

Ecole Doctorale Sciences de l'Environnement d'Ile-de-France

THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE PARIS VI

Spécialité Océanologie Biologique

Présentée par

Carole COLIN

Pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université Paris VI

« Caractérisation biochimique et moléculaire des haloperoxydases dépendantes du vanadate chez l'algue brune *Laminaria digitata* »

Thèse soutenue le 14 Mai 2004

devant le jury composé de :

Directeur de thèse :

- **M. Bernard KLOAREG,** Professeur à l'Université Pierre et Marie Curie, Paris VI

Rapporteurs :

- **Mme Danièle WERCK,** Directeur de recherche à l'Université Louis Pasteur, Strasbourg
- **M. Alain PUGIN,** Professeur à l'Université de Bourgogne, Dijon

Examineurs :

- **M. Jean DELETTRE,** Professeur à l'Université Pierre et Marie Curie, Paris VI
- **M. Bruno FIEVET,** Ingénieur de recherche à l'IRSN, Cherbourg-Octeville
- **M. Yves AMBROISE,** Ingénieur de recherche au CEA, Gif sur Yvette

REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé à la Station Biologique de Roscoff au sein de l'UMR 7139 dirigée par Bernard Kloareg jusqu'à fin 2003 et actuellement par Catherine Boyen. Cette thèse a été financée par la Région de Bretagne durant trois ans, puis par le CNRS les six mois suivant.

Je tiens à remercier les membres de mon jury d'avoir accepté d'être rapporteurs et examinateurs de ce travail.

Je remercie le Professeur André Toulmond pour son accueil à la Station Biologique.

Je remercie le Professeur Bernard Kloareg pour son accueil chaleureux au sein de l'UMR 7139 d'abord en DEA, puis en thèse. Je le remercie pour ses conseils et sa disponibilité.

Je remercie Philippe Potin qui m'a permis de travailler dans l'équipe Biochimie des défenses des algues et qui se démène pour nous. Je remercie particulièrement Catherine Leblanc qui m'a présentée ce sujet de thèse et qui m'a guidée tout au long de ce travail. Je la remercie pour ses conseils, son soutien, sa grande disponibilité et également pour sa générosité et sa patience.

Je tiens également à remercier Emmanuelle Leize-Wagner et Elsa Wagner, de l'UMR 7509, pour leur collaboration et leur accueil lors de mon séjour à Strasbourg.

Merci à l'ensemble de l'UMR 7139 dont la liste est très longue : merci Catherine B., Maryvonne, Sabine, Sylvie, Estelle, Yann, Gaëlle, William, Tristan, Seb, Gurvan, Audrey, Marion, Ludo, Akira, Mark, Cécile, Jonas, Florian, Stéphane, ainsi qu'à l'équipe de Brest et particulièrement à Jean Pierre. Chacune de ces personnes m'a apportée, de façon différente, énormément de plaisir à travailler dans cette unité de recherche. Je remercie Pi et Susana qui ont eu la patience de me supporter dans le bureau durant ces derniers mois de rédaction. J'adresse des remerciements particuliers à Murielle (Mumu), Delphine et Vincent avec qui j'ai passé d'agréables moments « Hors Station ».

Un grand Merci à tous les Services Communs de la Station à savoir : le service informatique et génomique (Merci particulier à Claude et Jean pour votre aide efficace et précieuse, à Laurent et Morgan), le centre de documentation scientifique (Merci Nicole et Maryse pour votre gentillesse et votre rapidité à trouver les articles), le personnel de l'hôtel de France et le personnel des services techniques et administratifs. Un merci particulier à Martine.

Merci également à tous les chercheurs, techniciens et étudiants qui constituent avec les services communs la grande famille de la Station Biologique de Roscoff. Je remercie surtout Franck Z., Robert, Xavier, Dominique M., Stéphane E., Nathalie S., Sandrine B., Laurence G., Alain P., Julie et Mag pour leur sympathie. Et bien sur un merci particulier à Isabelle (Isa), Alexis, Fabrice, et une seconde fois à Mumu, Delphine et Vincent, mais également à Pascale (Pascalou), Grande Marie et Céline qui ont participé à des moments de vie inoubliables et forts en émotions.

Je remercie Franky et Laure pour leur générosité, leur joie de vivre, les bons p'tits plats avec un peu de musique de préférence... Merci à Taim..., en attendant ce fameux repas bien mérité... Merci également à Marco du Winch Pub chez qui j'ai effectué de sympathiques escales.

Merci Régis pour les bons moments passés ensemble et pour tout ce que tu m'as apporté pour la suite. Je remercie également Caroline, Sandrine, Solenne et Christelle en m'excusant de ne pas donner suffisamment de mes nouvelles.

J'adresse une pensée particulière à ma famille : tout d'abord à mes parents qui m'ont toujours soutenus et encouragés pendant toutes mes années d'études et qui ont tant bien que mal essayés de comprendre mon travail, à mon grand frère protecteur Mik et sa petite famille Sophie et Lilie, à ma grande sœur adorée Manu, à Baptiste et au p'tit dernier de la famille, Noé. Merci également Maria et Tonio.

Enfin, je ne remercierais jamais assez Marc, qui m'a épaulé et encouragé jour après jour, qui a supporté durement mes variations d'humeur et mes absences. Il m'a donné la force et a contribué à ce que je mène à bien ce travail. Ca y est !!!

Un grand Merci à vous tous.

TABLE DES MATIERES

RESUME	3
ABSTRACT	4
ABBREVIATIONS	5
LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX	6
INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE	8
I- Les composés halogénés	8
A) Définition et propriétés physico-chimiques des halogènes	8
B) Les composés inorganiques halogénés	8
C) Les composés organiques halogénés	9
D) Le cycle biogéochimique des halogènes	10
E) Formation des composés organiques halogénés naturels	12
1) <i>Processus physico-chimiques</i>	12
2) <i>Processus catalytiques</i>	13
II- Les haloperoxydases dépendantes du vanadate	14
A) Définitions et généralités sur les haloperoxydases	14
1) <i>Réactions chimiques et détections d'activités haloperoxydases</i>	14
2) <i>Classification des différents types d'haloperoxydases</i>	15
B) Caractérisations des haloperoxydases dépendantes du vanadate	17
1) <i>Analyses biochimiques</i>	17
2) <i>Caractérisations moléculaires</i>	19
3) <i>Résolutions de structures cristallines</i>	19
C) Mécanisme d'action des haloperoxydases dépendantes du vanadate	21
1) <i>Architecture du site actif</i>	21
2) <i>Mécanisme d'oxydation des halogénures</i>	22
3) <i>Spécificité pour les halogénures</i>	23
4) <i>Sélectivité et régiosélectivité vis-à-vis de composés organiques</i>	25
5) <i>Mécanisme de sulfoxydation</i>	25
D) Origine et évolution des haloperoxydases dépendantes du vanadate	26
1) <i>Homologie entre les vCPOs et les vBPOs</i>	26
2) <i>Similitudes entre les vHPOs et les phosphatases</i>	27
E) Rôles biologiques putatifs des vHPOs	28
1) <i>Toxicité et rôles biologiques des composés halogénés</i>	28
2) <i>Détoxication du peroxyde d'hydrogène</i>	30
3) <i>Adhésion - Pontages oxydatifs dans la paroi</i>	31
4) <i>Absorption d'halogénures</i>	32
PROBLEMATIQUES ET OBJECTIFS DE LA THESE	33

MATERIEL ET METHODES D'ETUDE	35
I- Matériel végétal	35
II- Préparation des éliciteurs oligo-alginates	36
III- Elicitation des sporophytes de <i>L. digitata</i>	36
IV- Dosage des espèces activées de l'oxygène par chimioluminescence	37
V- Méthodes biochimiques	37
VI- Analyse des haloperoxydases purifiées en spectrométrie de masse	43
VII- Caractérisation moléculaire	49
RESULTATS	57
<u>Chapitre 1 : Identification et caractérisation des activités vHPOs chez <i>L. digitata</i></u>	57
I- Purification des activités vHPOs chez <i>L. digitata</i>	57
II- Propriétés biochimiques et immunologiques des vHPOs purifiées	58
III- Localisation des activités vHPOs, <i>in vivo</i> , chez <i>L. digitata</i>	59
VI- Article 1	61
<u>Chapitre 2 : Caractérisation moléculaire des vHPOs purifiées chez <i>L. digitata</i> – couplage avec une approche protéomique</u>	62
I- Bromoperoxydases putatives chez <i>L. digitata</i>	62
II- Approche protéomique : stratégie de séquençage <i>de novo</i> des vHPOs	63
III- Identification moléculaire des activités vBPOs et vIPO chez <i>L. digitata</i>	64
<u>Chapitre 3 : Evolution des vHPOs et spécificité biochimique</u>	66
I- Les vHPOs chez <i>L. digitata</i> : des familles multigéniques	66
II- Evolution des vHPOs chez les algues marines	67
III- Structure du site actif et spécificité pour les halogénures	68
IV- Article 2	70
<u>Chapitre 4 : Rôles des vHPOs : un lien entre le métabolisme halogéné et les mécanismes de défense ?</u>	71
I- Résultats	71
II- Discussion	74
CONCLUSIONS – PERSPECTIVES	81
I- Les vHPOs : des enzymes clé du métabolisme halogéné chez <i>L. digitata</i>	81
II. Les vHPOs : des enzymes impliquées dans le stress oxydant et les mécanismes de défense	85
III. Modélisation de la structure tridimensionnelle de la vIPO : vers une compréhension du mécanisme d'action des vHPOs	87
IV. Evolution des vHPOs : vers une spécificité de ces enzymes pour l'oxydation des halogénures ?	89
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	91
ANNEXES	103

RESUME

Les algues marines, de par leur capacité à accumuler les halogénures et à produire des composés halogénés, constituent un compartiment d'une importance indéniable dans le cycle biogéochimique des halogènes. En particulier, les laminaires ont la singularité de concentrer l'iodure jusqu'à 150,000 fois la concentration de cet élément dans l'eau de mer. Cependant les mécanismes régissant les transferts d'halogènes au sein de l'algue, d'une part, et le rôle biologique des halogénures dans l'algue, et notamment celui de l'iodure chez les laminaires, d'autre part, restent inconnus. Dans ce contexte, nous avons choisi comme modèle d'étude l'algue brune *Laminaria digitata* (L.) Lamouroux et nous avons caractérisé, au niveau biochimique et moléculaire, des enzymes clé du métabolisme halogéné : les haloperoxydases, possédant comme cofacteur l'ion vanadate (vHPOs).

Chez *L. digitata*, ces enzymes constituent deux familles multigéniques distinctes : la famille des bromoperoxydases (vBPOs) et la famille des iodoperoxydases (vIPOs). Des extraits protéiques de vIPO et de vBPO ont été purifiés à l'homogénéité électrophorétique. Ces enzymes diffèrent par leur poids moléculaire, leurs caractéristiques immunologiques, leurs profils peptidiques, et surtout par leurs activités spécifiques. En effet, alors que la vBPO peut oxyder le bromure et l'iodure, la vIPO est spécifique de l'iodure et possède une efficacité d'oxydation pour cet halogénure nettement supérieure à celle de la vBPO. Cette particularité suggère que la vIPO, pariétale et localisée au niveau du cortex, est directement responsable de l'importante absorption de l'iodure chez cette algue.

Cette spécificité stricte de la vIPO, par rapport aux autres vHPOs, serait due à une augmentation du potentiel électronégatif au niveau du site actif, combinée à une altération de la topologie du site de fixation des halogénures. D'un point de vue évolutif, une vBPO serait l'ancêtre des vHPOs chez les algues brunes et la perte de la capacité d'oxyder le brome serait à l'origine de la vIPO et donc de l'émergence de cette nouvelle fonction biochimique.

Outre le rôle particulier et spécifique des vIPOs dans l'absorption de l'iode, les différents représentants des deux familles de vHPOs semblent plus ou moins impliqués dans les mécanismes de défense et dans la réponse à divers stress, et particulièrement lors de stress oxydants. Dans ce contexte, elles jouent un rôle direct comme enzymes antioxydantes, en consommant du peroxyde d'hydrogène. Elles synthétisent également des composés halogénés, considérés comme des signaux de défense. Nous avons également établi des liens entre leurs inductions et la voie de signalisation des oxylipines.

Mots Clés : *Laminaria digitata*, haloperoxydase dépendante du vanadate, halogénure, iode, absorption, VHOC, défense, stress oxydant

ABSTRACT

Marine algae have the ability to accumulate halogens and produce a variety of halogenated compounds of primary importance in the biochemical cycle of halogens. Particularly, *Laminaria* may concentrate iodine up to 150,000 fold from the concentration found in seawater. Nevertheless the basic mechanisms involved in the metabolism of halogens in algae and the biological significance of the halide pool in the algae are still unknown. We have chosen the brown alga *Laminaria digitata* (L.) Lamouroux as a biological model for characterising, at both biochemical and molecular level, the key enzymes regulating halogen metabolism: the haloperoxidases, possessing a vanadate ion as cofactor (vHPO).

In *L. digitata*, these enzymes form two distinct multigenic families: the bromoperoxidase (vBPOs) and the iodoperoxidase (vIPOs). Protein extracts of both vIPO and vBPO were purified to electrophoretic homogeneity. These enzymes differ in their respective molecular weight, immunological characteristics, peptide profiles and above all by their specific activity. While vBPO can oxidise both bromide and iodide, vIPO is specific to iodide and its oxidative capacity for this halide is higher than vBPO. This particularity suggests that vIPO, localised in the cell wall and at the level of the cortex, may be directly responsible for the absorption of iodide in this algae.

This strict specificity of vIPO compared to other vHPOs is suggested to result from an increase in electronegative potential at the active site, together with an alteration of the structural topology of the site of fixation of halides. From an evolutionary perspective, one vBPO may have been the ancestor of contemporary vHPOs in brown algae. In that case, the loss of the bromide-oxidising function may have been at the origin of vIPOs and the appearance of this novel biochemical function.

As well as the particular and specific role of vIPOs in the absorption of iodine, members of both vHPO families seem to be involved in defence mechanisms and some stress induced responses and particularly under oxidative stress conditions. Within this context, they play a direct role as anti-oxidative enzymes, by consuming hydrogen peroxide. They may also synthesise halogenated compounds which are considered as defence mechanisms. We have also established the existence of some links between their induction with the oxylipin pathway.

Keywords : *Laminaria digitata*, vanadate dependant haloperoxidase, halide, iodide, absorption, VHOC, defence, oxidative stress

ABBREVIATIONS

ADN	<u>A</u> cide <u>d</u> ésoxyribo <u>n</u> ucléique
ADNc	<u>A</u> cide <u>d</u> ésoxyribo <u>n</u> ucléique <u>c</u> omplémentaire
ARN	<u>A</u> cide <u>r</u> ibo <u>n</u> ucléique
ARNm	<u>A</u> cide <u>r</u> ibo <u>n</u> ucléique <u>m</u> essenger
CPO / BPO / IPO	<u>C</u> hloro <u>p</u> ero <u>x</u> ydase, <u>B</u> romo <u>p</u> ero <u>x</u> ydase, <u>I</u> odo <u>p</u> ero <u>x</u> ydase
CTAB	<u>B</u> romure de <u>c</u> étyl <u>t</u> riméthyl <u>a</u> mmonium
Da	<u>D</u> alton (unité de masse moléculaire)
DTT	<u>D</u> ithio <u>t</u> hréitol
EDTA	Acide <u>é</u> thylène <u>d</u> iamino <u>t</u> étra <u>c</u> étique sel disodique
EGTA	Acide <u>g</u> lycol <u>é</u> thylène <u>d</u> iamine <u>t</u> étra <u>c</u> étique
ESI	<i><u>E</u>lectrospray <u>i</u>onization</i>
EST	<u>E</u> tiquette de <u>s</u> équence <u>t</u> ranscrite
FADH ₂	<i>Reduced <u>f</u>lavin <u>a</u>denine <u>d</u>inucleotide</i>
HPLC	<i><u>H</u>igh <u>p</u>erformance <u>l</u>iquid <u>c</u>hromatography</i>
HPO / vHPO	<u>H</u> alo <u>p</u> ero <u>x</u> ydase / <u>H</u> alo <u>p</u> ero <u>x</u> ydase dépendante du <u>y</u> anadate
HRP	<i><u>H</u>orse <u>r</u>adish <u>p</u>eroxidase</i>
LB	<u>L</u> uria- <u>B</u> ertani
LC-MS	<i><u>L</u>iquid <u>c</u>hromatography-<u>m</u>ass <u>s</u>pectrometry</i>
m/z	Rapport masse (<u>m</u>) sur charge (<u>z</u>)
MEN	<u>M</u> OPS/ <u>E</u> DTA/ <u>N</u> aAc
MS/MS	Spectrométrie de masse en tandem
pb	<u>P</u> aire de <u>b</u> ase
kb	<u>K</u> ilo paire de <u>b</u> ase
PBS	<i><u>P</u>hosphate <u>b</u>uffered <u>s</u>aline</i>
PCR	<i><u>P</u>olymerase <u>c</u>hain <u>r</u>eaction</i>
PEG	<u>P</u> oly- <u>é</u> thylène <u>g</u> lycol
ppm	<u>P</u> artie par <u>m</u> illion (1 mg.kg ⁻¹ \approx 1 mg.l ⁻¹)
Q-TOF	<i>Hybrid <u>q</u>uadrupole orthogonal acceleration <u>T</u>ime-<u>O</u>f-<u>F</u>light tandem mass spectrometer</i>
SDS	<u>D</u> odécyl- <u>s</u> ulfate de <u>s</u> odium
SDS-PAGE	<i><u>S</u>DS-<u>p</u>oly-<u>a</u>crylamide gel <u>e</u>lectrophoresis</i>
SM	Chlorure de <u>s</u> odium/sulphate de <u>m</u> agnésium/Tris
SSC	(Chlorure) de <u>s</u> odium ; <u>c</u> itrate de <u>s</u> odium
TAE	<u>T</u> ris/ <u>A</u> monium/ <u>E</u> DTA
Tris	<u>T</u> ris (hydroxymethyl) aminomethane
TE	<u>T</u> ris/ <u>E</u> DTA
UV	<u>U</u> ltraviolet
VHOC	<i><u>V</u>olatile <u>h</u>alogenated <u>o</u>rganic <u>c</u>ompounds</i>

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

Figures :

- Figure 1 :** Exemples de composés halogénés naturels
- Figure 2 :** Schéma du cycle des halogènes dans l'atmosphère
- Figure 3 :** Mécanisme d'action des enzymes halogénantes retrouvées uniquement chez les bactéries
- Figure 4 :** Réaction catalysée par l'halogénure méthyl transférase
- Figure 5 :** Structures chimiques de la caldariomycine, du 2-chloro-1,3-cyclopentanedione et du monochlorodimédone - Représentation schématique de l'halogénéation du monochlorodimédone
- Figure 6 :** Représentations structurales des trois classes d'haloperoxydases
- Figure 7 :** Représentations des chaînes carbonées des trois vHPOs cristallisées sous forme native
- Figure 8 :** Représentations des structures secondaires de la vCPO de *Curvularia inaequalis*, du dimère de la vBPO d'*Ascophyllum nodosum* et de la vBPO de *Corallina officinalis*
- Figure 9 :** Région du site actif de la vCPO de *Curvularia inaequalis* – Représentation de la surface du tunnel du site actif de la vCPO de *C. inaequalis* et de la vBPO d'*Ascophyllum nodosum*
- Figure 10 :** Comparaison du site actif (à ~5 Å du vanadate) de la vCPO de *Curvularia inaequalis*, de la vBPO d'*Ascophyllum nodosum* et de la vBPO de *Corallina officinalis*
- Figure 11 :** Schéma putatif du mécanisme d'oxydation du chlorure par la vCPO
- Figure 12 :** Superposition du site actif de la vCPO de *Curvularia inaequalis* et de sa forme peroxovanadate
- Figure 13 :** Mécanisme d'action schématisé des vHPOs en présence ou non de substrats organiques
- Figure 14 :** Schéma putatif du mécanisme d'oxydation du sulfure par la vBPO ou la vCPO
- Figure 15 :** Comparaison du site actif de la vCPO de *Curvularia inaequalis* et de celui de la phosphatase de la bactérie *Escherichia blattae*
- Figure 16 :** Burst oxydant et émission de VHOC suite à l'élicitation d'algues marines par des oligosaccharides
- Figure 17 :** Accumulation d'iode dans les sporophytes de *Laminaria digitata*
- Figure 18 :** Mécanisme putatif de l'entrée de l'iode chez *Laminaria digitata*
- Figure 19 :** Schéma représentant les différents modes d'action potentiels des vHPOs dans une cellule d'algue marine
- Figure 20 :** Champs de *Laminaria digitata* à marée basse, à fort coefficient
- Figure 21 :** Représentation du cycle de vie de *Laminaria digitata* et cultures de l'algue au laboratoire
- Figure 22 :** Structure de l'alginate
- Figure 23 :** Représentation schématique du principe de l'électrophorèse préparative et de l'électro-élution
- Figure 24 :** Représentation schématique de la source électrospray (ESI)
- Figure 25 :** Schéma simplifié du fonctionnement en ESI-MS
- Figure 26 :** Schéma de la stratégie employée pour l'étude des vHPOs en MS/MS
- Figure 27 :** Schéma du spectromètre de masse en fonctionnement MS/MS
- Figure 28 :** Présentation de la fragmentation des peptides en MS/MS
- Figure 29 :** Clivage des liaisons internes de la liaison peptidique : les fragments internes et les ions immoniums
- Figure 30 :** Schéma simplifié du principe de la 5' RACE-PCR
- Figure 31 :** Profils des activités vHPOs d'un extrait protéique de sporophyte de *L. digitata* après migration en conditions natives
- Figure 32 :** Activité iodoperoxydase des vHPOs purifiées du sporophyte de *L. digitata* en conditions natives
- Figure 33 :** Analyses en conditions dénaturantes (SDS-PAGE) de la vIPO et de la vBPO purifiées du sporophyte de *L. digitata*

Figure 34 : Activité iodoperoxydase spécifique des vIPO et vBPO purifiées en fonction du pH et en fonction de la température

Figure 35 : Tests immunologiques (ou *Western blot*) de la vIPO et de la vBPO purifiées du sporophyte de *L. digitata*

Figure 36 : Localisation des activités peroxydases sur des coupes de thalle de sporophytes de *L. digitata*

Figure 37 : Détection des activités vHPOs dans le milieu de digestion de la paroi cellulaire des sporophytes de *L. digitata*, dans le milieu de culture des protoplastes et dans les protoplastes

Figure 38 : Cartographie physique des deux ADNc de vBPO identifiés chez *L. digitata*

Figure 39 : Exemple des spectres MS et MS/MS des ions précurseurs multi- ou mono-chargés pour les bandes vBPOb et vIPO analysées en Q-TOF

Figure 40 : Couverture de la séquence de vBPO1 (40 %) par les peptides obtenus par LC-MS/MS

Figure 41 : Cartographie physique des ADNc de vIPO identifiés chez *L. digitata*

Figure 42 : Couverture de la séquence de vIPO1 (34 %) par les peptides obtenus par LC-MS/MS

Figure 43 : Hybridation de l'ADN génomique (*Southern blot*) de *L. digitata*

Figure 44 : Cartographie physique des quatre gènes vBPO de *L. digitata* actuellement identifiés

Figure 45 : Arbre phylogénétique fondé sur la comparaison des séquences protéiques des vHPOs par la méthode du plus proche voisin (ou *Neighbour-Joining method*) avec la matrice de Dayhoff

Figure 46 : Comparaison de la structure du site actif des différentes vHPOs

Figure 47 : Inhibition compétitive par le bromure de l'oxydation de l'iodure par la vIPO purifiée

Figure 48 : Structure de l'entrée du tunnel du site actif chez la vBPO d'*A. nodosum* et la vIPO de *L. digitata*

Figure 49 : Expression des vHPOs chez les sporophytes de *L. digitata*

Figure 50 : Expression des vBPOs chez les sporophytes et les protoplastes de *L. digitata*

Figure 51 : Expression des gènes de vBPOs et de vIPOs dans des sporophytes de *L. digitata* récoltés sur la grève au cours de l'année

Figure 52 : Coupes de thalle de sporophytes de *L. digitata* et détection des activités peroxydases, en présence d'o-dianisidine et après élicitation ou non par des oligo-gulonates

Figure 53 : Cinétique d'expression des gènes de vHPO chez des sporophytes de *L. digitata* élicités ou non par des oligo-gulonates

Figure 54 : Suivi en *Western blot* des vBPO et vIPO chez des sporophytes de *L. digitata* élicités ou non par des oligo-gulonates

Figure 55 : Suivi des activités vHPOs suite à une élicitation des sporophytes par des oligo-gulonates

Figure 56 : Détection des activités vHPOs une heure après l'application, sur les sporophytes de *L. digitata*, de diverses concentrations en peroxyde d'hydrogène

Figure 57 : Effet de l'application du clofibrate sur les sporophytes de *L. digitata*

Figure 58 : Effet de l'application de différentes oxylipines sur les activités vHPOs des sporophytes de *L. digitata*

Tableaux :

Tableau 1 : Pourcentages d'identité entre les différentes séquences protéiques de vHPOs

Tableau 2 : Activité bromoperoxydase et iodoperoxydase chez *L. digitata*

Tableau 3 : Résultats obtenus par LC-MS/MS pour les vBPOs purifiées et homologues avec la digestion *in silico* de la séquence protéique vBPO1

Tableau 4 : Analyses LC-MS/MS de la vIPO purifiée et comparaison avec les séquences protéiques des vBPOs d'*A. nodosum* et de *F. distichus*

Tableau 5 : Paramètres cinétiques des vBPO et vIPO purifiées

INTRODUCTION

BIBLIOGRAPHIQUE

I- Les composés halogénés

A) Définition et propriétés physico-chimiques des halogènes

Le fluor (F), le chlore (Cl), le brome (Br), l'iode (I) et l'astate (At), situés dans la 17^{ème} colonne du tableau périodique, forment le groupe des halogènes et possèdent sept électrons dans leur couche électronique la plus externe. Plus on monte dans la classification périodique (de At vers F), plus l'atome d'halogène est petit et électronégatif (Greenwood et Earnshaw, 1997). L'astate étant le seul halogène artificiel, il ne sera pas mentionné par la suite.

La forme élémentaire des halogènes naturels est toujours la molécule diatomique (F₂, Cl₂, Br₂, et I₂) qui est toxique, extrêmement oxydante et très réactive chimiquement. Les halogènes atteignent leur configuration électronique la plus stable par le gain d'un électron, formant ainsi un ion négatif appelé halogénure. Les halogènes peuvent également être liés de façon covalente à un carbone. L'iode étant le plus gros des halogènes, la liaison covalente carbone-iode est la plus faible, conduisant à des composés organiques iodés plus instables (Greenwood et Earnshaw, 1997).

B) Les composés inorganiques halogénés

La croûte terrestre contient ~550 ppm de fluor (majoritairement sous forme de CaF₂, Na₃AlF₆ et Ca₅(PO₄)₃F) ce qui fait de lui le treizième élément le plus commun sur terre. Il se trouve largement répandu dans les minéraux et les roches sédimentaires. Dans les océans, le fluor, présent à ~1.2 mg/l, constitue un élément mineur (Spotte et Bidwell, 1985 ; Greenwood et Earnshaw, 1997).

Sur terre, on retrouve environ quatre à cinq fois moins de chlore (soit ~120 ppm) que de fluor. Le chlore est majoritairement retrouvé dans les océans, sous forme de chlorure (NaCl), à une concentration de ~19 g/l (soit ~550 mM) (Spotte et Bidwell, 1985 ; Greenwood et Earnshaw, 1997).

Le brome et l'iode sont présents à de très faibles quantités sur terre (respectivement ~ 2.5 ppm et ~ 0.45 ppm soit ~ 300 et $\sim 1,200$ fois moins que le fluor). Ils se trouvent essentiellement, dans l'océan, sous forme d'anions, avec des concentrations de ~ 65 mg/l (soit ~ 1 mM) pour le brome, un élément mineur, et de ~ 50 $\mu\text{g/l}$ (soit ~ 0.5 μM) pour l'iode, un élément trace (Spotte et Bidwell, 1985 ; Greenwood et Earnshaw, 1997).

Parmi les halogènes, l'iode existe majoritairement dans l'eau de mer sous les formes inorganiques dissoutes, d'iodates (IO_3^-) (< 0.20 à 0.50 μM) et d'iodures (I^-) (< 0.01 à 0.25 μM), mais aussi en plus faible quantité sous forme d'iode moléculaire (I_2), d'acide hypo-iodeux (HOI), d'iode particulaire et de composés organiques iodés variés (pour revues, Wong, 1991 ; Carpenter, 2003). Tandis que la concentration totale d'iode dissout, d'environ 0.50 μM , reste relativement stable, faisant de cet élément un biointermédiaire typique, la balance IO_3^-/I^- peut subir des variations en fonction de la profondeur ou de la localisation géographique. Les concentrations en iodure, plus élevées dans la couche euphotique, peuvent ainsi représenter plus de 50 % de l'iode inorganique total (soit 0.25 μM) (pour revue, Wong, 1991).

Dans l'océan, les composés inorganiques halogénés sont classés en deux catégories : les formes inorganiques « non réactives » et les formes inorganiques « réactives ». Les formes inorganiques « non réactives » (halogénures X^- et iodates IO_3^-) peuvent être transformées, par photochimie ou par l'intermédiaire d'une enzyme, en composés inorganiques « réactifs » (HOX , X_2 et X_3^-). Ces dernières peuvent alors réagir avec la matière organique et former des composés organiques halogénés (Greenwood et Earnshaw, 1997).

C) Les composés organiques halogénés

A ce jour, plus de 3,800 métabolites halogénés, contenant majoritairement du chlore, ont été identifiés (pour revue, Gribble, 2003). Les structures de ces composés organiques halogénés, relativement variées, vont de la simple molécule formée d'un atome de carbone jusqu'à des molécules complexes (dérivés terpéniques, indoliques, lipidiques, d'acides aminés...). Cette grande diversité des composés organiques halogénés est illustrée par la **figure 1**.

