre a été affiché avec MEGA (Kumar et al., 2004).

Chapitre III

*Caractérisation structurale d'une iodoperoxydase
dépendante du vanadium de Zobellia galactanivorans*

Chapitre III : Caractérisation structurale d'une iodopéroxydase dépendante du vanadium de *Zobellia galactanivorans*

I. Introduction

Des produits naturellement halogénés ont été isolés en abondance à partir d'eucaryotes marins, mais également plus récemment à partir de micro-organismes marins et terrestres. Ces composés halogénés sont de types peptides, indoles, terpènes, phénols et hydrocarbonés volatils (par exemple chloroforme, dibromomethane, iodoethane). Ces métabolites marins halogénés sont produits en grande quantité (Gribble, 1998; Faulkner, 2002) et ont des rôles associés aux mécanismes de défense, c'est-à-dire préventif contre la prédation ou répulsif contre certains micro-organismes (Manley, 2002).

L'iode (I) a été découvert en 1813 dans les algues brunes (Courtois, 1813). Après avoir été identifié chez d'autres organismes et par des études plus systématiques, il s'avère que c'est chez les algues brunes que l'on retrouve la plus forte concentration en iode. En effet, les laminaires sont les organismes qui accumulent le plus d'iode avec une quantité moyenne de 1 % du poids sec chez *Laminaria digitata* ce qui représente une accumulation 10 000 fois supérieure à la concentration en iode de l'eau de mer (58 $\mu\text{g.L}^{-1}$) (Küpper et al., 1998). L'accumulation d'iode dans les cellules des kelps ferait intervenir des halopéroxydases dépendante du vanadium (vHPO ; désignation générique et indépendant de l'ion halogène sur lequel l'enzyme est active) (Figure I_12) (Küpper et al., 1998; Verhaeghe et al., 2008). Ces enzymes sont également potentiellement impliquées dans la biosynthèse des métabolites halogénés (Butler and Carter-Franklin, 2004; Butler, 1999; Winter and Moore, 2009).

Les vHPO catalysent l'oxydation des halogénures en présence de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et sont nommées en fonction de l'halogénure le plus électronégatif qu'elles sont capables d'oxyder, c'est-à-dire que les chloro-péroxydases (vCPO) peuvent aussi

bien oxyder le chlorure que le bromure et l'iode, les bromo-péroxydases (vBPO) réagissent avec le bromure et l'iode alors que les iodo-péroxydases (vIPO) sont spécifiques à l'iode. Il existe actuellement une seule structure de vCPO, celle du champignon *Curvularia inaequalis* (Messerschmidt and Wever, 1996). Par contre, plusieurs structures de vBPO ont été résolues dont deux vBPO d'algues rouges *Corallina officinalis* (Isupov et al., 2000) et *Corallina pilulifera* (Garcia-Rodriguez et al., 2005) ainsi qu'une d'algue brune, *Ascophyllum nodosum* (Weyand et al., 1999).

Le repliement global de ces différentes enzymes est relativement conservé et composé principalement par des hélices. En solution, les vBPO algales forment un dimère *via* des interactions hydrophobes, et dans le cas de la vBPO d'algues brunes (*A. nodosum*, *L. digitata* et *Fucus distichus*) la dimérisation est renforcée par la présence de deux ponts disulfures inter chaînes. Quand à la vBPO de *C. officinalis*, six dimères s'assemblent pour former un dodecamère (Isupov et al., 2000).

Le site de fixation de l'ion vanadate est très bien conservé entre les différentes séquences de vHPO d'algues (Weyand et al., 1999; Garcia-Rodriguez et al., 2005). Au sein de ce site, l'atome de vanadium est coordonné dans une géométrie bipyramidale à base triangulaire par quatre atomes d'oxygène et un atome d'azote qui provient de la chaîne latérale d'une histidine (Nε2). La liaison entre le cofacteur vanadate et l'histidine a tout d'abord été décrite comme une liaison covalente de coordination (Messerschmidt and Wever, 1996) puis comme une liaison covalente (Weyand et al., 1999; Macedo-Ribeiro et al., 1999). Le vanadate est stabilisé par un réseau de liaisons hydrogènes qui implique six résidus très conservés qui sont, une histidine, deux arginines, une lysine, une glycine et une sérine. Des expériences de mutagenèse dirigée et d'enzymologie ont montrées que ces résidus étaient importants dans la fixation du vanadate (Macedo-Ribeiro et al., 1999). Seule, la vIPO de *L. digitata* présente une substitution parmi ces six résidus, la sérine est remplacée par une alanine (Colin et al., 2005), mais la structure tridimensionnelle de cette vIPO n'a pas été déterminée pour le moment.

Actuellement toutes les vHPO décrites proviennent d'eucaryotes bien que leur présence chez les procaryotes ait été prédite (Winter et al., 2007). L'annotation experte du génome de *Zobellia galactanivorans* (Barbeyron et al. en préparation) a montré la présence de trois vHPO qui ont été clonées afin d'être caractérisées. Nous présentons ici la structure d'une

de ces enzymes, vIPO1 qui s'avère être une iodopéroxydase dépendante du vanadium (Delage communication personnelle).

II. Résultats et discussion

II.A. Résolution de la structure cristallographique

La structure cristallographique de la iodopéroxydase dépendante du vanadium de *Z. galactanivorans* (vIPO1_Zg) a été résolue à 1,8 Å de résolution par la méthode de diffusion anormale à différentes longueurs d'ondes (MAD : Multiwavelength Anomalous Diffraction) en utilisant une protéine recombinante dans laquelle les méthionines ont été remplacées par des sélénométhionines. Cette substitution permet d'introduire dans le cristal des atomes de sélénium, qui ont un fort pouvoir de diffusion anormale (Hendrickson et al., 1990).

Afin de déterminer les différentes longueurs d'ondes auxquelles les données de diffraction devaient être enregistrées pour l'obtention d'un jeu de données MAD complet, nous avons mesuré sur un cristal d'IPO1 (Figure IV_1A) un spectre de fluorescence aux rayons X autour de la raie d'absorption K du sélénium (0.9795 Å / 12 658 keV) (Figure IV_1B).

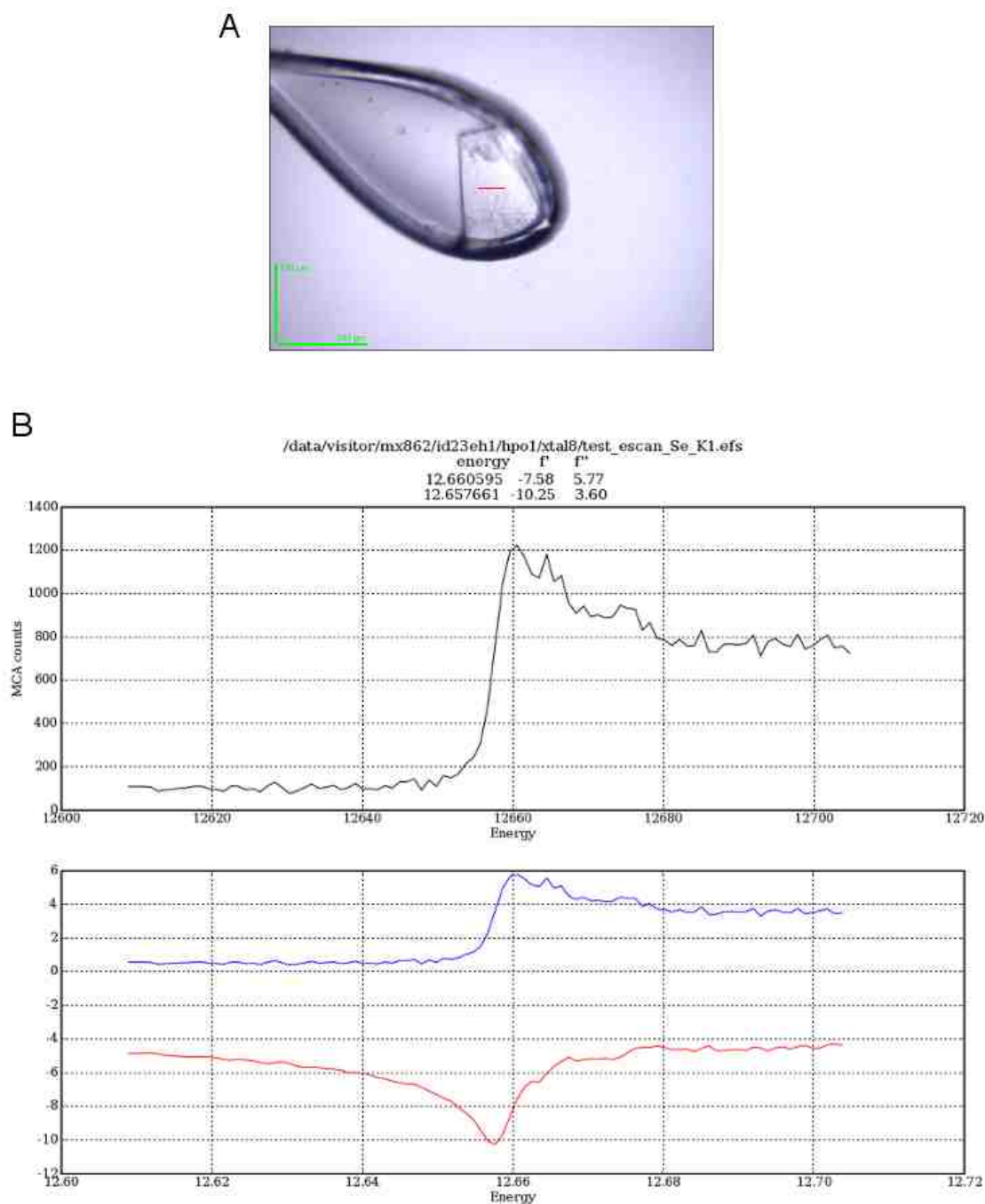


Figure IV_1: A : Cristal typique de vIPO1 de *Z. galactanivorans* monté sur la ligne de lumière synchrotron. B : Figure du haut : Spectre expérimental d'absorption d'énergie autour du seuil d'absorption du sélénium, situé théoriquement à 12 658 keV sur un cristal de vIPO1_Zg sélénée. Figure du bas : Première et deuxième dérivé de la courbe expérimentale pour déterminer la position exacte du seuil et du point d'inflexion, ainsi que la force du signal (f' et f''), calculées avec CHOOCH (Evans and Pettifer, 2001).

En se basant sur le spectre de fluorescence mesuré nous avons déterminé les trois longueurs d'ondes auxquelles les données devaient être enregistrées. Le jeu de données correspondant au pic d'absorption a donc été enregistré à la longueur d'onde de 0,9793 Å, celui correspondant au point d'inflexion à 0,9796 Å et celui à plus haute énergie et éloigné du seuil d'absorption à 0,9685 Å. Après traitement des données nous obtenons trois jeux de données pour lesquels les statistiques sont présentées dans le tableau IV_1.

	Pic	Point d'inflexion	Eloigné
Source	ESRF ID23-EH1		
Longueur d'onde (Å)	0,9793	0,9796	0,9685
Groupe d'espace	P 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁		
Paramètres de maille	a = 42,84 Å ; b = 84,36 Å ; c = 117,38 Å		
	$\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$		
Résolution (Å)	20 – 1,80 (1,85 – 1,80)	20 – 1,80 (1,85 – 1,80)	20 – 1,90 (1,95 – 1,90)
Nombre de réflexions / uniques	198076 / 75515	198448 / 75565	168928 / 64259
Complétude (%)	99,1 (99,6)	99,2 (99,7)	99,1 (99,5)
Multiplicité	2,6 (2,6)	2,6 (2,6)	2,6 (2,6)
I / σ	13,74 (5,17)	10,91 (2,74)	10.60 (2.52)
R_{sym}	5,3 (20,7)	7,2 (44,2)	8.3 (45.4)

Tableau IV_1 : Résumé des statistiques des données de diffraction.

Pour calculer les phases et ainsi résoudre la structure de la vIPO1_Zg nous avons utilisé la suite SHELXC/D/E (Sheldrick, 2008) via l'interface HKL2MAP (Pape and Schneider, 2004). La première étape, qui utilise SHELXC, permet d'estimer et contrôler l'intensité du signal anomal (Figure IV_2A) ainsi que d'extraire les facteurs de structure provenant de la sous-structure des atomes lourds (FA). La seconde étape consiste à localiser la position des atomes lourds dans l'unité asymétrique. Ici le programme SHELXD recherche la position de ces atomes par calcul *ab initio* en utilisant les FA qui proviennent de SHELXC. Le coefficient de Matthews indique une seule molécule dans l'unité asymétrique. Nous avons donc effectué le calcul en recherchant la position de 12 atomes de sélénium, ce qui correspond au nombre de sélénium présents dans la séquence de la vIPO1_Zg. Dix sept sites ont été identifiés par SHELXD, mais seulement 11 ont un taux d'occupation supérieur à 50 % (Figure

IV_2B). SHELXE calcule ensuite les phases pour l'ensemble du jeu de données et ce pour les deux énantiomères de la structure (Figure IV_2C).

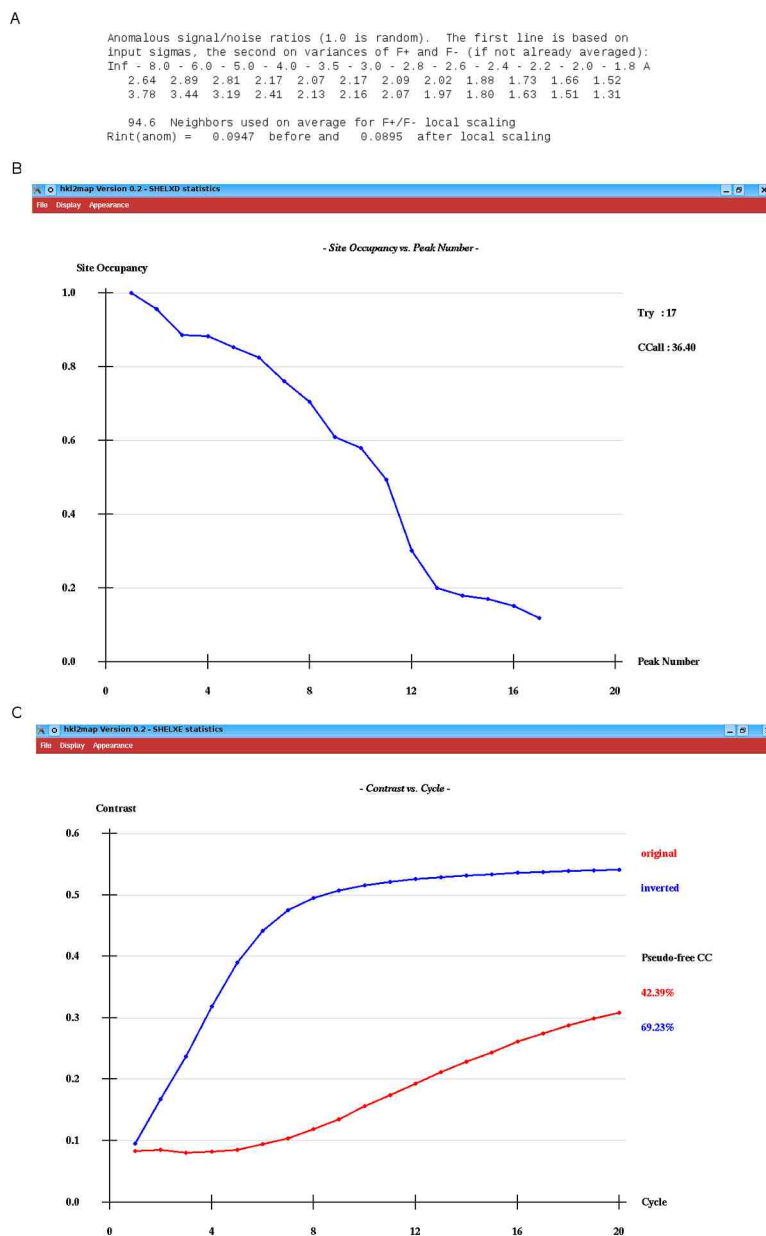


Figure IV_2: Phasage des données MAD par la suite SHELXC/D/E. A : Intensité du signal anomal du jeu de données enregistré au pic d'absorption en fonction de la résolution. B : Occupation dans les différents sites d'atomes lourds identifiés par SHELXD. C : Coefficient de corrélation pour les deux énantiomères en fonction du nombre de cycles de phasage par SHELXE.

La carte obtenue pour la "main inversée" après calcul des phases par SHELXE (Figure IV_3) permet d'observer que la densité électronique est relativement continue et permet déjà d'identifier certains résidus.