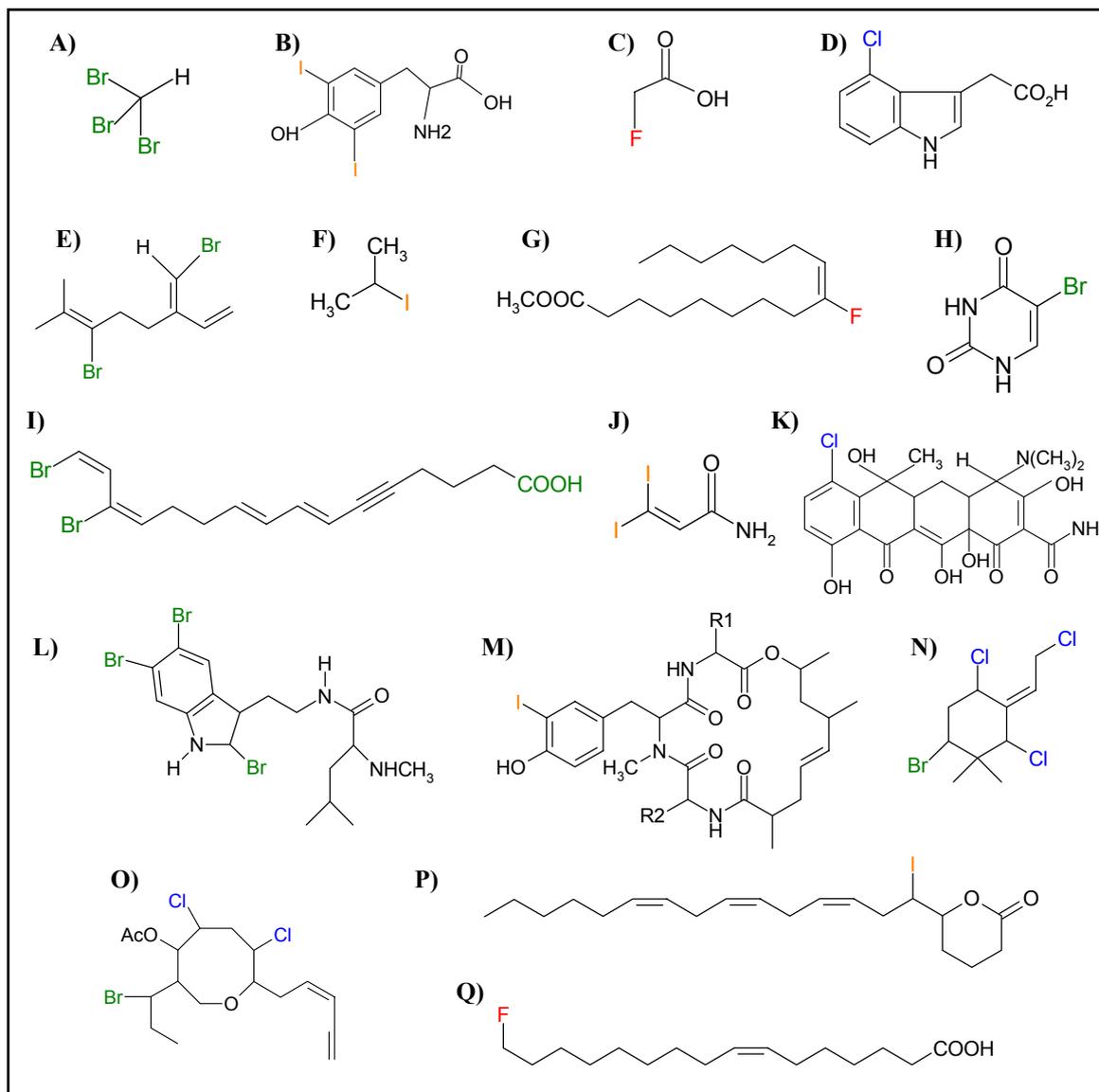


Figure 1 : Exemples de composés halogénés naturels. **A)** Le bromoforme, majoritaire dans les algues marines (pour revue, Gribble, 2003). **B)** La 3,5-diiodotyrosine, isolée dans la gorgone marine *Gorgonia cavolonii* (pour revue, Dembitsky et Srebnik, 2002). **C)** L'acide fluoroacétique produit par la bactérie *Streptomyces cattleya* et les plantes (Murphy et coll., 2001). **D)** L'acide 4-chloroindole-3-acétique, hormone de croissance chez le poisson (pour revue, Gribble, 2003). **E)** Le 3,10E-dibromomyrcène, un monoterpène acyclique produit par l'algue rouge *Ochtodes secundiramea* (Polzin et coll., 2003). **F)** L'isopropyl d'iode, composé volatil produit par les algues marines (Gschwend et coll., 1985). **G)** L'acide 9-fluoropalmitique, produit par la levure *Saccharomyces cerevisiae* (pour revue, Dembitsky et Srebnik, 2002). **H)** Le 5-bromouracil, produit par la myeloperoxydase humaine (pour revue, Gribble, 2003). **I)** L'acide (7E,9E,13E,15E)-14,16-dibromohexadeca-7,9,13,15-tétraen-5-ynoïque détecté dans l'éponge *Oceanapia* sp. (pour revue, Dembitsky et Srebnik, 2002). **J)** Un éthyle ester iodé trouvé chez l'algue rouge *Asparagopsis taxiformis* (pour revue, Gribble, 2003). **K)** La 7-chlorotétracycline synthétisée par *Streptomyces aureofaciens* (Dairi et coll., 1995). **L)** L'alternatamide B, une amide bromotryptamine, trouvée chez le bryozoaire *Amathia alternata* (pour revue, Dembitsky et Srebnik, 2002). **M)** La structure de base de peptides cytotoxiques contenant des acides aminés iodés, isolés d'éponges marines (pour revue, Dembitsky et Srebnik, 2002). **N)** Un monoterpène cyclique halogéné trouvé chez l'algue rouge *Ochtodes secundiramea* (Polzin et coll., 2003). **O)** La 13-epilauréncienyne (3Z), une C15-acétogénine synthétisée par l'algue rouge *Laurencia* sp. (pour revue, Gribble, 2003). **P)** La δ -lactone de l'acide 6-iodo-4-hydroxy-eicosa-8,11,14-trienoïque formée par la lactoperoxydase des mammifères (pour revue, Dembitsky et Srebnik, 2002). **Q)** Le ω -fluoro-7-16:1, un acide gras insaturé fluoré, identifié dans l'arbuste *Dichapetalum toxicarium* (pour revue, Dembitsky et Srebnik, 2002).

Les composés organiques halogénés sont synthétisés dans la nature par un grand nombre d'organismes vivants (bactéries, champignons, lichens, algues et invertébrés marins, plantes supérieures, insectes et certains vertébrés dont l'homme) ou formés durant des processus naturels abiotiques (éruptions volcaniques, feux de forêts et autres processus géothermiques) (pour revues, Dembitsky et Srebnik, 2002 ; Gribble, 2003). Certains composés halogénés tels que les chlorofluorocarbones (CFCs) (pour revue, McCulloch., 2003), les polychlorobiphényles (PCBs) (Montone et coll., 2003) et d'autres polluants organiques persistants (POPs) (pour revue, Breivik et coll., 2004) ont une origine strictement anthropique.

Tandis que les métabolites chlorés et fluorés, préférentiellement produits dans l'environnement terrestre, ont principalement des sources anthropiques, les métabolites bromés et iodés qui prédominent dans l'environnement marin ont majoritairement des sources biogéniques. Bien que le fluor représente l'halogène le plus abondant de la croûte terrestre, les composés fluorés biologiques sont très rares ; de même, très peu de composés naturels iodés ont été identifiés (pour revues, Murphy, 2003 ; Gribble, 2003 ; Ballschmiter, 2003).

Les composés halogénés constitués d'un à trois atomes de carbone peuvent être volatils. De tels composés organiques halogénés volatils (ou VHOC pour *Volatile Halogenated Organic Compounds*), présents à l'état de trace (de l'ordre du ng/l) dans les océans et l'atmosphère (Lovelock, 1973 ; Fogelqvist, 1985 ; Krysell et Nightingale, 1994), contribuent cependant activement à la chimie de l'atmosphère (pour revue, Platt et Honninger, 2003).

D) Le cycle biogéochimique des halogènes

Le cycle des halogènes est schématisé sur la **figure 2**.

Les VHOC anthropiques, c'est-à-dire les composés principalement chlorés, sont rejetés soit pour les plus volatils directement dans l'atmosphère, soit dans les eaux côtières par les effluents industriels et urbains (Fogelqvist et Krysell, 1986 ; Marchand et coll., 1988) ou les rivières (Dyrssen et coll., 1990).

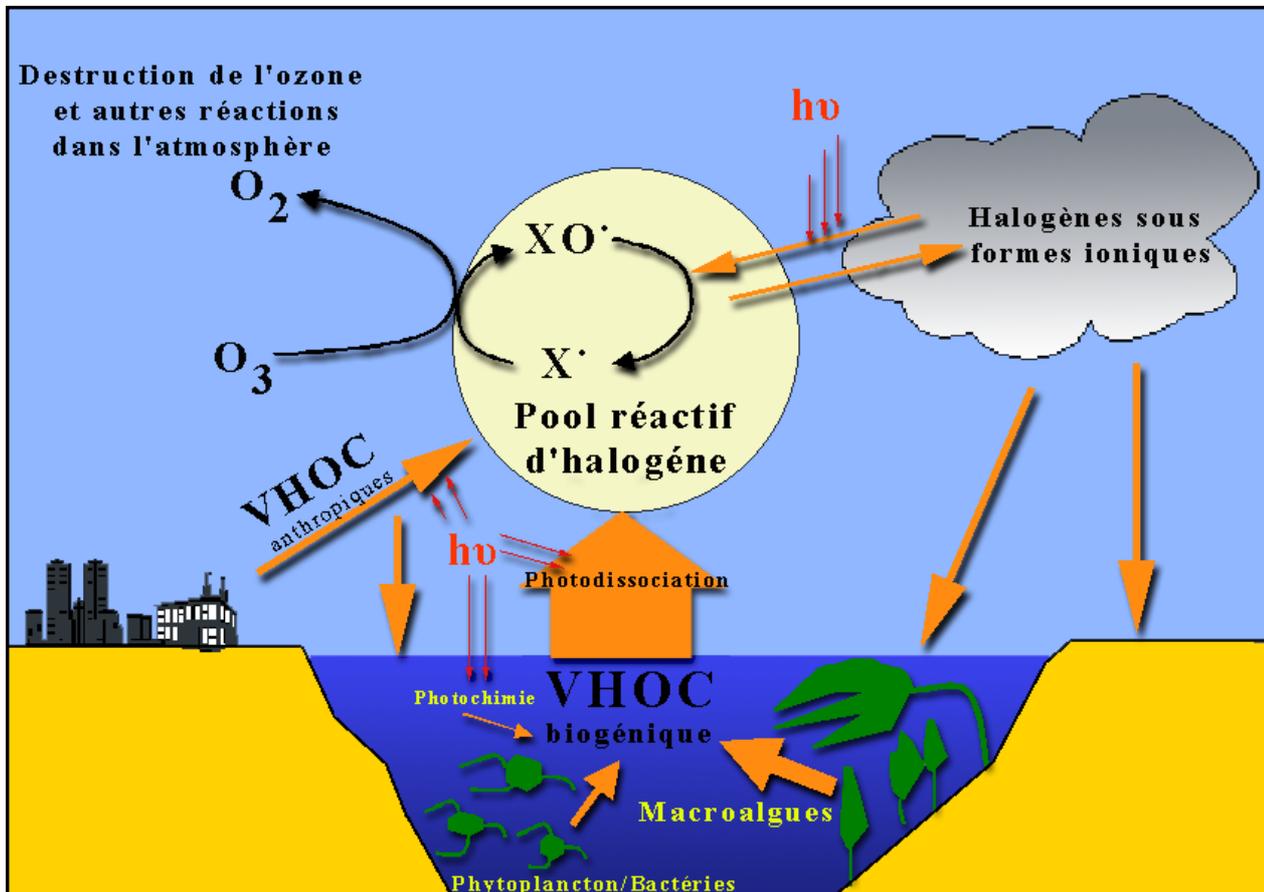


Figure 2 : Schéma du cycle des halogènes dans l'atmosphère.

Les VHOC biogéniques sont, quant à eux, majoritairement produits à la surface des océans par différents processus (*Cf Introduction, Chapitre I. E*). Ils sont émis par les halophytes (Rhew et coll., 2000), le phytoplancton (Moore et coll., 1995), les macroalgues (Gschwend et coll., 1985 ; Carpenter et coll., 2000 ; Baker et coll., 2001) ou produits par des réactions catalysées par la lumière (Moore et Zafiriou, 1994).

Les VHOC présents dans l'eau de mer passent dans l'atmosphère (Liss, 1986), où ils sont rapidement dissociés par photolyse ou par des réactions avec le radical hydroxyle (Carpenter et coll., 1999 ; Cotter et coll., 2001). Ce phénomène est à l'origine d'un pool réactif d'halogènes (les radicaux halogènes X^{*}) et d'une hausse importante d'halogènes oxydés (Wayne et coll., 1995 ; Platt et Janssen, 1996 ; Kolb, 2002 ; O'Dowd et coll., 2002). La chimie des halogènes dans l'atmosphère est extrêmement complexe. Ils interviennent dans un grand nombre de réactions chimiques (Chatfield et Crutzen, 1990 ; Toumi, 1994 ; Platt et Janssen, 1996) et contribuent notamment à la destruction de l'ozone troposphérique et stratosphérique (Molina et Rowland, 1974 ; Yung et coll., 1980 ; Prather et coll., 1984 ; pour revues, Platt et Hönniger, 2003 ; Carpenter, 2003).

Ces halogènes réactifs peuvent être inactivés dans la phase gazeuse et dans les aérosols, puis régénérés par voie photochimique. Ils sont éliminés définitivement de la phase gazeuse vers les aérosols sous forme ionique (Vogt et coll., 1999). Ces ions halogènes sont alors entraînés avec les dépôts secs d'aérosols et les précipitations à la surface des océans ou déposés sur les continents, où ils sont transportés par les cours d'eau jusqu'à l'océan (Campos et coll., 1996 ; Truesdale et Jones, 1996 ; Laniewski et coll., 1999). Les halogènes inorganiques dissouts dans l'eau de mer sont alors disponibles pour produire des VHOC biogéniques. Au niveau des sédiments, la diagenèse des composés halogénés (non volatils) entraîne un flux d'halogènes dissouts dans la colonne d'eau (Upstill-Goddard et Elderfield, 1988 ; pour revue, Wong 1991). Ceci complète le cycle global des composés halogénés.

Dans ce cycle biogéochimique, les algues marines constituent un compartiment d'une importance indéniable pour la production biogénique des composés halogénés volatils, réémis ensuite vers l'atmosphère (Gschwend et coll., 1985 ; Manley et Dastoor, 1988 ; Nightingale et coll., 1995 ; Pedersen et coll., 1996 ; Carpenter et coll., 1999 ; Laturus, 2001). Cependant, les mécanismes biochimiques et physiologiques de formation de ces composés halogénés et leurs rôles biologiques ne sont pas clairement établis chez ces organismes. Tant que ces

processus ne seront pas compris, il sera impossible de décrire, de façon quantitative et qualitative, le transfert dynamique (ou *turn-over*) des halogènes dans ce compartiment et donc d'évaluer son implication dans le cycle des halogènes.

E) Formation des composés organiques halogénés naturels

Les composés organiques halogénés naturels sont formés à partir de deux types de mécanismes : physico-chimiques ou catalytiques.

1) Processus physico-chimiques

- La formation de monohalométhane (CH_3X) se fait principalement par méthylation d'un halogénure (X^-). Ceci est réalisable grâce à des composés sulfurés (sulfonium) agissant comme donneurs d'ions CH_3^+ , tel que le diméthyl-b-propiothétine, le S-adénosylméthionine ou le chlorure de méthionine méthyl sulfonium (Urhahn et Ballschmiter, 1998 ; pour revue, Ballschmiter, 2003).

- Des sources photochimiques de CH_3I ont été mises en évidence dans l'océan de surface (Urhahn et Ballschmiter, 1998; pour revue, Ballschmiter, 2003). En effet, la photolyse de la matière organique dissoute forme des radicaux méthyles (CH_3^\bullet) et l'oxydation de l'iodure par différents oxydants, tel que le radical hydroxyle (OH^\bullet), entraîne la formation du radical iode (I^\bullet) ; ainsi CH_3I peut être produit par recombinaison radicalaire des radicaux méthyle et iode (Moore et Zafiriou, 1994 ; Happell et Wallace, 1996).

- Une substitution d'halogénures sur un composé d'origine biogénique peut être possible soit par un mécanisme radicalaire faisant intervenir l'énergie lumineuse, soit par un échange ionique d'halogénures (pour revue, Ballschmiter, 2003).

2) *Processus catalytiques*

Malgré le grand nombre de composés organiques halogénés identifiés, les mécanismes catalysant l'incorporation des atomes d'halogènes sur les composés organiques sont peu ou mal compris. Cependant, l'élucidation de certaines voies de biosynthèse met en évidence que ces composés peuvent être produits, de façon directe ou indirecte, par des enzymes (McCormick, 1997 ; Kirner et coll., 1998 ; pour revues, Murphy, 2003 ; van Pée et Unversucht, 2003 ; van Pée et Zehner, 2003).

- Parmi les enzymes « halogénantes », trois sont d'origine strictement bactérienne :

- Les perhydrolases (Itoh et coll., 2001 ; Kawanami et coll., 2002 ; De Mot et coll., 2003) sont susceptibles de produire des composés organiques halogénés de façon indirecte, sans aucune spécificité de substrat ou regiospécificité. En présence d'acide carboxylique et de peroxyde d'hydrogène, elles produisent du peracide qui peut oxyder un halogénure (chlorure, bromure ou iodure) en acide hypo-halogéneux. Cet agent halogénant réagit dans un second temps avec un composé carboné pour former des composés organiques halogénés (R-X) (**Figure 3-A**) (Hofmann et coll., 1998).

- Les « halogénases » dépendantes du FADH₂ possèdent, quant à elles, une spécificité de substrat et une regiosélectivité (Dairi et coll., 1995 ; Zehner et coll., 2000 ; Sanchez et coll., 2002). Ces enzymes sont actives en présence de FADH₂, d'halogénures (chlorure ou bromure) et d'oxygène (**Figure 3-B**) (Keller et coll., 2000).

- La fluorinase, enfin, convertit par substitution nucléophile l'ion fluorure et le S-adénylméthionine en 5'-fluoro-5'-désoxyadénosine (**Figure 3-C**) (O'Hagan et coll., 2002).

- Deux autres types d'enzymes ont été identifiées chez des procaryotes et des eucaryotes :

- Les halogénures méthyltransférases produisent des monohalométhanés (CH₃X), chez les champignons (Harper et Hamilton, 1988 ; Wuosmaa et Hager, 1990 ; Saxena et coll., 1998), les algues marines (Wuosmaa et Hager, 1990 ; Itoh et coll., 1997 ; Ohsawa et coll., 2001a) et

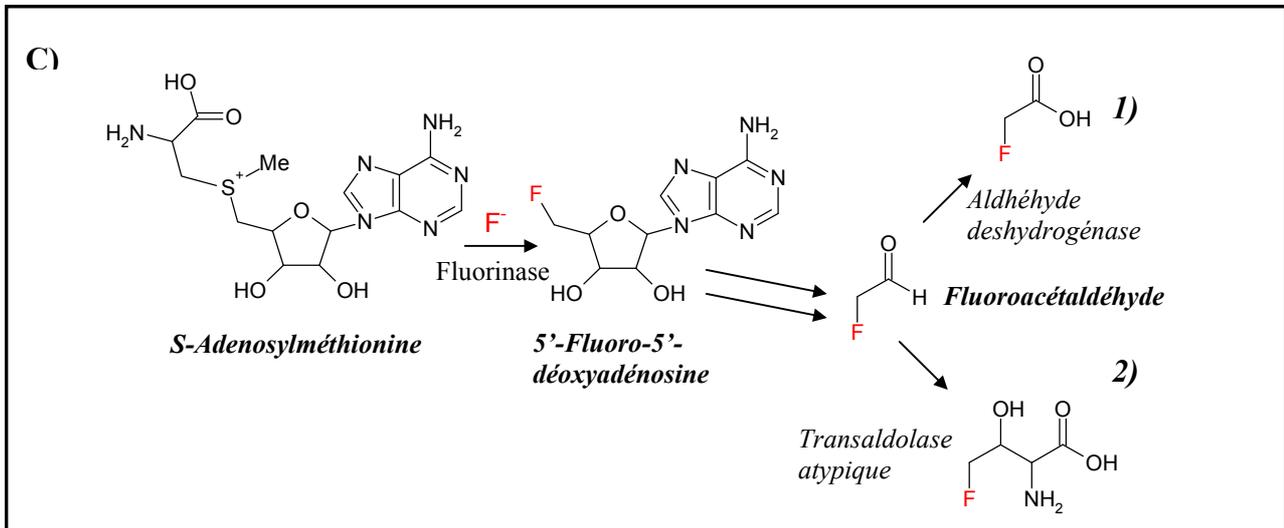
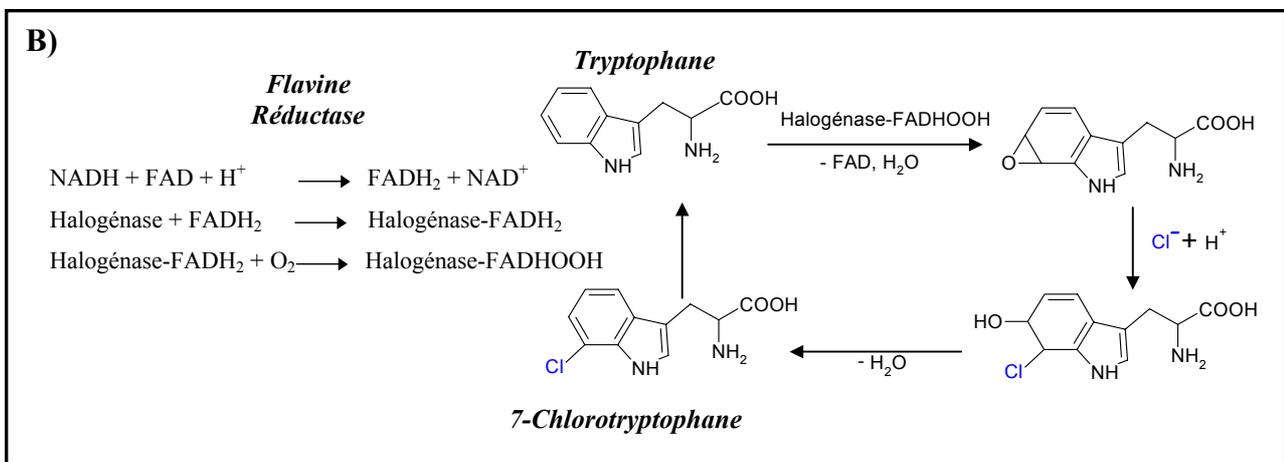
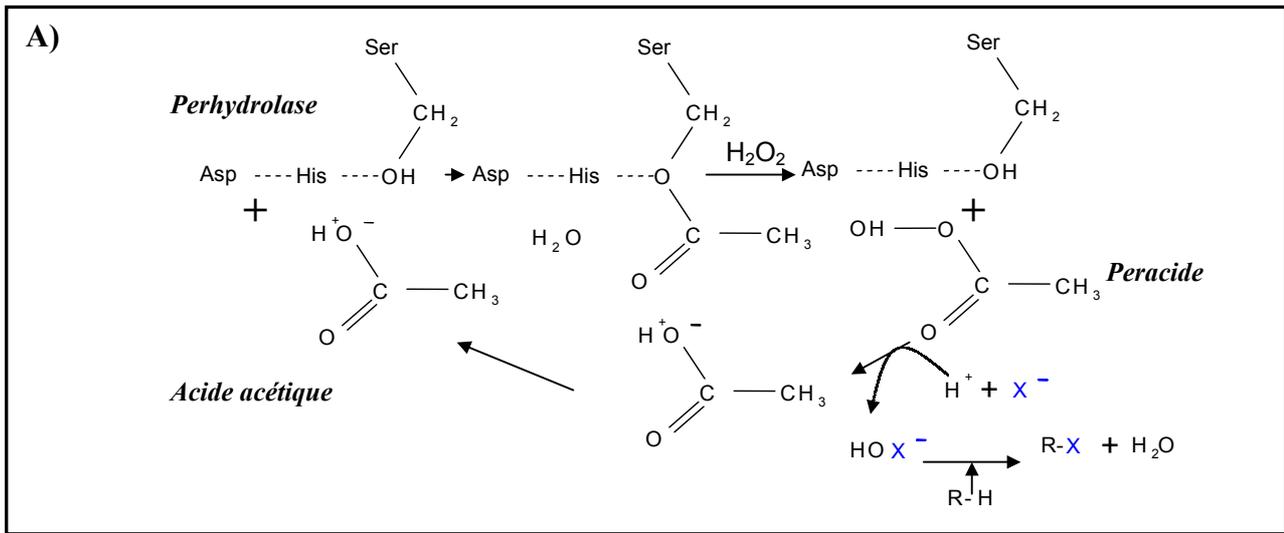


Figure 3 : Mécanisme d'action des enzymes halogénantes retrouvées uniquement chez des bactéries. **A)** Mécanisme d'action des perhydrolases (Hofmann et coll., 1998). **B)** Mécanisme hypothétique d'action de l'halogénase dépendante du FADH_2 / Chlorination du tryptophane. La réduction du FAD est préalablement catalysé par une flavine réductase (pour revue, van Pée et Unversucht, 2003). **C)** Intervention d'une fluorinase dans la biosynthèse de l'acide fluoroacétique (**1**) et de la 4-fluorothréonine (**2**) chez la bactérie *Streptomyces cattleya* (O'Hagan et coll., 2002).

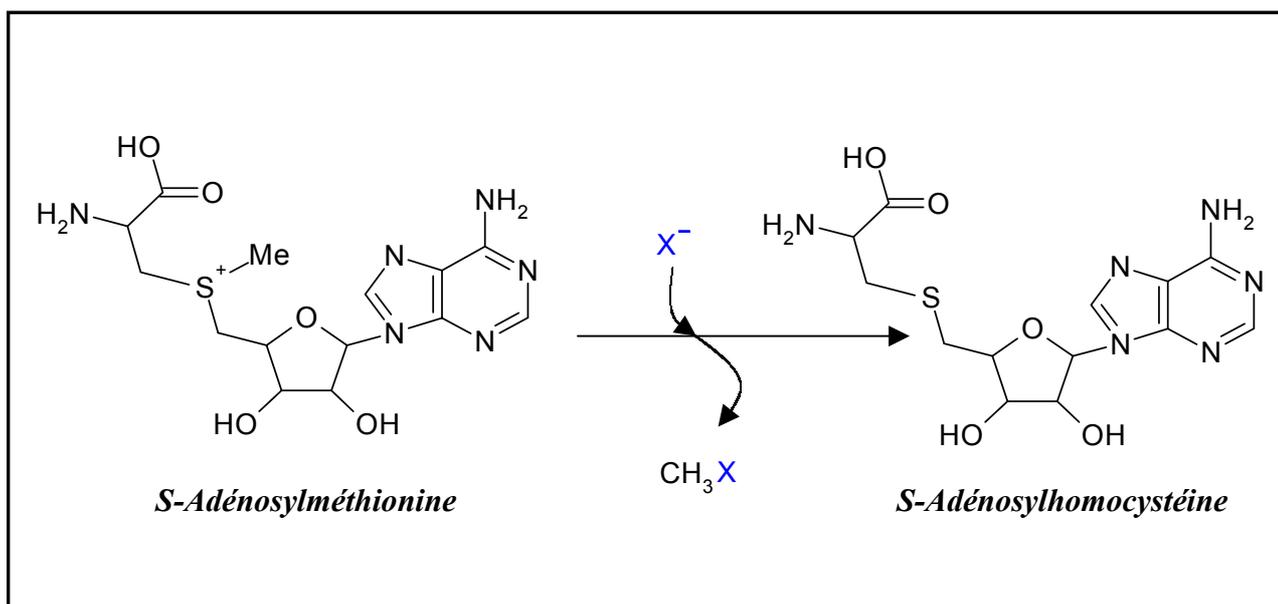


Figure 4 : Réaction catalysée par l'halogénure méthyl transférase ($X= Cl^-$, Br^- ou I^-) (pour revue, Murphy, 2003).

les plantes halophiles (Wuosmaa et Hager, 1990 ; Attieh et coll., 1995 ; Saini et coll., 1995 ; Ni et Hager, 1998). Ces enzymes catalysent la synthèse de CH_3X à partir de S-adénosylméthionine et d'halogénures (chlorure, bromure ou iodure) (**Figure 4**). Des activités de méthylation d'halogénures dépendantes du S-adénosylméthionine sont également détectées chez des bactéries (Amachi et coll., 2001).

- Les haloperoxydases, présentes dans la majorité des embranchements du règne vivant (Hewson et Hager, 1980 ; pour revues, van Pée, 1996 ; Neidleman et Geibert, 1986), semblent être les enzymes impliquées dans l'halogénéation d'un nombre important de composés organiques.

II- Les haloperoxydases dépendantes du vanadate

A) Définition et généralités sur les haloperoxydases

1) Réactions chimiques et détections d'activités haloperoxydases

Les haloperoxydases (HPOs) sont capables, en présence de peroxyde d'hydrogène, d'oxyder les halogénures (équation 1) et éventuellement de produire de façon indirecte (équation 2) ou directe (équation 3) des composés organiques halogénés (pour revue, Neidleman et Geibert, 1986).



où X^- représente l'halogénure (Cl^- , Br^- ou I^-) et R-H le substrat organique

L'acide hypo-halogéneux (HOX), produit lors de l'équation 1, est considéré comme un intermédiaire et, ainsi, en présence d'un accepteur nucléophile (substrat organique R-H), un composé organique halogéné (R-X) pourra être produit (équation 2). Pour une halogénéation efficace, une mole d'halogénure est oxydée pour une mole de peroxyde

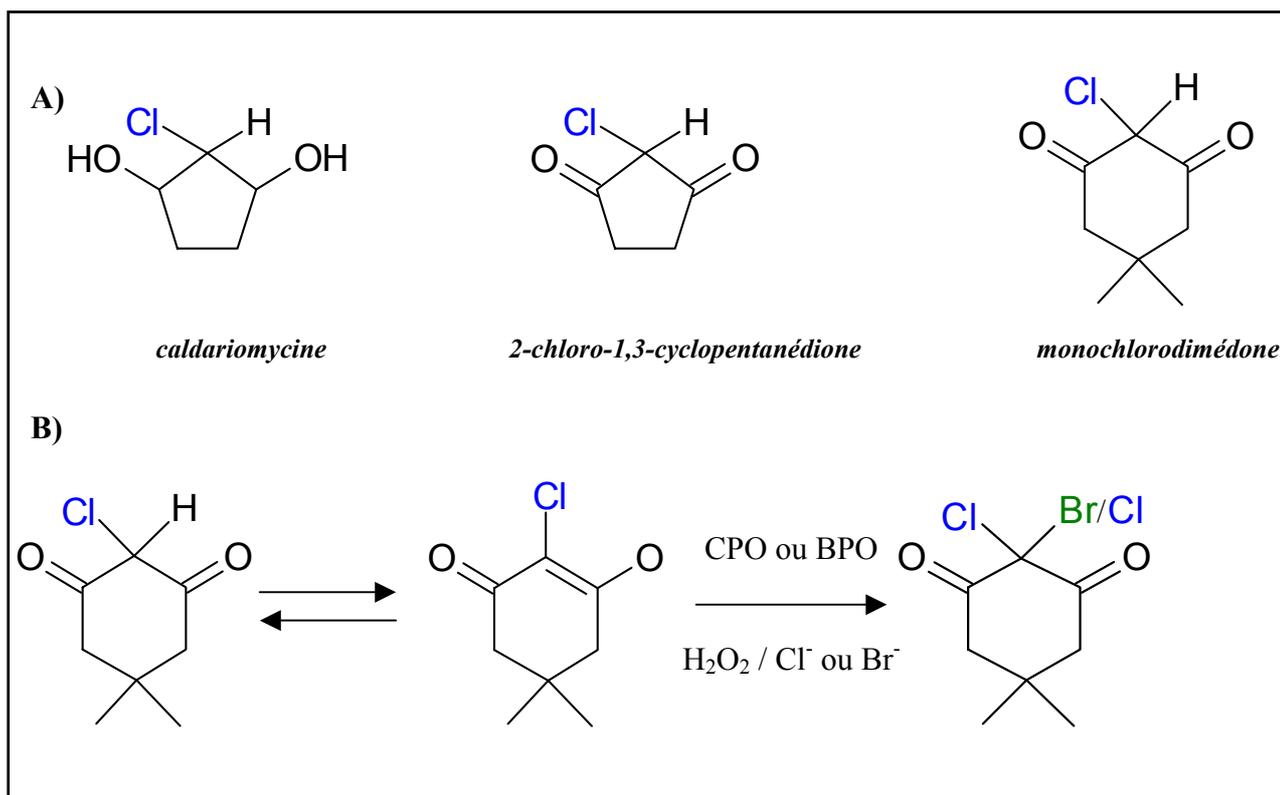


Figure 5 : A) Structures chimiques de la caldariomycine, du 2-chloro-1,3-cyclopentanedione et du monochlorodimédone. B) Représentation schématique de l'halogénéation du monochlorodimédone par une chloro- ou une bromoperoxydase (CPO ou BPO) en présence de peroxyde d'hydrogène et d'halogénures (Cl⁻ ou Br⁻).

d'hydrogène, « halogénant » ainsi une mole de substrat organique (R-H) (pour revue, Butler, 1998). En absence d'accepteur nucléophile, l'acide hypo-halogéneux peut être réduit par un second peroxyde d'hydrogène, conduisant à la formation d'oxygène et d'halogénure (équation 4) (Everett et coll., 1990a).



Les HPOs sont nommées suivant l'halogénure le plus électronégatif qu'elles sont capables d'oxyder : une chloroperoxydase (CPO) oxyde le chlorure, le bromure et l'iode, une bromoperoxydase (BPO) oxyde le bromure et l'iode, tandis qu'une iodoperoxydase (IPO) est spécifique de l'iode. Le peroxyde d'hydrogène n'ayant pas la force énergétique pour oxyder le fluorure, il n'existe pas de fluoroperoxydase (pour revue, Butler et coll., 2001).

La première HPO a été détectée dans le champignon marin *Caldariomyces fumago* (Shaw et Hager, 1959), qui produit un métabolite antimicrobien, la caldariomycine. Cette enzyme a été identifiée comme une CPO (Shaw et Hager, 1961). Suite à cette découverte, une réaction spectrophotométrique, fondée sur la chlorination ou la bromination du monochlorodimédone (2-chloro-5,5-diméthyl-1,3-dimédone) en présence de peroxyde d'hydrogène et d'halogénure (chlorure et bromure), a été développée pour la détection des activités haloperoxydases. Ce composé synthétique possède, en effet, une structure analogue au 2-chloro-1,3-cyclopentanedione, un intermédiaire dans la biosynthèse de la caldariomycine (**Figure 5**) (Hager et coll., 1966).

L'activité iodoperoxydase, quant à elle, est mesurée spectrophotométriquement par la formation de triiodures (I_3^-) après oxydation de l'iode en présence de peroxyde d'hydrogène (Vilter, 1984).

2) Classification des différents types d'haloperoxydases

En utilisant ces techniques de détection, un très grand nombre d'activités iodo-, bromo- et chloroperoxydases ont pu être mises en évidence chez des bactéries, des lichens, des champignons, des algues et des invertébrés marins ainsi que chez des animaux terrestres (Hewson et Hager, 1980 ; pour revues, Neidleman et Geibert, 1986 ; Dembitsky, 2003).

Ces enzymes sont regroupées en trois grands groupes selon la nature de leur cofacteur (**Figure 6**) (pour revue, Littlechild, 1999) :

- Les HPOs ne possédant aucun groupe prosthétique sont présentes chez de nombreuses bactéries, telles que la BPO de *Streptomyces aureofaciens* (Hecht et coll., 1994) ou la CPO de *Serratia marcescens* (Preobrazhenskaya et coll., 2003).

- Chez les organismes terrestres, les HPOs prédominantes possèdent un hème comme groupe prosthétique. Dans la majorité des cas, elles possèdent une ferriprotoporphyrine IX, telles que la BPO de l'actinomycète *Streptomyces phaeochromogenes* (van Pee et Lingens, 1985), la myeloperoxydase (CPO) et la peroxydase éosinophile (BPO) des globules blancs, la lactoperoxydase (BPO) et la thyroïde peroxydase (IPO) des mammifères (Furtmüller et coll., 2001, 2002, 2003 ; pour revue, O'Brien, 2000).

Dans le milieu marin, des HPOs possédant un atome de fer incorporé à un hème ont également été isolées chez des vers, des champignons et quelques algues vertes (Morris et Hager 1966 ; Baden et Corbett, 1980 ; Franzen et coll., 1998 ; Verdel et coll., 2000). D'autre part, une CPO composée d'une hémoprotéine et d'une flavoprotéine a été identifiée chez le ver marin *Notomastus lobatus* (Chen et coll., 1991).

- Le troisième groupe de HPOs possèdent du vanadate (VO_4^{3-}) comme cofacteur (les vHPOs) (pour revues, Butler et Walker, 1993 ; Vilter, 1995) (**Annexe 1**).

Ces activités vHPOs majoritairement détectées chez des eucaryotes marins sont exclusivement des vBPOs ou des vIPOs (Butler et coll., 2001) (**Annexe 1**). La première activité vBPO a été caractérisée chez l'algue brune *Ascophyllum nodosum* (Vilter, 1983 ; Vilter, 1984 ; de Boer et coll., 1986). Depuis, de nombreuses activités vBPOs ont été découvertes dans toutes les classes d'algues marines, incluant les chlorophycées (algues vertes), les phaeophycées (algues brunes) et les rhodophycées (algues rouges) (Itoh et coll., 1986 ; Krenn et coll., 1989 ; Sheffield et coll., 1993 ; Moore et Okuda, 1996 ; Almeida et coll., 2001 ; pour revues, Vilter, 1995 ; Dembitsky et Srebnik, 2002 ; Dembitsky, 2003) et chez des lichens (Plat et coll., 1987 ; Rezanka et Dembitsky, 1999 ; pour revue, Dembitsky et Srebnik, 2002). Quelques activités vIPOs ont aussi été détectées chez des algues brunes telles que *Laminaria hyperborea* et *Laminaria ochroleuca* (Almeida et coll., 2001) (**Annexe 1**).

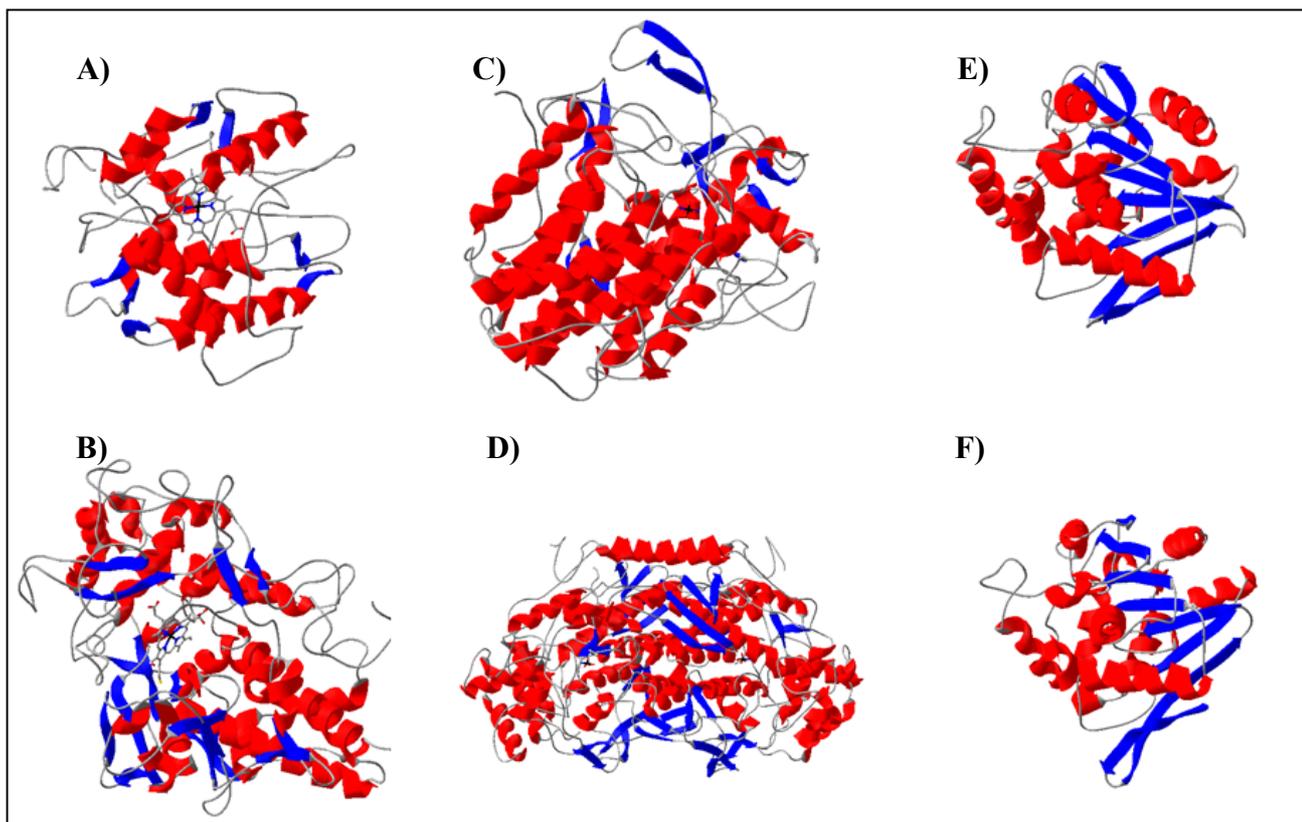


Figure 6 : Représentations structurales des trois classes d'haloperoxydases : les HPOs possédant un hème (**A-B**), les HPOs dépendantes du vanadate (**C-D**) et les HPOs sans cofacteur (**E-F**). **A)** La CPO du champignon *Leptoxyphium fumago* (Code PDB : 2CPO) (Sundaramoorthy et coll., 1995). **B)** La myeloperoxydase humaine (Code PDB : 1MYP) (Zeng et Fenna, 1992). **C)** La CPO du champignon *Curvularia inaequalis* (Code PDB : 1VNC) (Messerschmidt et Wever, 1996). **D)** La BPO de l'algue brune *Ascophyllum nodosum* (Code PDB : 1QI9) (Weyand et coll., 1999). **E)** La CPO de la bactérie *Streptomyces lividans* (Code PDB : 1A88) (Hofmann et coll., 1998). **F)** La BPO de la bactérie *Streptomyces aureofaciens* (Code PDB : 1BRO) (Hecht et coll., 1994).

Dans le milieu terrestre, les seules vHPOs identifiées sont des vCPOs, isolées chez des champignons hyphomycètes de la famille des Dematiaceae (**Annexe 1**) (Liu et coll., 1987 ; van Schijndel, 1993).

B) Caractérisations des haloperoxydases dépendantes du vanadate

1) Analyses biochimiques

Malgré le grand nombre d'activités vHPOs détectées, seulement quelques enzymes ont été isolées et purifiées. Chez les algues, la présence de polysaccharides pariétaux pose des difficultés d'extraction protéique. Ainsi, pour chaque groupe d'algues, il est nécessaire d'établir des protocoles d'extraction spécifiques pour purifier ces enzymes, comme par exemple l'extraction par partition de phase proposée par Hans Vilter dans le début des années 90 pour l'extraction des vHPOs d'algues brunes (Vilter, 1994).

L'étude des caractères biochimiques et des paramètres cinétiques a été réalisée sur des vBPOs et des vIPOs purifiées ou partiellement purifiées à partir d'algues brunes, sur des vBPOs d'algues rouges, sur la vBPO d'un lichen et sur la vCPO d'un champignon hyphomycète appartenant à la famille des Dematiaceae. Les tableaux en **annexe 2** récapitulent les résultats de ces études.

Le poids moléculaire des vHPOs natives isolées est compris entre 67,000 Da, pour la vCPO du champignon terrestre *Curvularia inaequalis* (van Schijndel et coll., 1993), et 790,000 Da, pour la vBPO de l'algue rouge *Corallina pilulifera* (Itoh et coll., 1986). Les activités spécifiques pour l'oxydation du brome sont comprises entre 12 unités/mg, pour la vBPO1 de l'algue brune *L. saccharina* (Almeida et coll., 2001), et 1,730 unités/mg, pour la vBPO de l'algue brune *Macrocystis pyrifera* (Soedjak et Butler, 1990a). Pour la vBPO de l'algue brune *A. nodosum*, une faible activité chloroperoxydase (0.49 unité/mg) a été mise en évidence en présence de fortes concentrations en chlorure (1.5 M) (Soedjak et Butler, 1990b). Les données biochimiques sur les vHPOs caractérisées comme des vIPOs restent assez partielles. De plus, certaines d'entre elles ont été nommées vIPOs alors qu'elles possèdent une faible activité bromoperoxydase (Almeida et coll., 1996 ; Almeida et coll., 1998 ; Almeida et coll., 2000)

(Tableau 1, **Annexe 2**). Seules les enzymes de *L. ochroleuca* et de *L. hyperborea* ont clairement été identifiées comme étant des vIPOs strictes (Almeida et coll., 2001).

L'affinité des vBPOs et de la vCPO pour leurs substrats dépend du pH. En effet, à pH élevé, elle augmente pour le peroxyde d'hydrogène tandis qu'à l'inverse, elle diminue pour l'halogénure (Everett et coll., 1990a ; Soedjak et Butler, 1991 ; van Schijndel et coll., 1994 ; Soedjak et coll., 1995). Chez ces enzymes, à pH élevé (>pH 6.5), une importante concentration de peroxyde d'hydrogène (>20 mM) favorise la production d'oxygène plutôt que l'halogénéation de substrats organiques (Everett et coll., 1990a ; Soedjak et Butler, 1991 ; Soedjak et coll., 1995). Par contre, à faible pH (pH<5), les vHPOs sont inhibées de façon irréversible par de fortes concentrations en peroxyde d'hydrogène (Soedjak et coll., 1995 ; Winter et Butler, 1996). De plus, dans le cas de la vCPO de *C. inaequalis*, les fortes concentrations en chlorure inhibent de façon non compétitive la fixation du peroxyde d'hydrogène (à pH>5, inhibition à partir d'une concentration en chlorure de 40 mM). A faible pH (<3-4), cette inhibition est plus élevée (à pH<4, inhibition à partir d'une concentration en chlorure de 5 mM) et devient compétitive avec la fixation du peroxyde d'hydrogène (van Schijndel et coll., 1994). Dans le cas des vBPOs d'*A. nodosum*, de *M. pyrifer* et de *F. distichus* à un pH compris entre 4 et 6, le bromure, à une concentration >25 mM, a un effet inhibiteur sur la fixation du peroxyde d'hydrogène, cependant les auteurs ne sont pas d'accord sur le caractère compétitif de cette inhibition. Par contre, aucune inhibition n'est observée à un pH<4 et, à un pH>6, seule la vBPO de *F. distichus* est inhibée (Wever et coll., 1985 ; Wever et coll., 1988 ; Everett et coll., 1990b ; Soedjak et Butler, 1991).

Ces enzymes restent actives à de fortes concentrations de leur produit, l'acide hypo-halogéneux (2.5-4 mM) (Liu et coll., 1987 ; van Schijndel et coll., 1994).

Les vHPOs présentent des propriétés physico-chimiques qui les distinguent des HPOs possédant un hème. En particulier, elles sont thermostables (Tableau 1, **Annexe 2**) et résistent à de hautes concentrations en solvants organiques comme l'acétone, le méthanol, l'éthanol et l'isopropanol (Wever et coll., 1985 ; de Boer et coll., 1987 ; van Schijndel et coll., 1994 ; pour revue, Vilter, 1995). Elles sont également relativement stables dans des solutions à fortes concentrations en chlorure de guanidium, un agent chaotropique, ou en SDS, un détergent (Tromp et coll., 1990 ; van Schijndel et coll., 1994). Ces propriétés sont très intéressantes pour des applications biotechnologiques industrielles, où les vHPOs pourraient

être utilisées pour la synthèse de composés organiques halogénés (pour revues, Neidleman et Geigert, 1986 ; Littlechild, 1999 ; Rehder, 2003).

2) Caractérisations moléculaires

La vCPO du champignon terrestre *C. inaequalis* est la première vHPO à avoir été clonée et séquencée (Simons et coll., 1995), puis exprimée dans *Saccharomyces cerevisiae* pour obtenir une grande quantité de vCPO recombinante (Hemrika et coll., 1997 ; Hemrika et coll., 1999). Deux autres séquences de vCPOs de champignons, appartenant également à la famille des Dematiaceae, sont maintenant connues : celle d'*Embellisia didymospora* (Barnett et coll., 1998) et celle, partielle, de *Drechslera biseptata* (Hemrika et coll., 1997).

Six vBPOs ont été séquencées à partir d'algues marines : la vBPO de l'algue brune *A. nodosum* (Vilter, 1995), la vBPO de l'algue brune *Fucus distichus* (Genbank : numéro d'accès # AAC35279), deux vBPOs de l'algue rouge *Corallina pilulifera* (Shimonishi et coll., 1998) et deux vBPOs de l'algue rouge *C. officinalis* (Brindley et coll., 1998 ; Carter et coll., 2002). Les vBPOs de *C. pilulifera* et de *C. officinalis* ont récemment été exprimées dans *Escherichia coli* (Shimonishi et coll., 1998 ; Carter et coll., 2002).

3) Résolutions de structures cristallines

Après leur cristallisation en solution, trois structures tridimensionnelles de vHPOs natives ont été résolues par diffraction aux rayons X (**Annexe 3**) : la vCPO du champignon terrestre *C. inaequalis* (Messerschmidt et Wever, 1996) et la vBPO de l'algue brune *A. nodosum* (Weyand et coll., 1999), en présence de leur cofacteur, le vanadate, et la vBPO de l'algue rouge *C. officinalis*, en présence de phosphate (Isupov et coll., 2000 ; pour revue, Littlechild et Garcia-Rodriguez, 2003). Les structures tridimensionnelles de ces enzymes sont représentées sur la **figure 7**.

La vCPO de *C. inaequalis* est une enzyme monomérique cylindrique constituée de deux domaines. Sa structure secondaire est dominée par des hélices α et le motif principal de

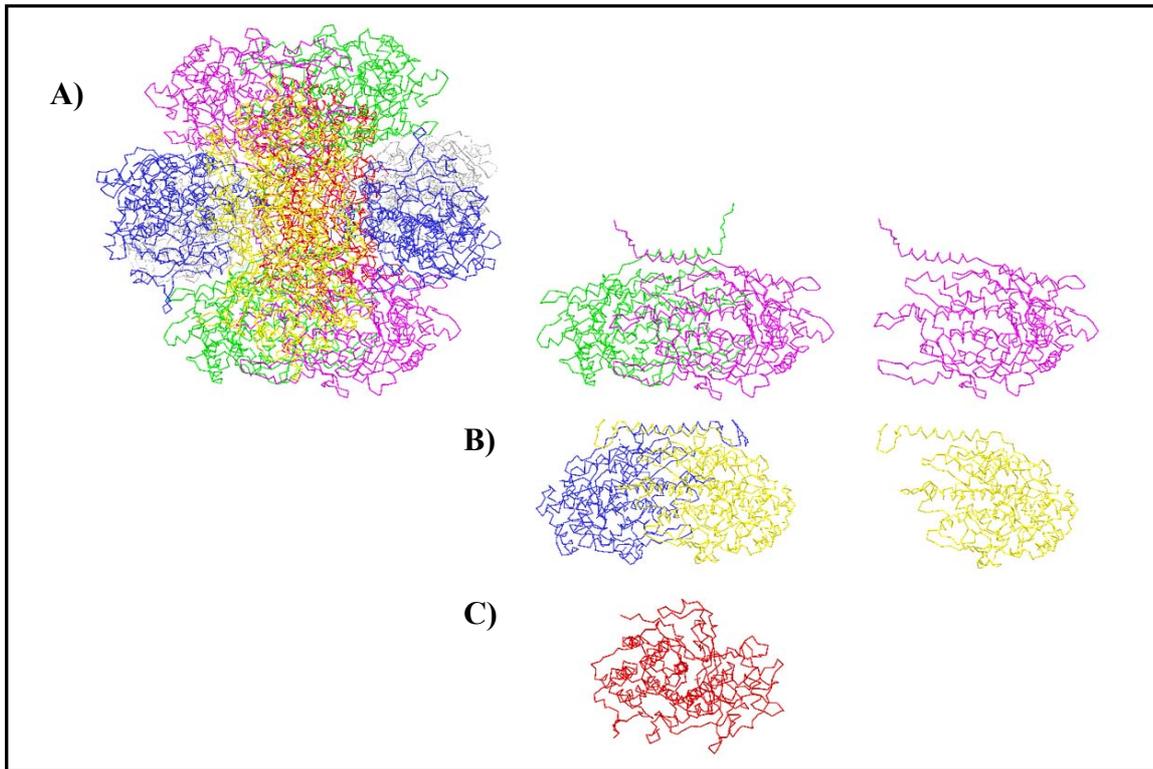


Figure 7 : Représentations des chaînes carbonées des trois vHPOs cristallisées sous forme native.

A) La vBPO dodécamérique de l'algue rouge *Corallina officinalis* (Code PDB : 1QHB) (Isupov et coll., 2000). **B)** La vBPO dimérique de l'algue brune *Ascophyllum nodosum* (Code PDB : 1QI9) (Weyand et coll., 1999). **C)** La vCPO monomérique du champignon *Curvularia inaequalis* (Code PDB : 1VNC) (Messerschmidt et Wever, 1996).

sa structure tertiaire est constitué de deux ensembles de quatre hélices (**Figure 8**) (Messerschmidt et Wever, 1996 ; Messerschmidt et coll., 1997).

La vBPO d'*A. nodosum* est un homodimère. Chaque monomère possède trois ponts disulfure intramoléculaires et un pont intermoléculaire. De plus, quatre ponts salins ainsi que de nombreuses autres interactions, principalement hydrophobes, stabilisent l'interface dimérique (Weyand et coll., 1999). La vBPO de *C. officinalis*, enzyme dodécamérique, est constituée de six homodimères identiques et présente en son centre une cavité. Les monomères associés en dimère sont connectés par des ponts salins et des liaisons hydrophobes. Les 12 sous-unités présentent 23 axes de symétrie (Isupov et coll., 2000 ; pour revue, Littlechild et Garcia-Rodriguez, 2003). La thermosabilité et la résistance aux substrats de ces vBPOs pourraient venir de l'importance des interactions liant les monomères, conduisant à une structure très solide (pour revue, Littlechild et Garcia-Rodriguez, 2003). Comme pour la vCPO, chez ces deux vBPOs, l'unité monomérique est également constituée d'hélices α avec quelques courts feuilletts β et le corps de l'homodimère est constitué de deux ensembles de quatre hélices (**Figure 8**) (Weyand et coll., 1999 ; Isupov et coll., 2000).

Tandis que les cristaux de la vCPO de *C. inaequalis* (Messerschmidt et coll., 1997) et de la vBPO d'*A. nodosum* (Weyand et coll., 1999) présentent, au niveau de leur site actif, une molécule de vanadate, une molécule de phosphate occupe la place de ce cofacteur dans la structure cristallisée de la vBPO de *C. officinalis* (Isupov et coll., 2000). Pour les trois vHPOs, chaque monomère possède un site actif (Messerschmidt et coll., 1997 ; Weyand et coll., 1999 ; Isupov et coll., 2000). L'activité enzymatique de ces enzymes nécessite une molécule de vanadate au niveau de ce site actif. Chez les vHPOs, la région du site actif se situe au fond d'un tunnel, composé principalement de résidus chargés et de résidus hydrophobes (**Figure 9-A**) (Messerschmidt et Wever, 1996 ; Weyand et coll., 1999 ; Isupov et coll., 2000). Dans le cas des vBPOs, dimériques, la surface de ce tunnel est constituée de résidus appartenant aux deux monomères (**Figure 9-B**) (Weyand et coll., 1999 ; Isupov et coll., 2000).

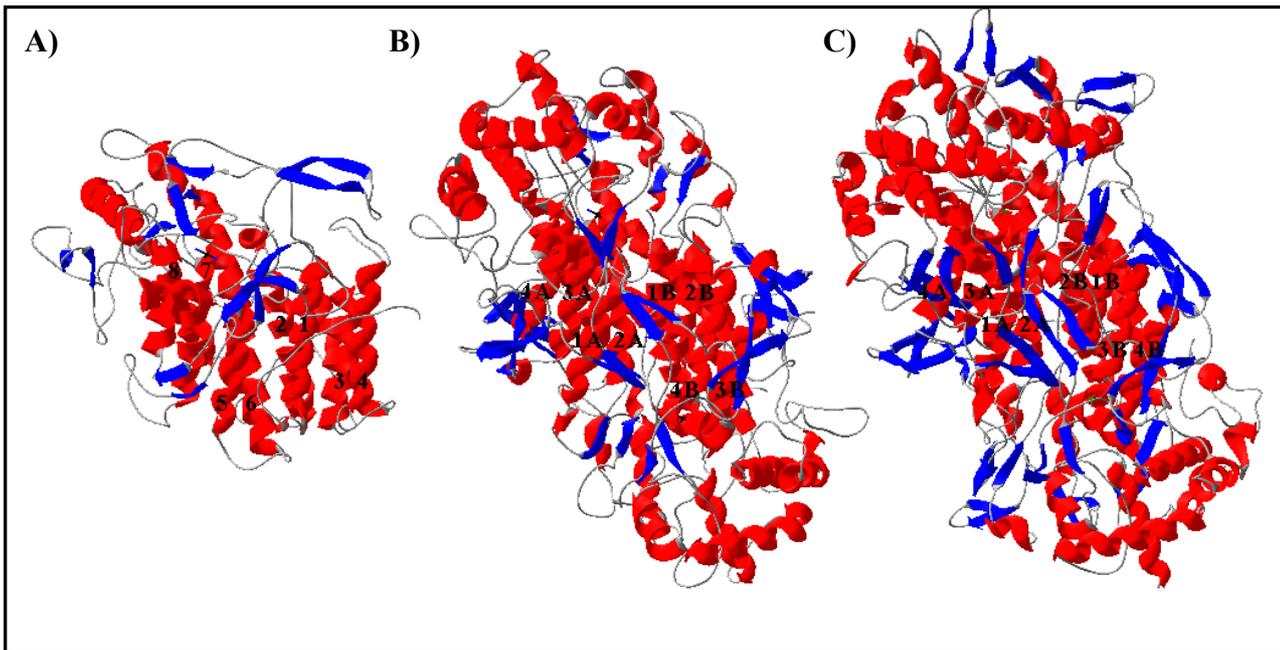


Figure 8 : Représentations des structures secondaires de la vCPO de *Curvularia inaequalis* (A), du dimère de la vBPO d'*Ascophyllum nodosum* (B) et de la vBPO de *Corallina officinalis* (C). Les hélices constituant le corps de l'enzyme sont numérotées (A et B pour chacun des monomères).

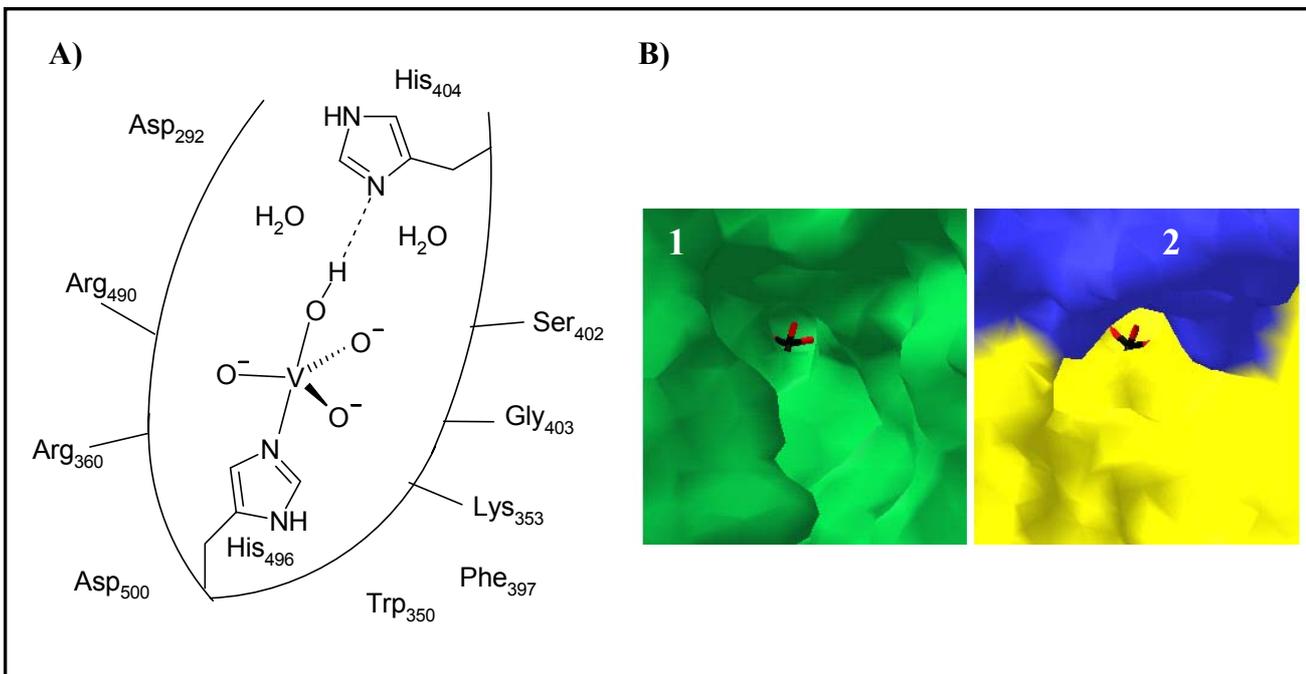


Figure 9 : A) Région du site actif de la vCPO de *Curvularia inaequalis*. B) Représentation de la surface du tunnel du site actif de la vCPO de *C. inaequalis* (1) et de la vBPO d'*Ascophyllum nodosum* (2). Chez la vBPO, le monomère sur lequel est fixé le vanadate est coloré en jaune tandis que le deuxième monomère, qui vient recouvrir le premier, est représenté en bleu.

C) Mécanismes d'action des haloperoxydases dépendantes du vanadate

1) Architecture du site actif

Malgré les faibles homologies existant entre les séquences protéiques des vHPOs, l'architecture des sites actifs de la vCPO de *C. inaequalis* et des vBPOs d'*A. nodosum* et de *C. officinalis* est très conservée (**Figure 10**) et est apparemment relativement simple (Messerschmidt et Wever, 1996 ; Weyand et coll., 1999 ; Isupov et coll., 2000). Dans le cas de la vCPO de *C. inaequalis* et de la vBPO d'*A. nodosum* (cristallisées avec leur cofacteur), le vanadate (HVO_4^{2-}), présent dans son état d'oxydation le plus élevé (5+), est associé à la protéine par une liaison covalente avec un résidu histidine (His496 dans la vCPO et His486 dans la vBPO d'*A. nodosum*) (Messerschmidt et Wever, 1996 ; Weyand et coll., 1999). Dans la vBPO de *C. officinalis*, cette histidine (His551) est conservée mais ne forme pas de liaison covalente avec le phosphate inorganique (Isupov et coll., 2000) (**Figure 10**).

Le vanadate réside dans une coordination géométrique bipyramidale trigonale. Trois des atomes d'oxygène du vanadate constituent un plan équatorial tandis que le quatrième, apical, lie un hydroxyle (**Figure 10**) (Messerschmidt et coll., 1997 ; Weyand et coll., 1999). Ces atomes d'oxygène sont en contact, par des liaisons hydrogène, avec des acides aminés (hydrophobes et chargés positivement) de l'enzyme (**Figure 10**) et avec des molécules d'eau (Messerschmidt et coll., 1997 ; Weyand et al, 1999).

La compréhension du rôle du vanadate d'une part, et de chaque résidu présent au niveau du site actif d'autre part, résultent d'études biophysiques et spectroscopiques (de Boer et coll., 1988a, b ; Hormes et coll., 1988 ; Arber et coll., 1989 ; Kusthardt et coll., 1993 ; Dau et coll., 1999 ; Renirie et coll., 2000a ; Casny et coll., 2000), ainsi que d'études de mutagenèse dirigée (Macedo-Ribeiro et coll., 1999 ; Hemrika et coll., 1999 ; Carter et coll., 2002 ; Tanaka et coll., 2003) et d'études de cinétique enzymatique sur certaines des protéines mutantes obtenues (Hemrika et coll., 1999 ; Carter et coll., 2002 ; Tanaka et coll., 2003). L'essentiel des mutations a été réalisé à partir de la vCPO de *C. inaequalis* et les structures tridimensionnelles des protéines mutantes ont généralement été établies (**Annexe 3**). Un tableau en **Annexe 3** répertorie les résultats et les conclusions de ces études.

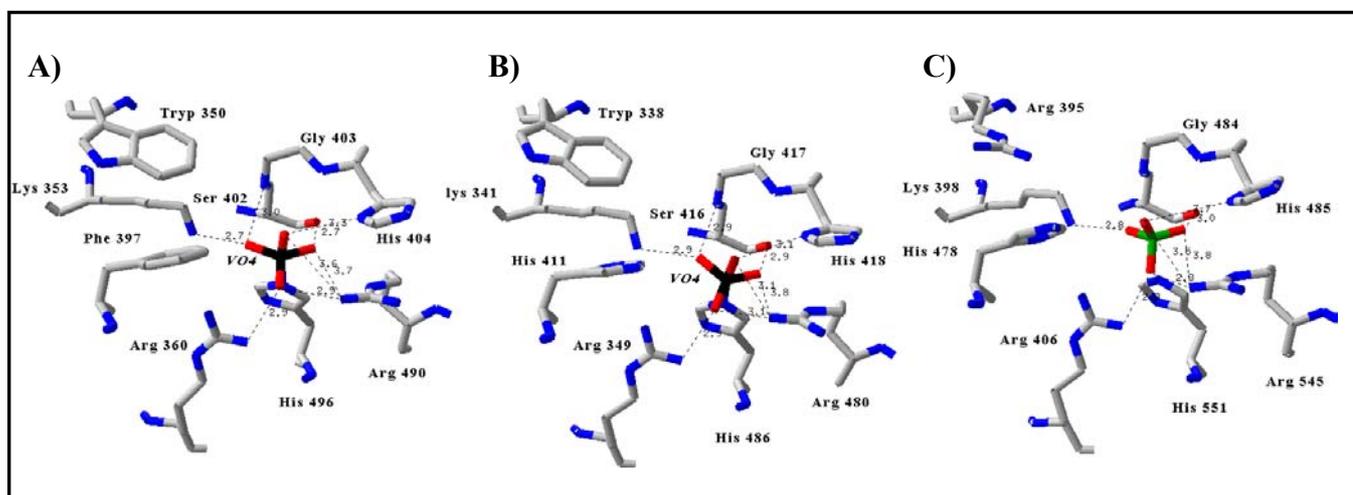


Figure 10 : Comparaison du site actif (à ~ 5 Å du vanadate) de la vCPO de *Curvularia inaequalis* (A), de la vBPO d'*Ascophyllum nodosum* (B) et de la vBPO de *Corallina officinalis* (C). Les distances des liaisons hydrogène, représentées en pointillés, entre le vanadate (ou le phosphate) et les résidus de l'enzyme sont données en Å. (couleurs : carbone en gris, azote en bleu, oxygène en rouge, vanadate en noir, phosphate en vert).