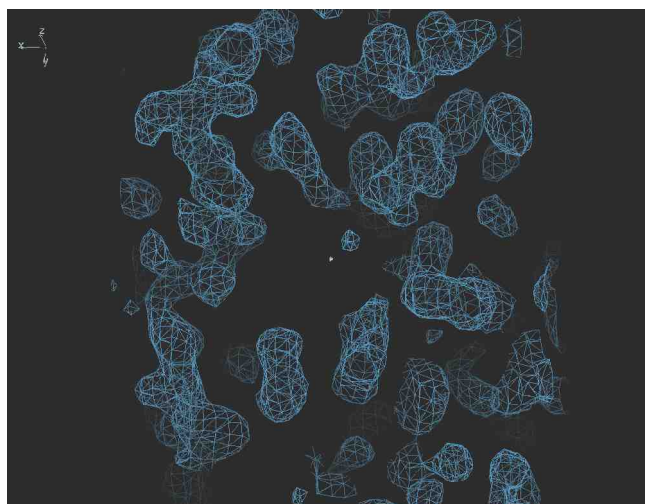
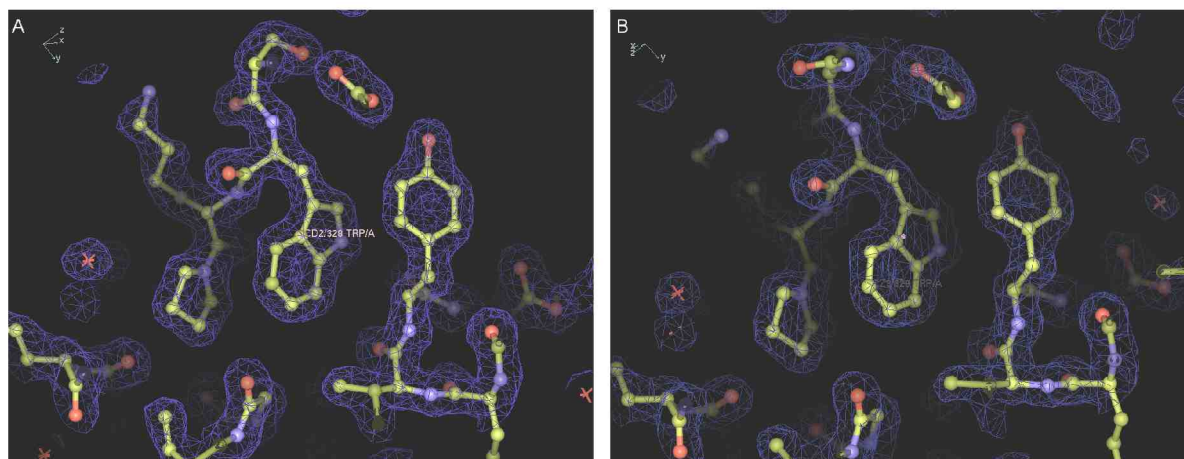


Figure IV_3: Carte de densité électronique $2Fo - Fc$ tracée à 1σ de la *vIPO1* de *Z. galactanivorans* obtenue après calcul des phases par SHELXE. La solution "main inversée" a été utilisée pour le calcul de la carte.

Néanmoins, afin d'automatiser et d'accélérer la procédure de construction du modèle, nous sommes tout d'abord passés par une étape d'aplatissement de solvant *via* le logiciel DM inclus dans la suite CCP4 puis par une reconstruction automatique avec ARP/WARP (Langer et al., 2008) et REFMAC5 (Vagin et al., 2004). Le programme a permis de reconstruire 362 résidus sur les 434 de l'enzyme entière (Figure IV_4A). Le modèle a ensuite été affiné manuellement en alternant avec des cycles d'affinement automatique par REFMAC5. Les statistiques d'affinement sont présentées dans le tableau IV_2. La reconstruction automatique a très bien fonctionné et le modèle obtenu (Figure IV_4A) est proche du modèle final (Figure IV_4B).



*Figure IV_4 : Modèle de la vIPO1 de *Z. galactanivorans* après construction automatique (A) et à la fin de l'affinement (B).*

Affinement	
R_{work} (R_{free})	16,3 (20,2)
Ecart type sur les liaisons (Å)	0,03
Ecart type sur les angles (°)	1,95
Qualité du graphique de Ramachandran	
Pourcentage de résidus dans les régions les plus favorable	97,01
Pourcentage de résidus dans les régions autorisées	1,99
Pourcentage de résidus dans les régions non autorisées	1
Nombre d'atomes (Facteur B moyen (Å²))	
Proteine	3224 (15,53)
Eau	235 (25,15)
Cofacteur	5 (15,08)
Ion	1 (14,2)

*Tableau IV_2 : Résumé des statistiques d'affinement de la vIPO1 de *Z. galactanivorans*.*

Le modèle final contient 409 résidus, un atome de sodium et un cofacteur vanadate. Les résidus Thr 174 à Asp 178 ainsi que Ser 265 à Thr 275 ne sont pas visibles dans la carte de densité électronique $2F_o - F_c$ et il est possible qu'ils existent dans plusieurs conformations désordonnées ou fortement flexibles.

II.B. La structure de la vIPO1 de *Zobellia galactanivorans*

Comme attendu et par homologie avec les structures de vHPO déjà connues, le repliement général de l'enzyme est principalement en hélices avec 14 hélices α et 2 hélices 3_{10} . Il est à noter également la présence d'un feuillet β antiparallèle constitué de deux brins par les résidus Phe 381 à Asp 383 et Arg 394 à Phe 396. Le cœur de la structure est formé par deux fagots de 5 hélices, l'un est constitué par les hélices 1 à 5 et le second par les hélices 10, 11, 13, 15 et 16. Les deux fagots sont reliés par une symétrie d'ordre 2 dont l'axe est perpendiculaire aux hélices et passe entre les fagots (Figure IV_5). Le repliement global de l'enzyme est relativement similaire à la vCPO de *C. inaequalis*.

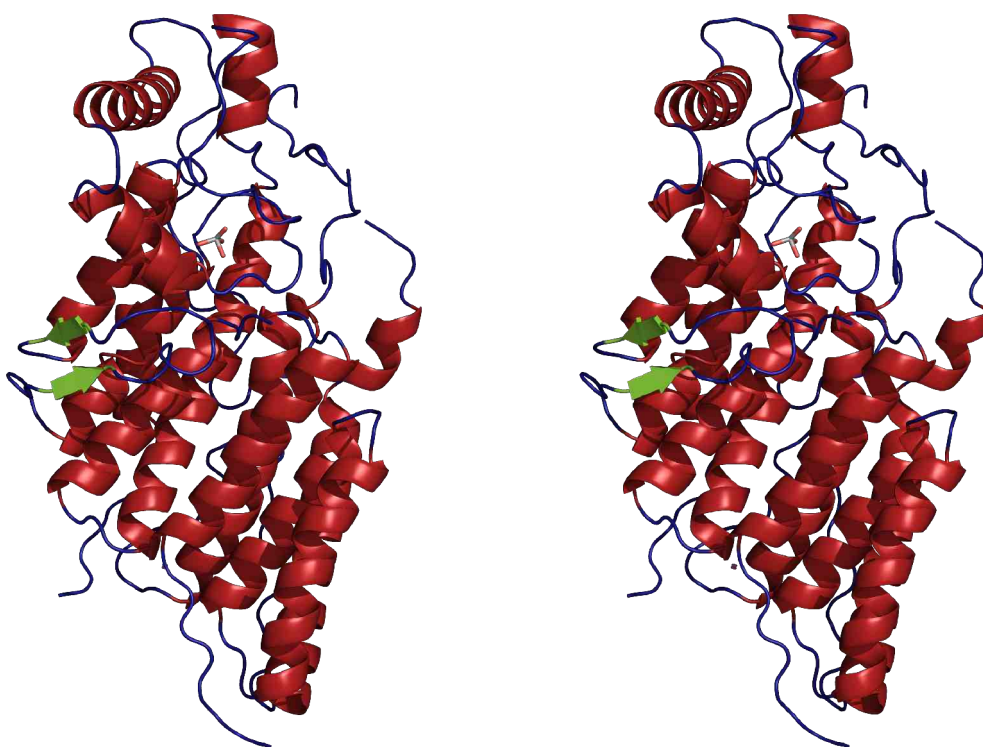


Figure IV_5: Vue en stéréo de la structure de vIPO1 de Z. galactanivorans.

II.C. Comparaison avec les structures des vHPO d'algues et de champignon

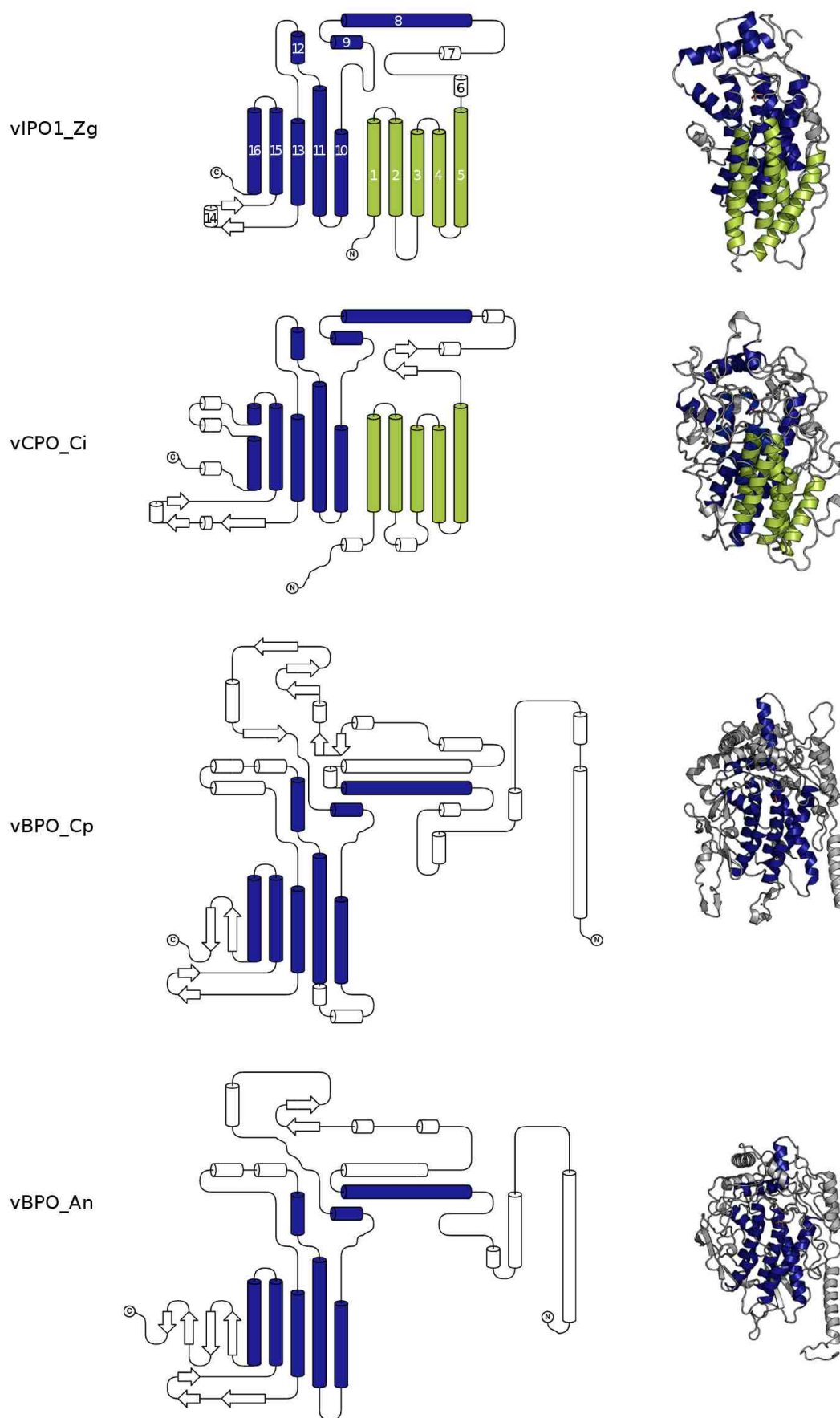
Malgré le fait que le repliement global de la vIPO1 de *Z. galactanivorans* est similaire à la vCPO de *C. inaequalis*, l'écart type entre les deux structures est de 1,79 Å, et il est encore plus élevé avec les vHPO algales puisque celui-ci est respectivement de 2,26, 2,55 et 2,61 avec les vBPO de *C. officinalis*, *C. pilulifera* et *A. nodosum* (Tableau IV_3). Il est donc intéressant de noter que vIPO1 provenant du milieu marin est plus proche de la vCPO du champignon terrestre que des vBPO marines provenant d'algues. Néanmoins, ceci est probablement lié au fait que ces deux enzymes sont monomériques alors que les enzymes algales sont multimériques. Les vBPO des deux espèces de *Corallina* (Algue rouge) sont très proches entre elles mais relativement éloignées de la vBPO de *A. nodosum* (Algue brune). Il semble donc que les structures globales de vHPO soient relativement éloignées entre les différents phyla, mais seul l'augmentation du nombre de structures, qui pour le moment est relativement faible, permettra de confirmer cette hypothèse.

	vIPO1 <i>Z. galactanivorans</i>	vBPO <i>A. nodosum</i>	vBPO <i>C. officinalis</i>	vBPO <i>C. pilulifera</i>	vCPO <i>C. inaequalis</i>
vIPO1 <i>Z. galactanivorans</i>	-	2,608	2,259	2,548	1,791
vBPO <i>A. nodosum</i>	-	-	1,418	1,633	2,948
vBPO <i>C. officinalis</i>	-	-	-	0,482	3,164
vBPO <i>C. pilulifera</i>	-	-	-	-	2,584
vCPO <i>C. inaequalis</i>	-	-	-	-	-

Tableau IV_3 : Ecart type entre les différentes structures globales de vHPO.
La superposition des structures est basée sur l'alignement des structures secondaires.

II.D. Structures tertiaires et quaternaires des vHPO

Les diagrammes de topologie des structures de vHPO présentés dans la figure IV_6 montrent les hélices présentes dans les différentes vHPO qui se superposent. Huit hélices sont équivalentes entre les quatre structures (Figure IV_6, hélices en bleu) : les cinq hélices du fagot 2 et les hélices 6, 7 et 10 qui se situent au-dessus de ce fagot. Le site actif de l'enzyme se situe au début de l'hélice 13, dans cette zone structuralement conservée. La figure IV_6 montre également que les vBPO d'algues présentent une grande insertion entre les hélices 6 et 7. Par contre, les enzymes algales n'ont pas les hélices 1 à 5 qui forment le fagot 1. Dans le dimère des vBPO algales, les hélices du fagot 2 du second monomère se situent à la position qu'aurait le fagot 1 s'il était présent. De plus, ces hélices du site catalytique des vBPO sont quasiment superposables à celles du fagot 1. Cette observation a servi de base à l'hypothèse qu'une duplication du gène ancestral, similaire aux vBPO algales, aurait eu lieu et abouti chez le champignon à une structure monomérique qui possède les deux fagots d'hélices au sein de la même chaîne. Un des sites actifs aurait été perdu par la suite (Littlechild et al., 2002). Néanmoins, cette duplication semble très peu vraisemblable, du fait que les séquences en acides aminés sont totalement différentes. Il ne resterait donc aucune conservation de la séquence d'acides aminés entre les deux domaines, ce qui est fort peu probable. Il est donc beaucoup plus plausible que l'enzyme ancestrale était monomérique avec deux fagots d'hélices et que les algues ont perdu le fagot d'hélice en N-terminal. Cette perte du fagot 1 expose donc l'ex-surface d'interaction du fagot 2 au solvant, or cette surface est hydrophobe. L'enzyme aurait alors dimérisée *via* ces surfaces hydrophobes. De plus, cette dimérisation aurait été facilitée par le remplacement d'un des fagot de 5 hélices par un autre et donc par une structure quasiment identique. Chez les algues rouges, un assemblage plus complexe de ces dimères aurait eu lieu par la suite pour former un dodécamère (Isupov et al., 2000) alors que chez les algues brunes l'interaction entre les deux monomères au sein du dimère a été renforcée par la présence de deux ponts disulfures (Weyand et al., 1999).



II.E. Site de fixation du vanadate

En se concentrant sur le site de fixation du vanadate, les structures sont beaucoup plus conservées (Tableau IV_4). Cependant, cette tendance de ressemblance est la même que pour la structure globale des vHPO, c'est-à-dire que la structure de la vIPO1 de *Z. galactanivorans* est plus proche de celle de vCPO de *C. inaequalis* que des vBPO algales. De même les deux vBPO d'algues rouges sont très proches l'une de l'autre. La très grande conservation structurale du site de fixation du vanadate dans les différentes vHPO a déjà été décrite (Colin et al., 2005) (revue Leblanc et al., 2006). Ici, avec la première structure d'une vHPO d'origine procaryote, nous pouvons d'ores et déjà élargir ce constat pour l'ensemble des vHPO, qu'elles soient d'origines eucaryotes ou procaryotes. Ce site de fixation a donc été conservé au cours de l'évolution depuis les procaryotes jusqu'aux eucaryotes.

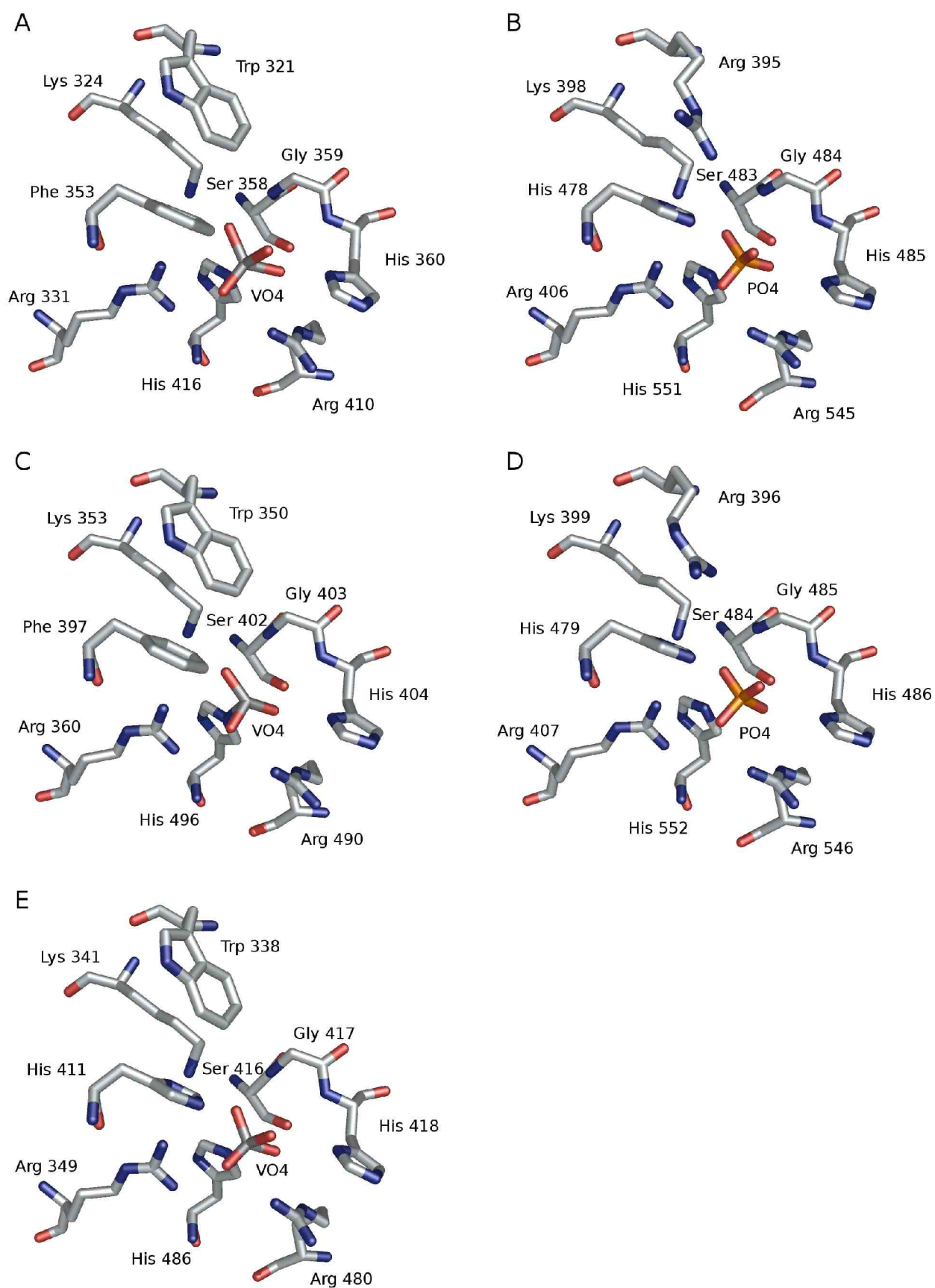
	vIPO1 <i>Z. galactanivorans</i>	vBPO <i>A. nodosum</i>	vBPO <i>C. officinalis</i>	vBPO <i>C. pilulifera</i>	vCPO <i>C. inaequalis</i>
vIPO1 <i>Z. galactanivorans</i>	-	0,379	0,436	0,409	0,258
vBPO <i>A. nodosum</i>	-	-	0,380	0,355	0,367
vBPO <i>C. officinalis</i>	-	-	-	0,104	0,454
vBPO <i>C. pilulifera</i>	-	-	-	-	0,419
vCPO <i>C. inaequalis</i>	-	-	-	-	-

Tableau IV_4 : Ecart type entre les différentes structures du site de fixation du vanadate dans les vHPO.

⇨ Figure IV_6 : Comparaison topologique des vHPO. La colonne de gauche présente les schémas de topologie des différentes vHPO. Les hélices en bleu correspondent aux hélices conservées entre les différentes vHPO. Les hélices en vert sont les hélices du fagot 1. La colonne de droite présente la structure du monomère pour chaque vHPO avec le même code couleur. Zg : *Zobellia galactanivorans*. Ci : *Curvularia inaequalis*. Co : *Corallina pilulifera*. An : *Ascophyllum nodosum*.

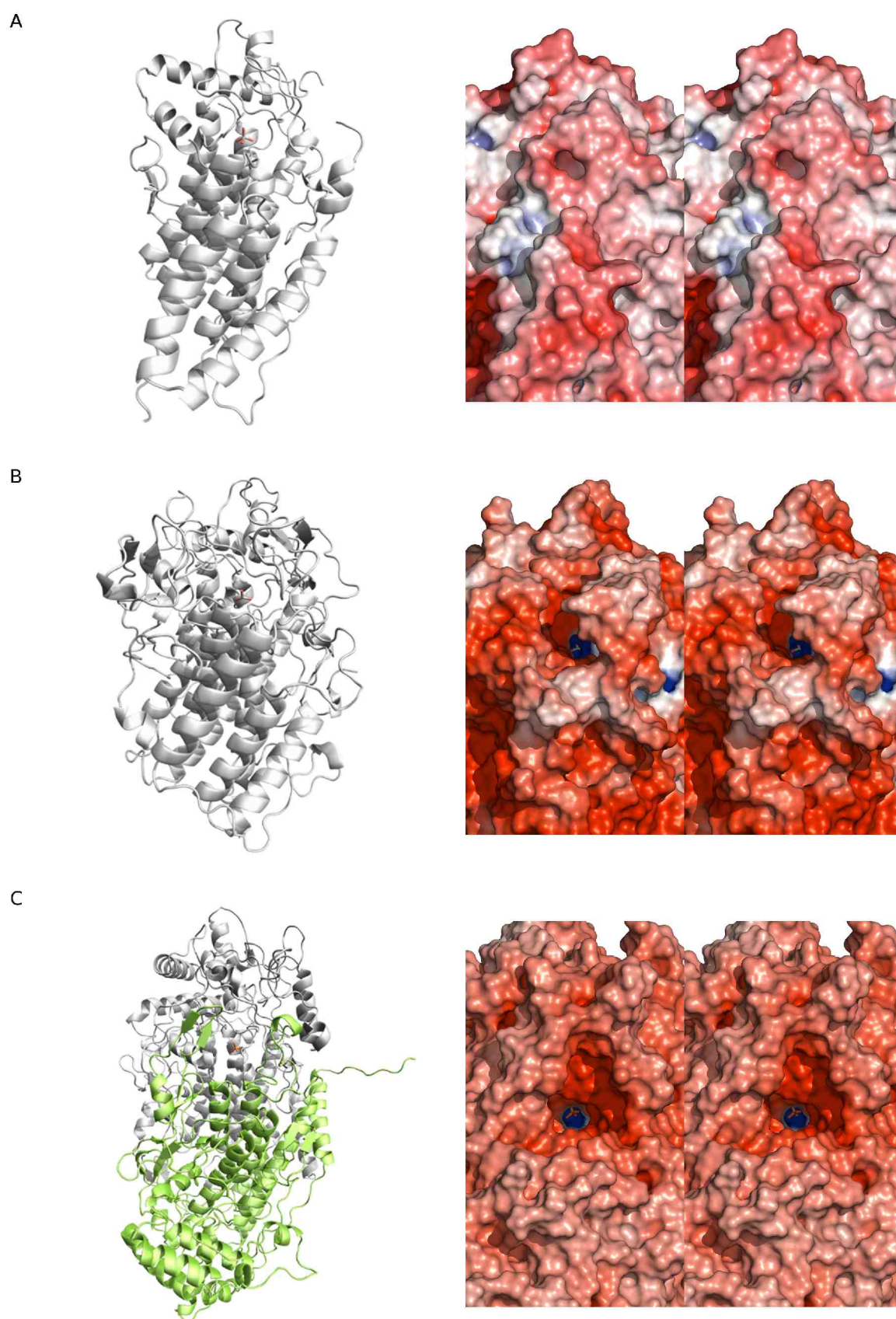
L'ensemble des sites de fixation du vanadate dans les différentes vHPO sont présentés dans la figure IV_7. Les résidus strictement conservés dans toutes les vHPO, c'est-à-dire Lys 324, Arg 331, Gly 359, His 360, His 416 et Arg 410 (numérotation de vIPO1_Zg) sont retrouvés ici avec des conformations très similaires entre l'ensemble des vHPO (Figure IV_7). Sur la figure IV_7, les sites actifs de la vIPO1 de *Z. galactanivorans* (Figure IV_7 A) et de la vCPO de *C. inaequalis* (Figure IV_7 C) possèdent les mêmes résidus. Ceci suggère qu'aucun de ces résidus ne peut être responsable seul de la spécificité d'halogénéation. Comme la plupart des autres vHPO, à l'exception de la vIPO de *L. digitata*, la vIPO1 de *Z. galactanivorans* a une sérine en position 358. Dans la vIPO de *L. digitata*, cette sérine est remplacée par une alanine (Colin et al., 2005) or ce résidu avait été muté en alanine dans la vCPO de *C. inaequalis* (Tanaka et al., 2003) n'entraînant aucun effet majeur sur l'activité de bromination. Ensemble, la vIPO1 de *Z. galactanivorans*, et ce mutant confirment que ce résidu n'est pas responsable, ou en tous les cas pas le seul responsable, de la sélectivité pour l'halogénure. Ceci va à l'encontre de l'hypothèse selon laquelle la seule présence d'une alanine en position 358 neutraliserait moins la charge du peroxy-vanadate, qui devient moins capable d'oxyder les halogénures hautement électronégatifs (Colin et al., 2005). La sélectivité pour l'halogénure implique donc d'autres résidus et notamment ceux de la seconde sphère de coordination du vanadate (Hasan et al., 2006).

⇒ Figure IV_7 : Comparaison des sites actifs des différentes vHPO.
A : vIPO1 de *Z. galactanivorans*. B : vBPO de *C. officinalis* (code PDB n°1QHB). C : vCPO de *C. inaequalis* (code PDB n°1VNC).
D : vBPO de *C. pilulifera* (code PDB n°1UP8). E : vBPO de *A. nodosum* (code PDB n°1QI9).



En revanche, le rôle de la cavité en forme d'entonnoir à l'entrée du site actif semble être particulièrement important dans le cas de la vIPO1. En effet, alors qu'il existe une cavité ouverte qui mène au site actif dans toutes les structures de vBPO et de vCPO, cette dernière n'est pas observée dans la structure de la vIPO1 de *Z. galactanivorans* (Figure IV_8).

⇒ *Figure IV_8 : Comparaison des cavités catalytiques entre différentes vHPO. Sur la partie gauche, est représentée la structure de la vHPO dans sa forme biologiquement active et dans le sens d'observation de la cavité. Sur la partie droite, est représentée en stéréo la cavité catalytique, et ce, pour la vIPO1 de Z. galactanivorans (A), la vCPO de C. inaequalis (B) et la vBPO de C. officinalis (C).*



Dans les vBPO algales, les deux monomères participent à la formation de la cavité catalytique (Isupov et al., 2000). En conséquence, la chaîne peptidique assure seule sa spécificité *via* les résidus qui se retrouvent autour de cette cavité dans les vHPO monomériques. Dans la vIPO1 de *Z. galactanivorans*, l'entrée de la cavité est bouchée par la tyrosine 263 (Figure IV_9). Cette tyrosine se trouve sur la boucle entre les hélices 9 et 10, et cette boucle est une de celles qui est invisible dans la carte de densité électronique. Dans la structure de la vCPO de *C. inaequalis*, la boucle entre les hélices équivalentes est beaucoup plus courte (Figure IV_10) et comme le montrent les facteurs d'agitation thermique, cette boucle est beaucoup plus flexible dans la vIPO1 de *Z. galactanivorans*. D'où le fait qu'elle n'est pas totalement visible dans la densité électronique. Un mouvement de l'ensemble de cette boucle semble permettre le déplacement de la tyrosine 263 afin d'ouvrir la cavité aux substrats, le H_2O_2 et l'atome d'iode.

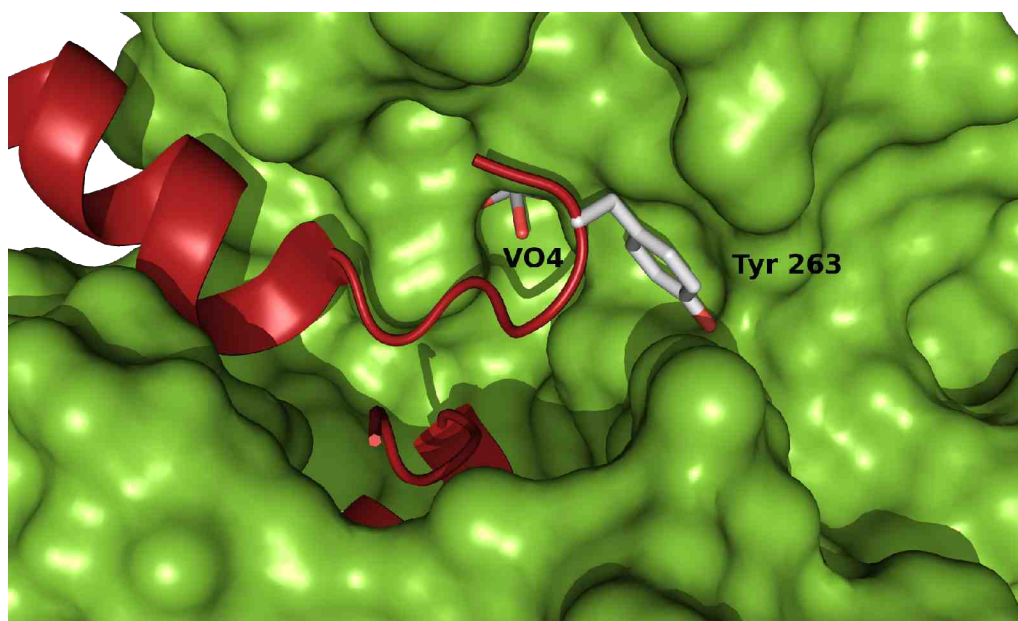
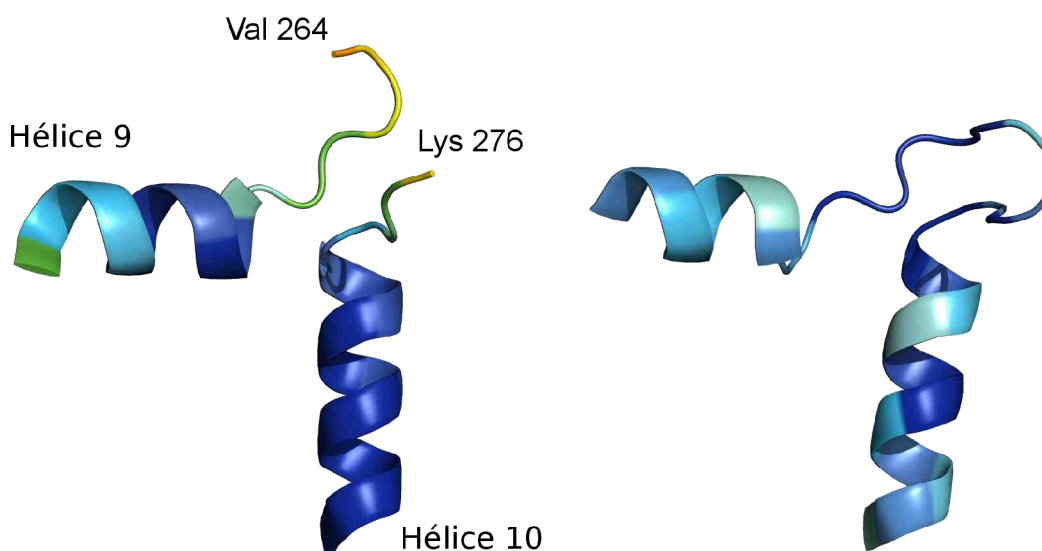


Figure IV_9 : Représentation de la boucle, entre les hélices 9 et 10, portant la tyrosine 263 devant la cavité catalytique.



*Figure IV_10 : Comparaison de la boucle entre les hélices 9 et 10 dans les structures de la vIPO1 de *Z. galactanivorans* (gauche) et *C. inaequalis* (droite). L'agitation thermique est représenté par le code couleur et va du bleu (Stable) à l'orange (Mobile).*

II.F. Phylogénie des vHPO

Afin de comprendre le rôle de cette enzyme chez *Z. galactanivorans*, nous avons cherché à déterminer sa position dans l'arbre phylogénétique des vHPO (Figure IV_12). Comme le montre la figure IV_11, l'ensemble des séquences se divisent en trois clades bien distincts.

Dans le clade du bas de cet arbre, nous retrouvons les algues rouges et les algues brunes mais également des cyanobactéries ainsi que des Firmicutes (Bactéries Gram +). Il est important de noter que les vHPO de cyanobactéries sont à la base de ce clade. Il est bien établi que les plastes des algues rouges, des algues vertes et des plantes dérivent de l'endosymbiose primaire d'une cyanobactérie ancestrale (Reyes-Prieto et al., 2007). La position basale des vHPO de cyanobactéries est en accord avec l'hypothèse que les algues rouges ont acquis leur vHPO des cyanobactéries lors de l'endosymbiose primaire. De même, la position des vHPO d'algues brunes suggère que ces organismes photosynthétiques ont obtenu ce type d'enzymes des algues rouges lors de l'endosymbiose secondaire. En effet, le plaste des algues brunes dérive d'une algue rouge ancestrale (Reyes-Prieto et al., 2007).