Ainsi, dans tous les cas, bien que le repliement de la protéine native et celui des protéines recombinantes soient identiques, les modifications ponctuelles des résidus du site actif provoquent des baisses significatives de l'activité haloperoxydase (**Annexe 3**). Ces études ont permis de mettre en évidence que les vHPOs possèdent un site actif très rigide constitué de plusieurs résidus essentiels à l'activité enzymatique. Le résidu histidine (His496 dans la vCPO ; **Figure 10**) impliqué dans la liaison covalente avec le vanadate est indispensable pour établir la géométrie bipyramidale trigonale du vanadate et donc assurer l'activité haloperoxydase. Cinq résidus (Lys353, Arg490, Arg360, Ser402 et Gly403 dans la vCPO ; **Figure 10**), jouent, par l'intermédiaire de liaisons hydrogène, le rôle de donneurs de protons et permettent ainsi de neutraliser la charge négative du vanadate. Un second résidu histidine (His404 dans la vCPO ; **Figure 10**), quant à lui, semble jouer un rôle important dans la coordination du peroxyde d'hydrogène. La différence majeure entre le site actif de la vCPO et celui des vBPOs réside dans la présence chez les vBPOs d'un troisième résidu histidine supplémentaire (His411 dans la vBPO d'*A. nodosum* ; **Figure 10**) à la place de la phénylalanine (Phe397) chez la vCPO. Cette histidine ne présente aucune liaison hydrogène avec le vanadate (pour revue, Butler et coll., 2001).

2) Mécanisme d'oxydation des halogénures

Le mécanisme d'action pour l'oxydation des halogénures, qui semble similaire entre la vCPO et les vBPOs, est de type « bi-bi ping-pong » (Cleland, 1973 ; Everett et coll., 1990b), où le peroxyde d'hydrogène serait le premier substrat, suivi de l'halogénure. Bien que ce mécanisme ne soit pas complètement résolu, le schéma représenté en **figure 11** est actuellement le plus vraisemblable (Hemrika et coll., 1999 ; pour revue, Butler et coll., 2001).

Durant la réaction catalytique, le vanadate, dont l'état d'oxydation (+5) ne change pas, fonctionne comme un acide de Lewis (de Boer et coll., 1988b ; Hormes et coll., 1988 ; Arber et coll., 1989 ; Kusthardt et coll., 1993). La fixation du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) sur le vanadate constitue la première étape du cycle catalytique des vHPOs (**Figure 11, étape 1 A-D**). Pour ce faire, l'histidine catalytique (His404 dans la vCPO et His496 dans la vBPO) doit être déprotonée (van Schijndel et coll. 1994). Le groupement hydroxyle du vanadate

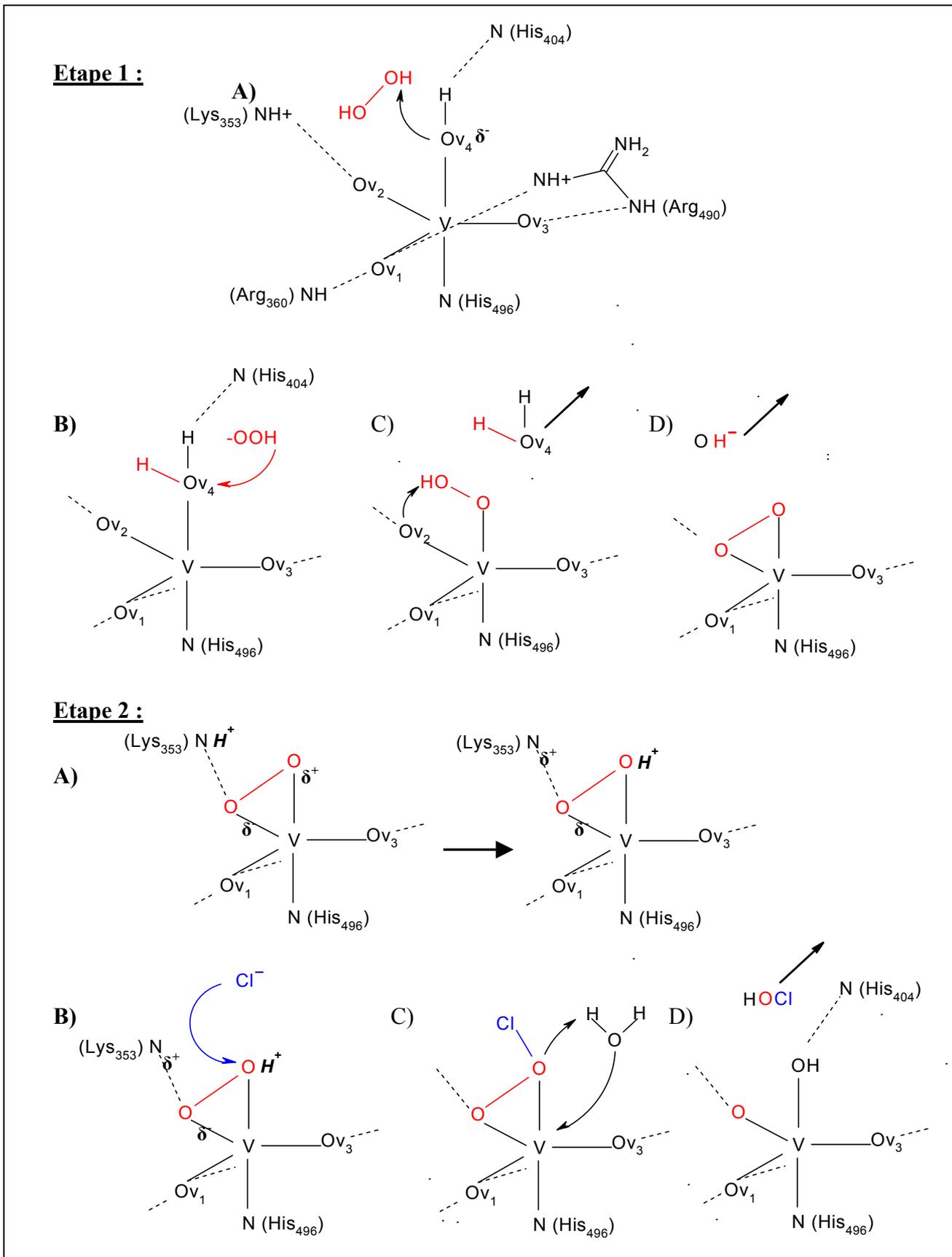


Figure 11 : Schéma putatif du mécanisme d'oxydation du chlorure par vCPO.

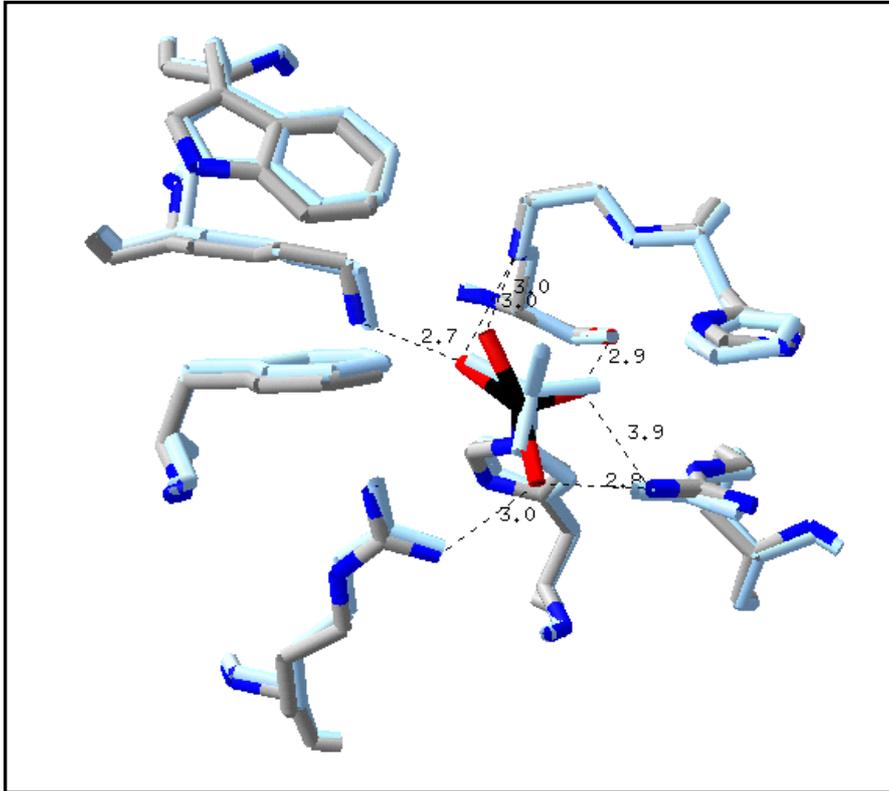


Figure 12 : Superposition du site actif de la vCPO de *Curvularia inaequalis* (en bleu) et de sa forme peroxovanadate (coloration par atome). Les liaisons hydrogène entre le peroxovanadate et les résidus de la vCPO sont représentées en pointillés. On peut noter la distorsion du vanadate après fixation du peroxyde d'hydrogène.

formant avec ce résidu histidine une liaison hydrogène polarisée est alors plus nucléophile et serait activé pour attaquer le premier substrat, le peroxyde d'hydrogène.

Chez la vCPO de *C. inaequalis* un intermédiaire peroxy-enzyme actif se forme durant la réaction catalytique (Messerschmidt et coll., 1997). La structure de la vCPO native liée au peroxyde d'hydrogène révèle une distorsion bipyramidale tétragonale du vanadate (**Figure 12**). Sous cette forme, le groupement hydroxyle disparaît et le peroxyde d'hydrogène se lie au vanadate dans le même plan que le résidu histidine (His496 dans la vCPO) impliqué dans la liaison covalente avec le vanadate (**Figure 12**) (Messerschmidt et coll., 1997). Un ensemble de réactions, décrites dans le schéma (**Figure 11, étape 1 A-D**), expliquerait la formation de la liaison du peroxyde d'hydrogène au vanadate. L'intermédiaire peroxovanadium (+5) assure ensuite l'oxydation de l'halogénure (Messerschmidt et coll., 1997).

En solution, le peroxovanadium (+5) ou le diperoxovanadium (+5) n'oxyde pas les halogénures (Clague et Butler, 1995). Chez les vHPOs, ce sont donc des résidus de l'enzyme qui vont assurer l'activation de l'intermédiaire peroxovanadium. Dans la structure de la vCPO, la lysine (Lys353), qui forme l'une des plus fortes liaisons hydrogène avec l'un des deux atomes d'oxygène du peroxovanadium, est considérée comme étant le résidu permettant l'activation du peroxovanadium pour l'oxydation des halogénures (**Figure 11, étape 2**) (Hemrika et coll., 1999). La liaison hydrogène entre cette lysine et le peroxovanadium entraînerait une polarisation de la liaison oxygène-oxygène formée par le peroxyde d'hydrogène. Ainsi, un des atomes d'oxygène serait protoné (**Figure 11, étape 2 A**) (dans le cas de la vCPO) et pourrait subir l'attaque nucléophile de l'halogénure (**Figure 11, étape 2 B**). La rupture de la liaison oxygène-oxygène du peroxovanadium permettrait la formation de l'acide hypo-halogéneux (**Figure 11, étape 2 C, D**) (Hemrika et coll., 1999).

3) Spécificité pour les halogénures

La neutralisation plus ou moins importante de la charge négative du vanadate par les différents résidus du site actif constitue le paramètre le plus étudié pour expliquer la

spécificité des vHPOs pour les halogénures. Cependant, plusieurs facteurs semblent impliqués dans ces différences de spécificités entre les vHPOs (Tanaka et coll., 2003).

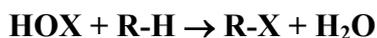
La capacité des vHPOs à oxyder les halogénures semble liée au potentiel électro négatif dans la région du vanadate. Ainsi, Weyand et collaborateurs (1999) ont proposé que la substitution du résidu phénylalanine (Phe397), présent dans la vCPO, en histidine « supplémentaire » chez les vBPOs (His478 de la vBPO d'*A. nodosum*), ainsi que la liaison hydrogène de l'histidine catalytique (His418 chez la vBPO d'*A. nodosum*) avec un résidu acide aspartique (Asp333 de la vBPO d'*A. nodosum*) pouvaient directement jouer sur la préférence pour la bromination chez les vBPOs, plutôt que pour la chlorination. Chez la vBPO, bien que Casny et collaborateurs (2000) aient mis en évidence l'existence de l'intermédiaire peroxovanadium par spectroscopie RMN (pour résonance magnétique nucléaire), sa structure tridimensionnelle n'est pas connue. Ainsi, il a été suggéré que l'histidine « supplémentaire » interviendrait dans de nouvelles liaisons hydrogène avec le résidu lysine (Lys341 dans la vBPO d'*A. nodosum*), qui participe avec l'intermédiaire peroxovanadium à la même liaison hydrogène que celle présente dans la vCPO (**Figure 11, étape 2 B**) (Hemrika et coll., 1999). Cependant, par la présence de ces nouvelles liaisons hydrogène, l'atome d'oxygène du peroxyde d'hydrogène ne serait pas protoné mais simplement chargé positivement ; ce qui rendrait impossible l'oxydation du chlorure, plus électro négatif, par les vBPOs (Hemrika et coll., 1999).

Les cinétiques enzymatiques des vBPOs et de la vCPO montrent une saturation à forte concentration en bromure ou chlorure, ce qui suggère l'existence d'un site de fixation des halogénures et donc d'une possible discrimination des halogénures par l'enzyme (pour revue, Butler, 1999). Cependant, l'halogénure ne se fixe pas directement au vanadate (Kusthardt et coll., 1993). Actuellement, aucun site de fixation des halogénures n'a été mis en évidence et l'implication de certains résidus de l'enzyme dans cette fonction reste hypothétique. Dans la vCPO de *C. inaequalis*, des résidus hydrophobes (Trp350, Phe397 et His404) formeraient un site de fixation potentiel pour le chlorure (Messerschmidt et Wever, 1996). Chez la vBPO d'*A. nodosum*, le site de fixation putatif du bromure semblait être le résidu sérine (Ser416), présent au niveau du site actif et formant l'une des plus fortes liaisons hydrogène avec le vanadate (Dau et coll., 1999). Cependant, l'accessibilité au solvant de ce résidu sérine dans la structure de la vBPO de *C. officinalis* et sa mutation dans la vCPO de *C.*

inaequalis indiquent qu'il n'intervient pas directement dans la liaison avec l'halogénure (Isopov et coll., 2000 ; Tanaka et coll., 2003).

4) Sélectivité et régiosélectivité vis-à-vis de composés organiques

L'acide hypo-halogéneux est susceptible d'attaquer des composés nucléophiles (R-H) pour réaliser une halogénéation non stéréospécifique suivant la réaction :



Tandis que la fonction biochimique de la vCPO serait exclusivement la production de HOCl, dans le cas des vBPOs, des substrats organiques peuvent interagir avec l'enzyme et empêcher la libération immédiate de l'acide hypo-halogéneux (Tschirret-Guth et Butler, 1994). Certaines molécules organiques seraient ainsi susceptibles de se lier de façon sélective à l'enzyme ce qui autoriserait une stéréospécificité de la réaction d'halogénéation (cas des indoles et terpènes) (**Figure 13**) (pour revues, Butler et Tschirret-Guth, 1997 ; Butler, 1998).

Plusieurs composés halogénés naturels produits par des organismes marins possèdent d'ailleurs des centres carbone-halogène chiraux. Leur biosynthèse impliquerait des vHPOs qui catalyseraient non seulement des réactions d'halogénéation de façon stéréosélective, mais également de façon régiosélective (Coughlin et coll., 1993; Martinez et coll. 2001 ; pour revue, Butler et Tschirret-Guth, 1997). Cependant, à l'heure actuelle, les sites de fixation de substrats organiques chez les vBPOs et les mécanismes d'halogénéation (bromination et/ou iodination) de ces composés restent inconnus.

5) Mécanismes de sulfoxidation

En l'absence d'halogénure, il a été montré que les vHPOs peuvent catalyser les réactions de transfert d'oxygène sur un grand nombre de composés organiques (pour revues, Ligtenbarg et coll., 2003 ; Dembitsky, 2003).

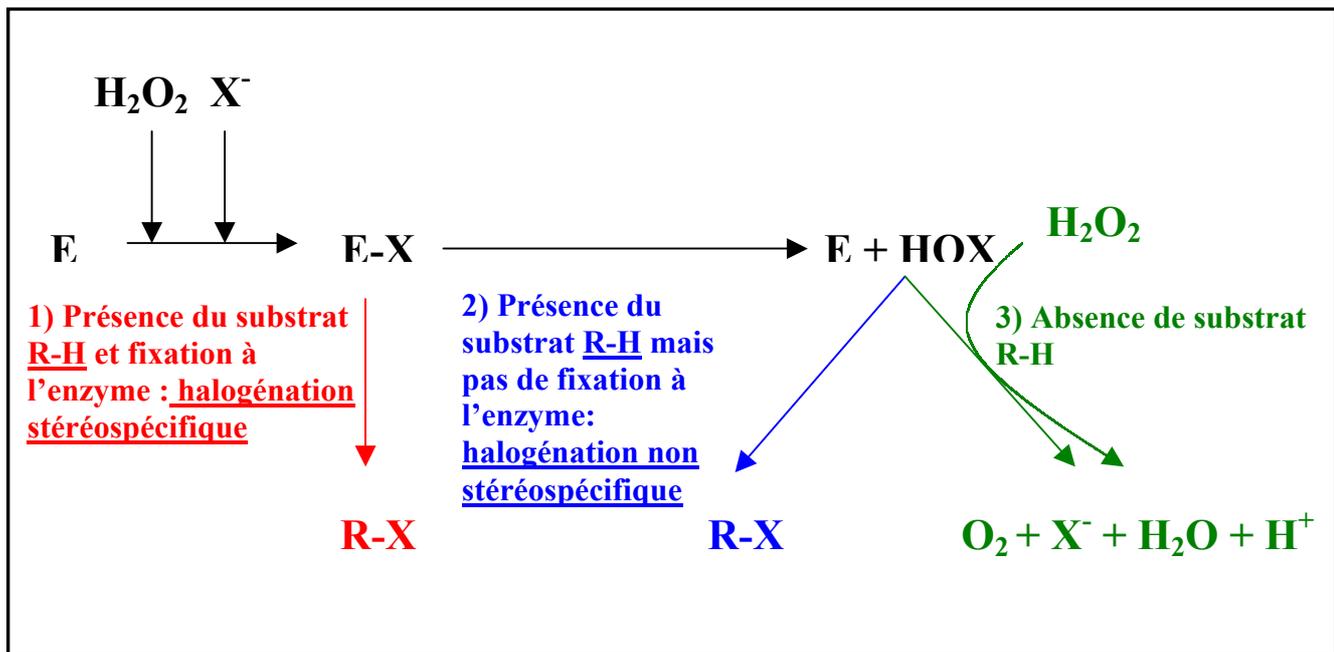


Figure 13 : Mécanisme d'action schématisé des vHPOs en présence (1 et 2) ou non (3) de substrats organiques.

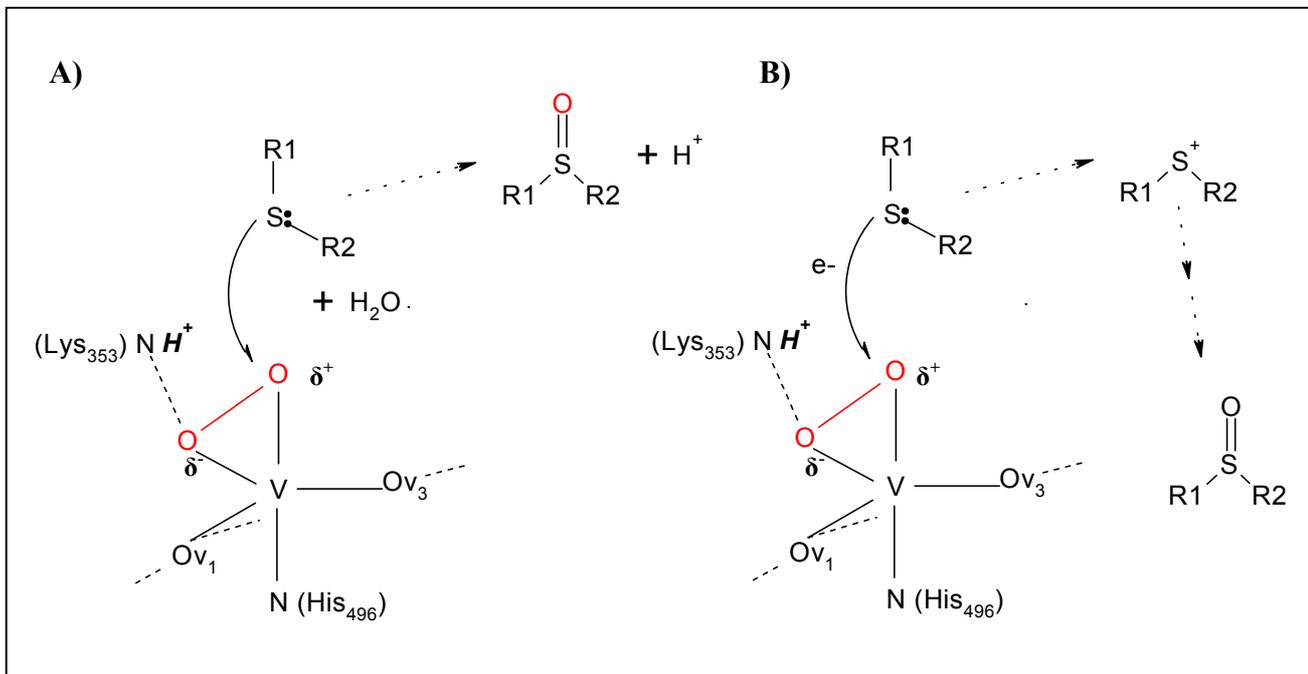


Figure 14 : Schéma putatif du mécanisme d'oxydation du sulfure par la vBPO (A) et la vCPO (B) (ten brink et coll., 2001).

En particulier, les vBPOs sont capables de catalyser des réactions de sulfoxydation énantiomériques en présence de peroxyde d'hydrogène (**Figure 14**) (Andersson et coll., 1997 ; Andersson et Allenmark, 1998 ; ten Brink et coll., 1998 ; 1999). Chez la vBPO d'*A. nodosum*, le transfert direct et sélectif de l'oxygène du peroxyde lié au vanadium vers le sulfure suggère que le sulfure se lie près ou dans le site actif avec une affinité relativement faible (**Figure 14**) (ten brink et coll., 2001). Le schéma putatif du mécanisme de sulfoxydation par les vBPOs proposé par Smith et Pecoraro (2002) est équivalent à celui présenté pour l'oxydation des halogénures.

D) Origine et évolution des haloperoxydases dépendantes du vanadate

1) Homologie entre les vCPOs et les vBPOs

Le **tableau 1** présente les pourcentages d'homologies entre les différentes séquences protéiques de vHPOs. Les séquences primaires des vCPOs de champignons sont extrêmement divergentes par rapport à celles des vBPOs d'algues marines. Les homologies de séquences obtenues entre les deux vBPOs d'algues brunes (70 %) d'une part, et entre les vBPOs de *Corallina sp.* (supérieure à 90 % dans chaque cas) d'autre part, sont assez élevées. Cependant, elles restent faibles quand on compare les séquences de vBPOs d'algues brunes avec celles d'algues rouges (environ 20-25 %).

Bien que leurs séquences protéiques soient très éloignées et difficilement comparables dans leur globalité (**Tableau 1**), la structure tridimensionnelle de la vCPO de *C. inaequalis* et celles des formes dimériques des vBPOs sont aisément superposables. En effet, la majorité des hélices α de la vCPO ont leurs homologues structuraux chez les vBPOs (Weyand et coll., 1999 ; Isupov et coll., 2000) (**Figures 7 et 8**). De plus, la région du site actif est extrêmement conservée (**Figure 10**). Un lien évolutif existerait donc entre les vCPOs et les vBPOs (pour revue, Littlechild et Garcia-Rodriguez, 2003). Il a été proposé que les vBPOs seraient le reflet d'enzymes ancestrales ayant conservé deux sous-unités pour former la région du site actif, tandis que la vCPO serait le résultat d'une duplication du gène codant pour la sous-unité « ancestrale ». Au cours de l'évolution, le domaine N-terminal de la vCPO aurait ensuite perdu la fonction catalytique, alors que son domaine C-terminal aurait conservé la

	An-vBPO						
Fd-vBPO	70%	Fd-vBPO					
Cp-vBPO1	25%	20%	Cp-vBPO1				
Cp-vBPO2	26%	21%	90%	Cp-vBPO2			
Co-vBPOc	25%	20%	96%	90%	Co-vBPOc		
Co-vBPOp	26%	21%	91%	94%	91%	Co-vBPOp	
Ci-vCPO	10%	9%	7%	7%	7%	7%	Ci-vCPO
Ed-vBPO	8%	7%	6%	6%	6%	6%	65%

Tableau 1 : Pourcentages d'homologie entre les différentes séquences protéiques de vHPOs. An-vBPO, vBPO de l'algue brune *Ascophyllum nodosum* (N° d'accension NCBI # P81701). Fd-vBPO, vBPO de l'algue brune *Fucus distichus* (N° d'accension NCBI # AAC35279). Cp-vBPO1, vBPO1 de l'algue rouge *Corallina pilulifera* (N° d'accension NCBI # BAA31261). Cp-vBPO2, vBPO2 de l'algue rouge *Corallina pilulifera* (N° d'accension NCBI # BAA31262). Co-vBPOc, vBPO cloné de l'algue rouge *Corallina officinalis* (N° d'accension NCBI # AAM46061). Co-vBPOp, vBPO obtenu par séquençage protéique de l'algue rouge *Corallina officinalis* (N° d'accension NCBI # 1QHBA). Ed-vCPO, vCPO du champignon *Embellisia didymospora* (N° d'accension NCBI # CAA72344). Ci-vCPO, vCPO du champignon *Curvularia inaequalis* (N° d'accension NCBI # 1VNC).

structure et les résidus constituant le site actif (pour revue, Littlechild et Garcia-Rodriguez, 2003).

2) *Similitudes entre les vHPOs et les phosphatases*

La région du site actif des vHPOs présente des similitudes de séquences avec trois classes de phosphatases (Hemrika et coll., 1997 ; Neuwald, 1997 ; Stukey et Carman, 1997 ; Renirie et coll., 2000b ; Ghosh et coll. 2002 ; pour revues, Hemrika et Wever, 1997 ; Littlechild et coll., 2002) :

- Les isoformes solubles et membranaires des phosphatases acides prostatiques, enzymes cruciales dans la transduction du signal chez les mammifères

- La glucose-6-phosphatase, enzyme clé de la gluconéogenèse et l'homéostasie du glucose et impliquée dans la maladie de von Gierke (Glycogénose hépatothique)

- Les phosphatases acides bactériennes de classe A

Dans la classe des phosphatases acides prostatiques par exemple, les enzymes possèdent un motif conservé (GSYPSGHT) similaire à celui de la région du site actif chez les vHPOs P[S/A]YPSGHAT. Le résidu histidine liant de façon covalente le vanadate (Histidine 496 chez la vCPO) est donc également conservé chez ces phosphatases (Hemrika et coll., 1997). Il a été montré que le vanadate est un inhibiteur compétitif des phosphatases (Singh et coll., 1981 ; Vescina et coll., 1996). A l'inverse, la remétallisation de la forme apo-haloperoxydase par le vanadate est inhibée par le phosphate. Ceci suggère que les phosphatases et les vHPOs possèdent des sites de fixation du vanadate ou du phosphate et des sites actifs très proches d'un point de vue structural (Hemrika et coll., 1997). De plus, la forme apo de la vCPO de *C. inaequalis* montre une activité phosphatase, en hydrolysant le phosphate p-nitrophenyl, un substrat commun des phosphatases (Hemrika et coll., 1997 ; Renirie et coll., 2000b). A l'inverse, certaines phosphatases ont montré des activités haloperoxydases après substitution du phosphate par du vanadate (Tanaka et coll., 2002). La détermination structurale de la phosphatase de la bactérie *Escherichia blattae* a confirmé cette

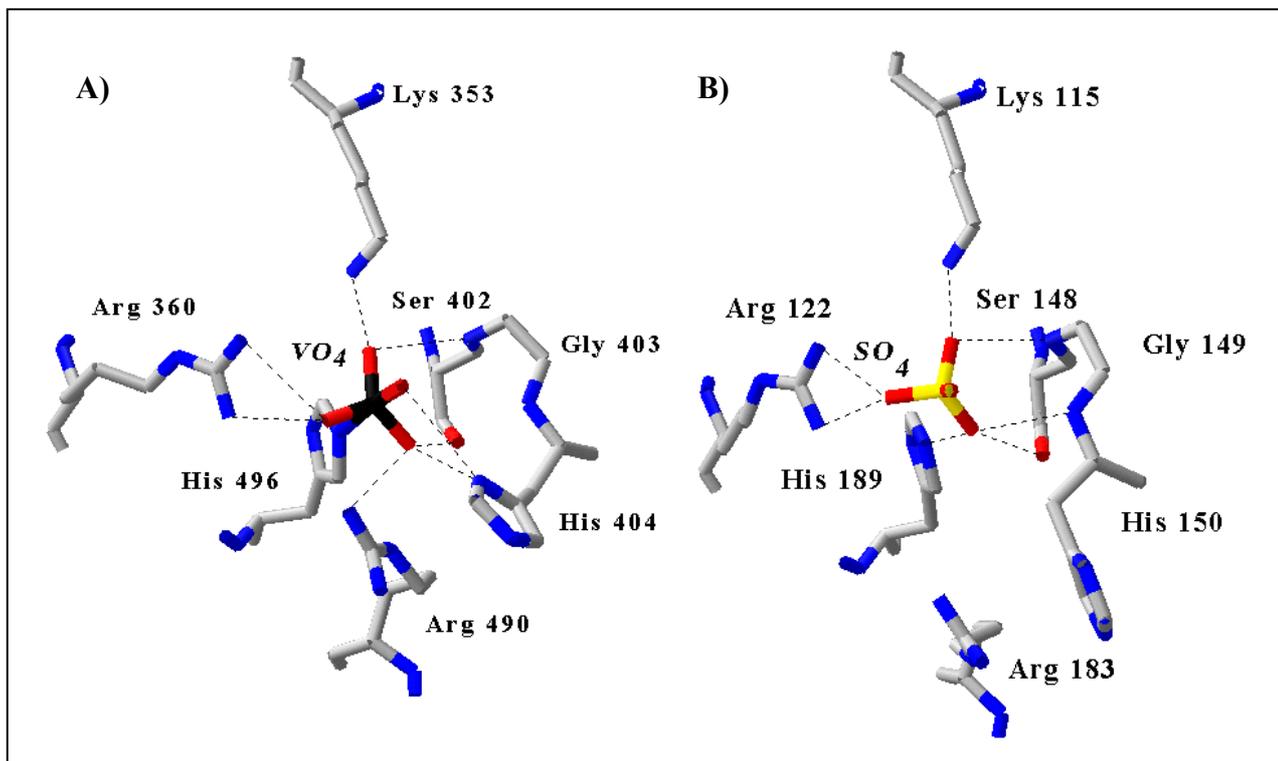


Figure 15 : Comparaison du site actif de la vCPO de *Curvularia inaequalis* (A) et de celui de la phosphatase de la bactérie *Escherichia blattae* (B) (Code PDB : 1D2T). La phosphatase a été co-cristallisée avec du sulfate (Tanaka et coll., 2002). Les liaisons hydrogène entre le vanadate (ou le sulfate) et les résidus de l'enzyme sont représentées en pointillés.

similitude d'architecture au niveau du site actif (**Figure 15**) (Ishikawa et coll., 2000 ; Tanaka et coll., 2002 ; pour revue, Littlechild et coll., 2002).

Une activité de sulfoxydation a été observée chez une phytase ayant incorporée du vanadate (van de Velde et coll., 2000a, b). Sous sa forme native, la phytase isolée du champignon *Aspergillus ficuum* est une phosphatase. Au niveau du site de fixation du métal, les résidus de cette phytase sont très proches de ceux identifiés au niveau du site actif des vBPOs (Kostrewa et coll., 1997).

D'après certains auteurs, cette similitude de structures et d'activité enzymatique suggèreraient une origine commune lointaine entre les vHPOs et les phosphatases (Hemrika et coll., 1997).

E) Rôles biologiques putatifs des vBPOs

Les vHPOs semblent être impliquées dans plusieurs fonctions biologiques, en lien direct avec les propriétés et/ou les rôles biologiques de leurs substrats et/ou produits.

1) Toxicité et rôles biologiques des composés halogénés

- Chez les organismes marins, les vHPOs sont responsables de la production des composés organiques halogénés naturels. Ces composés, très variés, qui vont des indoles, terpènes, acétogénines, phénols halogénés... aux composés volatils halogénés (bromoforme, chloroforme, bromométhane...) (Gschwend et coll., 1985 ; pour revues, Dembitsky et Srebnik, 2002 ; Gribble, 2003), possèdent d'importantes activités biologiques et notamment antiherbivores (McConnell et Fenical, 1980) et antimicrobiennes (Fenical, 1982 ; Vairappan et coll., 2001a, b ; Vairappan, 2003 ; pour revue, Neidleman et Geigert, 1986). Ainsi, chez les algues, il semble que la production de VHOC soit l'une des stratégies mises en place par l'organisme pour se protéger contre les épiphytes et/ou lors d'attaque de pathogènes (Malin et coll., 2001 ; pour revues, Potin et coll., 1999 ; Potin et coll., 2002 ; Manley, 2002).