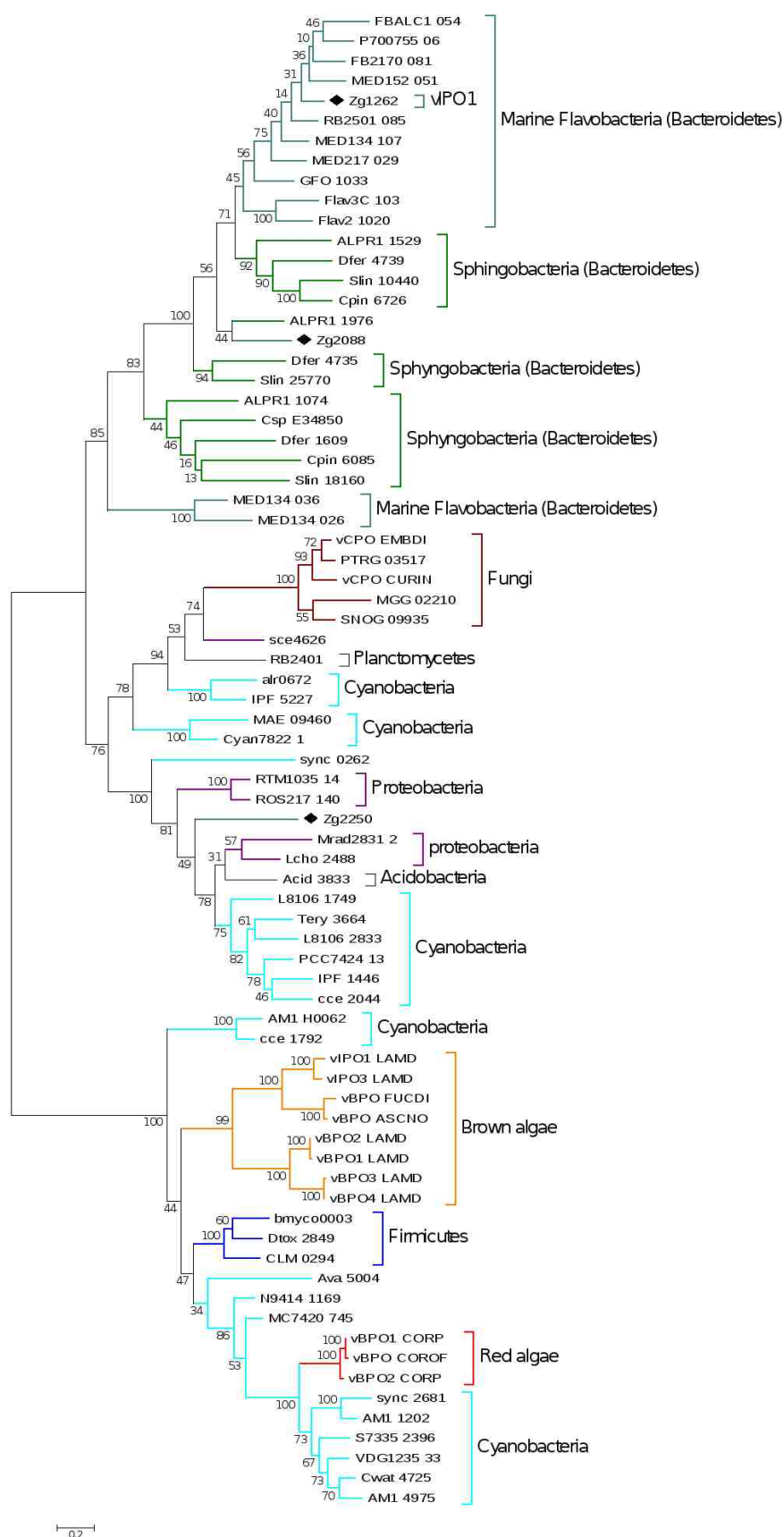
Le deuxième clade en haut de l'arbre, est constitué uniquement de procaryotes, des

flavobactéries marines et des Sphingobactéries marines et terrestres. Ce clade inclut deux vHPO de *Z. galactanivorans*, Zg-1262 (vIPO1) et Zg-2088. Les vHPO sont donc relativement répandue chez les procaryotes, et particulièrement dans le milieu marin. Il est fort vraisemblable que ce groupe comprenne non seulement des iodo-péroxydases mais également des bromo et chloro-péroxydases.

Le troisième clade (central) est constitué par des vHPO de divers phyla bactériens (cyanobactéries, protéobactéries, planctomycètes, acidobactéries et flavobactéries), et des champignons. Ce clade contient également la troisième vHPO de *Z. galactanivorans*, Zg-2250, ce qui confirme que cette vHPO est relativement distante des deux autres vHPO (Zg-1262 et Zg-2088). La position terminale des vCPO de champignons dans ce clade suggère que ces eucaryotes ont également acquis leur vHPO par transfert latéral à partir d'une bactérie, probablement du type protéobactérie puisque la chloropéroxydase bactérienne la plus proche (sce 4626) provient de *Soranguim cellulorum* (Deltaproteobacteria).

Cette analyse phylogénétique explique les différences de structure observées précédemment et montre que les iodo-péroxydases de *Z. galactanivorans* et *L. digitata* n'ont pas la même histoire évolutive, car elles appartiennent à deux clades bien distincts. La spécificité iodo-péroxydases de ces deux enzymes est donc le résultat d'une convergence fonctionnelle au sein d'une évolution divergente.

⇒ Figure IV 11 : Arbre phylogénétique des vHPO. Les ♦ indiquent les vHPO de *Z. galactanivorans*.



Cet ensemble d'informations évolutives va dans le sens de notre hypothèse sur la multimérisation, c'est-à-dire que l'enzyme ancestrale était monomérique et que l'apparition du dimère chez les algues est due à la perte du fagot d'hélices 1. En effet, les vHPO sont d'origine procaryote et ont été acquises par les eucaryotes au cours de l'évolution. La vCPO de champignon ne peut donc pas provenir d'une enzyme ancestrale proche des vBPO d'algues, comme l'avait proposé Littlechild en 2002, puisqu'elles appartiennent à deux clades différents. Les champignons ont probablement acquis leurs vCPO par transfert latéral à partir d'une protéobactérie.

II.G. Rôle de la boucle entre les hélices 9 et 10

Il est intéressant de noter que la boucle qui vient fermer la gorge catalytique dans la vIPO1 de *Z. galactanivorans* n'est présente que dans certains membres du groupe d'enzymes du même clade (Figure IV_12). Le site actif des vHPO, qui contiennent cette boucle, est donc beaucoup plus "isolé"/protégé du solvant que celui des vHPO d'algues, de cyanobactéries, de protéobactéries et de champignons. Il est peu probable que cette boucle soit responsable de la spécificité de substrat de l'enzyme. En effet, les vHPO algales et fongiques montrent qu'il est possible de sélectionner l'halogénure sans avoir à obstruer la gorge catalytique. Cette boucle pourrait donc être une façon pour l'enzyme de protéger l'intermédiaire réactionnel péroxo-vanadate de réactions non spécifiques. Cette protection servirait notamment de prévention face à la réaction qui à haute concentration de peroxyde d'hydrogène (comme par exemple suite à un burst oxydant de l'algue), aboutit à la formation de 2-oxo-histidine, inactivant l'enzyme (Soedjak et al., 1995; Meister Winter and Butler, 1996). Une seconde hypothèse basée sur le fait que la présence de cette vIPO1 chez *Z. galactanivorans* pourrait servir à détoxifier le milieu environnant de la bactérie lors d'un burst de H_2O_2 généré par l'algue, est que la boucle sert à prévenir l'inhibition non compétitive de la fixation du H_2O_2 par le substrat halogénure (de Boer and Wever, 1988; Everett et al., 1990). L'accumulation de l'iode chez *L. digitata* et probablement chez toutes les algues, se fait dans la paroi (Verhaeghe et al., 2008), donc cette haute concentration en iode autour de la bactérie pourrait inhiber l'enzyme et ainsi freiner la détoxification du peroxyde d'hydrogène. La concentration en H_2O_2 pourrait alors atteindre un niveau létal pour *Z. galactanivorans*. Cette boucle aurait donc un rôle de régulation de l'accès au site actif.

L'obtention de structures cristallographiques des intermédiaires réactionnels, c'est-à-dire le cofacteur sous la forme peroxyo-vanadate ou en présence d'iode dans la cavité, permettrait d'apporter des informations quant au mécanisme d'hydrolyse pour ainsi comprendre le rôle exact de cette boucle. Des expériences consistant à tremper des cristaux de vIPO1 dans une solution contenant du peroxyde d'hydrogène sont actuellement en cours.

[illegible]

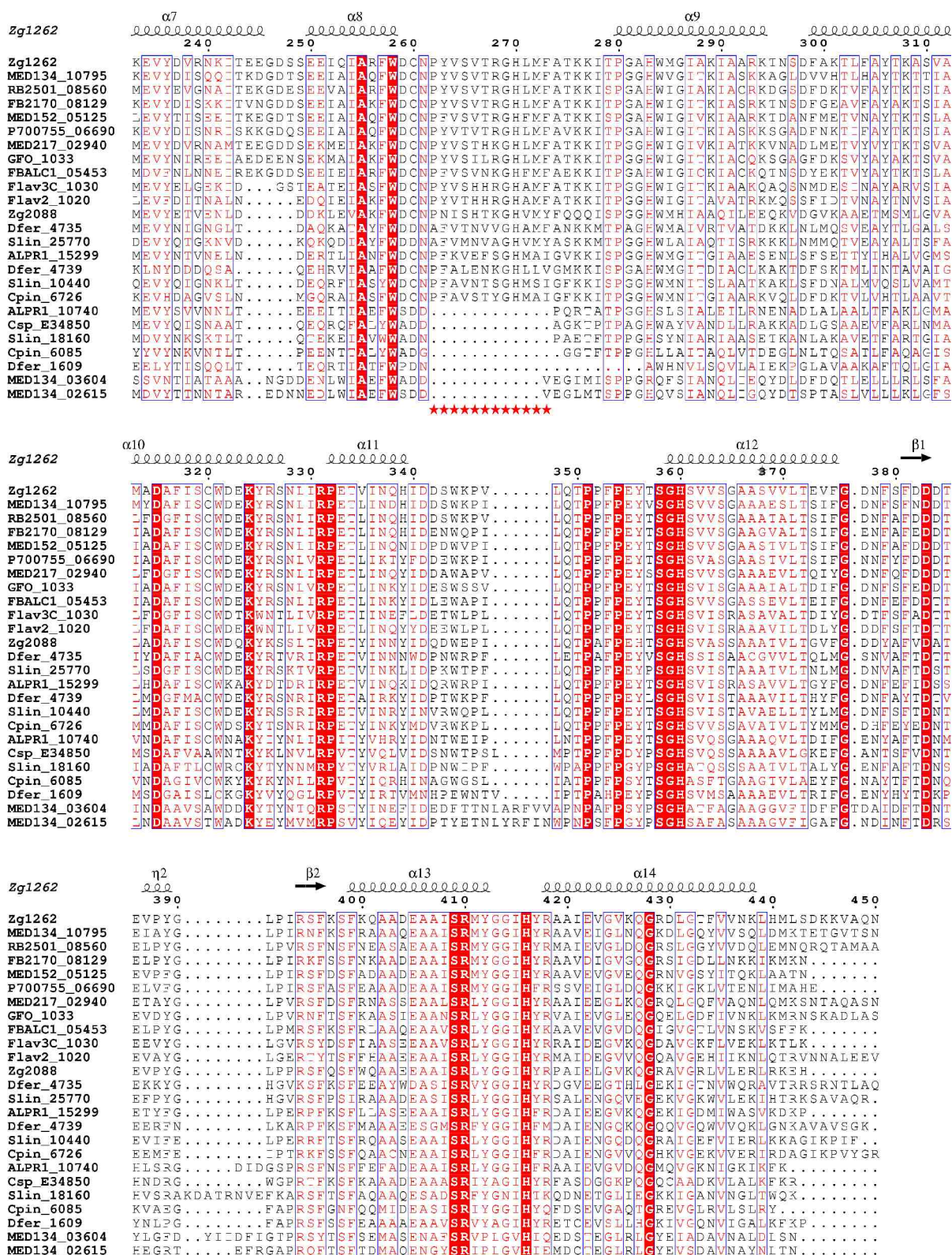


Figure IV 12 : Alignement des vHPO du clade auquel appartient la vIPO1 de *Z. galactanivorans* (Zg1262). La boucle qui couvre la cavité catalytique est signalée par des étoiles rouges.

III. Matériel et méthodes

III.A. Surexpression et purification

Le gène *vIPO1* de *Z. galactanivorans* a été cloné dans le plasmide d'expression pFO4, qui a ensuite été utilisé pour transformer la souche d'expression BL21 (DE3) de *Escherichia coli*. La surexpression de l'enzyme sélénée a été réalisée dans 200 mL de milieu auto-inducteur PASM-5052 à 20 °C pendant 10 jours.

Les cellules, resuspendues dans un tampon 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 200 mM NaCl, 100 mM KI et 50 mM imidazole, ont été lysées à l'aide d'une presse de French. Le lysat bactérien a été centrifugé 1h30 à 20 000 rpm et le surnageant chargé sur une colonne "Chelating fast flow sepharose" (GE healthcare) précédemment chargée avec des ions Ni²⁺ et équilibrée avec le même tampon que ci-dessus. La protéine a été éluée en utilisant un tampon 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 200 mM NaCl, 100 mM KI et 500 mM imidazole. Les fractions montrant la présence de la protéine par électrophorèse en gel d'acrylamide dénaturant (SDS-PAGE) sont regroupées, et le tampon a été échangé par dialyse contre un tampon 50 mM Tris pH 7,5. La protéine a ensuite été concentrée à 7,2 mg.mL⁻¹.

III.B. Cristallisation

La protéine a été cristallisée par la technique de la goutte suspendue en mélangeant 1 µL de protéine avec 0,5 µL de la solution contenue dans le puits et constituée de 23 % de PEG 1150, 100 mM de tampon phosphate/citrate pH 4,2, et 2 % de glycérol.

III.C. Collecte des données de diffraction et résolution de la structure

Un cristal de *vIPO1* a été congelé à 100 K après avoir été brièvement congelé dans une solution cryoprotectante composée de 23 % de PEG 1150, 100 mM de tampon phosphate/citrate pH 4,2, et 4 % de glycérol.

La démarche de la résolution de la structure est détaillée dans la partie résultats. Brièvement nous avons enregistré un jeu MAD à trois longueurs d'onde pour lesquelles les données ont été indexées, intégrées et mises à échelle *via* la suite de logiciels XDS (Kabsch, 1993). Le

calcul des phases a été effectué *via* la suite SHELXC/D/E (Sheldrick, 2008) en utilisant l'interface graphique HKL2MAP (Pape and Schneider, 2004). Le premier modèle a été construit de manière automatique par le logiciel ARP/WARP (Langer et al., 2008). Ce modèle a ensuite été affiné en alternant des cycles manuels *via* COOT (Emsley and Cowtan, 2004) et automatiques avec REFMAC5 (Vagin et al., 2004).

III.D. Phylogénie

Les séquences des vHPO de *Zobellia galactanivorans* ont été alignées avec leurs homologues en utilisant MAFFT, via une méthode d'affinement itérative et une matrice d'évaluation des scores Blosum62 (Kato et al., 2002). L'arbre phylogénétique est dérivé de cet alignement par une méthode basée sur le maximum de vraisemblance en utilisant le programme PhyML (Guindon & Gascuel, 2003). La fiabilité de l'arbre a été testée par une analyse statistique "bootstrap" avec 100 re-échantillonnages des données. L'arbre a été affiché avec MEGA (Kumar et al., 2004).

Conclusions et perspectives

Conclusions et perspectives

Les interactions entre les bactéries marines hétérotrophes et les algues sont un champ de recherche aussi vaste que l'océan. Les trois gouttes d'eau que j'ai apportées au cours de ma thèse ont consisté en :

- La caractérisation enzymatique de protéines bactériennes impliquées dans la dégradation du ι -carraghénane, un polysaccharide de la paroi d'algues rouges.
- La caractérisation biochimique et structurale de nouvelles enzymes impliquées dans la dégradation de polysaccharides marins.
- L'étude structurale d'une enzyme qui pourrait être impliquée dans les mécanismes de résistance aux systèmes de défense algale.

1. Les iota-carraghénases de la famille GH 82

Les iotases étaient jusqu'à présent représentées par deux membres dont la structure consiste en une hélice β catalytique et deux domaines additionnels (A et B) en position C-terminale. J'ai montré au cours de cette thèse que cette forme n'est pas unique même s'il apparaît que ce soit la plus répandue. Les deux séquences, CgiA2_Zg et CgiA3_Zg, plus courte, identifiées dans le génome de *Z. galactanivorans*, montrent qu'il existe des systèmes de dégradation du ι -carraghénane à plusieurs composantes. Il n'a pas été possible de pousser plus loin la caractérisation biochimique et structurale de ces deux nouvelles séquences du fait que nous n'arrivons pas pour le moment à surexprimer CgiA2_Zg et que CgiA3_Zg, qui est uniquement surexprimée avec une queue GST est récalcitrante à la purification sous cette forme. Mais ces nouvelles séquences de GH 82 ont permis de diriger des expériences de mutagenèse à partir de la séquence d'*Alteromonas fortis*. Nous avons ainsi identifié les deux résidus catalytiques de la famille 82, qui sont l'acide glutamique 245 et l'acide aspartique 247. Et la comparaison des paramètres cinétiques mesurés de différents mutants à ceux de l'enzyme native, montre l'importance des résidus Gln222, His281 et Glu310 dans la mécanique catalytique de cette enzyme. Gln222 positionne de façon optimale la molécule d'eau catalytique, His281 et Glu310 stabilise la tyrosine 341 qui interagit avec le substrat. De plus, l'orientation de la chaîne latérale de Gln222 est fixée par un ion chlorure. Et comme le

montre la structure apo que j'ai résolue, la perte de cet ion chlorure induit une déstructuration du réseau d'eau au sein du site actif. La présence de cet ion chlorure, dans une poche très spécifique et positionnant la Gln222 implique qu'il existe un événement additionnel à l'effet de charge. Très probablement l'électronégativité du chlorure doit induire des délocalisations de charges au sein de ce site actif et ainsi conférer à d'autres composants de ce système leurs propriétés fonctionnelles.

Afin de poursuivre l'étude de la famille 82, il serait très intéressant d'arriver à exprimer les iotases CgiA2_Zg et CgiA3_Zg. Ces deux enzymes, vraisemblablement non processives, doivent avoir une activité sur le ι-carraghénane qui est différente de CgiA1. La compréhension de leurs activités permettrait d'établir la séquence des premières étapes de la voie métabolique du carraghénane chez *Z. galactanivorans*. De plus, ces enzymes devraient avoir un nombre de sous-sites de fixation du ι-carraghénane différent des séquences de type CgiA1, ce qui devrait générer des produits de dégradation différents. Pour cette raison, l'intérêt d'obtenir ces enzymes pures est crucial afin de fournir un nouvel outil enzymatique aux personnes qui cherchent à comprendre la structure du ι-carraghénane au sein de la paroi d'algues rouges.

Maintenant que nous avons les premières mutantes inactives de la iotase d'"*A. fortis*", l'obtention d'une structure cristallographique d'un complexe avec un octa- ou un decasaccharides devient possible. Cela permettrait d'observer d'une part le positionnement du ι-carraghénane dans les sous-sites -1 et -2 qui est probablement différent de celui du modèle que nous avons réalisé, et d'autre part d'avoir la structure du domaine A dans sa position totalement fermée.

Il faudrait également être attentif aux nouvelles séquences qui pourraient être déposées dans les banques données, et envisager de caractériser les plus divergentes afin de peut-être identifier une nouvelle spécificité dans cette famille 82.

II. Identification et caractérisation d'une nouvelle famille de glycoside hydrolases

Nous avons vraisemblablement identifiés une nouvelle famille de GH à partir des cinq séquences identifiées dans le génome de *Z. galactanivorans*. J'ai surexprimé et purifié deux

membres (Zg-3597 et Zg-4663) de cette nouvelle famille et entreprit des études biochimiques et structurales. Malgré le fait que ces deux enzymes appartiennent à de potentiels opérons impliqués dans la dégradation de galactane sulfaté, nous n'avons pas encore identifié leurs substrats. Néanmoins, nous savons déjà que ces enzymes ne sont pas stables à des températures supérieures à 30°C. D'un point de vue structurale ces enzymes devraient avoir un repliement de type β -propeller. Zg-3597 dimérise alors que Zg-4663 reste monomérique. La structure à basse résolution obtenue par SAXS de Zg-3597 va dans le sens d'un dimère de β -propeller. En revanche l'interface entre les deux dimères semble tout à fait particulière et seule la résolution de la structure cristallographique permettra de comprendre comment interagissent les deux monomères.

Le travail sur cette famille devra tout d'abord se poursuivre dans les deux voies initiées au cours de mon travail. C'est-à-dire l'identification du substrat d'au moins une des deux enzymes, et la résolution de leurs structures cristallographiques. Pour identifier les substrats de ces enzymes nous allons devoir élargir la gamme de polysaccharides potentiels, notamment en réalisant des extraits d'algues, de plantes verte marine et d'animaux marins comme l'oursin, l'acidies ou le poisson. Pour résoudre les structures cristallographiques, la meilleure option semble être de recommencer une production de l'enzyme Zg-4663, qui est l'enzyme qui cristallise le mieux, sous forme seléno-méthionilée, mais avec des variations des tampons de purification afin que l'enzyme reste soluble. En se basant ensuite sur la structure et les alignements de séquences, il devrait être possible de proposer des candidats en tant que résidus catalytiques. Des expériences de mutagenèse seront alors à envisager afin d'identifier expérimentalement ces résidus. De plus, l'identification d'un substrat permettra alors de déterminer le mécanisme d'hydrolyse (Inversion ou rétention de configuration anomérique) ainsi que le mode d'action de l'enzyme (endo, exo et peut-être processif).

III. Une iodo-péroxydase dépendante du vanadium de *Zobellia galactanivorans*

Au cours de ma thèse, j'ai pu collaborer sur le sujet des halo-péroxydases dépendantes du vanadium et résoudre la première structure cristallographique d'une vHPO bactérienne qui De plus, s'avère être une vIPO. L'étude phylogénétique des vHPO réalisée ici montre que cette

enzyme est le seul membre caractérisé d'un clan de vHPO constitué uniquement de bactéries, principalement marines. En combinant cette phylogénie à l'étude topologique des cinq structures disponibles de vHPO, nous proposons un nouveau modèle évolutif de cette classe d'enzyme. L'enzyme ancestrale était monomérique et formée par l'association de deux fagots de cinq hélices α . L'acquisition de ces enzymes par les algues rouges à la suite de l'endosymbiose primaire a abouti à la perte du fagot en N-terminal et la dimérisation des vHPO. Les algues brunes qui ont acquis leur fonction vHPO à la suite de l'endosymbiose secondaire ont donc des enzymes similaires à celle des algues rouges, alors que les champignons ont acquis la fonction vHPO par transfert latéral depuis une bactérie et ont donc des vHPO similaires à celles-ci. La vIPO1 de *Z. galactanivorans* a également révélé une régulation originale de l'accès à la cavité catalytique. En effet, alors que la cavité catalytique est accessible au solvant dans les structures de champignon et d'algues, chez *Z. galactanivorans* l'entrée de cette cavité est bouchée par une boucle qui joue un rôle de couvercle. Nous ne pouvons pas encore conclure sur le rôle exact de cette boucle mais nous pensons qu'elle doit avoir une fonction de protection de l'intermédiaire réactionnel peroxyvanadate ou une régulation de l'accès au site actif des substrats dans le but d'empêcher une inhibition par le substrat.

Pour expliquer le rôle de la boucle qui protège la cavité catalytique, l'obtention de la structure de la vIPO1_Zg en complexe avec l'intermédiaire réactionnel peroxyvanadate et en complexe avec un ion iodure, pourrait apporter des informations quant au rôle de cette boucle. Dans cette structure, cette boucle pourrait être visible, ce qui permettrait de montrer à quelles étapes elle existe en position ouverte. La comparaison biochimique et structurale avec une vHPO du même clan, qui ne possède pas cette boucle pourrait également servir à expliquer non seulement le rôle de la boucle "couvercle", mais également les mécanismes de sélection de l'halogénure. Il serait d'ailleurs très intéressant d'étudier plusieurs séquences du clan auquel appartient la vIPO1_Zg, pour avoir une preuve expérimentale qu'il existe dans ce clan non seulement des iodo- mais également des bromo- et chloro-péroxydases. De plus, une étude biochimique sur la troisième enzyme de *Z. galactanivorans* (Zg-2250), qui appartient au même clan que les vCPO de champignons et qui est relativement proche des vHPO de protéobactéries, pourrait apporter des informations sur la spécificité de ce clan.

Ce chapitre sur la vIPO1 de *Z. galactanivorans* traite d'un sujet relativement éloigné des deux autres chapitres sur des glycoside hydrolases. Mais il existe un point de comparaison entre les vHPO et les iotases de la famille 82. En effet, il existe chez les iotases une poche de fixation très spécifique de l'ion chlorure, c'est-à-dire du plus petit et du plus électronégatif des halogénures, alors que dans les vHPO la sélectivité augmente avec le diamètre de halogénure et donc la diminution de l'électronégativité. Mais dans les deux cas, interviennent des résidus hydrophobes et notamment des phénylalanines. La compréhension des mécanismes qui régissent la sélectivité de l'une des poches peut donc fournir des informations à la compréhension de la seconde.

IV. Perspectives générales

Les résultats biochimiques et structurales obtenus au cours de cette thèse sont importants pour comprendre le fonctionnement de ces différentes enzymes impliquées dans les interactions entre la bactérie et l'algue sur laquelle elle se trouve. Mais cela ne répond pas aux questions sur comment la bactérie utilise ces enzymes, c'est-à-dire à quel moment ces enzymes vont elles être exprimées ? Quels sont leurs taux d'expression ? Existe-t-il une expression constitutive ? Dans le but d'intégrer ces résultats dans un contexte systémique, il pourrait être envisagé de réaliser des expériences de transcriptomique et / ou de protéomique et de comparer les résultats lorsque la bactérie est cultivée dans différentes conditions. Pour les GH 82 de *Zobellia galactanivorans*, une comparaison de l'expression des trois gènes en présence ou non de ι -carraghénane permettrait de montrer si une ou plusieurs iotases sont exprimées de manière constitutive et quelles sont celles qui sont exprimées en présence de ι -carraghénane. Pour celles dont l'expression serait constitutive, nous pourrions observer des variations d'expression. Ces données, fourniraient donc des informations sur l'activation des trois gènes de iotases lorsque *Z. galactanivorans* est en présence de ι -carraghénane et donc lorsqu'elle se trouve sur une paroi d'algue rouge carraghénophyte. Des expériences similaires peuvent être reproduites pour les vHPO de *Z. galactanivorans*. Il faudrait cultiver *Z. galactanivorans* en présence d'iodure ou de peroxyde d'hydrogène et comparer les résultats d'expression à ceux obtenus depuis une culture dépourvue des deux inducteurs testés. En revanche, pour les nouvelles enzymes Zg-3597 et Zg-4663, l'identification des substrats reste

une priorité. Et lorsque, au moins un des deux substrats aura été identifié il sera possible de reproduire le même type d'expériences que celle proposées pour les GH 82 et les vHPO. Il sera de plus, intéressant de regarder la taille des ARN messagers et quelles sont les gènes transcrits sur cet ARNm afin de connaître la longueur exacte de l'opéron putatif et quels sont les gènes qu'il comprend.

Mes travaux sur ces différentes enzymes sont les suites de l'analyse du génome de *Z. galactanivorans* et abordent différents aspects de recherche comme la caractérisation de métabolismes originaux ou l'étude de nouvelles enzymes. Mais le coté expérimental qui vise à confirmer les hypothèses issues de l'analyse des génomes peut être fastidieux, frustrant et ingrat. C'est-à-dire qu'il faut parfois plusieurs années pour caractériser biochimiquement, enzymatiquement et structuralement une protéine alors que les hypothèses sur cette protéine ont été réalisées en quelques heures. Avant l'ère de la génomique et même encore un peu aujourd'hui, la démarche était de partir d'une fonction, remonter à la protéine et ensuite identifier le gène. De nos jours, la démarche est en quelque sorte inversée, le gène est connu, parfois la fonction et on cherche à caractériser la protéine. Avec l'augmentation rapide du nombre de génomes (un peu plus de 1000 génomes complets à fin 2009) (<http://genomesonline.org>), le nombre de séquences publiées augmente beaucoup plus vite que le nombre de séquences caractérisées. Néanmoins, pour tenter de combler cet écart entre les séquences prédites et les séquences caractérisées, il a été mis en place des programmes de clonages et de surexpression à moyen et haut débit. Les résultats de ces programmes sont d'environ 45 % de protéines surexprimées solubles (O'Toole et al., 2004). Ceci n'est qu'une première étape vers la caractérisation d'une protéine. Il faut ensuite trouver par exemple le partenaire de la protéine ou son activité enzymatique, or il n'existe que pour quelques sujets et techniques, des tests à haut débit (Kinases, cristallisation) pour y arriver. De manière générale, le travail s'effectue au cas par cas. D'autant plus que chaque protéine est unique et est donc active dans une gamme de paramètres qui lui sont propres (pH, salinité, température) et qu'il faut identifier. Néanmoins, certaines protéines s'accordent très bien à des protocoles standards utilisés, et leur caractérisation est alors grandement facilitée, par exemple ici la vIPO1 de *Z. galactanivorans*. Mais d'autres protéines ont besoin de protocoles spécifiques aux différentes étapes du fait de leurs propriétés particulières. Et ce sont ces difficultés expérimentales qui poussent les chercheurs à concevoir de nouvelles expériences, et explorer

d'autres techniques. Par exemple, la non obtention de cristaux de la protéine Zg-3597, m'a fait me tourner vers le SAXS. Et j'ai alors appris *via* cette technique des informations importantes sur mon enzyme, mais j'ai surtout découvert une technique que je peux maintenant appliquer à d'autres sujets. La difficulté technique permet donc de garder un esprit ouvert, favorable à une recherche originale.

Références

Références

A

- van Aalten DM, Synstad B, Brurberg MB, Hough E, Riise BW, Eijsink VG, and Wierenga RK. **2000**. Structure of a two-domain chitotriosidase from *Serratia marcescens* at 1.9Å resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97:5842-5847.
- Abdel-Fattah AF, Hussein MM, and Salem HM. **1974**. Studies of the purification and some properties of sargassan, a sulphated heteropolysaccharide from *Sargassum linifolium*. *Carbohydrate Research* 33:9-17.
- 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.
- Aghajari N, Feller G, Gerday C, and Haser R. **2002**. Structural basis of α -amylase activation by chloride. *Protein Sci.* 11:1435-41.
- Akagawa-Matsushita, M., Matsuo, M., Koga, Y., and Yamasato, K. **1992**. *Alteromonas atlantica* sp. nov. and *Alteromonas carrageenovora* sp. nov., bacteria that decompose algal polysaccharides. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 42:621-627.
- Almeida M, Filipe S, Humanes M, Maia MF, Melo R, Severino N, da Silva JAL, Fraústo da Silva JJR, and Wever R. **2001**. Vanadium haloperoxidases from brown algae of the Laminariaceae family. *Phytochemistry* 57:633-642.
- Anderson NS, Campbell JW, Harding MM, Rees DA, and Samuel JWB. **1969**. X-ray diffraction studies of polysaccharide sulphates: Double helix models for kappa- and iota-carrageenans. *J. Mol. Biol.* 45:85-88.
- Andrews JH. 1976. The Pathology of marine algae. *Biological Reviews* 51:211-252.
- Andrews JH. 1977. Observations on the pathology of seaweeds in the Pacific Northwest. *Botanique* 55:1019-1027.
- Aquino RS, Landeira-Fernandez AM, Valente AP, Andrade LR, and Mourão PAS. **2005**. Occurrence of sulfated galactans in marine angiosperms: evolutionary implications. *Glycobiology* 15:11-20.
- Archibald FS, and Duong MN. **1986**. Superoxide dismutase and oxygen toxicity defenses in the genus *Neisseria*. *Infect. Immun.* 51:631-641.

- Archibald FS, and Duong MN. **1984**. Manganese acquisition by *Lactobacillus plantarum*. *J. Bacteriol.* 158:1-8.
- Archibald FS, and Fridovich I. **1981a**. Manganese and defenses against oxygen toxicity in *Lactobacillus plantarum*. *J. Bacteriol.* 145:442-451.
- Archibald FS, and Fridovich I. **1981b**. Manganese, superoxide dismutase, and oxygen tolerance in some lactic acid bacteria. *J. Bacteriol.* 146:928-936.
- Armand S, Wagemaker MJ, Sánchez-Torres P, Kester HC, van Santen Y, Dijkstra BW, Visser J, and Benen JA. **2000**. The active site topology of *Aspergillus niger* endopolygalacturonase II as studied by site-directed mutagenesis. *J. Biol. Chem.* 275:691-696.
- Arnott S, Scott WE, Rees DA, and McNab CGA. **1974**. i-Carrageenan: Molecular structure and packing of polysaccharide double helices in oriented fibres of divalent cation salts. *J. Mol. Biol.* 90:253-256.
- B**
- Baldauf, Sandra L. **2008**. An Overview of the phylogeny and diversity of eukaryotes. *JSE* 46:263-273.
- Baldrige, C. W. , and Gerard, R. W. **1932**. The Extra respiration of phagocytosis. *Am. J. Physiol.* 103:235-236.
- Ban N, Nissen P, Hansen J, Moore PB, and Steitz TA. **2000**. The Complete Atomic Structure of the Large Ribosomal Subunit at 2.4 Å Resolution. *Science* 289:905-920.
- Barbeyron T, Henrissat B, and Kloareg B. **1994**. The Gene encoding the kappa-carrageenase of *Alteromonas carrageenovora* is related to β -1,3-1,4-glucanases. *Gene* 139:105-109.
- Barbeyron T, L'Haridon S, Corre E, Kloareg B, and Potin P. **2001**. *Zobellia galactanovorans* gen. nov., sp. nov., a marine species of Flavobacteriaceae isolated from a red alga, and classification of *Cytophaga uliginosa* (ZoBell and Upham 1944) Reichenbach 1989 as *Zobellia uliginosa* gen. nov., comb. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51:985-997.
- Barbeyron T, Michel G, Potin P, Henrissat B, and Kloareg B. **2000**. iota-Carrageenases constitute a novel family of glycoside hydrolases, unrelated to that of kappa-carrageenases. *J. Biol. Chem.* 275:35499-505.
- Beck T, Krasauskas A, Gruene T, and Sheldrick GM. **2008**. A magic triangle for experimental phasing of macromolecules. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 64:1179-1182.