En effet, chez l'algue rouge *C. pilulifera*, l'émission de bromoforme (CHBr_3) semble limiter, à la surface de l'algue, la croissance d'algues marines microscopiques et en particulier celle des diatomées (Ohsawa et coll., 2001b). De même, l'absence d'épiphytes chez certaines

espèces d'Entéromorphes peut être corrélée avec l'émission de VHOC (Abrahamsson et coll., 2003). Néanmoins, la relation entre la production de VHOC et l'absence d'épiphytes n'est pas stricte. En effet, les algues brunes qui produisent de grandes quantités de VHOC sont généralement épiphytées (pour revue, Manley, 2002).

Chez *L. digitata*, l'application de fragments de sa propre paroi, les oligo-alginates de type guluronate, provoque un burst oxydant et mime l'attaque d'un pathogène (**Figure 16 A**). Cette élicitation déclenche l'activation des défenses de l'algue (Küpper et coll., 2001). De plus, un efflux d'iodures est simultané au burst oxydant et dans un second temps, l'élicitation induit une augmentation de l'émission de composés organiques volatils iodés comme le iodométhane (Malin et coll., 2001) (**Figure 16 B**). Dans le système hôte – pathogène, *Chondrus crispus* (algue rouge) - *Acrochaete operculata* (algue verte), le signal pathogène d'*A. operculata* induit chez *C. crispus* un burst oxydant suivi d'une émission de VHOC potentiellement toxiques pour le pathogène (**Figure 16 C et D**) (Bouarab, 2000). En effet, l'application de VHOC sur des spores ou des germinations d'*A. operculata* entraîne la mort cellulaire de ce pathogène (Bouarab et coll., non publié). Chez l'algue rouge *Gracilaria conferta*, une activité de bromination est détectée après élicitation par des oligo-agars ou après une application exogène de peroxyde d'hydrogène (Weinberger et coll., 1999). Dans ce contexte, chez les algues marines, la production de VHOC via les vHPOs serait une réponse de défense chimique à l'attaque d'un pathogène (Malin et coll., 2001).

Chez les champignons terrestres tels que *C. inaequalis*, aucune production de composés organiques halogénés naturels n'a été mise en évidence et le rôle biologique des vCPOs reste encore spéculatif. Ces champignons sont des phytopathogènes susceptibles de pénétrer la cellule de la plante hôte et la vCPO de *C. inaequalis* est sécrétée dans le milieu de culture du champignon. La fonction putative de cette enzyme serait alors de produire de l'acide hypo-chloreux, qui dégraderait la paroi des cellules de plantes (Simons et coll., 1995 ; pour revue, Neidleman et Geigert, 1986).

- Les acyl-homosérine lactones sécrétées par les bactéries Gram - sont des molécules signal de communication et d'auto-induction des cellules d'une population (pour revue, Whitehead et coll., 2001). Ces molécules sont impliquées dans les mécanismes de « *quorum sensing* » (ou mécanisme d'évaluation de densité d'une population de bactéries), de « *swarming* » (ou déplacement en masse dans une direction d'une population de bactéries) (pour revue, Daniels et coll., 2004), de luminescence (Pearson, 2002), de virulence (pour

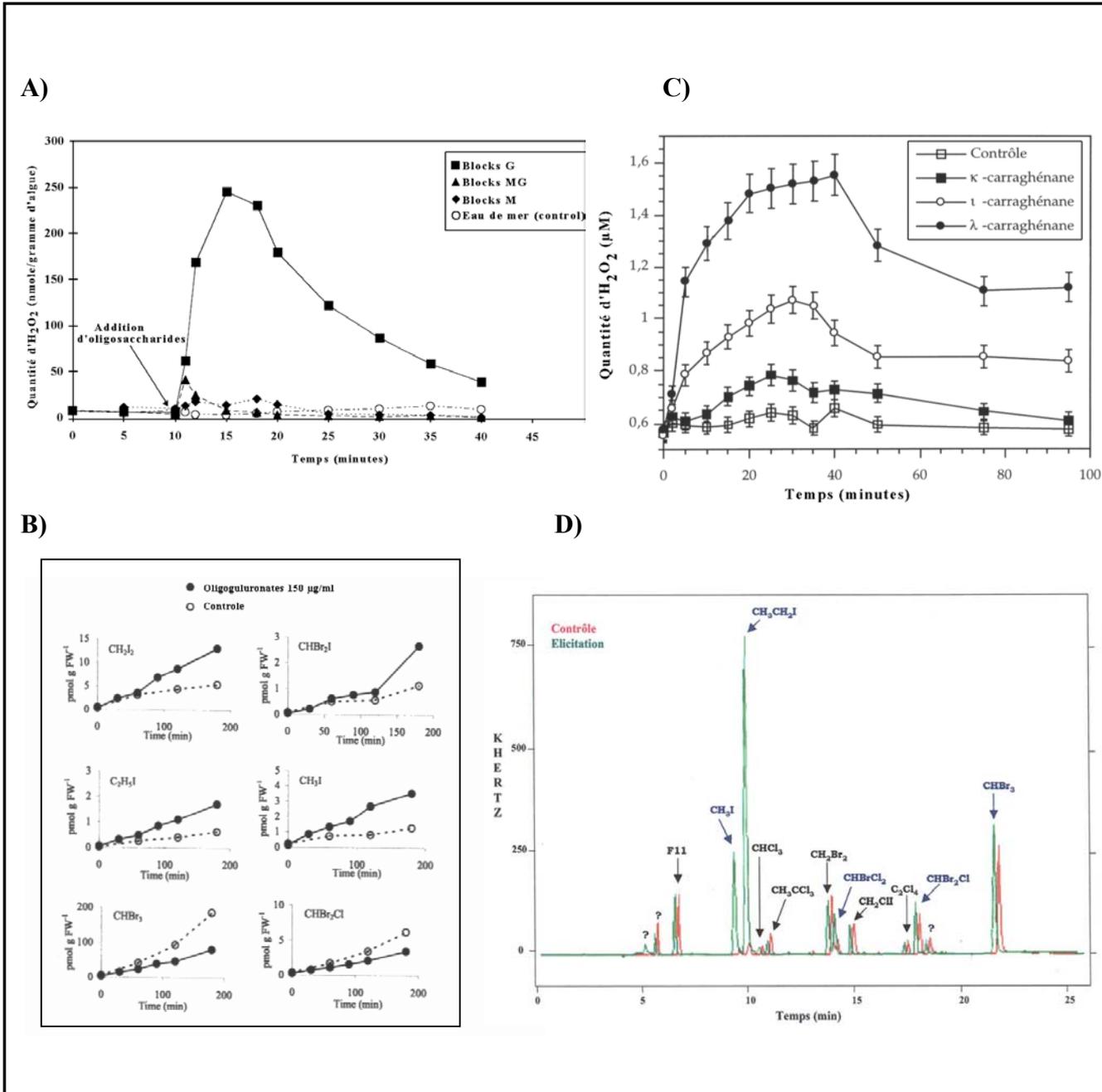


Figure 16 : Burst oxydant et émission de VHOC suite à l'élicitation d'algues marines par des oligosaccharides. Chez *Laminaria digitata*, l'élicitation par des oligo-alginates, de type guluronate provoque un burst oxydant (A) (Küpper et al. 2001) et l'émission de VHOCs (B) (Küpper, 2001). Chez *Chondrus crispus*, l'élicitation par des oligo-carraghénanes induit un burst oxydatif (C) et le signal pathogène d'*Acrochaete operculata* déclenche l'émission de VHOCs (D) (Bouarab, 2000).

revue, Whitehead et coll., 2001) et de formation de biofilms (pour revue, Daniels et coll., 2004). Chez *L. digitata*, la production d'acide hypo-halogéneux inactive ces acyl-homosérine lactones bactériennes (Borchardt et coll., 2001). Les vBPOs seraient ainsi impliquées dans un mécanisme de défense qui inhiberait la formation du biofilm bactérien à la surface de l'algue. Chez l'algue rouge australienne *Delisea pulchra*, des furanones halogénés, présents à la surface de l'algue, possèdent une structure similaire à celle des acyl-homosérine lactones et inhibent la colonisation bactérienne (Givskov et coll., 1996 ; Maximilien et coll., 1998). En effet, ces composés halogénés occupent le site de fixation des acyl-homosérine lactones au niveau des protéines LuxR, qui sont les activateurs transcriptionnels dans le système de régulation des acyl-homosérine lactones (Manefield et coll., 1999 ; Rasmussen et coll., 2000). Les furanones halogénés de *D. pulchra* inhibent également la synthèse d'antibiotiques appartenant à la classe des carbapenem et l'expression de facteurs de virulence chez la bactérie phytopathogène *Erwinia carotovora* (Manefield et coll., 2001)

- En plus de leur rôle dans la défense chimique des organismes, les composés organiques halogénés produits par les vHPOs pourraient agir comme des signaux chez les organismes marins (Collén et al, 1994). En effet, dans le milieu terrestre, certains composés halogénés, biologiquement actifs, interviennent dans la différenciation des cellules chez certains champignons et dans l'agrégation de phéromones chez certains insectes. Ils sont aussi connus comme hormones chez des plantes et chez les mammifères (pour revue, Gribble, 2003). De plus, la faculté chimio-attractrice des éosinophiles (un type de granulocytes) est due au 2-BrHDA, un aldéhyde gras bromé (Albert et al., 2003).

2) Détoxification du peroxyde d'hydrogène

Lors d'attaque de pathogènes ou de stress abiotiques (privation de carbone, variation de température, de lumière, dessiccation...), les algues marines doivent gérer les conséquences d'une production massive d'espèces activées de l'oxygène, et principalement de peroxyde de hydrogène, extrêmement toxique pour les cellules (Collén et coll., 1994 ; Mtolera et coll., 1996 ; Pedersén et coll., 1996 ; Küpper et coll., 2001, 2002 ; Aguilera et coll., 2002). Chez les plantes terrestres, ces mécanismes de détoxification du peroxyde d'hydrogène, bien définis, sont divisés en deux groupes : les systèmes enzymatiques mettant en jeu des

superoxydes dismutases, des ascorbate peroxydases, des catalases, des glutathione réductases... et les systèmes antioxydant non-enzymatiques (glutathion réduit, acide ascorbique, mannitol...) (pour revue, Mittler, 2002). Chez les algues marines, des travaux approfondis sur ces mécanismes ont montré l'existence des mêmes systèmes antioxydants (Mallick et Mohn, 2000 ; Aguilera et coll., 2002 ; Dummermuth et coll., 2003).

Des expériences réalisées sur des cultures de macroalgues ont permis de mettre en évidence une augmentation de la production des VHOC en présence de fortes teneurs en peroxyde d'hydrogène (1 M) dans le milieu (Collén et coll., 1994 ; Sundström et coll., 1996 ; Pedersén et coll., 1996 ; Küpper, 2001). Dans ce contexte, les vBPOs permettraient via l'oxydation de bromure ou/et d'iode, et la production de VHOC de détoxiquer de façon plus efficace le peroxyde d'hydrogène présent au niveau des cellules (Collén et coll., 1994 ; Mtolera et coll., 1996 ; Pedersén et coll., 1996 ; Malin et coll., 2001 ; Manley et Barbero, 2001 ; pour revue, Manley, 2002).

3) Adhésion - Pontages oxydatifs dans la paroi

Chez l'algue brune *Fucus distichus*, les vBPOs extracellulaires interviendraient dans la polymérisation de polyphénols, impliquée dans l'adhésion du zygote de l'algue à un substrat (Vreeland et coll., 1998 ; Vreeland et Ng, 1999). Très récemment, des données expérimentales ont démontré que le phénomène de pontage (ou *cross-linking*) des polyphénols nécessitait la présence d'une vBPO, d'halogénures et de peroxyde d'hydrogène (Berglin et coll., *non publié*).

Dans la paroi des plantes terrestres, des phénomènes similaires de pontages oxydatifs, faisant intervenir des peroxydases et/ou des oxydases, sont mis en place tels que la lignification (pour revue, Donaldson, 2001) et le pontage des pectines et des hétéroxylanes par l'acide férulique (pour revue, Hatfield et coll., 1999).

Via ces mécanismes de pontages, les vHPOs interviendraient donc non seulement dans la fixation de l'algue, mais aussi dans l'épaississement et/ou le renforcement de sa paroi qui pourrait constituer une défense mécanique lors de l'attaque de pathogènes.

4) Absorption d'halogénures

La majorité des macroalgues ont la capacité de concentrer soit le brome soit l'iode (Saenko et coll., 1978). En particulier, les algues brunes (Phaeophyceae), appartenant à l'ordre des Laminariales comme *L. digitata* et *L. saccharina*, représentent le plus grand réservoir d'iode parmi les organismes vivants (Black, 1948 ; Saenko et coll., 1978 ; Küpper et coll., 1998). Cet élément a d'ailleurs été découvert dans des cendres d'algues brunes marines (soude de varech) par Courtois en 1814 (Shaw, 1962) et ces algues ont longtemps été exploitées comme source d'iode. En particulier, la concentration en iode chez *L. digitata* peut atteindre 25 mM, soit 1 % du poids sec de l'algue (Black, 1948 ; Young et Langille, 1958 ; Saenko et coll., 1978 ; Amat, 1985) (**Figure 17**).

Les phénomènes de concentration de l'iode chez les algues ont fait l'objet de recherches dès la première moitié du siècle dernier. Ainsi, le lieu de stockage de l'iode, dans les laminaires, semblerait être des structures localisées à la surface du thalle (Roche et Yagi, 1952) comme de petites vacuoles sphériques non-spécialisées des cellules corticales de la lame ou des physodes des cellules du stipe (Kylin, 1929 ; Dangeard, 1957 ; Amat, 1985).

En ce qui concerne les mécanismes mis en place pour l'absorption de cet halogène, Dangeard (1928) et Kylin (1929) sont les premiers à avoir établi un lien entre le métabolisme oxydatif et l'entrée d'iode chez les algues marines. Ce n'est que très récemment que Küpper et collaborateurs (1998) a proposé un mécanisme de diffusion facilitée, faisant intervenir des enzymes extracellulaires de type haloperoxydases (**Figure 18**). Des vHPOs, présentes dans la paroi cellulaire, catalyseraient, en présence d'un niveau constitutif de peroxyde d'hydrogène apoplastique (de l'ordre de 50 μ M), l'oxydation d'iodure en acide hypo-iodé (HOI) (Küpper et coll., 1998). L'iode oxydé pourrait ainsi soit (1) être réémis sous forme d'iode moléculaire (I_2) ou de composés volatils halogénés (VHOC), soit (2) traverser de façon facilitée la membrane plasmique sous forme de HOI ou de I_2 . Dans la cellule, ces espèces lipophiles seraient ensuite transformées en composés organiques iodés ou réduites en iodure (I⁻), qui constitue vraisemblablement la forme de stockage de l'iode (Küpper et coll., 1998). Ce système, très efficace, permettrait à l'algue d'accumuler jusqu'à 150,000 fois la concentration de l'iode dans l'eau de mer.

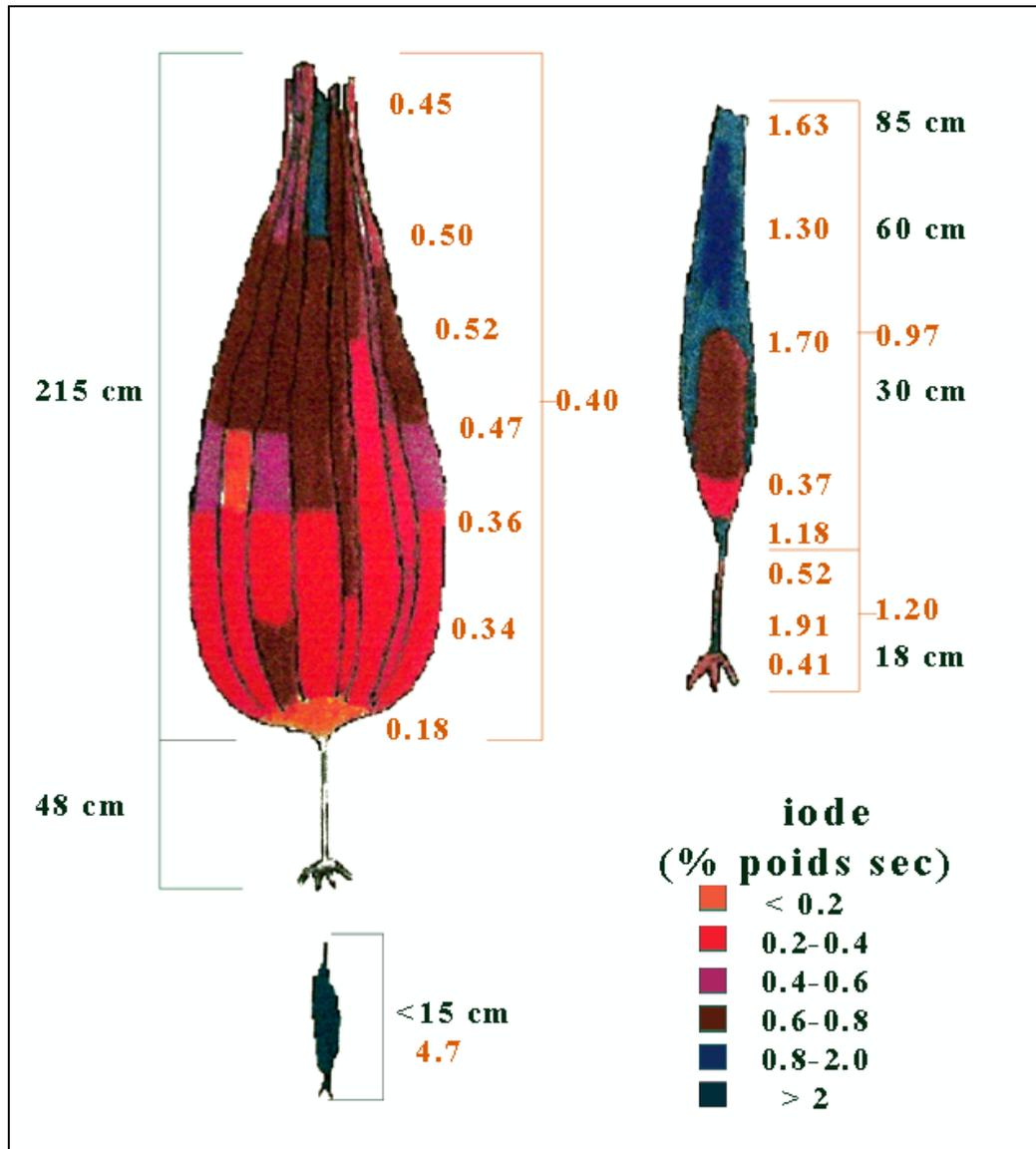


Figure 17 : Accumulation d'iode dans les sporophytes de *Laminaria digitata*. Les algues ont été récoltées à Roscoff durant le printemps 1996. Les teneurs en iode sont représentées par différentes couleurs (se référer à la légende).

Remarque : les algues âgées d'un an (1 m de long) et plus contiennent moins d'iode dans la zone méristématique. Les jeunes sporophytes contiennent jusqu'à 4.7 % de leur poids sec d'iode, ce qui représente 150,000 fois la concentration de cet élément dans l'eau de mer (Küpper et coll., 1998).

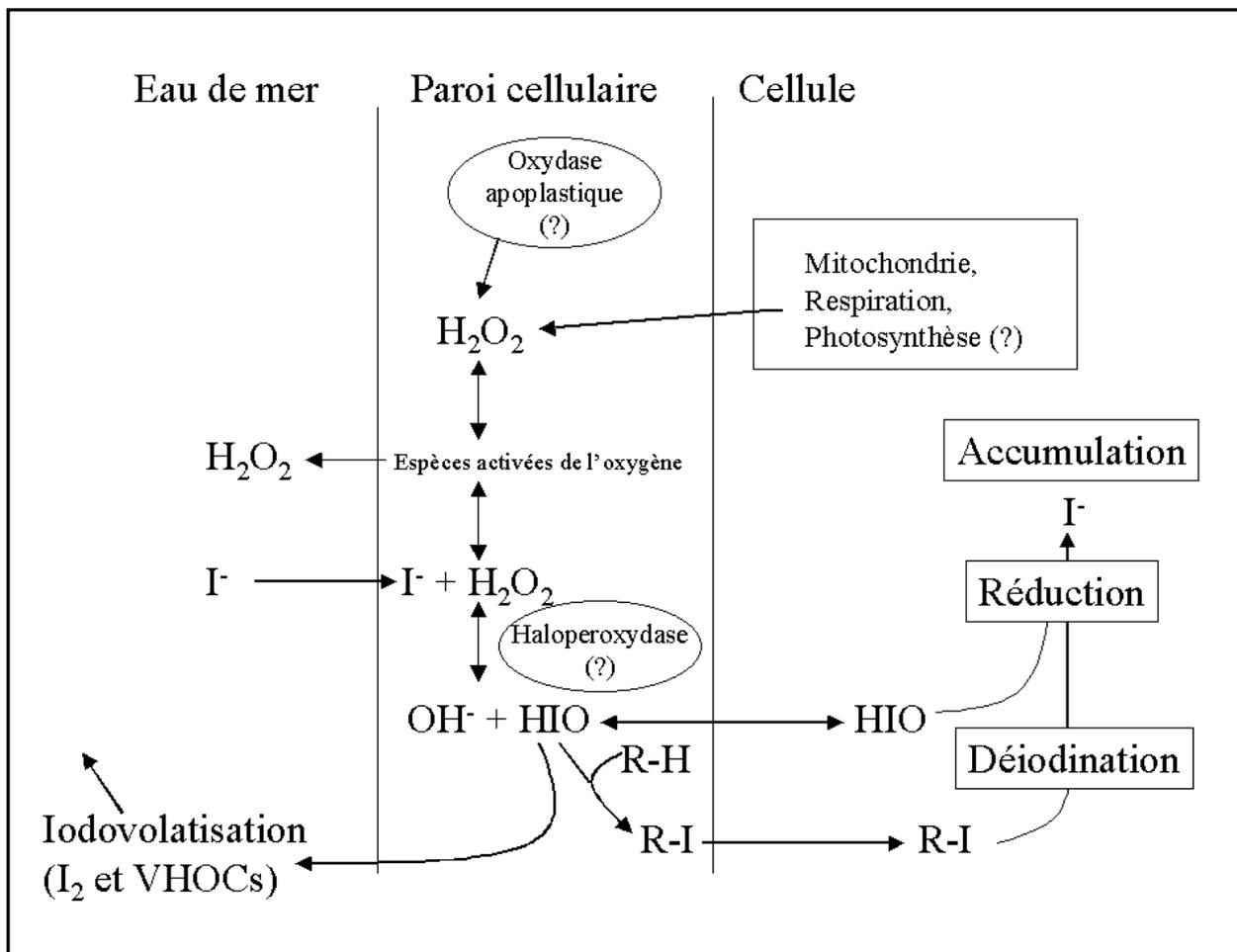


Figure 18 : Mécanisme putatif de l'entrée de l'iode chez *Laminaria digitata*. Le peroxyde d'hydrogène apoplastique est consommé, par une haloperoxydase, pour l'oxydation de l'iodure en acide hypo-iodé et en iode moléculaire. L'iode oxydé peut ensuite traverser la membrane de façon facilitée. L'activité haloperoxydase peut également catalyser l'iodination de composés organiques (R-H) (Küpper et coll., 1998).

***PROBLEMATIQUE ET
OBJECTIFS DE LA THESE***

Problématique et objectifs de la thèse

Les laminaires, et en particulier *Laminaria digitata*, constituent un modèle biologique intéressant pour l'étude des vHPOs impliquées dans le métabolisme halogéné.

- D'une part, l'accumulation considérable d'iode intracellulaire constitue l'une des particularités des sporophytes de laminaires. Cependant, son rôle biologique reste encore inconnu. Dans l'eau de mer, les teneurs en iodure étant de $\sim 0.5 \mu\text{M}$, soit $\sim 1/2,000^{\text{ème}}$ et $\sim 1/1,000,000^{\text{ème}}$ des concentrations, respectivement, en bromure et en chlorure, les mécanismes mis en place pour l'absorption de cet élément sont extrêmement efficaces, mais également spécifiques. Des résultats préliminaires indiqueraient l'implication d'une haloperoxydase dans l'absorption de l'iode chez *L. digitata* (Küpper et coll., 1998).

- D'autre part, les laminaires, au stade sporophytique, constituent un compartiment biologique d'une importance indéniable pour la production des VHOC. Ces VHOC semblent produits, via les vHPOs, par les algues en état de stress et particulièrement lors des périodes d'exposition lumineuse et à marée basse (Carpenter et coll., 1999). Ainsi, chez les laminaires, le métabolisme halogéné semble lié aux mécanismes de défense et/ou aux réponses au stress.

- De plus, une étude du transcriptome de *L. digitata*, par une stratégie EST (pour étiquette de séquences transcrites) menée par Florent Crépineau au laboratoire, a permis de mettre en évidence que 12 EST présentaient de fortes homologues avec la vBPO de *F. distichus* (Crépineau et coll., 2000). Ainsi chez *L. digitata*, les vHPOs, représentant 2.4 % des ARNm totaux exprimés par le sporophyte, seraient fortement représentées. Le métabolisme halogéné, via l'activation de ces enzymes, serait donc extrêmement actif.

Chez les algues marines, les vHPOs pourraient intervenir à plusieurs niveaux dans les mécanismes de défense au sens large ; tout d'abord via la détoxification des composés actifs de l'oxygène lors de stress oxydant, mais aussi via le renforcement de la paroi et la production de composés halogénés toxiques. Ces différents modes d'action potentiel des vHPOs sont

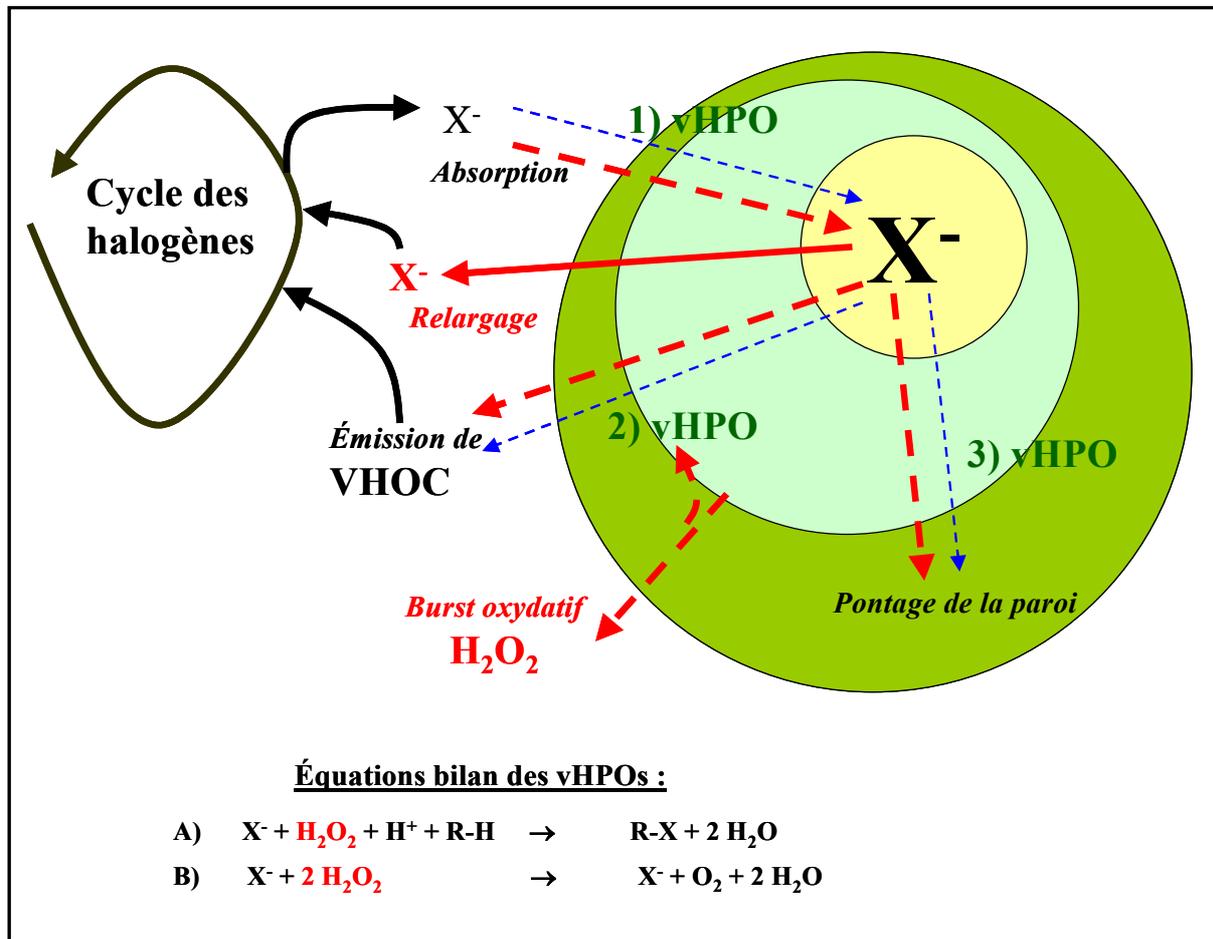


Figure 19 : Schéma représentant les différents modes d'action potentiels des vHPOs dans une cellule d'algue marine. 1) Implication des vHPOs dans l'absorption des halogénures (X^-) et particulièrement, chez les laminaires, dans l'accumulation d'iodure. 2) Rôle des vHPOs dans la production de composés volatils halogénés (VHOC). 3) Intervention des vHPOs dans le pontage de la paroi cellulaire.

Les flèches bleues et les flèches rouges représentent, respectivement, les événements présents de façon constitutive et ceux induits ou activés suite à un stress oxydant.

Les équations bilan des vHPOs en présence de composés carbonés (R-H) (A) ou en absence de composés carbonés et/ou en présence d'un excès de peroxyde d'hydrogène (B) sont situées sous le schéma.

schématisés dans la **figure 19**. Cependant, aucune étude n'a actuellement directement mis en évidence l'implication de ces enzymes dans les mécanismes de défense.

Dans ce contexte, ce travail de thèse a tout d'abord consisté à identifier, à purifier et à caractériser les activités biochimiques des vHPOs chez *L. digitata* (*Résultats, Chapitre 1*). L'objectif de cette thèse a ensuite été d'établir un lien entre les activités des vHPOs et les séquences codantes de vBPOs putatives (*Résultats, Chapitre 2*). Grâce à l'obtention de ces séquences, nous avons analysé l'évolution moléculaire de ces enzymes et tenté de comprendre l'extrême efficacité et spécificité pour l'oxydation de l'iode, chez les algues brunes (*Résultats, Chapitre 3*).

Le burst oxydant induit chez *L. digitata* après élicitation par des oligo-gulonates (Küpper et coll., 2001), suivi d'un efflux d'iodure et de l'émission de composés volatils iodés (Malin et coll., 2001), suggère que les vHPOs sont directement impliqués dans les mécanismes de défense contre l'attaque d'un pathogène chez cet organisme. En parallèle, nous avons donc analysé la régulation des vHPOs, en utilisant le modèle expérimental « sporophytes de *L. digitata* élicités par des oligo-gulonates » et suivi les différents niveaux de régulation des vHPOs (*Résultats, Chapitre 4*). De plus, les résultats de Küpper et coll. (2001) ont montré l'induction d'une phospholipase A₂ chez les sporophytes de *L. digitata* élicités. Ainsi, une partie de notre unité travaillant sur la signalisation lipidique (équipe de Jean-Pierre Salaün), nous avons entrepris des travaux préliminaires sur l'implication des vHPOs dans la voie des oxylipines.

***MATERIEL ET
METHODES D'ETUDE***

I- Matériel végétal

Les sporophytes sauvages de *Laminaria digitata* sont récoltés, à marée basse, dans les environs de Roscoff (Bretagne, France) (**Figure 20**). Ils sont gardés moins d'une semaine dans des bacs oxygénés où circule de l'eau de mer courante. La photopériode est de 12 heures de jour pour 12 heures de nuit. L'intensité lumineuse est à 50-60 $\mu\text{moles de photons/m}^2/\text{sec}$ et la température correspond à la température de surface de l'eau de mer à Roscoff qui varie de 9°C à 17°C en fonction des saisons.

J'ai mis en place, au laboratoire, des cultures de *L. digitata* dans le but d'obtenir des algues unialgales en conditions contrôlées (**Figure 21**). Les gamétophytes femelles (souches Lam dig Hel 1004) et les gamétophytes mâles (souches Lam dig Hel 1003), provenant du laboratoire du Docteur Müller (Konstanz, Allemagne), sont maintenus, à l'obscurité et à $\sim 10^\circ\text{C}$. Les sporophytes obtenus après fécondation des gamétophytes sont mis en culture dans de l'eau de mer filtrée et autoclavée enrichie d'un milieu Provasoli ES (Starr et Zeikus, 1987) (Composition en **annexe 4**). Les cultures sont maintenues à $\sim 10^\circ\text{C}$ avec une photopériode de 10h/14h (jour/nuit) et un flux lumineux de 50-60 $\mu\text{moles de photons/m}^2/\text{sec}$. Le milieu de culture est renouvelé une à deux fois par semaine et l'état des cultures est observé régulièrement sous loupe binoculaire.