- Bellion, C., Hamer, G. K., and Yaphe, W. **1982**. The Degradation of *Eucheuma spinosum* and *Eucheuma cottonii* carrageenans by ι -carrageenases and κ -carrageenases from marine bacteria. *Can. J. Microbiol.* 28:874-880.
- 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.
- Bilan MI, Vinogradova EV, Shashkov AS, and Usov AI. **2007**. Structure of a highly pyruvylated galactan sulfate from the Pacific green alga *Codium yezoense* (Bryopsidales, Chlorophyta). *Carbohydr. Res.* 342:586-596.
- Blanvillain S, Meyer D, Boulanger A, Lautier M, Guynet C, Denancé N, Vasse J, Lauber E, and Arlat M. **2007**. Plant carbohydrate scavenging through tonb-dependent receptors: a feature shared by phytopathogenic and aquatic bacteria. *PLoS ONE* 2:224.
- de Boer E, Plat H, Tromp MG, Wever R, Franssen MC, van der Plas HC, Meijer EM, and Schoemaker HE. **1987**. Vanadium containing bromoperoxidase: An example of an oxidoreductase with high operational stability in aqueous and organic media. *Biotechnol. Bioeng.* 30:607-610.
- de Boer E, and Wever R. **1988**. The Reaction mechanism of the novel vanadium-bromoperoxidase. A steady-state kinetic analysis. *J. Biol. Chem.* 263:12326-12332.
- 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. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:3174-3179.
- Bouarab, Potin, Correa, and Kloareg. **1999**. Sulfated oligo-saccharides Mediate the Interaction between a Marine Red Alga and Its Green Algal Pathogenic Endophyte. *Plant Cell* 11:1635-1650.
- Bouarab K. **2000**. Bases biochimiques et cellulaires des interactions plante-pathogène dans le système *Chondrus crispus* - *Acrochaete operculata*. *Thèse de doctorat*.
- Brux C, Ben-David A, Shallom-Shezifi D, Leon M, Niefind K, Shoham G, Shoham Y, and Schomburg D. **2006**. The Structure of an inverting GH43 β -xylosidase from *Geobacillus stearothermophilus* with its substrate reveals the role of the three catalytic residues. *J. Mol. Biol.* 359:97-109.
- Brisson LF, Tenhaken R, and Lamb C. **1994**. Function of Oxidative Cross-Linking of Cell Wall Structural Proteins in Plant Disease Resistance. *Plant Cell* 6:1703-1712.
- Brot N, and Weissbach H. **1983**. Biochemistry and physiological role of methionine sulfoxide residues in proteins. *Arch. Biochem. Biophys.* 223:271-281.

- Brunzelle JS, Jordan DB, McCaslin DR, Olczak A, and Wawrzak Z. **2008**. Structure of the two-subsite β -d-xylosidase from *Selenomonas ruminantium* in complex with 1,3-bis[tris(hydroxymethyl)methylamino]propane. *Arch. Biochem. Biophys.* 474:157-166.
- Burke C, Kjelleberg S, and Thomas T. **2009**. Selective extraction of bacterial DNA from the surfaces of macroalgae. *Appl. Environ. Microbiol.* 75:252-256.
- Butler A. **1999**. Mechanistic considerations of the vanadium haloperoxidases. *Coordination Chemistry Reviews* 187:17-35.
- Butler A, and Carter-Franklin JN. **2004**. The Role of vanadium bromoperoxidase in the biosynthesis of halogenated marine natural products. *Nat. Prod. Rep.* 21:180-188.

C

- Cantarel BL, Coutinho PM, Rancurel C, Bernard T, Lombard V, and Henrissat B. **2009**. The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics. *Nucleic Acids Res.* 37:D233-238.
- Carpita NC, and Gibeaut DM. **1993**. Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *The Plant Journal* 3:1-30.
- Carter-Franklin JN, Parrish JD, Tschirret-Guth RA, Little RD, and Butler A. **2003**. Vanadium haloperoxidase-catalyzed bromination and cyclization of terpenes. *J. Am. Chem. Soc.* 125:3688-3689.
- Cases I, and de Lorenzo V. **2005**. Genetically modified organisms for the environment: stories of success and failure and what we have learned from them. *Int. Microbiol.* 8:213-222.
- Castro MO, Pomin VH, Santos LL, Vilela-Silva AC, Hirohashi N, Pol-Fachin L, Verli H, Mourão PA. **2009**. A unique 2-sulfated beta-galactan from the egg jelly of the sea urchin *Glyptocidaris crenularis*: conformation flexibility versus induction of the sperm acrosome reaction. *The Journal of Biological Chemistry* 284(28):18790-18800.
- Chevolot L, Mulloy B, Ratiskol J, Foucault A, and Collicec-Jouault S. **2001**. A Disaccharide repeat unit is the major structure in fucoidans from two species of brown algae. *Carbohydrate Research* 330:529-535.
- Cho, SW, Lee, S, Shin W. **2001**. The X-ray structure of *Aspergillus aculeatus* polygalacturonase and a modeled structure of the polygalacturonase-octagalacturonate complex. *J Mol Biol.* 311(4), 863-878.

- Clantin B, Hodak H, Willery E, Loch C, Jacob-Dubuisson F, Villeret V. **2004**. The Crystal structure of filamentous hemagglutinin secretion domain and its implications for the two-partner secretion pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(16), 6194-6199.
- Coassin M, Ursini F, and Bindoli A. **1992**. Antioxidant effect of manganese. *Arch. Biochem. Biophys* 299:330-333.
- 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. *J. Biol. Inorg. Chem.* 10:156-166.
- 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. *J. Biol. Chem.* 278:23545-23552.
- Colin S. **2005**. Développement d'enzymes recombinants issus des bactéries marines *P. carageenovora* et SW5 pour la production d'oligos-fucoïdanes et d'oligos-Lambda carraghénanes. *Thèse de doctorat*.
- Colin S, Deniaud E, Jam M, Descamps V, Chevolot Y, Kervarec N, Yvin J, Barbeyron T, Michel G, and Kloareg B. **2006**. Cloning and biochemical characterization of the fucanase FcnA: definition of a novel glycoside hydrolase family specific for sulfated fucans. *Glycobiology* 16:1021-1032.
- Collén PN, Lemoine M, Daniellou R, Guégan J, Paoletti S, and Helbert W. **2009**. Enzymatic Degradation of kappa-Carrageenan in Aqueous Solution. *Biomacromolecules* 10(7):1757–1767
- Collins T, De Vos D, Hoyoux A, Savvides SN, Gerday C, Van Beeumen J, and Feller G. **2005**. Study of the active site residues of a glycoside hydrolase family 8 xylanase. *J. Mol. Biol.* 354:425-435.
- Compan I, and Touati D. **1993**. Interaction of six global transcription regulators in expression of manganese superoxide dismutase in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* 175:1687-1696.
- Conway B, and Greenberg EP. **2002**. Quorum-sensing signals and quorum-sensing genes in *Burkholderia vietnamiensis*. *J. Bacteriol.* 184:1187-1191.
- Correa JA, and Sánchez PA. **1996**. Ecological aspects of algal infectious diseases. *Hydrobiologia* 326-327:89-95.
- Cosse A. **2007**. Analyse du transcriptome des réponses de défense de l'algue brune *Laminaria digitata*. *Thèse de doctorat*.

- Cosse, A., Leblanc, C. & Potin, P., **2008**. Dynamic Defense of Marine Macroalgae Against Pathogens: From Early Activated to Gene Regulated Responses. *Advances in Botanical Research* 46:221-266.
- Courtois B. **1813**. Découverte d'une substance nouvelle dans le Vareck. *Annales de chimie* 88:304-310.
- Craigie, J. **1990**. Cell Walls. Biology of the red algae. K. Cole and R. Sheath. Cambridge university Press. Cambridge.
- Czerwinski EW, Midoro-Horiuti T, White MA, Brooks EG, Goldblum RM. **2005**. Crystal structure of Jun a 1, the major cedar pollen allergen from *Juniperus ashei*, reveals a parallel beta-helical core. *J Biol Chem* 280(5), 3740-3746.

D

- Dalisay DS, Webb JS, Scheffel A, Svenson C, James S, Holmström C, Egan S, and Kjelleberg S. **2006**. A mannose-sensitive haemagglutinin (MSHA)-like pilus promotes attachment of *Pseudoalteromonas tunicata* cells to the surface of the green alga *Ulva australis*. *Microbiology* 152:2875-2883.
- Daniel R, Berteau O, Jozefonvicz J, and Goasdoue N. **1999**. Degradation of algal *Ascophyllum nodosum* fucoidan by an enzymatic activity contained in digestive glands of the marine mollusc *Pecten maximus*. *Carbohydrate Research* 322:291-297.
- Daniel R, Berteau O, Chevolut L, Varenne A, Gareil P, and Goasdoue N. **2001**. Regioselective desulfation of sulfated L-fucopyranoside by a new sulfoesterase from the marine mollusk *Pecten maximus*: application to the structural study of algal fucoidan *Ascophyllum nodosum*. *Eur. J. Biochem.* 268:5617-5626.
- Day DF, and Yaphe W. **1975**. Enzymatic hydrolysis of agar: purification and characterization of neoagarobiose hydrolase and p-nitrophenyl α -galactoside hydrolase. *Can. J. Microbiol.* 21:1512-1518.
- Descamps V, Colin S, Lahaye M, Jam M, Richard C, Potin P, Barbeyron T, Yvin J, and Kloareg B. **2006**. Isolation and culture of a marine bacterium degrading the sulfated fucans from marine brown algae. *Mar. Biotechnol.* 8:27-39.
- Duarte MER, Nosedá MD, Cardoso MA, Tulio S, and Cerezo AS. **2002**. The Structure of a galactan sulfate from the red seaweed *Bostrychia montagnei*. *Carbohydrate Research* 337:1137-1144.
- Dubrac S, and Touati D. **2000**. Fur Positive Regulation of Iron Superoxide Dismutase in *Escherichia coli*: Functional Analysis of the sodB Promoter. *J. Bacteriol.* 182:3802-3808.

E

- 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). *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 146:135-143.
- Emsley P, Charles IG, Fairweather NF, Isaacs NW. **1996**. Structure of *Bordetella pertussis* virulence factor P.69 pertactin. *Nature* 381(6577), 90-92.
- Emsley P, Cowtan K. **2004**. Coot : model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 60:2126-2132.
- Ernie Liu T, M'Timkulu T, Geigert J, Wolf B, Neidleman SL, Silva D, and Hunter-Cevera JC. 1987. Isolation and characterization of a novel nonheme chloroperoxidase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 142:329-333.
- Esterbauer H, Steiner W, Labudova I, Hermann A, and Hayn M. **1991**. Production of *Trichoderma* cellulase in laboratory and pilot scale. *Bioresource Technology* 36:51-65.
- Evans G, and Pettifer RF. **2001**. CHOOCH: a program for deriving anomalous-scattering factors from X-ray fluorescence spectra. *J Appl Cryst.* 34:82-86.
- Everett RR, Soedjak HS, and Butler A. **1990**. Mechanism of dioxygen formation catalyzed by vanadium bromoperoxidase. Steady state kinetic analysis and comparison to the mechanism of bromination. *J Biol Chem.* 265:15671-15679.
- Everett RR, and Butler A. **1989**. Bromide-assisted hydrogen peroxide disproportionation catalyzed by vanadium bromoperoxidase: absence of direct catalase activity and implications for the catalytic mechanism. *Inorganic Chemistry* 28:393-395.

F

- Farias EHC, Pomin VH, Valente A, Nader HB, Rocha HAO, and Mourão PAS. **2008**. A Preponderantly 4-sulfated, 3-linked galactan from the green alga *Codium isthmocladum*. *Glycobiology* 18:250-259.
- Farr, S.B. & Kogoma, T., **1991**. Oxidative stress responses in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Microbiological Reviews* 55(4), 561-585.
- Faulkner DJ. **2002**. Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.* 19:1-48.

- Federici L, Caprari C, Mattei B, Savino C, Di Matteo A, De Lorenzo G, Cervone F, Tsernoglou D. **2001**. Structural requirements of endopolygalacturonase for the interaction with PGIP (polygalacturonase-inhibiting protein). *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(23), 13425-13430.
- Feller G, Bussy O, Houssier C, and Gerday C. **1996**. Structural and functional aspects of chloride binding to *Alteromonas haloplanctis* α -amylase. *J. Biol. Chem.* 271:23836-41.
- Fülöp V, Ridout CJ, Greenwood C, Hajdu J. **1995**. Crystal structure of the di-haem cytochrome c peroxidase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Structure* 3(11), 1225-1233.
- G**
- Galperin MY. **2004**. Bacterial signal transduction network in a genomic perspective. *Environmental Microbiology* 6:552-567.
- Garcia-Brugger A, Lamotte O, Vandelle E, Bourque S, Lecourieux D, Poinssot B, Wendehenne D, and Pugin A. **2006**. Early signaling events induced by elicitors of plant defenses. *Mol. Plant Microbe Interact.* 19:711-724.
- Garcia-Rodriguez E, Ohshiro T, Aibara T, Izumi Y, and Littlechild J. **2005**. Enhancing effect of calcium and vanadium ions on thermal stability of bromoperoxidase from *Corallina pilulifera*. *Journal of Biological Inorganic Chemistry* 10:275-282.
- Glöckner FO, Kube M, Bauer M, Teeling H, Lombardot T, Ludwig W, Gade D, Beck A, Borzym K, Heitmann K, et al. **2003**. Complete genome sequence of the marine planctomycete *Pirellula* sp. strain 1. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100:8298-8303.
- Goodhew, C. F., I. B. Wilson, D. J. Hunter, and G. W. Pettigrew. **1990**. The cellular location and specificity of bacterial cytochrome c peroxidases. *Biochem. J.* 271:707-712.
- Goyal A, Ghosh B, and Eveleigh D. **1991**. Characteristics of fungal cellulases. *Bioresource Technology* 36:37-50.
- Grant R, Filman D, Finkel S, Kolter R, and Hogle J. **1998**. The Crystal structure of Dps, a ferritin homolog that binds and protects DNA. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 5:294-303.
- Greenberg JT, and Demple B. **1989**. A global response induced in *Escherichia coli* by redox-cycling agents overlaps with that induced by peroxide stress. *J. Bacteriol.* 171:3933-3939.
- Greer CW, and Yaphe W. **1984**. Purification and properties of ι -carrageenase from a marine bacterium. *Can. J. Microbiol.* 30:1500-1506.
- Gribble GW. **1998**. Naturally Occurring Organohalogen Compounds. *Accounts of Chemical Research* 31:141-152.

Guibet, Marion. **2007**. Analyse structurale des carraghénanes par hydrolyse enzymatique. *Thèse de doctorat*.

Guibet M, Boulenguer P, Mazoyer J, Kervarec N, Antonopoulos A, Lafosse M, and Helbert W. **2008**. Composition and distribution of carrabiose moieties in hybrid kappa-/iota-carrageenans using carrageenases. *Biomacromolecules* 9:408-415.

Guindon, S, Gascuel, O. **2003**. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Systematic Biology* 52(5), 696-704.

H

Ha N, Oh S, Sung JY, Cha KA, Lee MH, and Oh B. **2001**. Supramolecular assembly and acid resistance of *Helicobacter pylori* urease. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 8:505-509.

Hammond-Kosack KE, and Jones JD. **1996**. Resistance gene-dependent plant defense responses. *Plant Cell* 8:1773-1791.

Hart PJ, Pfluger HD, Monzingo AF, Hollis T, and Robertus JD. **1995**. The Refined crystal structure of an endochitinase from *Hordeum vulgare* L. seeds at 1.8 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 248:402-413.

Hasan Z, Renirie R, Kerkman R, Ruijsenaars HJ, Hartog AF, and Wever R. **2006**. Laboratory-evolved vanadium chloroperoxidase exhibits 100-fold higher halogenating activity at alkaline pH: catalytic effects from first and second coordination sphere mutations. *J. Biol. Chem.* 281:9738-9744.

Hassett DJ, Charniga L, and Cohen MS. **1990**. recA and catalase in H₂O₂-mediated toxicity in *Neisseria gonorrhoeae*. *J. Bacteriol.* 172:7293-7296.

Haug A, Larsen B, and Smidsrod O. **1966**. A Study of the Constitution of Alginic Acid by Partial Acid Hydrolysis. *Acta Chem Scand* 20:183-190.

Haug A, Larsen B, and Smidsrod O. **1967**. Studies on the Sequence of Uronic Acid Residues in Alginic Acid. *Acta Chem Scand* 21:705-712.

Hehemann J. **2009**. Structural and fonctional organisation of the enzyme system of the marine flavobacterium *Zobellia galactanivorans*. *Thèse de doctorat*.

Hemrika W, Renirie R, Macedo-Ribeiro S, Messerschmidt A, and Wever R. **1999**. Heterologous expression of the vanadium-containing chloroperoxidase from *Curvularia inaequalis* in *Saccharomyces cerevisiae* and site-directed mutagenesis of the active site residues His(496), Lys(353), Arg(360), and Arg(490). *J Biol Chem.* 274:23820-23827.

Hendrickson WA, Horton JR, and LeMaster DM. **1990**. Selenomethionyl proteins produced for analysis by multiwavelength anomalous diffraction (MAD): a vehicle for direct determination of three-dimensional structure. *EMBO J.* 9:1665-1672.

Howard BM, and Fenical W. **1976**. α - and β -snyderol; new bromo-monocyclic sesquiterpenes from the seaweed . *Tetrahedron Letters* 17:41-44.

Huang W, Matte A, Li Y, Kim YS, Linhardt RJ, Su H, Cygler M. **1999**. Crystal structure of chondroitinase B from *Flavobacterium heparinum* and its complex with a disaccharide product at 1.7 Å resolution. *J Mol Biol.* 294(5), 1257-1269.

I

Imlay JA. **1995**. A Metabolic enzyme that rapidly produces superoxide, fumarate reductase of *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* 270:19767-19777.

Irie T, Suzuki M, and Masamune T. **1965**. Laurencin, a constituent from species. *Tetrahedron Letters* 6:1091-1099.

Isupov MN, Dalby AR, Brindley AA, Izumi Y, Tanabe T, Murshudov GN, and Littlechild JA. **2000**. Crystal structure of dodecameric vanadium-dependent bromoperoxidase from the red algae *Corallina officinalis*. *J. Mol. Biol.* 299:1035-1049.

Itoh N, Izumi Y, and Yamada H. **1986**. Characterization of nonheme type bromoperoxidase in *Corallina pilulifera*. *J. Biol. Chem.* 261:5194-5200.

J

Jam M, Flament D, Allouch J, Potin P, Thion L, Kloareg B, Czjzek M, Helbert W, Michel G, and Barbeyron T. **2005**. The endo- β -agarases AgaA and AgaB from the marine bacterium *Zobellia galactanivorans*: two paralogue enzymes with different molecular organizations and catalytic behaviours. *Biochem. J.* 385:703-713.

Jenkins J, Mayans O, Smith D, Worboys K, Pickersgill RW. **2001**. Three-dimensional structure of *Erwinia chrysanthemi* pectin methylesterase reveals a novel esterase active site. *J Mol Biol.* 305(4), 951-960.

John M, Röhrig H, Schmidt J, Walden R, and Schell J. **1997**. Cell signalling by oligo-saccharides. *Trends in Plant Science* 2:111-115.

Jouanneau D. **2010**. Détermination de la composition et de la distribution des carraghénanes par hydrolyse enzymatique. *Thèse de doctorat*.

Jwa N, Agrawal GK, Tamogami S, Yonekura M, Han O, Iwahashi H, and Rakwal R. **2006**. Role of defense/stress-related marker genes, proteins and secondary metabolites in defining rice self-defense mechanisms. *Plant Physiology and Biochemistry* 44:261-273.

K

- Kabsch W. **1993**. Automatic processing of rotation diffraction data from crystals of initially unknown symmetry and cell constants. *Journal of Applied Crystallography* 26:795–800.
- Katoh K, Misawa K, Kuma K, Miyata T. **2002**. MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucl. Acids Res.* 30(14), 3059–3066.
- Kezuka Y, Ohishi M, Itoh Y, Watanabe J, Mitsutomi M, Watanabe T, and Nonaka T. **2006**. Structural studies of a two-domain chitinase from *Streptomyces griseus* HUT6037. *J. Mol. Biol.* 358:472–484.
- Kloareg B, and Quatrano RS. **1988**. Structure of the cell walls of marine algae and ecophysiological functions of the matrix polysaccharides. *Oceanogr. Mar. Biol. Annu. Rev.* 26:259–315.
- Kolender AA, Pujol CA, Damonte EB, Matulewicz MC, and Cerezo AS. **1997**. The system of sulfated from the red seaweed *Nothogenia fastigiata*: Structures, antiherpetic and anticoagulant properties. *Carbohydrate Research* 304:53–60.
- Kreger DR. **1962**. In: Physiology and Biochemistry of algae, R. A. Lewin. Academic Press. New York. p 315–335.
- Kubaneck 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. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100:6916–6921.
- Kumar, S., Tamura, K. & Nei, M., **2004**. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics* 5(2), 150–163.
- Küpper FC, Schweigert N, Ar Gall E, Legendre J, Vilter H, and Kloareg B. **1998**. Iodine uptake in Laminariales involves extracellular, haloperoxidase-mediated oxidation of iodide. *Planta* 207:163–171.
- Küpper, F.C., and Müller, D.G. **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, Gaquerel E, Boneberg E, Morath S, Salaün J, 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. *J. Exp. Bot.* 57:1991–1999.
- Küpper FC, Kloareg B, Guern J, and Potin P. **2001**. Oligoguluronates Elicit an Oxidative Burst in the Brown Algal Kelp *Laminaria digitata*. *Plant Physiol.* 125:278–291.

Küpper, F.C. et al., **2002**. Oligoalginate recognition and oxidative burst play a key role in natural and induced resistance of sporophytes of laminariales. *Journal of Chemical Ecology*, 28(10), 2057-2081.

de La Fortelle, E., and Bricogne, G., **1997**. Maximum-likelihood heavy-atom parameter refinement for multiple isomorphous replacement and multiwavelength anomalous diffraction methods. In *Macromolecular Crystallography Part A*. 276:472-494.

L

Lacombe-Harvey M, Fukamizo T, Gagnon J, Ghinet MG, Dennhart N, Letzel T, and Brzezinski R. **2009**. Accessory active site residues of *Streptomyces* sp. N174 chitosanase: variations on a common theme in the lysozyme superfamily. *FEBS J* 276:857-869.

Langer G, Cohen SX, Lamzin VS, and Perrakis A. **2008**. Automated macromolecular model building for X-ray crystallography using ARP/wARP version 7. *Nat. Protoc.* 3:1171-1179.

Larsson AM, Andersson R, Ståhlberg J, Kenne L, and Jones TA. **2003**. Dextranase from *Penicillium minioluteum*: Reaction Course, Crystal Structure, and Product Complex. *Structure* 11:1111-1121.

Laternus F, Svensson T, Wiencke C, and Oberg G. **2004**. Ultraviolet radiation affects emission of ozone-depleting substances by marine macroalgae: results from a laboratory incubation study. *Environ. Sci. Technol.* 38:6605-6609.

Leblanc C, Colin C, Cosse A, Delage L, La Barre S, Morin P, Fiévet B, Voiseux C, Ambroise Y, Verhaeghe E, et al. **2006**. Iodine transfers in the coastal marine environment: the key role of brown algae and of their vanadium-dependent haloperoxidases. *Biochimie* 88:1773-1785.

Littlechild J, Garcia Rodriguez E, and Isupov M. **2009**. Vanadium containing bromoperoxidase-insights into the enzymatic mechanism using X-ray crystallography. *J. Inorg. Biochem.* 103:617-621.

Littlechild J, Garcia-Rodriguez E, Dalby A, and Isupov M. **2002**. Structural and functional comparisons between vanadium haloperoxidase and acid phosphatase enzymes. *J. Mol. Recognit.* 15:291-296.

M

Mabeau S, Kloareg B, and Joseleau J. **1990**. Fractionation and analysis of fucans from brown algae. *Phytochemistry* 29:2441-2445.

- Macedo-Ribeiro S, Hemrika W, Renirie R, Wever R, and Messerschmidt A. **1999**. X-ray crystal structures of active site mutants of the vanadium-containing chloroperoxidase from the fungus *Curvularia inaequalis*. *J. Biol. Inorg. Chem* 4:209-219.
- Mahowald MA, Rey FE, Seedorf H, Turnbaugh PJ, Fulton RS, Wollam A, Shah N, Wang C, Magrini V, Wilson RK, et al. **2009**. Characterizing a model human gut microbiota composed of members of its two dominant bacterial phyla. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106:5859-5864.
- Malinowski R, and Filipecki M. **2002**. The Role of cell wall in plant embryogenesis. *Cell. Mol. Biol. Lett.* 7:1137-1151.
- 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 (Pt 2):283-291.
- Manley SL. **2002**. Phytogenesis of halomethanes: A product of selection or a metabolic accident? *Biogeochemistry* 60:163-180.
- Matsuo Y, Suzuki M, Kasai H, Shizuri Y, and Harayama S. **2003**. Isolation and phylogenetic characterization of bacteria capable of inducing differentiation in the green alga *Monostroma oxyspermum*. *Environ. Microbiol.* 5:25-35.
- Mayans O, Scott M, Connerton I, Gravesen T, Benen J, Visser J, Pickersgill R, Jenkins J. **1997**. Two crystal structures of pectin lyase A from *Aspergillus* reveal a pH driven conformational change and striking divergence in the substrate-binding clefts of pectin and pectate lyases. *Structure* 5(5), 677-689.
- McFiggans G, Coe H, Burgess R, Allan J, Cubison M, Alfarra MR, Saunders R, Saiz-Lopez A, Plane JMC, Wevill D, et al. **2004**. Direct evidence for coastal iodine particles from Laminaria macroalgae – linkage to emissions of molecular iodine. *Atmos. Chem. Phys.* 4:701-713.
- Medcalf DG, and Larsen B. **1977a**. Structural studies on ascophyllan and the fucose-containing complexes from the brown alga *Ascophyllum nodosum*. *Carbohydrate Research* 59:539-546.
- Medcalf DG, and Larsen B. **1977b**. Fucose-containing polysaccharides in the brown algae *Ascophyllum nodosum* and *Fucus vesiculosus*. *Carbohydrate Research* 59:531-537.
- Medcalf DG, Schneider TL, and Barnett RW. **1978**. Structural features of a novel glucuronogalactofucan from *ascophyllum nodosum*. *Carbohydrate Research* 66:167-171.
- Meister Winter GE, and Butler A. **1996**. Inactivation of Vanadium Bromoperoxidase: Formation of 2-Oxohistidine. *Biochemistry* 35:11805-11811.

- Messerschmidt A, and Wever R. **1996**. X-ray structure of a vanadium-containing enzyme: chloroperoxidase from the fungus *Curvularia inaequalis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 93:392-396.
- van der Meulen HJ, Harder W, and Veldkamp H. **1974**. Isolation and characterization of *Cytophaga flevensis* sp. nov., a new agarolytic flexibacterium. *Antonie Van Leeuwenhoek* 40:329-346.
- Mian AJ, and Percival E. **1973a**. Carbohydrates of the brown seaweeds *Himanthalia lorea* and *Bifurcaria bifurcata* : Part II. structural studies of the "fucans". *Carbohydrate Research* 26:147-161.
- Mian AJ, and Percival E. **1973b**. Carbohydrates of the brown seaweeds *Himanthalia lorea*, *Bifurcaria bifurcata*, and *Padina pavonia* : Part I. extraction and fractionation. *Carbohydrate Research* 26:133-146.
- Michel G, Chantalat L, Fanchon E, Henrissat B, Kloareg B, and Dideberg O. **2001**. The iota-carrageenase of *Alteromonas fortis*. A β -helix fold-containing enzyme for the degradation of a highly polyanionic polysaccharide. *J. Biol. Chem.* 276:40202-9.
- Michel G, Flament D, Barbeyron T, Vernet T, Kloareg B, and Dideberg O. **2000**. Expression, purification, crystallization and preliminary X-ray analysis of the iota-carrageenase from *Alteromonas fortis*. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 56:766-8.
- Michel G, Chantalat L, Duee E, Barbeyron T, Henrissat B, Kloareg B, and Dideberg O. **2001**. The kappa-carrageenase of *P. carrageenovora* Features a Tunnel-Shaped Active Site: A Novel Insight in the Evolution of Clan-B Glycoside Hydrolases. *Structure* 9:513-525.
- Michel G, Helbert W, Kahn R, Dideberg O, and Kloareg B. **2003**. The Structural bases of the processive degradation of iota-carrageenan, a main cell wall polysaccharide of red algae. *J. Mol. Biol.* 334:421-33.
- Michel G, Nyval-Collen P, Barbeyron T, Czjzek M, and Helbert W. **2006**. Bioconversion of red seaweed galactans: a focus on bacterial agarases and carrageenases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 71:23-33.
- Miller MB, and Bassler BL. **2001**. Quorum sensing in bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 55:165-199.
- Morrice LM, McLean MW, Long WF, and Williamson FB. **1983a**. β -agarases I and II from *Pseudomonas atlantica*. Substrate specificities. *Eur. J. Biochem* 137:149-154.
- Morrice LM, McLean MW, Williamson FB, and Long WF. **1983b**. β -agarases I and II from *Pseudomonas atlantica*. Purifications and some properties. *Eur. J. Biochem* 135:553-558.

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.

N

Nedashkovskaya OI, Suzuki M, Vancanneyt M, Cleenwerck I, Lysenko AM, Mikhailov VV, and Swings J. **2004**. *Zobellia amurskyensis* sp. nov., *Zobellia laminariae* sp. nov. and *Zobellia russellii* sp. nov., novel marine bacteria of the family Flavobacteriaceae. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54:1643-1648.

Numao S, Maurus R, Sidhu G, Wang Y, Overall CM, Brayer GD, and Withers SG. **2002**. Probing the role of the chloride ion in the mechanism of human pancreatic α -amylase. *Biochemistry* 41:215-25.

de Nys R, and Steinberg PD. **2002**. Linking marine biology and biotechnology. *Curr. Opin. Biotechnol.* 13:244-248.

O

O'Dowd CD, Jimenez JL, Bahreini R, Flagan RC, Seinfeld JH, Hämeri K, Pirjola L, Kulmala M, Jennings SG, and Hoffmann T. **2002**. Marine aerosol formation from biogenic iodine emissions. *Nature* 417:632-636.

O'Hagan D, Schaffrath C, Cobb SL, Hamilton JTG, and Murphy CD. **2002**. Biochemistry: Biosynthesis of an organofluorine molecule. *Nature* 416:279.

Ohshiro T, Hemrika W, Aibara T, Wever R, and Izumi Y. **2002**. Expression of the vanadium-dependent bromoperoxidase gene from a marine macro-alga *Corallina pilulifera* in *Saccharomyces cerevisiae* and characterization of the recombinant enzyme. *Phytochemistry* 60:595-601.

Ohshiro T, Nakano S, Takahashi Y, Suzuki M, and Izumi Y. **1999**. Occurrence of bromoperoxidase in the marine green macro-alga, *Ulva* lens, and emission of volatile brominated methane by the enzyme. *Phytochemistry* 52:1211-1215.

O'Toole N, Grabowski M, Otwinowski Z, Minor W, Cygler M. **2004**. The structural genomics experimental pipeline: Insights from global target lists. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 56(2), 201-210.

P

Pape T, and Schneider TR. **2004**. HKL2MAP: a graphical user interface for macromolecular phasing with SHELX programs. *J. Appl. Cryst.* 37:843-844.

Emsley P, Charles IG, Fairweather NF, and Isaacs NW. **1996**. Structure of *Bordetella pertussis* virulence factor P.69 pertactin. *Nature*, 381(6577), 90-92.

- Paul VJ, and Puglisi MP. **2004**. Chemical mediation of interactions among marine organisms. *Nat. Prod. Rep.* 21:189-209.
- Pedersén M, Collén J, Abrahamsson K, and Ekdahl A. **1996**. Production of halocarbons from seaweeds: an oxidative stress reaction? *Sci. Mar.* 60:257-263.
- Percival E, and Young M. **1974**. Carbohydrates of the brown seaweeds : Part III. *Desmarestia aculeata*. *Carbohydrate Research* 32:195-201.
- Peters WS, Hagemann W, Deri Tomos A. **2000**. What makes plants different? Principles of extracellular matrix function in 'soft' plant tissues. *Comp. Biochem. Physiol., Part A Mol. Integr. Physiol.* 125:151-167.
- Petersen TN, Kauppinen S, Larsen S. **1997**. The crystal structure of rhamnogalacturonase A from *Aspergillus aculeatus*: a right-handed parallel beta helix. *Structure*, 5(4), 533-544.
- Plat H, Krenn B E, and Wever R. **1987**. The bromoperoxidase from the lichen *Xanthoria parietina* is a novel vanadium enzyme. *Biochemical journal* 248:277-279.
- Pomposiello PJ, Bennik MHJ, and Demple B. **2001**. Genome-Wide Transcriptional Profiling of the *Escherichia coli* Responses to Superoxide Stress and Sodium Salicylate. *J. Bacteriol.* 183:3890-3902.
- Popper ZA. **2008**. Evolution and diversity of green plant cell walls. *Current Opinion in Plant Biology* 11:286-292.
- Potin P, Bouarab K, Kupper F, and Kloareg B. **1999**. Oligo-saccharide recognition signals and defence reactions in marine plant-microbe interactions. *Current Opinion in Microbiology* 2:276-283.
- Potin P, Bouarab K, Salaün J, Pohnert G, and Kloareg B. **2002**. Biotic interactions of marine algae. *Curr. Opin. Plant Biol.* 5:308-317.
- Potin P, Sanseau A, Gall Y, Rochas C, and Kloareg B. **1991**. Purification and characterization of a new kappa-carrageenase from a marine *Cytophaga*-like bacterium. *European Journal of Biochemistry* 201:241-247.
- Potin P. **1992**. Recherche, production et caractérisation de galactane-hydrolases pour le préparation d'oligosaccharides des parois d'algues rouges. *Thèse de doctorat*.