Des protoplastes de sporophytes de *L. digitata* ont été obtenus en suivant le protocole de Butler et collaborateurs (1989). La zone méristématique est découpée en fragments d'environ 5-8 mm, puis décontaminée dans de l'eau de mer filtrée contenant 1 % de bétadine. Les fragments sont ensuite lavés par filtration et placés dans de l'eau de mer à 70 % (45 minutes à 4°C). Ils sont ensuite relavés par filtration et placés dans un milieu de chélation (Butler et coll., 1989) pendant 20 minutes à 13°C, à l'obscurité sous agitation modérée. Les fragments sont récupérés, filtrés, découpés plus finement (2-3 mm) et incubés dans un milieu de digestion (3 à 5 heures à 13°C) dans l'obscurité et sous agitation modérée (Butler et coll., 1989 ; l'eau de mer artificielle contient du MgCl_2 100mM et du KCl 150 mM, comme osmoticum, durant l'étape de digestion). Après observation de protoplastes au microscope, la solution est filtrée à 200 μm puis à 70 μm . Le filtrat final est centrifugé 10 minutes à 100 g et le culot de protoplastes est ensuite remis en suspension dans un milieu de culture (eau de mer artificielle). Après trois lavages consécutifs (centrifugation 10 minutes à 50 g et remise en



Figure 20 : Champs de *Laminaria digitata* à marée basse, à fort coefficient.

Ile de Sieck, Santec, Bretagne, France

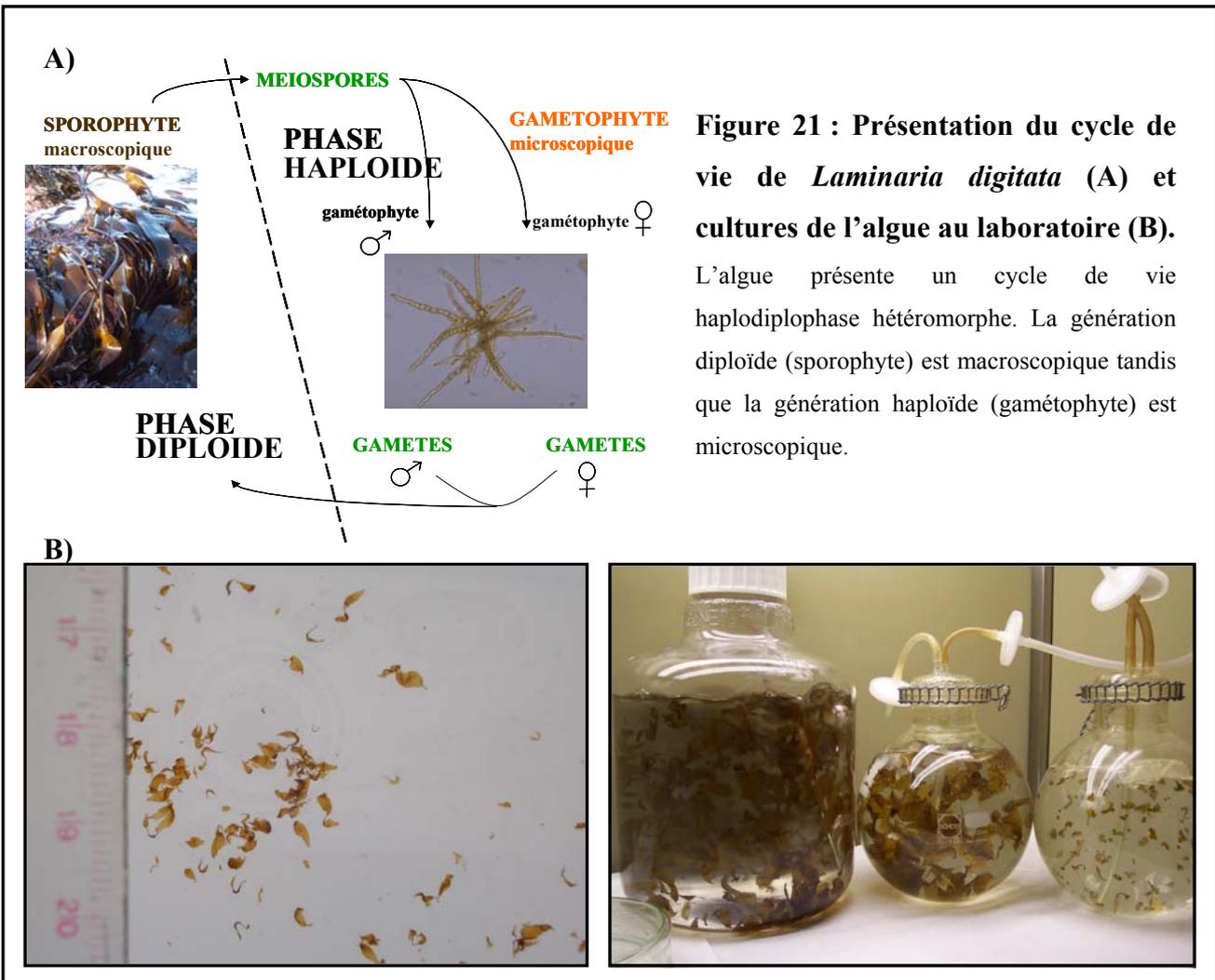


Figure 21 : Présentation du cycle de vie de *Laminaria digitata* (A) et cultures de l'algue au laboratoire (B).

L'algue présente un cycle de vie haplodiplophase hétéromorphe. La génération diploïde (sporophyte) est macroscopique tandis que la génération haploïde (gamétophyte) est microscopique.

suspension dans le milieu de culture), les protoplastes sont mis en culture en présence d'osmoticum, de nutriments et d'antibiotiques (rifampicine 0.4 µg/ml et carbeniciline 4.8 µg/ml) à 12°C, à l'obscurité, en évitant toute agitation.

II- Préparation des éliciteurs oligo-alginates

L'alginate est un co-polymère linéaire de α -1,4-L-guluronate et β -1,4-D-mannuronate (**Figure 22**). Les oligo-alginates sont préparés, au laboratoire, à partir de l'alginate de sodium des stipes de *L. hyperborea*. Les oligomères d'alginate sont produits par hydrolyse acide ménagée et précipitation sélective (Haug et coll., 1974). Trois catégories d'oligo-alginates sont obtenues : les blocks guluronates (GG), les blocks mannuronates (MM) et les blocks MG (**Figure 22**). La pureté de ces oligo-alginates est vérifiée par spectroscopie RMN (pour résonance magnétique nucléaire).

III- Elicitation des sporophytes de *L. digitata*

Des jeunes sporophytes de *L. digitata*, de 2 à 10 cm, sont placés dans de l'eau de mer filtrée (10 à 100 ml), sous agitation, à 12°C. Un lot d'algues est élicité avec des oligo-guluronates (stock de 15 mg/ml) à une concentration finale de 150 µg/ml. En parallèle, un second lot sans ajout d'oligosaccharides sert de témoin. Afin de mettre en évidence l'efficacité des oligo-guluronates et la mise en place de mécanismes de défense chez les plantules élicitées, nous suivons, durant les premières minutes après élicitation, l'émission de peroxyde d'hydrogène dans l'eau de mer (*Cf Matériel et Méthodes, Chapitre IV*), correspondant au burst oxydant. Une heure après élicitation, chaque lot d'algues est placé dans un volume d'eau de mer plus important (~500 ml). Les algues sont ensuite congelées, dans l'azote liquide, à chaque point de la cinétique (en général 6, 12, 24 et 48 heures après élicitation).

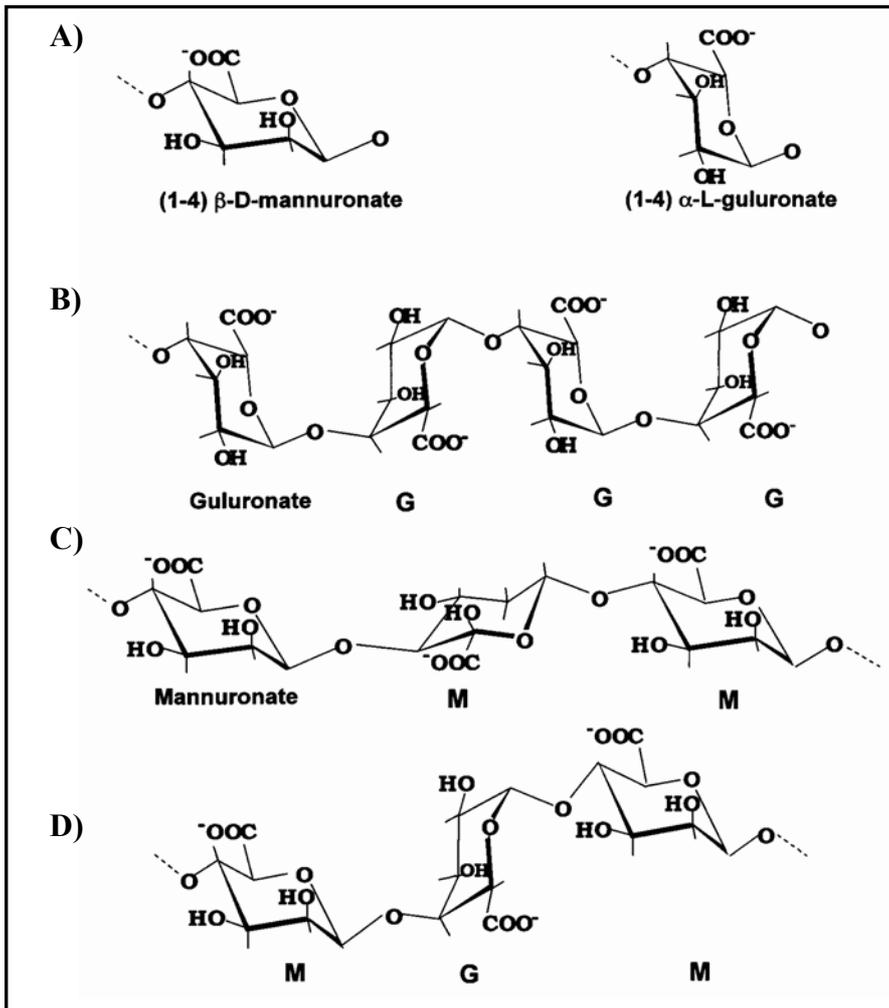


Figure 22 : Structure de l'alginate. A) Les monomères d'acide uronique. B) Les blocks GG. C) Les blocks MM.
 D) Les blocks MG.

IV- Dosage des espèces activées de l'oxygène par chimioluminescence

Les mesures de peroxyde d'hydrogène présent dans le milieu extérieur sont effectuées à l'aide d'un luminomètre (Lumat LB 9507 ; EG&G Berthold). Cet appareil est doté de deux injecteurs reliés à des solutions de réactifs : le luminol (50 µl à 0.3 mM par injection) et la peroxydase de raifort HRP (pour *Horse Radish Peroxidase*) (100 µl à 20 unités/ml dans 10 mM de tampon phosphate pH 7.8 par injection). En présence de peroxyde d'hydrogène et de la HRP, le luminol, oxydé en aminophtalate, émet de la luminescence mesurée par cet appareil. Une gamme étalon préparée en utilisant des concentrations connues de peroxyde d'hydrogène permet de déduire la concentration de peroxyde d'hydrogène émise par les algues dans l'eau de mer.

V- Méthodes biochimiques

A. Extraction protéique

L'extraction protéique est menée en suivant le protocole mis au point par Vilter (1994). La séparation par partition de phase (ou *aqueous polymer two-phase*) est actuellement considérée comme étant la meilleure technique pour l'extraction des haloperoxydases chez les algues brunes et, en particulier, chez les laminariales riches en polysaccharides et en composés phénoliques pariétaux.

Les sporophytes de *L. digitata* sont finement broyés dans de l'azote liquide à l'aide de sable de Fontainebleau. La poudre d'algue est ensuite reprise dans du carbonate du potassium (1 g/g d'algue) et du polyéthylène glycol (PEG, 1550 Da) (1.3 g/g d'algue), un polymère hydrophile. L'extraction peut se faire à température ambiante pendant ~30 minutes ou une nuit à 4°C. Après centrifugation (5,000 g, 15 minutes), deux phases, à caractère hydrophile différent, se forment. Les haloperoxydases se situent dans la phase supérieure riche en PEG, tandis que la majorité des polysaccharides, solubles dans les solutions alcalines, restent dans la phase inférieure riche en sels. Après avoir prélevé la phase supérieure, les haloperoxydases sont précipitées avec du sulfate d'ammonium (1/10^{ème} du volume de solution à 0.6 g/ml) et de l'acétone (3 volumes). Après une heure à -20°C et une seconde centrifugation (10,000 g, 30

minutes), les protéines sont redissoutes dans du tampon Tris 50 mM pH 9. Elles sont enfin conservées à 4°C avant leur purification (*Cf Matériel et Méthodes, Chapitre V. B*).

Une seconde extraction protéique, sans utiliser de PEG, a été mise au point chez les sporophytes de *L. digitata* en se basant sur le protocole établi pour l'extraction des protéines chez l'algue brune *F. distichus* (Corellou et coll., 2000). Les protéines sont extraites dans un tampon Tris 50 mM pH 8.5, EGTA 15 mM et DTT 2mM contenant un cocktail d'antiprotéases (Roche), 2 % de polyvinylpolypyrrodine, 0.5 % d'Igepal CA-630 (ou NP40) et de la mannuronate lyase (1 unité/ml). Après sonication (3 fois, 10 secondes) et centrifugation (10,000 g, 10 minutes), le surnageant constituant l'extrait protéique est conservé à 4°C avant d'être purifié (*Cf Matériel et Méthodes, V. B*).

Les protéines du gamétophyte de *L. digitata*, sont extraites dans une solution Tris 50 mM pH 9.0, chlorure de magnésium 15 mM, dithiothréitol 2 mM contenant 0.5 % de polyvinylpolypyrrolidone et 0.5 % Igepal CA-630. Après sonication (3 fois, 30 secondes) et centrifugation (10,000 g, 10 minutes), le surnageant, contenant les protéines, est conservé à 4°C.

Les protéines intracellulaires des protoplastes sont extraites, par lyse cellulaire, dans un tampon Tris 50 mM pH 9 contenant 2 mM de NaVO₃ et après sonication (30 secondes). Les protéines pariétales présentes dans le milieu de digestion de la paroi des protoplastes sont précipitées en présence de sulfate d'ammonium (6 %) et de 3 volumes d'acétone. Après centrifugation (10,000 g, 30 minutes), le culot protéique est redissout dans du Tris 50 mM pH 9 et dialysé dans le même tampon.

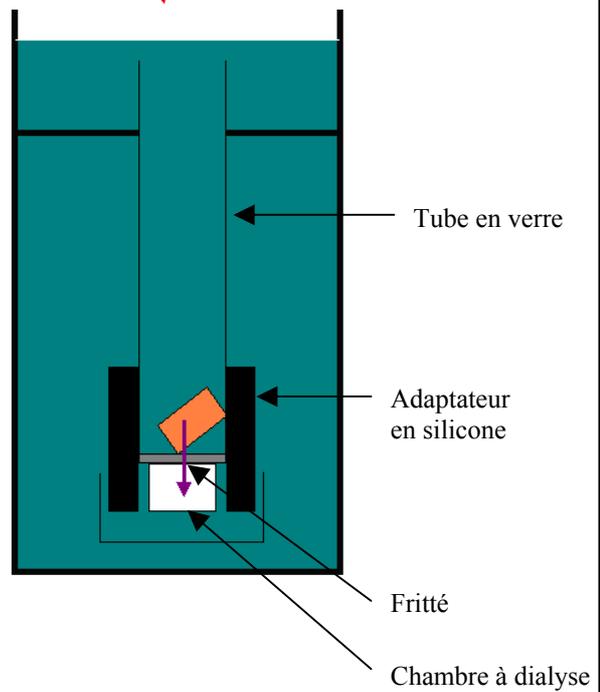
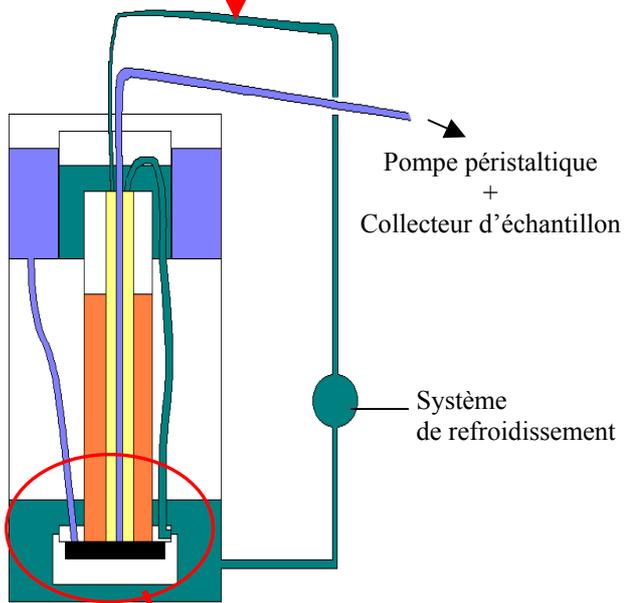
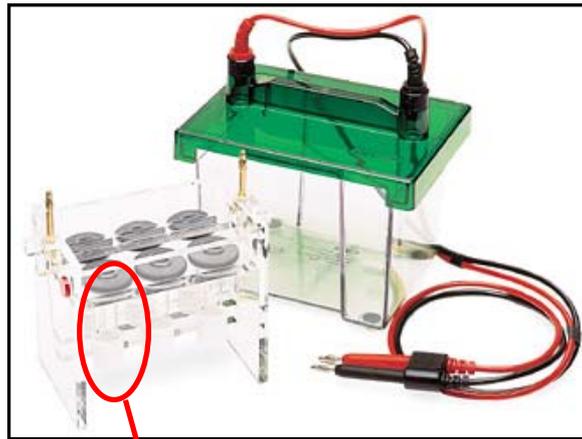
B. Purification des haloperoxydases du sporophyte

Afin d'éliminer l'excédent de sels et le PEG, la phase supérieure obtenue après la séparation « deux-phases » est placée dans des tubes à dialyse (MWCO : 6-8,000, Spectra/Por Membrane ; Spectrum), à 4°C, dans un tampon de contre dialyse (Tris 50 mM pH 9) qui est renouvelé toutes les heures, trois fois de suite.

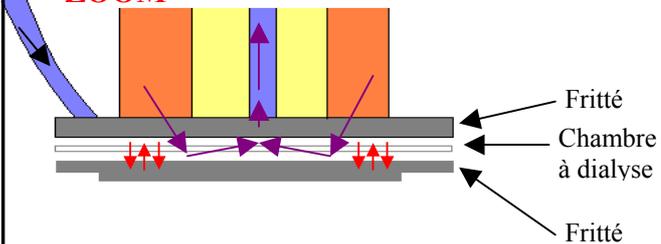
Electrophorèse Préparative



Electro-élution



ZOOM



- Tampon de migration
- Gel d'acrylamide
- Tampon de migration
- Tampon de migration

→ Passage de l'Echantillon

Figure 23 : Représentation schématique du principe de l'électrophorèse préparative et de l'électro-élution.

La concentration en sulfate d'ammonium juste inférieure à celle qui provoque la précipitation des haloperoxydases étant de 30 %, pour l'étape d'adsorption, l'extrait protéique et une colonne d'interactions hydrophobes (ou chromatographie d'adsorption) (colonne de 40 cm de hauteur, 3.5 cm de diamètre de phényl-Sépharose CL4B ; Pharmacia Biotech) sont équilibrés à 30 % de sulfate d'ammonium, 50 mM Tris pH 9. Après dépôt de ~500 ml d'échantillon, la colonne est lavée avec du sulfate d'ammonium 30 %, 50 mM Tris pH 9, ce qui conduit à l'élution des protéines non retenues. Ensuite, les protéines retenues sur la colonne sont éluées par un gradient croissant de tampon Tris 50 mM pH 9 s'étalant sur 10 volumes de colonne, à un débit de 1 ml/min. L'urée (6 M) permet d'éluer les protéines résiduelles.

Les fractions possédant des activités bromoperoxydase ou iodoperoxydase (*Cf Matériel et Méthodes, Chapitre V. E*) sont rassemblées, dialysées contre un tampon Tris 50 mM pH 9 et concentrées à l'aide d'une cellule d'ultracentrifugation (modèle 8200, filtres YM-10, Millipore). La dernière étape de purification consiste en une électrophorèse semi-préparative (modèle 491, Prep Cell ; Bio-Rad) (**Figure 23**) pour l'activité iodoperoxydase, et en une électro-élution (modèle 422, Electro-eluter ; Bio-Rad) (**Figure 23**) pour les activités bromoperoxydase.

En condition native, l'électrophorèse préparative (200 V, 50 mA) permet de collecter l'activité iodoperoxydase au fur et à mesure qu'elle migre et qu'elle sort du gel d'acrylamide (9%). Les fractions possédant l'activité sont ainsi rassemblées et conservées à 4°C (**Figure 23**).

Egalement en condition native, l'électro-élution (10 mA par tube d'électro-élution pendant au moins 6 heures) permet de récupérer en solution (au niveau de la chambre à dialyse) les enzymes contenues dans un gel natif d'acrylamide après migration (**Figure 23**).

C. Dosage des protéines

Les protéines contenues dans les extraits protéiques sont dosées par la méthode de Bradford (1976). Le réactif de dosage est un produit commercial (Protein Assay ; Bio-Rad). C'est une forme anionique de bleu de Coomassie (Coomassie G-250) qui se fixe préférentiellement aux protéines par interaction avec leurs groupements cationiques.

A 800 μ L d'extrait protéique dilué sont additionnés 200 μ L de réactif et la densité optique est mesurée à 595 nm grâce à un spectrophotomètre à double faisceau (UV-1601 ; Shimadzu). L'étalonnage est réalisé à l'aide d'une gamme étalon effectuée d'albumine de sérum de bœuf.

Pour rétablir l'activité des haloperoxydases, perdue lors de l'extraction, 2 mM d'orthovanadate (Na_2VO_3) (interférant avec le réactif de Bradford) sont ajoutés dans les échantillons après le dosage protéique.

D. Electrophorèses

Les électrophorèses sont réalisées avec les systèmes MINI PROTEAN de chez Bio-Rad.

1. Electrophorèse en gel natif

Le gel natif de polyacrylamide (9 %) est préparé dans un tampon Tris pH 8.8 alors que le gel de concentration est préparé dans un tampon Tris pH 6.8 à une concentration de 4 % en acrylamide (Bollag et coll., 1996). Après dépôt des échantillons protéiques, la migration s'effectue à voltage constant (80 volts). L'électrophorèse en gel natif permet de séparer les protéines en fonction de leur charge et de leur poids moléculaire.

2. Electrophorèse en gel dénaturant

L'électrophorèse, en conditions dénaturantes, est réalisée sur gel de polyacrylamide (9 %) en présence d'un détergent anionique, le sodium dodecyl sulfate (ou SDS) (Bollag et coll., 1996). Avant migration, un tampon dénaturant est ajouté à l'extrait protéique. Les protéines sont dénaturées après un bain de 5 minutes à 100°C. Le complexe protéines/SDS chargé négativement migre alors dans le gel d'acrylamide selon la taille de la protéine, parallèlement à un marqueur de poids moléculaire standard (Prestained SDS-PAGE Standards, broad range ; Bio-rad). Les protéines sont révélées par coloration au bleu de Coomassie ou au nitrate d'argent (Bollag et coll., 1996).

E. Test d'activité haloperoxydase

L'activité peroxydase peut être mise en évidence sur un gel natif en utilisant de l'o-dianisidine comme substrat. La détection d'activités haloperoxydases repose sur la capacité de l'enzyme à oxyder le dichlorure d'o-dianisidine en présence d'halogénure et de peroxyde d'hydrogène, formant ainsi un composé de couleur rouge-brun.

Ainsi, après migration, le gel est incubé, à l'obscurité, pendant 15 minutes, dans une solution d'o-dianisidine 0.1 mM et d'halogénure 10 mM (KI, KBr ou KCl) tamponnée par du phosphate de potassium (100 mM, pH 7.4). Le gel est ensuite placé, toujours à l'obscurité, dans une solution contenant 0.45 mM de peroxyde d'hydrogène jusqu'à ce que des bandes de couleur rouge-brun correspondant à l'activité haloperoxydase apparaissent.

Afin de détecter, de la même façon, des activités haloperoxydases suite à une migration en conditions dénaturantes, le SDS est préalable éliminé en incubant le gel dans le tampon Tris-Glycine contenant 0.1 % d'Igepal CA-630 (ou NP40).

L'activité bromoperoxydase peut être quantifiée en solution par spectrophotométrie (**Annexe 5**) en mesurant, à 290 nm, la conversion, en présence de peroxyde d'hydrogène, du monochlorodimédone (20/cm/mM) en monochlorobromodimédone (0.2/cm/mM). Les activités spécifiques sont ainsi exprimées en unités par milligramme de protéine, une unité correspondant à la quantité requise pour la bromination d'une micromole de monochlorodimédone par minute.

La quantification spectrophotométrique de l'activité iodoperoxydase en solution (**Annexe 5**) est mesurée, à 350 nm, en suivant la conversion d'iodure en triiodure en présence de peroxyde d'hydrogène et en calculant la différence entre la réaction en présence d'enzyme et la réaction sans enzyme. L'activité spécifique est définie en unités par milligramme de protéine, une unité correspondant à la quantité requise pour consommer une micromole de peroxyde d'hydrogène.

F. Western Blot

Les protéines dénaturées sont séparées, par électrophorèse, sur gel dénaturant d'acrylamide (9 %) et transférées (2 heures à 300 mA) sur une membrane de nitrocellulose (Bio-Rad) (Bollag et coll., 1996). La membrane est bloquée dans une solution de PBS pH 7.5 contenant 0.01 % de Tween 20 (PBS-T) et 5 % de lait écrémé, et ensuite incubée avec l'anticorps primaire (une nuit à 4°C). Après trois lavages dans du PBS-T, elle est incubée, une heure à température ambiante, avec l'anticorps secondaire (*goat anti-rabbit IgG*) couplé à une HRP. La dilution des différents anticorps est optimisée selon l'anticorps primaire utilisé. La détection en chimie luminescence a été réalisée en suivant les instructions du fournisseur (système ECL Western Blotting ; Amersham Bioscience). La synthèse de l'anticorps primaire spécifique de la vBPO de *L. digitata* a été réalisée par Eurogentec.

G. Identification de protéines glycosylées

Une colonne de Concanavaleine A a été utilisée pour mettre en évidence des groupes glucoses ou mannoses associés aux protéines. La colonne est équilibrée par une solution Tris 5 mM pH 7.5, NaCl 10 mM, MnCl₂ 0.1 mM, CaCl₂ 1 mM. Les glycoprotéines sont ensuite éluées avec des concentrations croissantes de méthyl- α -mannopyranoside (10, 100 et 500 mM).

H. Techniques utilisées pour déterminer le poids moléculaire des enzymes natives

Une première estimation de la taille des haloperoxydases natives a été réalisée en se basant sur le principe établi par Hedrick et Smith (Bollag et coll., 1996), qui consiste à faire migrer les échantillons dans plusieurs gels natifs à différentes concentrations en acrylamide (de 4 à 14%). Des courbes standards ont été établies avec des protéines de poids moléculaire connu (albumine, aldolase, catalase, ferritine et uréase).

Le poids moléculaire des haloperoxydases natives a également été déterminé en FPLC (pour *Fast Protein Liquid Chromatography*) à l'aide d'une colonne de filtration de gel

(Superdex 200 HR 10/30 ; Amersham), la phase mobile étant composée d'un tampon NaCl 100 mM, Tris 50 mM pH 9. Deux cent microlitres d'échantillons sont injectés et l'élution est réalisée à 500 µl/min. Des protéines standard (Amersham Biosciences) ont été utilisées pour la calibration.

VI- Analyse des haloperoxydases purifiées en spectrométrie de masse

A. Analyse des haloperoxydases natives en covalent et en non covalent

Ces analyses en spectrométrie de masse ont été réalisées à la Station Biologique de Roscoff avec l'aide de Laurent Thion du Service Informatique et Génomique. Un spectromètre de masse hybride de type électrospray Q-TOF (pour *hybrid Quadrupole orthogonal acceleration Time-Of-Flight tandem mass spectrometer*, ESI-Q-TOF II ; Micromass) en fonctionnement MS a été utilisé pour ces analyses (**Figures 24 et 25**).

Deux types d'échantillons purifiés ont été analysés en spectrométrie de masse, selon la technique d'extraction utilisée (avec ou sans PEG).

Les échantillons préparés à partir de l'extraction par partition de phase (avec PEG), sont préalablement passés sur une colonne échangeuse d'anions (DEAE-Sépharose, Amersham Pharmacia) équilibrée à 50 mM NaCl, 50 mM Tris pH 9. Les protéines sont éluées par un gradient décroissant de 50 mM NaCl, 50 mM Tris pH 9.

Avant les analyses en spectrométrie de masse, les fractions sont concentrées, lavées 10 fois par filtration (YM-50 ; Millipore) et équilibrées dans un tampon d'acétate d'ammonium 10 mM pH 6.5.

1. Analyse en non covalent

Le spectromètre est en mode positif en V et l'aiguille de la source ESI est maintenue à une tension de 2.5-3 kV. La tension du cône est de 50-200 V. Afin de préserver l'intégralité des liaisons non covalentes de l'enzyme et d'accroître leur sensibilité, le vide est amené à 50 mbar dans l'interface de la source (au lieu de 2 mbar normalement). La température de la

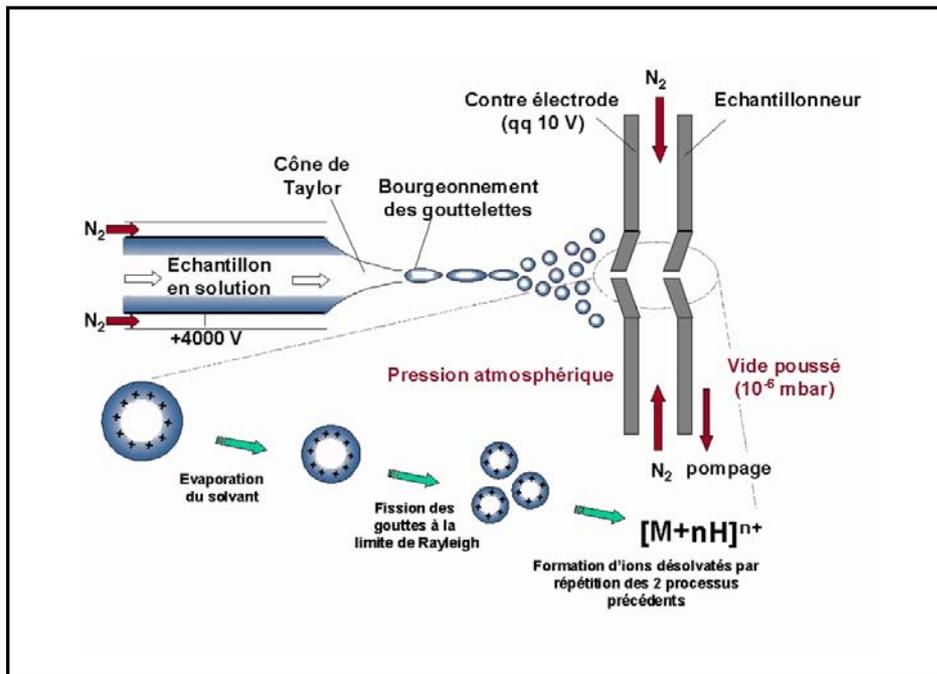


Figure 24 : Représentation schématique de la source électrospray (ESI) (d'après Wilm et Mann, 1994).

Le principe d'ionisation est le suivant : la solution source est introduite dans un capillaire porté à un haut potentiel électrique. Le champ électrique intense appliqué à la sortie du capillaire provoque la formation d'un nuage de gouttelettes chargées qui traversent simultanément un gradient de champ électrique et un gradient de pression dans la direction de l'analyseur du spectromètre de masse. La taille des gouttelettes diminue par évaporation du solvant (par explosions « coulombiennes » successives) et les ions ainsi formés sont canalisés vers l'analyseur où règne un vide poussé.