R

- Rabinovich ML, Melnick MS, and Bolobova AV. **2002a**. The structure and mechanism of action of cellulolytic enzymes. *Biochemistry Mosc* 67:850-871.

- Rabinovich ML, Melnik MS, and Bolobova AV. **2002b**. Dedicated to the memory of I.V. Berezin and R.V. Feniksova Microbial Cellulases (Review). *Applied Biochemistry and Microbiology* 38:305-322.
- Radman R, Saez T, Bucke C, and Keshavarz T. **2003**. Elicitation of plants and microbial cell systems. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 37(Pt 1), 91-102.
- 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 Pt 12:3237-3244.
- Raugei S, Carloni P. **2006**. Structure and function of vanadium haloperoxidases. *J Phys Chem. B* 110:3747-3758.
- Reiter W. **2002**. Biosynthesis and properties of the plant cell wall. *Current Opinion in Plant Biology* 5:536-542.
- de Reviers, Bruno. **2002**. *Biologie et phylogénie des algues*. Editions Belin.
- Reyes-Prieto A, Weber APM, and Bhattacharya D. **2007**. The origin and establishment of the plastid in algae and plants. *Annu. Rev. Genet.* 41:147-168.
- Romanenko LA, Zhukova NV, Rohde M, Lysenko AM, Mikhailov VV, and Stackebrandt E. **2003**. *Pseudoalteromonas agarivorans* sp. nov., a novel marine agarolytic bacterium. *Int J. Syst. Evol. Microbiol.* 53:125-131.
- Ross AG. **1953**. Some typical analyses of red seaweeds. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 4:333-335.
- Roszak AW, Robinson DA, Krell T, Hunter IS, Fredrickson M, Abell C, Coggins JR, and Laphorn AJ. **2002**. The Structure and Mechanism of the Type II Dehydroquinase from *Streptomyces coelicolor*. *Structure* 10:493-503.
- Rouvinen J, Bergfors T, Teeri T, Knowles J, and Jones T. **1990**. Three-dimensional structure of cellobiohydrolase II from *Trichoderma reesei*. *Science* 249:380-386.
- Rowell R. **1990**. Opportunities for Lignocellulosic Materials and Composites. In: Emerging technologies for materials and chemicals from biomass: Proceedings of symposium. *American Chemical Society. ACS symposium*. Washington, DC. P 12-27.

S

- Salaun, Stéphanie. **2009**. Interaction entre la macroalgue brune *Laminaria digitata* et ses épiphytes bactériens : Etudes moléculaire et spectroscopiques - Capacité d'adhésion et de formation de biofilm. *Thèse de doctorat*.

- Santos JA, Mulloy B, and Mourão PA. **1992**. Structural diversity among sulfated α -L-galactans from ascidians (tunicates). Studies on the species *Ciona intestinalis* and *Herdmania monus*. *Eur. J. Biochem.* 204:669-677.
- van Santen Y, Benen JA, Schröter KH, Kalk KH, Armand S, Visser J, Dijkstra BW. 1999. 1.68-Å crystal structure of endopolygalacturonase II from *Aspergillus niger* and identification of active site residues by site-directed mutagenesis. *J Biol Chem.* 274(43), 30474-30480.
- 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*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48 Pt 3:769-774.
- Sawabe T, Tanaka R, Iqbal MM, Tajima K, Ezura Y, Ivanova EP, and Christen R. **2000**. Assignment of *Alteromonas elyakovii* KMM 162T and five strains isolated from spot-wounded fronds of *Laminaria japonica* to *Pseudoalteromonas elyakovii* comb. nov. and the extended description of the species. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50 Pt 1:265-271.
- Seib KL, Wu HJ, Kidd SP, Apicella MA, Jennings MP, McEwan AG. **2006**. Defenses against oxidative stress in *Neisseria gonorrhoeae*: a system tailored for a challenging environment. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* : MMBR, 70(2), 344-361.
- Sepe, S.M. & Clark, R.A., **1985**. Oxidant membrane injury by the neutrophil myeloperoxidase system. I. Characterization of a liposome model and injury by myeloperoxidase, hydrogen peroxide, and halides. *Journal of Immunology*, 134(3), 1888-1895.
- van Schijndel JW, Vollenbroek EG, and Wever R. **1993**. The chloroperoxidase from the fungus *Curvularia inaequalis*; a novel vanadium enzyme. *Biochim. Biophys. Acta* 1161:249-256.
- Seaver LC, and Imlay JA. **2001**. Hydrogen Peroxide Fluxes and Compartmentalization inside Growing *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 183:7182-7189.
- Seib KL, Wu H, Kidd SP, Apicella MA, Jennings MP, and McEwan AG. **2006**. Defenses against oxidative stress in *Neisseria gonorrhoeae*: a system tailored for a challenging environment. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 70:344-361.
- Sheffield DJ, Smith AJ, Harry TR, and Rogers LJ. **1993**. Thermostability of the vanadium bromoperoxidase from *Corallina officinalis*. *Biochem. Soc. Trans* 21:445S.
- Sheldrick GM. **2008**. A short history of SHELX. *Acta Crystallogr., A, Found. Crystallogr.* 64:112-122.

- Soedjak HS, Walker JV, and Butler A. **1995**. Inhibition and inactivation of vanadium bromoperoxidase by the substrate hydrogen peroxide and further mechanistic studies. *Biochemistry* 34:12689-12696.
- Spiro MD, Ridley BL, Eberhard S, Kates KA, Mathieu Y, O'Neill MA, Mohnen D, Guern J, Darvill A, and Albersheim P. **1998**. Biological activity of reducing-end-derivatized oligogalacturonides in tobacco tissue cultures. *Plant Physiol* 116:1289-1298.
- Steinbacher S, Miller S, Baxa U, Budisa N, Weintraub A, Seckler R, and Huber R. **1997**. Phage P22 tailspike protein: crystal structure of the head-binding domain at 2.3 Å, fully refined structure of the endorhamnosidase at 1.56 Å resolution, and the molecular basis of O-antigen recognition and cleavage. *J. Mol. Biol* 267:865-880.
- Steinbacher S, Seckler R, Miller S, Steipe B, Huber R, Reinemer P. **1994**. Crystal structure of P22 tailspike protein: interdigitated subunits in a thermostable trimer. *Science* 265(5170), 383-386.
- Stohl EA, Criss AK, and Seifert HS. **2005**. The transcriptome response of *Neisseria gonorrhoeae* to hydrogen peroxide reveals genes with previously uncharacterized roles in oxidative damage protection. *Mol. Microbiol* 58:520-532.
- Storz G, Tartaglia LA, Farr SB, Ames BN. **1990**. Bacterial defenses against oxidative stress. *Trends in Genetics* : TIG, 6(11), 363-368.
- Studier, F.W. **2005**. Protein production by auto-induction in high density shaking cultures. *Protein Expression and Purification*, 41(1), 207-234.
- Sugano Y, Kodama H, Terada I, Yamazaki Y, and Noma M. **1994**. Purification and characterization of a novel enzyme, α -neoagarooligo-saccharide hydrolase (α -NAOS hydrolase), from a marine bacterium, *Vibrio* sp. strain JT0107. *J. Bacteriol.* 176:6812-6818.
- Svergun DI, Petoukhov MV, and Koch MH. **2001**. Determination of domain structure of proteins from X-ray solution scattering. *Biophys. J* 80:2946-2953.

T

- Tanaka N, Hasan Z, and Wever R. **2003**. Kinetic characterization of active site mutants Ser402Ala and Phe397His of vanadium chloroperoxidase from the fungus *Curvularia inaequalis*. *Inorganica Chimica Acta* 356:288-296.
- Thomas SR, McTamney PM, Adler JM, Laronde-Leblanc N, and Rokita SE. **2009**. Crystal structure of iodotyrosine deiodinase, a novel flavoprotein responsible for iodide salvage in thyroid glands. *J. Biol. Chem* 284:19659-19667.
- Tong H, Lee K, and Wong H. **1980**. The molecular weight and viscosity of the water-soluble polysaccharide(s) from *Eucheuma spinosum*. *Carbohydrate Research* 81:1-6.

Tor M, Lotze MT, and Holton N. **2009**. Receptor-mediated signalling in plants: molecular patterns and programmes. *J. Exp. Bot.* 60:3645-3654.

Turner S, Reid E, Smith H, and Cole J. **2003**. A novel cytochrome c peroxidase from *Neisseria gonorrhoeae*: a lipoprotein from a Gram-negative bacterium. *Biochem. J.* 373:865-873.

V

Vagin AA, Steiner RA, Lebedev AA, Potterton L, McNicholas S, Long F, and Murshudov GN. **2004**. REFMAC5 dictionary: organization of prior chemical knowledge and guidelines for its use. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr* 60:2184-2195.

Vattuone MA, de Flores EA, and Sampietro AR. **1975**. Isolation of neoagarobiose and neoagarotetraose from agarose digested by *Pseudomonas elongata*. *Carbohydr. Res.* 39:164-167.

van de Velde F, Pereira L, and Rollema HS. **2004**. The revised NMR chemical shift data of carrageenans. *Carbohydr. Res* 339:2309-2313.

Verhaeghe E, Fraysse A, Guerquin-Kern J, Wu T, Devès G, Mioskowski C, Leblanc C, Ortega R, Ambroise Y, and Potin P. **2008**. Microchemical imaging of iodine distribution in the brown alga *Laminaria digitata* suggests a new mechanism for its accumulation. *Journal of Biological Inorganic Chemistry* 13:257-269.

Viebbe C, Piculell L, and Nilsson S. **1994**. On the Mechanism of Gelation of Helix-Forming Biopolymers. *Macromolecules* 27:4160-4166.

Vitali J, Schick B, Kester HC, Visser J, Jurnak F. 1998. The tree-dimensional structure of *aspergillus niger* pectin lyase B at 1.7-Å resolution. *Plant Physiology*, 116(1), 69-80.

Vilter H. **1983**. Peroxidases from Phaeophyceae. III: Catalysis of Halogenation by Peroxidases from *Ascophyllum nodosum*. *Le Jol. Botanica Marina* 26:429-438.

Vilter H. **1984**. Peroxidases from phaeophyceae: A vanadium(V)-dependent peroxidase from *Ascophyllum nodosum*. *Phytochemistry* 23:1387-1390.

W

Watt DK, O'Neill SA, Percy AE, and Brasch DJ. **2002**. Isolation and characterisation of a partially methylated galacto-glucurono-xylo-glycan, a unique polysaccharide from the red seaweed *Apophloeoea lyallii*. *Carbohydrate Polymers* 50:283-294.

Weinberger F, and Friedlander M. **2000**. Endogenous and exogenous elicitors of a hypersensitive response in *Gracilaria conferta* (Rhodophyta). *Journal of Applied Phycology* 12:139-145.

- Weinberger, Florian, Friedlander, Michael, and Hoppe, Hans-Georg. **1999**. Oligoagars elicit a physiological response in *Gracilaria conferta* (RHODOPHYTA). *Journal of Phycology* 35:747-755.
- 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 oligo-saccharides in *Gracilaria chilensis* (Rhodophyta) and *Gracilaria conferta* (Rhodophyta). *Journal of Phycology* 41:863-873.
- Weinberger F, Pohnert G, Berndt M, 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. *J. Exp. Bot* 56:1317-1326.
- Weinberger F, Richard C, Kloareg B, Kashman Y, Hoppe H, and Friedlander M. **2001**. Structure-activity relationships of oligoagar elicitors toward *Gracilaria conferta* (Rhodophyta). *Journal of Phycology* 37:418-426.
- Wever R, and Hemrika W. **2001**. Vanadium haloperoxidases. In: *Handbook of metalloproteins*. Vol. 2. John Wiley & Sons. . p 1417-1428.
- Weyand M, Hecht H, Kieß M, Liaud M, Vilter H, and Schomburg D. **1999**. X-ray structure determination of a vanadium-dependent haloperoxidase from *Ascophyllum nodosum* at 2.0 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 293:595-611.
- Whitman WB, Coleman DC, and Wiebe WJ. **1998**. Prokaryotes: The unseen majority. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95:6578-6583.
- Winter JM, Moffitt MC, Zazopoulos E, McAlpine JB, Dorrestein PC, and Moore BS. **2007**. Molecular basis for chloronium-mediated meroterpene cyclization: cloning, sequencing, and heterologous expression of the napyradiomycin biosynthetic gene cluster. *J. Biol. Chem* 282:16362-16368.
- Winter JM, and Moore BS. **2009**. Exploring the chemistry and biology of vanadium-dependent haloperoxidases. *J. Biol. Chem* 284:18577-18581.
- Wojtaszek P. **1997**. Oxidative burst : an early plant response to pathogen infection. *Biochem. J.* 322 (Pt 3):681-692.

Y

- Yoder MD, Lietzke SE, and Jurnak F. **1993**. Unusual structural features in the parallel β -helix in pectate lyases. *Structure* 1:241-251.
- Yoder, M.D. & Jurnak, F., **1995**. Protein motifs. 3. The parallel beta helix and other coiled folds. *The FASEB Journal* 9(5), 335-342.

Résumé

La surface des algues est colonisée par des bactéries marines hétérotrophes qui entretiennent avec leurs hôtes différentes relations trophiques. Ces relations peuvent être de la symbiose, du commensalisme, du saprophytisme ou être pathogènes. Mais quel que soit le type d'interaction, les bactéries interagissent avec la paroi de leur hôte, essentiellement constituée de polysaccharides. Cette paroi, peut donc être une abondante source de carbone pour les bactéries marines. En conséquence, elle subit donc les attaques extérieures mais est également le lieu où s'expriment les mécanismes de défense de l'algue. *Zobellia galactanivorans*, une flavobactérie marine dont le génome a été séquencé, est un modèle de l'interaction entre les bactéries et les algues. En effet, 3 % des gènes de cette bactérie sont impliqués dans la dégradation de polysaccharides. De plus on retrouve, dans son génome, des enzymes participant à des métabolismes originaux comme celui de l'iode. Je me suis intéressé à trois aspects moléculaires de l'interaction entre *Z. galactanivorans* et les algues. Premièrement le génome de *Z. galactanivorans* possède deux nouvelles α -carraghénases de la famille GH 82, plus courtes que celles déjà décrites. Dans le but d'identifier la machinerie catalytique de ces enzymes, je me suis basé sur l'alignement multiple de l'ensemble des séquences de la famille GH 82 pour réaliser des expériences de mutagenèse dirigées sur la α -carraghénase "d'*Alteromonas fortis*", la seule biochimiquement caractérisée à ce jour. J'ai ainsi montré que les acides aminés E245 et D247 sont les deux résidus catalytiques. De plus, j'ai montré que les résidus Q222, H281 et E310 participent également à la catalyse. En analysant la structure 3D par cristallographie en absence de chlore, j'ai également pu montrer qu'un ion chlorure, proche du site actif, joue un rôle important dans la mise en place d'un réseau de molécules d'eau au sein du site actif. J'ai effectué une première caractérisation biochimique et structurale de deux membres d'une nouvelle famille de glycoside hydrolases, identifiés, dans le génome de *Z. galactanivorans*, au sein d'opérons putatifs très probablement impliqués dans la dégradation de polysaccharides sulfatés. Enfin, j'ai résolu la première structure cristallographique d'une iodoperoxydase vanadium-dépendante d'origine bactérienne. Cette enzyme pourrait être impliquée dans un mécanisme de détoxification de la bactérie, suite à un "burst oxydant" généré par l'algue. Cette première structure permet de revoir et de discuter l'évolution de ces protéines.

Abstract

The surface of algae is colonized by marine heterotrophic bacteria which entertain different trophic relationships with their host. These relationships may be of various types such as symbiosis, commensalism, saprophytic or pathogenic. In all cases the algal cell wall, which is mainly constituted by polysaccharides, is the first barrier bacteria have to interact with. Therefore, bacteria have developed sophisticated machineries (involving various glycoside hydrolases) to use the cell wall components as carbon source, but they also have to cope with algal defence reactions, which are also located in the cell wall of algae. *Zobellia galactanivorans* is a marine flavobacteria whose genome has recently been sequenced. It represents a model for the interaction between algae and bacteria. Indeed, 3 % of genes are involved in polysaccharide degradation, many of them organised in operon-like structures. Moreover, many enzymes present in the genome appear to be involved in original metabolisms, such as iodine utilization. My interest focused on the molecular aspects of three different factors involved in interaction of *Z. galactanivorans* with algae. The genome of *Z. galactanivorans* revealed two new sequences of glycosides hydrolases family 82 which are particular, due to their truncated sequences. Based on multiple sequence alignments, I designed site directed mutagenesis experiments, performed with the *Alteromonas fortis* enzyme, the first structural representant of α -carrageenases. The results show that E245 (proton donor) and D247 (nucleophile) are the catalytic residues and that residues Q222, H281 and E310 also play crucial roles in the enzymatic reaction. Using a crystallographic approach, I was able to highlight the importance of a chloride ion in the formation of a water network, close to the active site. I also initiated the first biochemical and structural characterization of two members of a new GH family, located in operon-like gene organisations apparently involved in the degradation of sulphated polysaccharides. A third part of my thesis concerns the crystallographic structure determination of a first prokaryote, vanadium dependent iodoperoxydase, identified in the *Z. galactanivorans* genome. The structural analysis of this enzyme that may be involved in a detoxification reaction following the oxidative burst generated by algae, allows us to suggest a new evolution pattern for this type of enzymes.