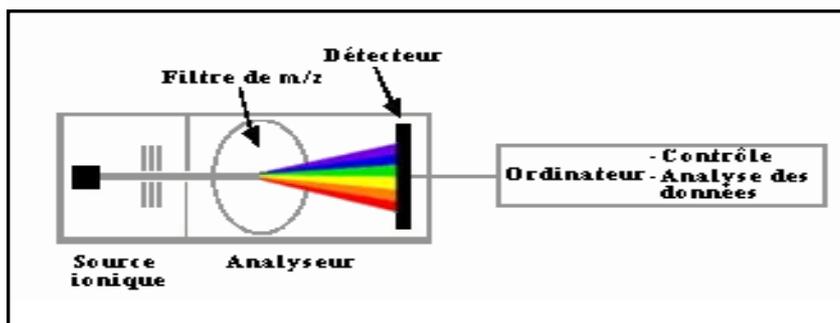


Figure 25 : Schéma simplifié du fonctionnement en ESI-MS. L'échantillon en solution est vaporisé sous forme de spray et reçoit plusieurs charges électroniques. Les ions sont ensuite dirigés les uns après les autres vers le détecteur en fonction de leur rapport masse/charge.

source et celle de désolvation sont à 80°C et 100°C respectivement. La calibration s'effectue avec de l'iodure de césium (2 mg/ml dans H₂O/propanol-2). L'échantillon, dans le tampon acétate d'ammonium, est directement injecté manuellement (1-1.5 µl/min) à l'aide d'une seringue (type 22 ; Harvard Apparatus). Les analyses ont été effectuées sur une échelle de m/z (rapport masse/charge) de 300 à 24,000.

2. Analyse en covalent

Le spectromètre est également en mode positif en V. La tension de l'aiguille et celle du cône sont respectivement de 2.30-2.75 kV et de 30-80 V. Le vide est maintenu à 2 mbar au niveau de la source. La température de la source et celle de désolvation sont à 80°C et 150°C respectivement. La calibration s'effectue avec de la myoglobine de cœur de cheval (200 fmoles/µl à 5 µl/min dans H₂O/CH₃CN et 0.2 % d'acide formique). L'échantillon, dans une solution d'acétonitrile (CH₃CN) et d'acide formique (0.4 % final), est directement injecté manuellement (1-1.5 µl/min) à l'aide d'une seringue (type 22 ; Harvard Apparatus). Les analyses ont été effectuées sur une échelle de m/z (rapport masse/charge) de 300 à 3,500.

B. Analyse des haloperoxydases en MS/MS

Ce travail a été réalisé en collaboration avec le laboratoire de Spectrométrie de Masse Bio-Organique de Strasbourg dirigé par Alain Van Dorsselaer (UMR 7509, CNRS-ULP, Strasbourg). J'ai réalisé les étapes d'isolement des bandes d'intérêt sur gel d'acrylamide coloré au bleu de Coomassie et analysé les résultats obtenus par spectrométrie de masse, en collaboration avec Elsa Wagner, une étudiante en thèse au laboratoire de Strasbourg (Wagner, 2003). Le schéma (**Figure 26**) illustre la stratégie que nous avons employée.

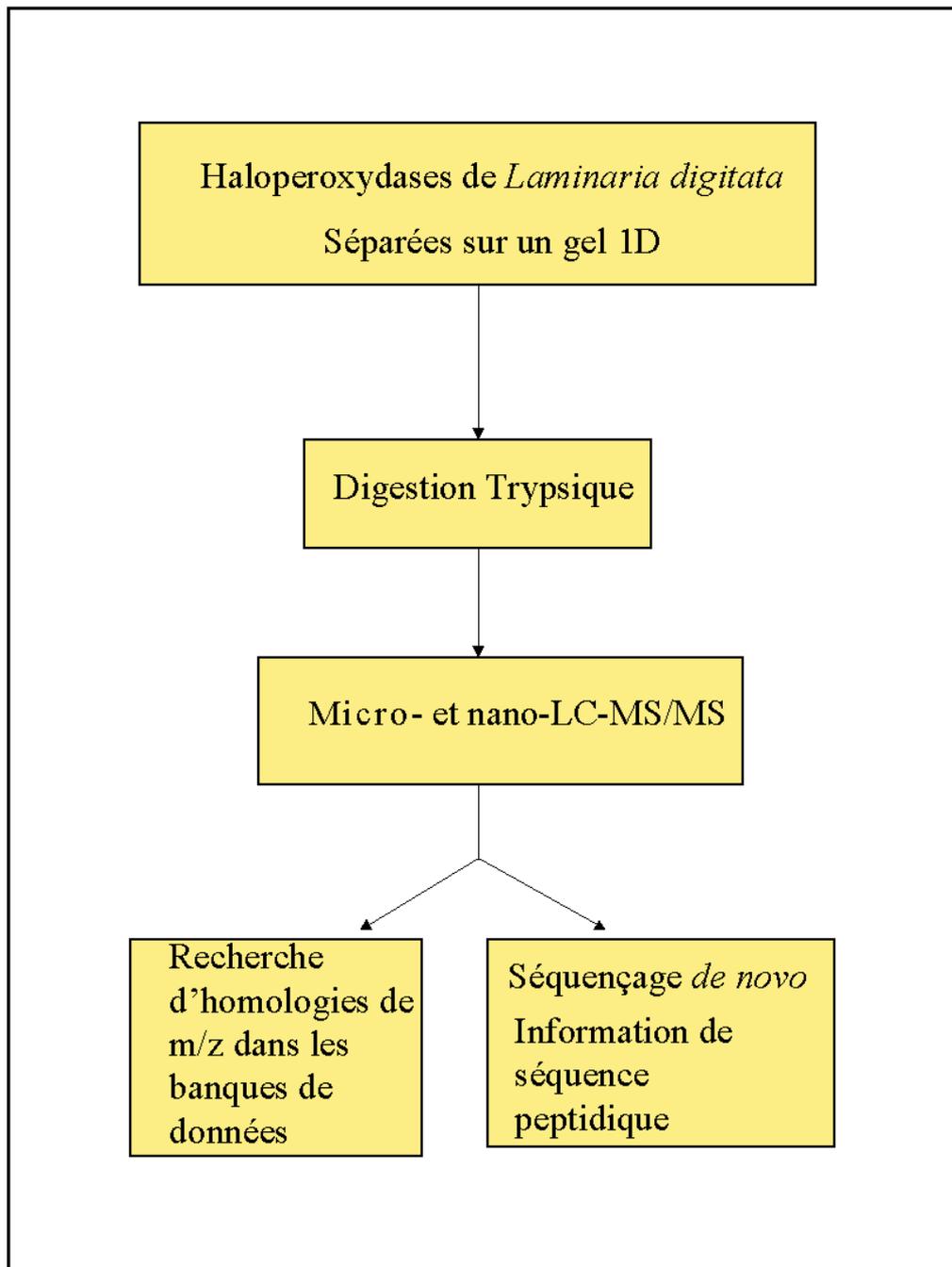


Figure 26 : Schéma de la stratégie employée pour l'étude des vHPOs en MS/MS

1. Digestion des haloperoxydases sur gels

Les protéines d'intérêt ont été visualisées sur gel natif (9 %) par coloration au bleu de Coomassie, et excisées par découpage des bandes à l'aide d'une lame de rasoir à usage unique. La digestion des protéines contenues dans le gel a été réalisée au laboratoire de Strasbourg suivant le protocole décrit par Rabilloud et coll. (2001) (Wagner, 2003). La réduction est réalisée par un traitement d'une heure à 57°C dans du DTT 10 mM. La réaction d'alkylation s'effectue dans 55 mM d'iodoacétamide durant 45 minutes à température ambiante et à l'obscurité. L'étape de digestion des protéines se fait sur la nuit à 35°C dans une solution fraîche de NH_4HCO_3 contenant 12 ng/ μl de trypsine. Les fragments de gels sont enfin centrifugés avant ajout d'une solution contenant 70 % d'acétonitrile, 5 % d'acide formique et 25 % d'eau. Pour l'analyse en nano-LC-MS/MS, le surnageant est évaporé afin d'éliminer l'acétonitrile. Enfin, 10 μl d'eau contenant 5 % d'acide formique sont ajoutés et 5 μl de cette solution sont injectés dans le système HPLC.

2. Spectromètres de masse : appareillage et utilisation

Les mesures de masse ont été effectuées au laboratoire de Strasbourg en nano-LC-MS/MS et en micro-LC-MS/MS (Wagner, 2003).

Les analyses en nano-LC-MS/MS ont été réalisées à l'aide d'un système de nano-HPLC (CapLC capillary LC system, Micromass) couplé à un spectromètre de masse ESI-Q-TOF (ESI-Q-TOF II, Micromass). Pour les analyses en micro-LC-MS/MS, ils ont utilisé un spectromètre de masse à trappe ionique (Esquie 3000+), fonctionnant avec une source électrospray en mode positive (Bruker-Daltonik GmbH), couplé à un système HPLC par capillaire (Agilent 1100 Series capillary LC system, Agilent Technologies).

Le mélange de peptides obtenus après digestion par la trypsine est tout d'abord séparé en HPLC. Lorsque le spectromètre détecte un ion (appelé ion précurseur) en mode MS (spectre MS), il le sélectionne et le fragmente par collision contre un gaz (**Figure 27**). La masse des ions fragments générés est obtenue en mesurant leur rapport de masse sur charge (noté m/z) (spectre MS/MS) (**Figure 27**). Ce spectre MS/MS est la signature de la séquence primaire de l'ion sélectionné (en acides aminés dans le cas des peptides).

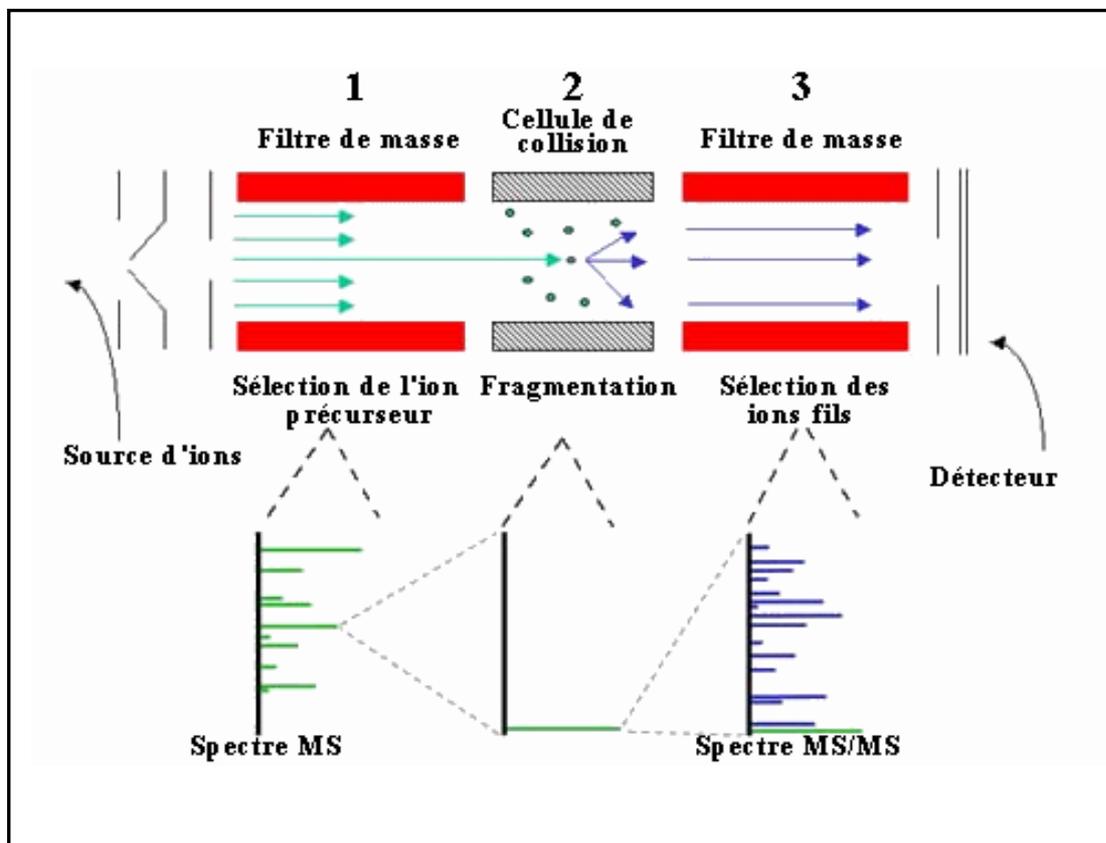


Figure 27 : Schéma du spectromètre de masse en fonctionnement MS/MS. La source ESI est la même qu'en mode MS (Figure 24). **1)** Le premier filtre de masse sert à analyser le mélange (spectre MS) et à sélectionner et isoler un ion parent (ou ion précurseur). **2)** Cet ion est soumis à des collisions avec un gaz rare induisant des dissociations. **3)** Les fragments obtenus ou ions fils sont analysés dans le deuxième filtre de masse (spectre MS/MS).

Les données de masse collectées au cours des analyses ont été traitées et transformées en fichiers PKL et MGF (formats génériques du Logiciel Mascot ; Matrix Science) et ainsi soumises au logiciel Mascot (tolérance de ~ 0.5 Da) pour les recherches d'identité de masses dans les banques de données. Les informations de séquence en acides aminés des peptides analysés par LC-MS/MS ont été obtenues par séquençage *de novo*.

3. Stratégie par séquençage de novo

Dans un spectre de masse, les peptides se fragmentent suivant des règles connues qui permettent de déterminer plus ou moins facilement la séquence en acides aminés des peptides ; c'est le séquençage *de novo*.

Lorsque nous avons démarré ce travail, nous ne disposions pas de logiciels suffisamment performants pour déterminer automatiquement les séquences des peptides. Néanmoins, des logiciels de séquençage (*De novo sequencing* de Biotools, Bruker ; Peptide sequencing de BiolyNX, Micromass), peu performants, nous ont aidé pour l'interprétation des spectres MS/MS. Cependant, nous avons souhaité vérifier manuellement les résultats obtenus. Ainsi, l'interprétation des résultats a principalement été réalisée de façon « manuelle », spectre après spectre. Nous verrons par la suite que des outils informatiques, très récemment commercialisés, apportent une aide précieuse pour l'approche systématique par séquençage *de novo* en LC-MS/MS.

- Séquençage de novo « manuel »

Les spectres de fragmentation étant constitués d'ions multichargés, nous avons eu recours, pour leur interprétation, à un algorithme permettant de les transformer en spectres d'ions monochargés. Ce calcul est appelé déconvolution (Wehofsky et Hoffmann, 2002). Selon le spectromètre de masse, nous avons utilisé le programme MaxEnt3 (Micromass) ou le programme de déconvolution du logiciel Data Analysis (Bruker).

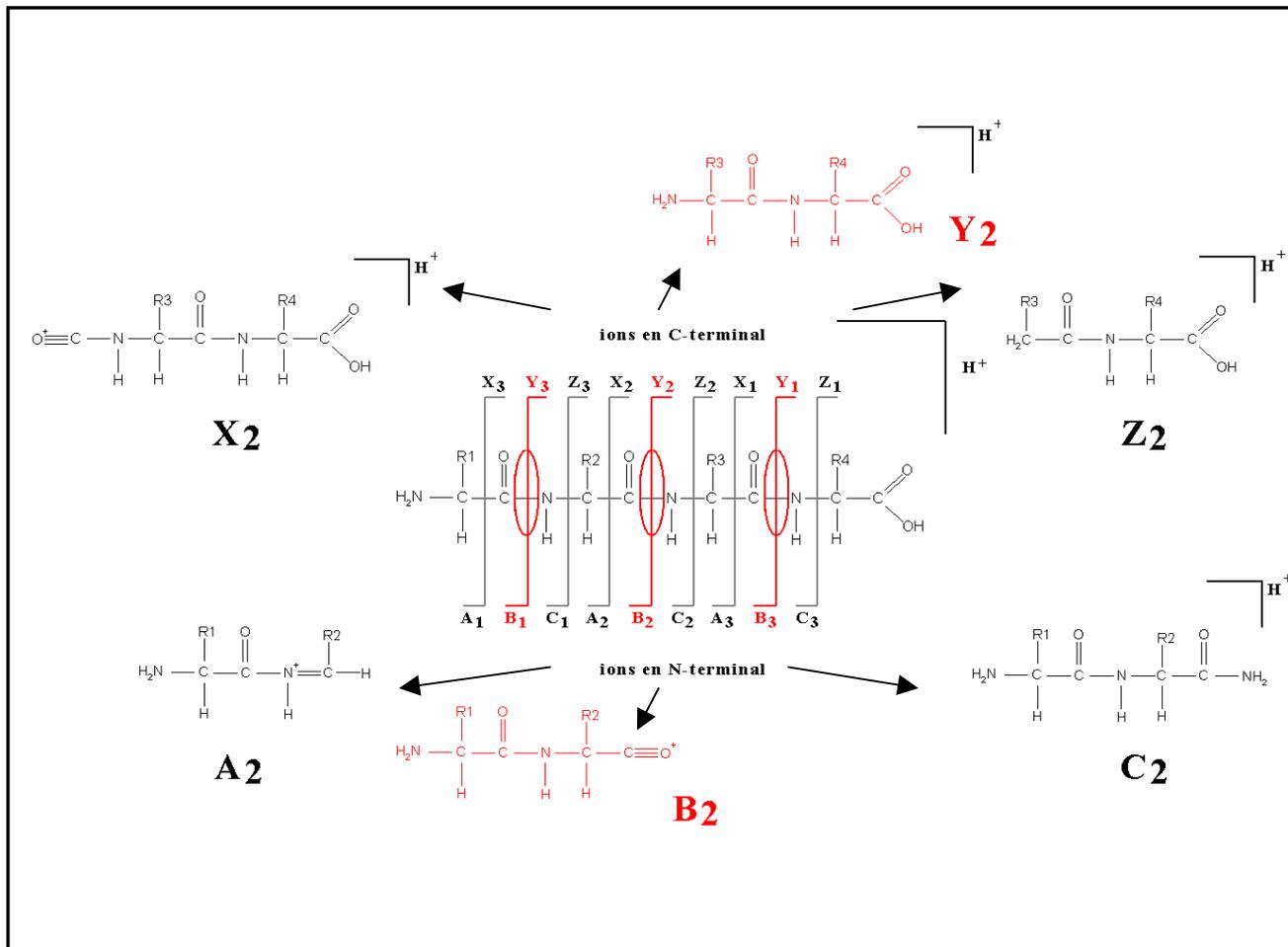


Figure 28 : Représentation de la fragmentation des peptides en MS/MS. Les peptides issus de la fragmentation de la liaison peptidique (fragments y et b) sont représentés en rouge.

La première difficulté rencontrée pour l'interprétation des spectres de fragmentation peptidique réside dans l'attribution des fragments à une série d'ions. Les peptides se fragmentent majoritairement en rompant leurs liaisons peptidiques (fragments b et y à basse énergie) (**Figure 28**) (Roepstorff et Fohlman, 1984 ; Johnson et coll., 1987). La distinction des fragments b et y est très importante car elle définit le cadre de lecture de la séquence peptidique (en indiquant l'orientation des acides aminés par rapport aux extrémités N et C-terminales). Trois indications sur les spectres MS/MS peuvent permettre de distinguer les séries de fragments b et y :

- Les peptides digérés à la trypsine ont pour particularité de porter une charge permanente conférée par la lysine ou l'arginine en position C-terminale. C'est pourquoi, leurs spectres MS/MS présentent généralement une série de fragments y dominants et des signaux de plus faibles intensités pour la série des fragments b.

- Le fragment y_1 peut servir de repère pour démarrer le séquençage. En effet, il possède un ratio m/z caractéristique : 147,1 ou 175,1 Da selon que le peptide tryptique se termine par une lysine ou une arginine respectivement.

- Il existe souvent des ions, quoique de faible intensité, correspondant à d'autres séries de fragments et permettant de guider l'identification : les ions a et c voisins des fragments majoritaires b et les ions x et z voisins des fragments majoritaires y (**Figure 28**) (Roepstorff et Fohlman, 1984 ; Johnson et coll., 1987).

La différence de masse entre les ions consécutifs d'une même série, y ou b, permet ensuite de déduire la séquence en acides aminés du peptide analysé. Cependant, l'interprétation des spectres de fragmentation est parfois ambiguë, notamment pour les acides aminés isobares (leucine/isoleucine) ou les acides aminés dont la différence de masse est très faible.

Deux autres types de fragments, trouvés dans la plupart des spectres à basse énergie, résultent du clivage d'au moins deux liaisons internes de la chaîne peptidique et apportent des informations complémentaires sur la composition en acides aminés.

- Le premier type est appelé fragment interne car il s'agit d'un fragment ayant perdu les côtés N et C-terminaux (**Figure 29 A**). Ce type d'ions contient rarement plus de

trois ou quatre acides aminés et se retrouve donc généralement dans le spectre au niveau des bas m/z. Les fragments internes sont souvent en faible abondance, à l'exception des fragments contenant un résidu proline. En effet, le groupement imino du résidu proline est inclus dans un cycle à cinq atomes et possède une affinité protonique plus importante que les autres liaisons amides du peptide. Ainsi, la protonation et le clivage de la liaison amide du résidu proline est un processus favorisé (Loo et coll., 1993). Les fragments internes peuvent donc permettre de confirmer partiellement la séquence peptidique mais compliquent cependant l'interprétation du spectre MS/MS.

- Le second type de fragment qui résulte de clivages multiples de la chaîne peptidique apparaît également dans les bas m/z du spectre : ce sont les ions immoniums des acides aminés (**Figure 29 B**). Bien qu'ils soient rarement observés pour tous les acides aminés du peptide, ceux qui apparaissent donnent une information sur la composition de la séquence étudiée (Falick et coll., 1993).

Par ailleurs, il est fréquent d'observer des ions caractérisés par une différence de -18 Da par rapport à un fragment b ou y. La présence de ces ions est difficilement interprétable :

- Elle peut correspondre à la déshydratation des groupements hydroxyl de résidus sérine ou thréonine ; dans ce cas on observe un ion y ou b ayant perdu une molécule d'eau. Ces pertes de -18 Da sont alors généralement observées de façon récurrente sur le spectre pour tous les fragments y ou b contenant au moins un de ces deux types d'acides aminés.

- La différence de masse observée peut également correspondre aux couples d'acides aminés : phénylalanine/acide glutamique (18,03 Da), méthionine/leucine ou isoleucine (17,96 Da), acide aspartique/proline (17,97 Da).

- Séquençage de novo « automatique » pour la LC-MS/MS

Le logiciel PEAKS (Bioinformatics Solutions Inc) permet, de façon correcte, le séquençage *de novo* des peptides analysés par LC-MS/MS. Il a été évalué au cours de la thèse

d'Elsa Wagner, à Strasbourg, en comparant des résultats issus d'un séquençage « manuel » avec ceux obtenus via son utilisation (Wagner, 2003). Pour ce type d'analyse, où les spectres MS/MS sont générés de façon automatique et en grand nombre, cet outil constitue une aide précieuse à l'interprétation.

VII- Caractérisation moléculaire

A. Clonage d'ADNc

1. Criblage d'une banque d'ADNc

Une banque d'ADNc construite dans le vecteur Lambda ZAP II (cDNA Synthesis Kit, Zap-cDNA Synthesis Kit ; Stratagène) (Crépineau et al., 2000) a été criblée avec une sonde spécifique d'un ADNc d'haloperoxydase (vBPO ou vIPO) de *L. digitata* en suivant les instructions du fabricant (Stratagène).

Après criblage, les phages sont amplifiés dans des bactéries de type MRF' rendues permissives. Le mélange bactéries permissives/phages est incubé à 37°C pendant 30 minutes afin de permettre l'infection des bactéries par les phages. Ensuite, il est étalé dans du milieu LB Top Agar sur une boîte de pétri de NZY-agar et incubé à 37°C toute une nuit. Les plages de lyse se développent sur le tapis bactérien et les phages sont resuspendus dans du tampon SM. Afin de déterminer la concentration des suspensions de phages, on effectue une titration, c'est à dire une culture sur boîte de dilutions successives du stock de phages.

Après élimination des bras du phage, le vecteur Uni-ZAP XR, contenant le fragment d'ADNc, est recircularisé pour former le phagemide pBluescript SK⁻ (Zap-cDNA Gigapack III Gold Cloning Kit ; Stratagène). Les bactéries XL-Blue rendues compétentes sont transformées par ces phagemides et cultivées sur LB Agar en présence d'ampicilline. Seules les bactéries ayant incorporées un vecteur pBluescript (résistance à l'ampicilline) vont pouvoir se multiplier. Les colonies blanches (sélection des colonies ayant un vecteur contenant l'insert) sont repiquées et cultivées dans du milieu liquide LB-ampicilline à 37°C sur une nuit.

Les extractions d'ADN plasmidique (ou mini-préparation) contenant l'insert sont effectuées grâce au kit « *FlexiPrep* » (Pharmacia Biotech). Les bactéries sont soumises à une lyse alcaline. Puis, les protéines et l'ADN bactérien sont éliminés par précipitation en conditions salines précises. L'ADN plasmidique est récupéré dans le surnageant puis purifié par adsorption sur des billes de Sephaglas. Cette purification vise essentiellement à éliminer les traces d'ADN bactérien et d'ARN. La taille de l'ADN plasmidique et des inserts est vérifiée par électrophorèse en gel d'agarose après digestion par les enzymes utilisées lors du clonage. Les clones intéressants sont conservés dans du glycérol 50 %, à -20°C.

2. 5' RACE-PCR

Le principe de la 5'RACE-PCR (pour *Rapid Amplification of cDNA Ends-PCR*) consiste à amplifier l'extrémité 5' des ADNc (**Figure 30**). Nous avons utilisé le kit 5' RACE de Clontech (SMART RACE cDNA Amplification Kit). La première étape de la RACE-PCR consiste en la synthèse d'ADNc « SMART », à partir d'ARN total. Cet ADNc particulier, synthétisé par la *PowerScript Reverse Transcriptase* possédant une activité terminale-transférase, a une séquence connue (l'oligo SMART II A) à son extrémité 5'. Cette séquence sert de cible à une amorce universelle qui, couplée avec une amorce spécifique interne du cDNA, permet d'amplifier l'extrémité 5' par PCR.

B. Criblage d'une banque d'ADN génomique

Une banque d'ADN génomique construite dans le vecteur Lambda DASH II (DNA Synthesis Kit, Dash-DNA Synthesis Kit ; Stratagène) (Nyvall et al., 2003) a été criblée avec une sonde spécifique de la partie 5' de l'ADNc *vBPO1* de *L. digitata* en suivant les instructions du fabricant (Lambda Dash II/*Bam*HI-Treated, Gigapack III Gold packaging extract ; Stratagène). Après criblage, les phages sont amplifiés dans des bactéries de type MRA rendues permissives. Le mélange bactéries permissives/phages est incubé à 37°C pendant 30 minutes afin de permettre l'infection des bactéries par les phages. Ensuite, il est étalé à l'aide de LB Top Agar sur une boîte de pétri de NZY-agar et incubé à 37°C toute une

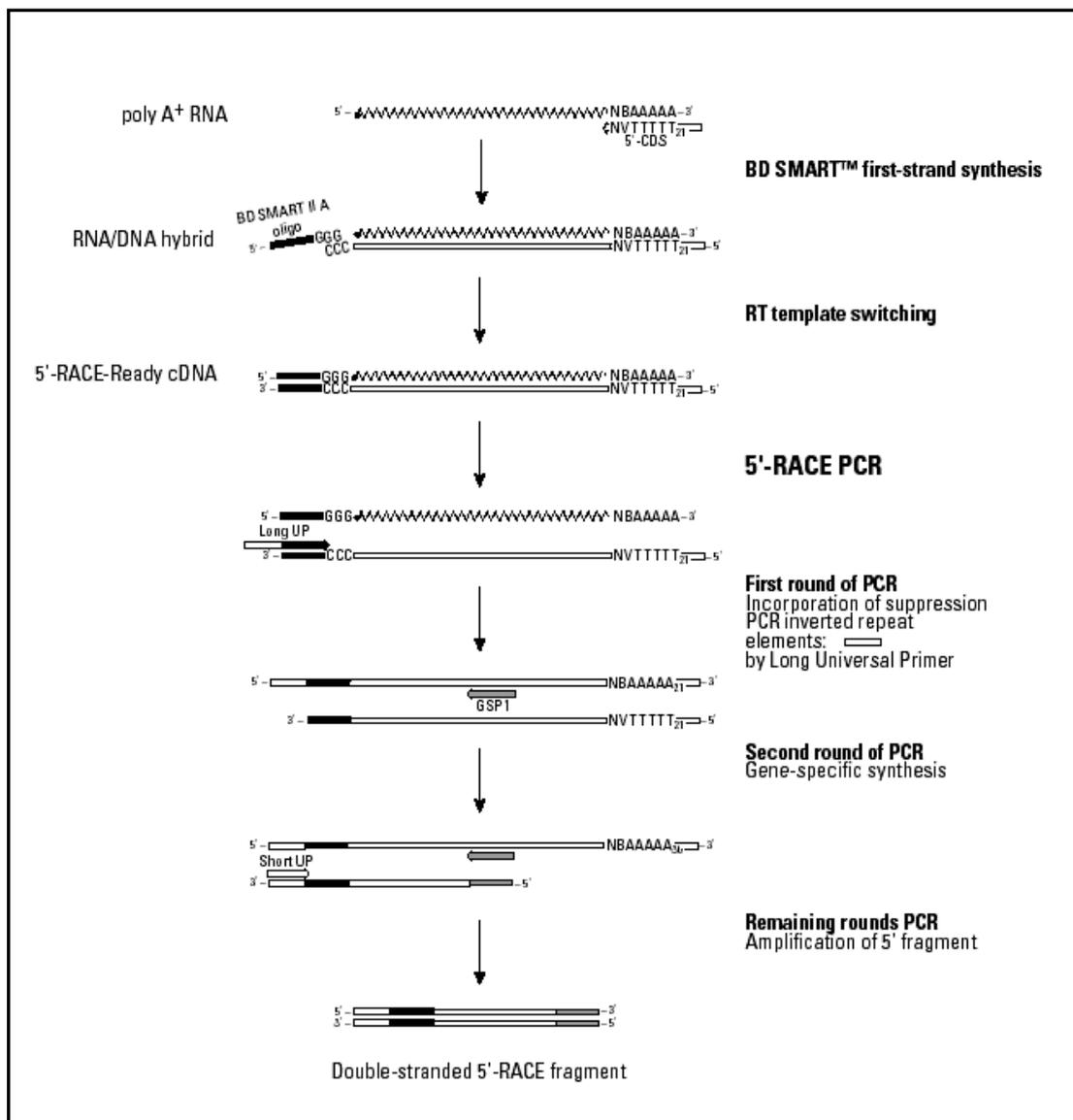


Figure 30 : Schéma simplifié du principe de la 5' RACE (Clontech).

nuit. Les plages de lyse se développent sur le tapis bactérien et les phages sont resuspendus dans du tampon SM.

L'ADN phagique a été purifiée à partir des suspensions de phages (kit Proméga) et une carte de restriction préliminaire a été réalisée par digestion enzymatique. Cet ADN a été utilisé dans des réactions de PCR.

D. Séquençage et Analyse des séquences

Au début de cette étude, le séquençage des inserts a été réalisé selon la méthode d'incorporation de terminateurs de chaînes (Maniatis et coll., 1989), avec le kit « *Thermo Sequenase Pre-Mixed Cycle Sequencing* » (Amersham Pharmacia Biotech). Le fragment d'ADN bicaténaire est rendu simple brin par dénaturation à 100°C. L'ADN monocaténaire, servant de matrice, est hybridé à une amorce universelle de séquence déterminée, marquée au *Texas Red*. La réaction cyclique est faite par une ADN polymérase, la polymérase *Thermo Sequenase*, en présence des quatre désoxyribonucléotides et d'un des quatre didésoxyribonucléotides, un analogue des nucléotides possédant une extrémité 3'H à la place de l'extrémité 3'OH. Ainsi, lorsque la polymérase, en lisant la matrice, incorpore ce didésoxyribonucléotide, la réaction s'arrête.

Les produits de polymérisation des quatre tubes sont déposés les uns à côté des autres sur un gel de polyacrylamide et la détection des échantillons marqués au *Texas Red* se fait à l'aide d'un séquenceur automatique, le séquenceur *Vistra 725* (*Vistra*, Amersham).

Suite à l'installation de la plate-forme de séquençage à haut-débit de Génomer nous avons disposé d'un séquenceur à capillaires (*ABI 3100*) à la Station Biologique de Roscoff. Le système de marquage utilisé, le « *Big-Dye Version 3* » (*Applied biosystems*), consiste en un marquage de chaque acide nucléotique situé en fin de brin par un fluorochrome différent. Ceci permet la préparation d'un seul mélange de réactifs par clone à séquencer au lieu des quatre nécessaires avec le système de marquage des amorces utilisé précédemment. Après l'étape de réaction de séquence par PCR, les produits sont lavés par filtration en utilisant le kit « *Montage Seq 96 Sequencing Reaction Cleanup* » (*Applied biosystems*), resuspendus dans une solution d'injection et analysés dans le séquenceur. Pendant qu'un champ électrique

permet la migration de l'échantillon, un laser provoque l'excitation des fluorochromes portés par les brins d'ADNc, séparés selon leur taille par électrophorèse. L'intensité de la fluorescence correspondant aux longueurs d'onde émises par les quatre fluorochromes est enregistrée en temps réel.

Le regroupement des séquences nucléotidiques en contig a été réalisé en utilisant le logiciel Sequencher (version 4.0). L'analyse des séquences nucléotidiques et leur traduction en séquences protéiques primaires ainsi que les alignements sont réalisés à l'aide du logiciel DNAMAN (version 4.15). Les alignements sont ensuite traités en utilisant le logiciel GENEDOC. Les séquences des autres vHPOs ont été obtenues via GenBank. Les diverses études de prédiction (peptides signal, sites de glycosylation, localisation cellulaire, digestion tryptique *in silico*...) et les modélisations tridimensionnelles des protéines sont effectuées via les programmes disponibles en libre accès sur le serveur ExPasy (www.expasy.org) ou sur le site www.cbs.dtu.dk/services/. L'analyse des structures tridimensionnelles des protéines est réalisée grâce au logiciel Swiss-Pdb-Viewer en libre accès sur le serveur ExPasy.

E. Extraction des acides nucléiques et hybridation sur membrane

1. Extraction des acides nucléiques

L'extraction est réalisée selon le protocole de Apt et collaborateurs (1995). Ce protocole permet d'obtenir, à partir d'algues brunes, des acides nucléiques assez purs et de l'ordre de plusieurs microgrammes, utilisables pour les hybridations d'ADN et d'ARN transférés sur membranes (*Southern blot* et *Northern blot*, respectivement). Cette technique d'extraction consiste à précipiter les polysaccharides sélectivement avec de l'éthanol.

Les algues sont broyées et mises dans un tampon d'extraction (100 mM Tris pH 7.5, 1.5 mM NaCl, 2 % CTAB, 50 mM EDTA, 50 mM DTT) à raison de 10 ml par gramme d'algues. La solution est alors agitée doucement pendant 15 minutes. Une extraction par un volume de chloroforme-alcool isoacrylique (24:1) est suivie d'une centrifugation (10,000 g, 20 minutes). Les polysaccharides sont ensuite précipités par l'addition lente et sous agitation douce, de 0.2-0.3 volume d'éthanol 100 % à la phase aqueuse. Une seconde extraction au

chloroforme-alcool isoamylique (24:1) permet d'éliminer les polysaccharides précipités. Une centrifugation (10,000 g, 20 minutes) est alors réalisée avant de récupérer la phase aqueuse contenant les acides nucléiques. Les ARN **(1)** et l'ADN **(2)** sont ensuite purifiés séparément.

(1) L'extraction de l'ARN consiste en une précipitation au chlorure de lithium, suivie de plusieurs étapes de purifications au phénol-chloroforme. Ainsi, la phase aqueuse précédemment obtenue est amenée à 3 M de LiCl et 1 % de β -mercaptoéthanol afin de précipiter les ARNs durant une nuit à -20°C . Après une centrifugation (10,000 g, 30 minutes), le culot d'ARN est resuspendu dans du TE stérile. Une première étape de purification consiste en une extraction avec un volume de phénol-chloroforme (1:1), suivie d'une centrifugation (10,000 g, 15 minutes). Une nouvelle extraction avec un volume de chloroforme-alcool isoamylique (24:1) est alors réalisée, toujours suivie d'une centrifugation (10,000 g, 15 minutes) pour bien séparer les deux phases. L'ARN contenu dans la phase aqueuse est ensuite précipité par 0.3 M d'acétate de sodium (pH 5.5) et deux volumes d'éthanol 100 %. Après au moins 6 heures à -20°C et centrifugation (10,000 g, 20 minutes), les ARNs sont redissout dans de l'eau stérile.

(2) La solution aqueuse d'acides nucléiques est précipitée par un volume d'isopropanol, 4 heures à température ambiante. Une centrifugation (10,000 g, 30 minutes) permet de récupérer l'ensemble des acides nucléiques qui sont alors solubilisés dans du TE. Une étape de purification de l'ADN peut être réalisée par un gradient isopycnique de chlorure de césium, qui permet d'éliminer les ARNs et les protéines. Ainsi, la solution d'ADN est amenée à 4.5 M de ClCs et 600 $\mu\text{g/ml}$ de bromure d'éthidium puis coulée délicatement dans un tube à sceller. La centrifugation à 50,000 g est réalisée pendant 48 heures. La couche contenant l'ADN est prélevée à l'aide d'une seringue, sous UV. Le bromure d'éthidium est éliminé par des lavages successifs au butanol saturé en eau, puis l'ADN est précipité par 2 volumes d'éthanol absolu et une centrifugation (10,000 g, 30 minutes). L'ADN est ensuite redissout dans de l'eau stérile.

La quantité et la qualité de l'ARN et de l'ADN obtenus sont évaluées par électrophorèse sur gel d'agarose et par dosage spectrométrique à 260 et 280 nm.

2. Migration et transfert d'ARN (Northern blot) et d'ADN (Southern blot)

La migration de l'ARN (5 à 20 µg par puits) est réalisée sur un gel d'agarose 1.5 % dénaturant, en présence de formaldéhyde et de formamide, dans du tampon MEN 1X. Elle dure 4 à 5 heures à 100 volts. Après une étape de neutralisation, le transfert sur membrane de nylon Hybond N+ (Amersham) se déroule durant la nuit, en présence de 20 X SSC, par capillarité (selon le protocole de Maniatis et coll., 1989).

L'ADN (2 à 5 µg) est tout d'abord digéré par des enzymes de restriction puis séparé sur gel d'agarose 0.8 % dans du tampon TAE. Après dénaturation et neutralisation de l'ADN dans le gel, le transfert est réalisé, de la même façon que pour l'ARN, en présence de 10 X SSC sur la nuit (selon le protocole de Maniatis et coll., 1989).

Après transfert, la membrane est soit chauffée 2 heures à 80°C soit exposée aux UV pour fixer les acides nucléiques. Elle est ensuite conservée à température ambiante, à l'obscurité jusqu'à hybridation.

3. Obtention de la sonde

La sonde ADN, obtenue par digestion par des enzymes de restriction ou par PCR, est purifiée après migration sur gel d'agarose à l'aide de kits (Wizzard, Proméga ; Ultrafree-DA-DNA, MILLIPORE). Différentes techniques de marquage et de détection ont été utilisées lors de cette étude.

- **Marquage fluorescent ou radioactif (par "Random Priming")** : Le marquage de la sonde est effectué par la méthode du Random Priming, en utilisant le kit Vistra Fluorescence (Amersham) pour le marquage à froid ou le kit Megaprime DNA labelling (Amersham) pour le marquage radioactif.

A la sonde dénaturée (à 100°C) sont ajoutés des amorces (mélanges d'hexanucléotides) et un mélange de nucléotides. Pour le marquage fluorescent, le dUTP est couplé à un fluorochrome (la fluorescéine), alors qu'en marquage radioactif, on utilise du $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP. L'enzyme Klenow

permet la synthèse du brin complémentaire marqué, à 37°C. L'efficacité du marquage est évaluée par un *dot blot*.

- **Marquage de la sonde en AlkPhos direct** : La sonde dénaturée est marquée à la phosphatase alcaline en utilisant le kit Alkphos Direct labelling & detection kit (Amersham Pharmacia Biotech).

2. Hybridation

- **Southern blot** : La membrane est préhybridée à 60°C, 2 heures, sous agitation douce dans la solution d'hybridation contenant du SSC, du SDS, un agent bloquant et du sulfate de Dextran. L'hybridation, après ajout de la sonde marquée dénaturée, se fait sur la nuit à 60°C (selon le protocole de Maniatis et coll., 1989). La membrane est ensuite lavée, à 60°C, dans une solution 1 X SSC, 0.1 % SDS (15 minutes) puis dans une solution 0.5 X SSC, 0.1 % SDS (15 minutes).

La détection par marquage fluorescent est ensuite principalement utilisée pour le *Southern blot*.

- **Northern blot** : La membrane est préhybridée à 42°C, 10 minutes à 2 heures, sous agitation douce dans la solution d'hybridation contenant 50 % formamide désionisé, 7 % SDS, 250 mM NaCl et 120 mM NaPO₄ pH 7.2. L'hybridation, à 42°C, après ajout de la sonde dénaturée, dure au moins 12 heures. Avant détection (en général en marquage radioactif), la membrane est lavée dans une solution 2 X SSC, 0.1 % SDS (deux fois 10 minutes à 42°C) puis dans une solution 1 X SSC, 0.1 % SDS (10 minutes à 42°C).

3. Détection

- **de la fluorescence (marquage ECF)** : La révélation repose sur la reconnaissance de la sonde fixée par un anticorps antifluorescéine couplé à la phosphatase alcaline. Celle-ci catalyse l'hydrolyse d'un réactif aromatique : le 1,2 dioxethane phosphate (ou AttoPhos) qui émet de la lumière après coupure du phosphate. La détection (excitation à 570 nm) est réalisée à l'aide d'un lecteur de chimiofluorescence de type STORM 840 (Molecular dynamics).

- **de la fluorescence (marquage AlkPhos direct)** : Le principe est le même que pour l'ECF. L'intérêt de cette méthode est sa rapidité. En effet, la sonde est directement marquée à la phosphatase alcaline.

- **de la radioactivité** : Après hybridation avec la sonde marquée, la membrane est exposée dans un sac scellé contre un écran Phosphor Screen (Kodak), qui est ensuite analysé avec le STORM.

RESULTATS

CHAPITRE 1 : IDENTIFICATION ET CARACTERISATION DES ACTIVITES vHPOs
CHEZ L. DIGITATA

Les résultats présentés dans ce chapitre sont décrits dans l'**article 1**.

I- Identification des activités vHPOs chez *L. digitata*

Nous avons optimisé l'extraction par partition de phase, proposée par Vilter (Vilter, 1994), afin d'extraire les différentes haloperoxydases présentes dans les sporophytes de l'algue brune *L. digitata*.

Seul l'ajout d'orthovanadate dans l'extrait protéique permet de détecter des activités haloperoxydases, ce qui indique que toutes les HPOs que nous avons extraites, chez *L. digitata*, sont dépendantes du vanadate. La migration de cet extrait protéique sur un gel natif d'acrylamide et la détection, sur gel, des activités haloperoxydases en présence d'halogénure met en évidence l'existence de plusieurs activités haloperoxydases chez les sporophytes de *L. digitata* (**Figure 31**). Alors qu'aucune activité chloroperoxydase n'est détectée, six bandes majeures présentant des activités bromoperoxydases (vBPOa à vBPOf) apparaissent en présence d'iodure ou de bromure. Une seule bande n'apparaît qu'en présence d'iodure ; cette activité haloperoxydase spécifique pour l'oxydation de l'iodure correspond à une iodoperoxydase (vIPO).

Ces activités haloperoxydases ont ensuite été fractionnées à l'aide d'une colonne d'interactions hydrophobes. D'une part, une électrophorèse semi-préparative a permis, ensuite, de purifier à l'homogénéité électrophorétique l'activité iodoperoxydase (**Figure 32-A**). D'autre part, chaque bande présentant une activité bromoperoxydase a été excisée du gel d'acrylamide après migration en conditions natives et électro-éluée séparément. Après migration sur un second gel, toutes les bandes préalablement électro-éluées présentent le même profil d'activité (**Figure 32-B**). En conditions dénaturantes (SDS-PAGE), l'activité vIPO correspond à une bande à ~80 kDa (**Figure 33**). Par contre, les activités vBPOs sont

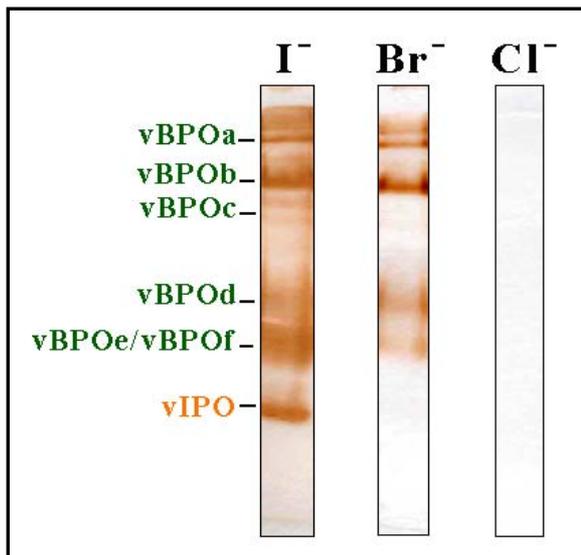


Figure 31 : Profils des activités vHPOs d'un extrait protéique de sporophyte de *L. digitata* après migration en conditions natives. Les trois gels correspondent à trois test d'activités différents selon la nature de l'halogénure ; c'est-à-dire en présence d'iodure (I^-), en présence de bromure (Br^-) ou en présence de chlorure (Cl^-). Les bandes vBPOa-vBPOf correspondent aux activités bromoperoxydases, tandis que l'activité iodoperoxydase est notée vIPO.

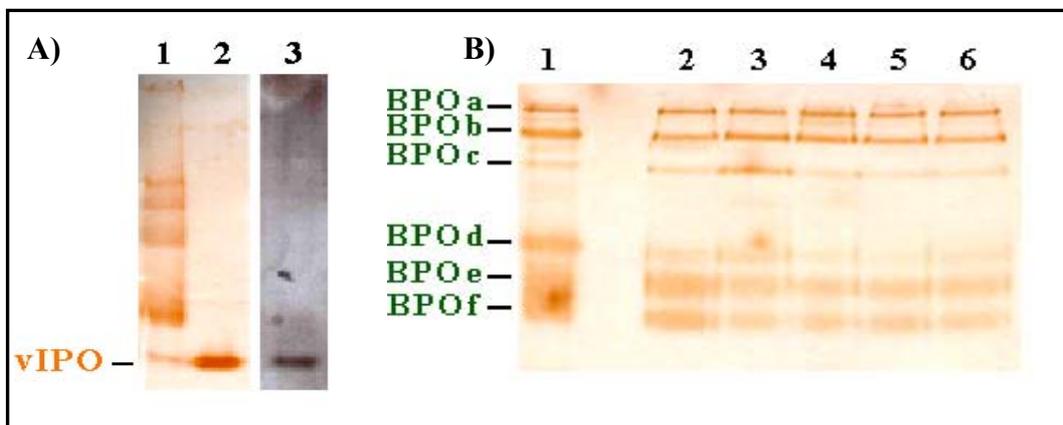


Figure 32 : Activité iodoperoxydase des vHPOs purifiées du sporophyte de *L. digitata* en conditions natives. A) 1) Activité iodoperoxydase d'un extrait protéique après extraction par partition de phase. 2 et 3) Respectivement, activité iodoperoxydase et coloration au nitrate d'argent de la vIPO purifiée par électrophorèse préparative. B) 1) Activité iodoperoxydase d'un extrait protéique après purification partielle sur colonne d'adsorption. Les six bandes d'activités bromoperoxydases purifiées par électro-élution sont annotées à gauche du gel (vBPOa – vBPOf). 2 et 6) Profils d'activité des vBPOs électro-élusés : vBPOa (2), vBPOb (3), vBPOc (4), vBPOd (5) et vBPOe-f (6).

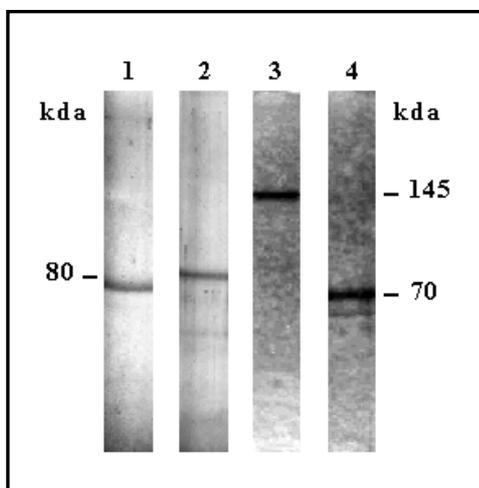


Figure 33 : Analyses en conditions dénaturantes (SDS-PAGE) de vIPO (1 et 2) et de vBPO (3 et 4) purifiées du sporophyte de *L. digitata*. Les enzymes sont dénaturées en absence (1 et 3) ou en présence (2 et 4) de β -mercaptoéthanol. Les gels sont colorés au nitrate d'argent.

	<i>Activité spécifique (unités/mg)</i>	
	<i>Bromoperoxydase</i>	<i>Iodoperoxydase</i>
Extrait protéique du gaméophyte	0.7	0.0
Extrait protéique du sporophyte	2.6	10.4
vBPO purifiée du sporophyte	42.0	62.0
vIPO purifiée du sporophyte	0.0	310.0

Tableau 2 : Activité bromoperoxydase et iodoperoxydase chez *L. digitata*. Les activités spécifiques sont exprimées en unités par milligramme de protéine. Une unité bromoperoxydase correspond à la quantité nécessaire pour brominer une micromole de monochlorodimédone par minute. Une unité iodoperoxydase correspond à la quantité nécessaire pour consommer une micromole de peroxyde d'hydrogène par minute.

portées par des enzymes dimériques, constituées de deux sous unités de ~70 kDa chacune (**Figure 33**).

Ces résultats et des analyses complémentaires sur le poids moléculaire de ces vHPOs natives, montrent que l'activité vIPO correspond à une enzyme dimérique de ~140 kDa constituée de deux sous-unités de masses très proches et liées par des interactions non covalentes. Le cas des activités vBPOs est plus complexe. En effet, l'unité de base de ces vBPOs est un dimère de ~145 kDa constitué de deux sous-unités, de masses très proches liées de façon covalente, et formant des multimères protéiques pouvant atteindre jusqu'à 600 kDa (correspondant à l'activité vBPOa observée sur gel natif). Des analyses par spectrométrie de masse en LC-MS/MS montrent que les activités vBPOb-d sont effectivement constituées de la même protéine de base ou de protéines de séquences très proches.

Les activités bromoperoxydases, purifiées à l'homogénéité électrophorétique, correspondent donc à un dimère qui s'agglomère spontanément en solution pour former à l'équilibre un mélange de multimères (de un à six unités dimériques). Nous avons réalisé des études préliminaires de spectrométrie de masse, en mode MS, sur la vIPO et la vBPO, dans des conditions permettant de conserver les liaisons faibles, c'est-à-dire non covalentes, des complexes, d'une part, et dans des conditions permettant d'observer les complexes liés de façon covalente, d'autre part. Cependant, bien que nous n'ayons obtenu aucun résultat satisfaisant pour l'instant (problème de contamination par le PEG), ces données permettraient de préciser la masse des enzymes en conditions natives, ainsi que de caractériser les différentes sous-unités et leur coordination au sein de l'enzyme.

Nous avons comparé les activités haloperoxydases entre les deux générations du cycle de *L. digitata*. Ainsi, il a été mis en évidence que contrairement aux sporophytes, les gamétophytes ne possèdent pas d'activité iodoperoxydase détectable mais seulement une faible activité bromoperoxydase (**Tableau 2**). Sur gel, le profil de l'activité bromoperoxydase des gamétophytes est similaire à celui des sporophytes.

II- Propriétés biochimiques et immunologiques des vHPOs purifiées

La vIPO purifiée des sporophytes possède, à pH 6.2, une activité iodoperoxydase de 310 unités/mg, c'est-à-dire cinq fois plus importante que celle de la vBPO purifiée qui est donc

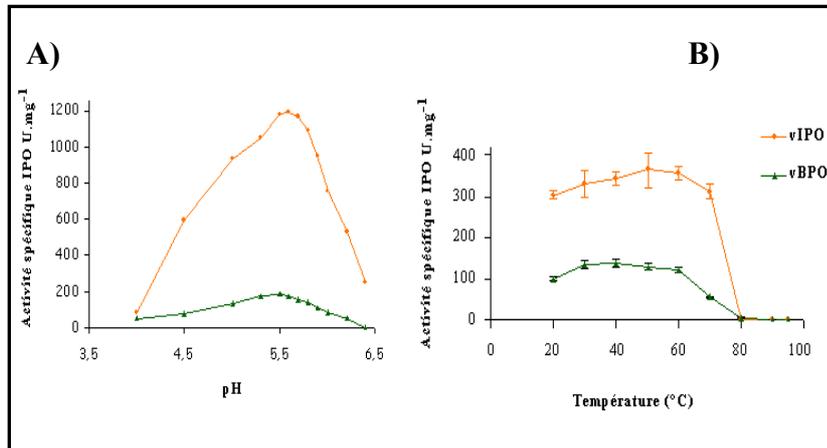


Figure 34 : Activité iodoperoxydase spécifique des vIPO et vBPO purifiées en fonction du pH (A) ou en fonction de la température (B).

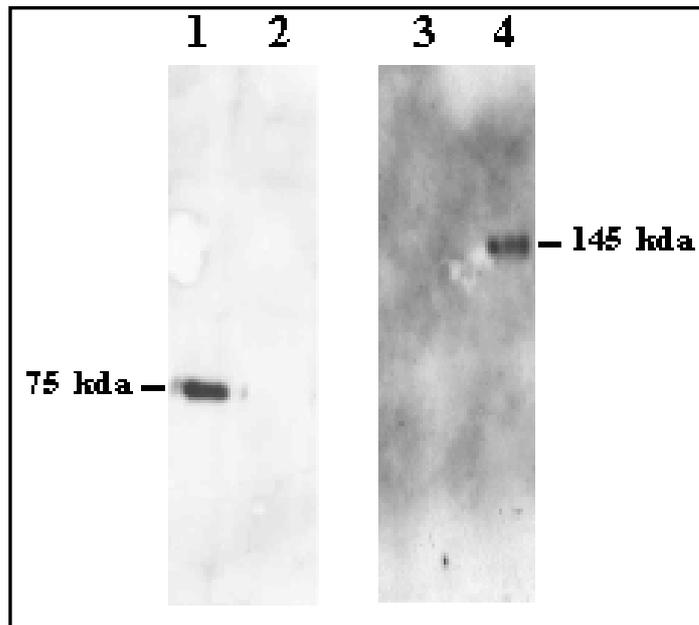


Figure 35 : Tests immunologiques (ou *Western blot*) de vIPO (1 et 3) et de vBPO (2 et 4) purifiées du sporophyte de *L. digitata*. Les échantillons sont traités au SDS et chauffés 5 minutes à 100°C. Les membranes sont hybridées par l'anticorps anti-BPO d'*A. nodosum* (1 et 2) ou par l'anticorps anti-BPO de *L. digitata* (3 et 4).

moins efficace pour l'oxydation de l'iodure (**Tableau 2**). A leur pH optimal (5.5) (**Figure 34 A**), ces deux enzymes présentent des activités plus élevées : 1,200 unités/mg pour la vIPO et 180 unités/mg pour la vBPO soit une activité iodoperoxydase 6.7 fois plus élevée pour la vIPO.

Ces enzymes paraissent particulièrement thermostables (**Figure 34 B**). En effet, la vIPO ne perd son activité qu'après 10 minutes à 80°C, alors que la vBPO, présentant encore une activité résiduelle à cette température, est totalement inactivée après une incubation de 10 minutes à 90°C. Comme il a été suggéré pour d'autres vBPOs, les propriétés d'agglomération de ces protéines, et en particulier celles de vBPO, peuvent expliquer cette grande thermostabilité en terme d'activité.

Une étude immunologique, par *Western blot*, a été réalisée sur ces deux enzymes (**Figure 35**). Un peptide a été synthétisé à partir de la séquence protéique putative d'une vBPO de *L. digitata* (vBPO1 ; Cf *Résultats, Chapitre 2*) afin de produire un anticorps polyclonal contre les vBPOs de *L. digitata*. Cet anticorps ne s'hybride pas avec la vIPO purifiée et reconnaît donc spécifiquement les vBPOs purifiées. Par contre, parmi les vHPOs purifiées de *L. digitata*, seule la vIPO est reconnue par l'anticorps anti-vBPO d'*A. nodosum* (**Figure 35**).

III. Localisation des activités vHPOs, in vivo, chez *Laminaria digitata*

A partir de coupes fines du thalle du sporophyte de *L. digitata*, des activités peroxydases sont détectées, en présence d'o-dianisidine et de peroxyde d'hydrogène, près de la cuticule, au niveau du cortex externe (**Figure 36**). En absence ou en présence d'halogénures, aucune différence significative n'est observée ; ce qui pourrait suggérer que la concentration en halogénures, dans l'eau de mer ou/et dans l'algue, suffit pour observer des activités haloperoxydases. Cependant, cette coloration, en absence d'halogénure, permet de détecter toutes les activités de type peroxydase. Ainsi, pour cette détection, *in vivo*, des activités dans le thalle, nous ne pouvons pas discriminer les activités vHPOs des autres activités peroxydases.

Les activités vHPOs ont été extraites à partir de protoplastes (cellules isolées sans paroi) de sporophytes de *L. digitata* (**Figure 37**). Seule l'activité vIPO est détectée dans le milieu de digestion de la paroi (**Figure 37 A**). Bien qu'avant la mise en culture des protoplastes, les activités vBPOs et vIPO soient toutes les deux présentes dans le milieu extérieur, l'activité vIPO disparaît ensuite du milieu de culture tandis que des activités vBPOs, toujours

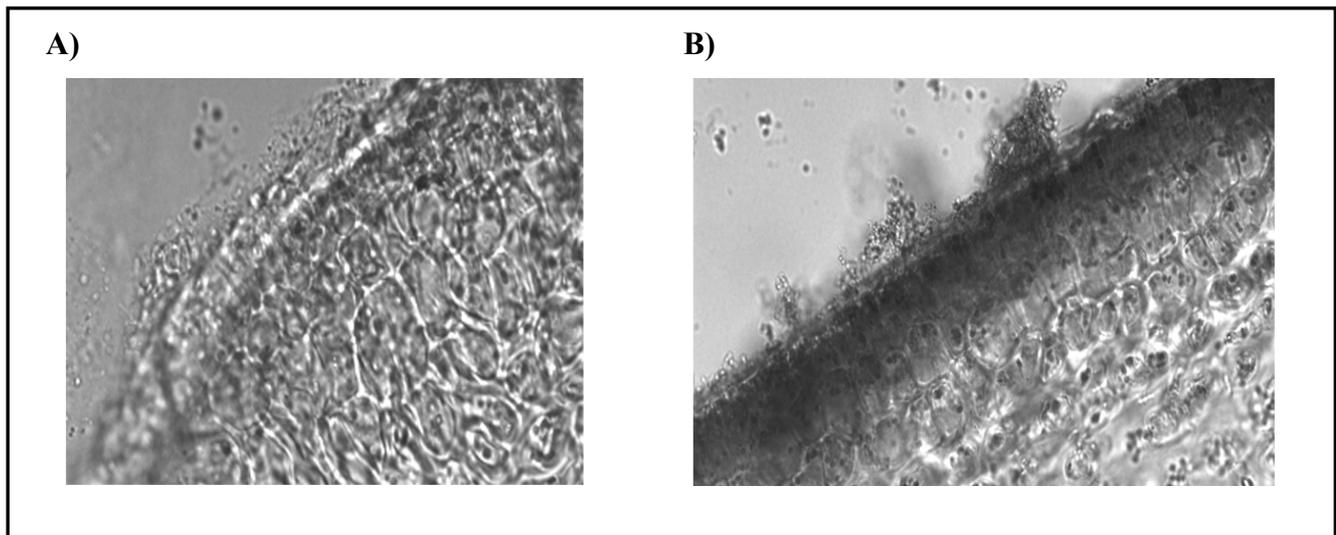


Figure 36 : Localisation des activités peroxydases sur des coupes de thalle de sporophytes de *L. digitata*. A) Témoin, sans o-dianisidine et sans peroxyde d'hydrogène. B) Détection des activités peroxydases en présence d'o-dianisidine (0,1 mM) et de peroxyde d'hydrogène (0.45 mM).

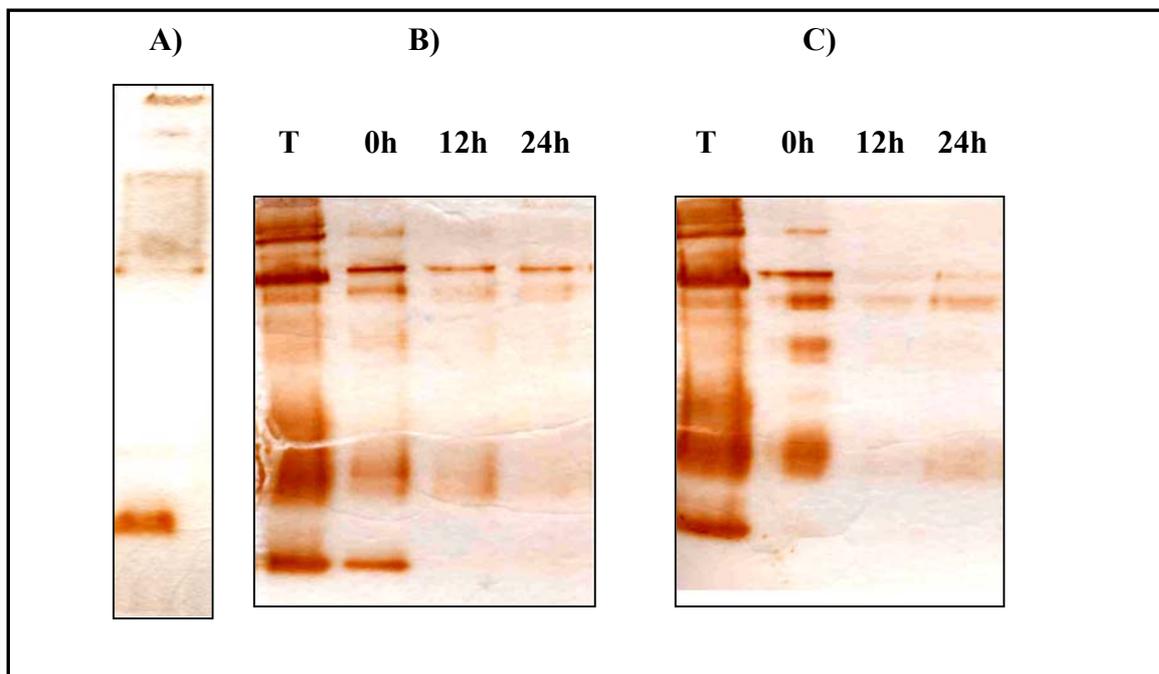


Figure 37 : Détection des activités vHPOs dans le milieu de digestion de la paroi cellulaire des sporophytes de *L. digitata* (A), dans le milieu de culture des protoplastes (B) et dans les protoplastes (C). T : témoin correspondant à un extrait protéique de sporophyte ; 0h-24h : temps après la mise en culture des protoplastes.

observées, diminuent progressivement (**Figure 37 B**). Seules des activités vBPOs, qui décroissent également au cours du temps (correspondant certainement à la mort des protoplastes), sont observées dans les protoplastes (**Figure 37 C**).

Ainsi, chez *L. digitata*, les activités vHPOs semblent présentes au niveau du cortex externe de l'algue. De plus, contrairement à l'activité vIPO qui est exclusivement pariétale, les activités vBPOs semblent surtout intracellulaires. La détection des activités vBPOs dans le milieu extérieur (**Figure 37 B**) peut soit correspondre à une réalité *in vivo* (certaines vBPOs seraient donc également excrétées et pariétales) ou soit être due à la lyse des protoplastes.

Conclusion

Les vIPO et vBPO purifiées de *L. digitata* diffèrent donc par leurs activités spécifiques, leurs poids moléculaires mais également par leurs caractéristiques immunologiques et leurs localisations sub-cellulaires. Ainsi, *L. digitata* présente des activités iodo- et bromoperoxydases distinctes qui correspondent à deux enzymes différentes. Bien que des activités vIPO aient déjà été identifiées chez les deux laminaires *L. hyperborea* et *L. ochroleuca*, nous avons réussi, pour la première fois, à purifier à l'homogénéité électrophorétique une activité haloperoxydase spécifique de l'oxydation de l'iodure. D'après les études immunologiques, il semble que cette vIPO soit relativement proche de la vBPO d'*A. nodosum*.

L'absence de cette activité vIPO chez les gamétophytes de *L. digitata* qui n'accumulent pas l'iode, contrairement aux sporophytes, la forte spécificité de cette enzyme pour cet élément ainsi que sa localisation pariétale et corticale chez les sporophytes suggèrent que nous avons identifié et purifié l'enzyme impliquée dans l'absorption de l'iode chez les sporophytes de *L. digitata*. En effet, la vIPO est plus efficace que les vBPOs pour l'oxydation de l'iode et donc pour l'absorption de l'iode, d'autant plus que dans l'eau de mer, la concentration d'iodure est très inférieure (0.25 μM) à celle du bromure (1 mM).

IV- Article 1

**« The Brown Algae Kelp *Laminaria digitata* Features Distinct
Bromoperoxidase and Iodoperoxidase Activities. »**

Journal of Biological Chemistry. 2003 ; 278(26) : 23545-52.

The Brown Algal Kelp *Laminaria digitata* Features Distinct Bromoperoxidase and Iodoperoxidase Activities*

Received for publication, January 9, 2003, and in revised form, March 17, 2003
Published, JBC Papers in Press, April 15, 2003, DOI 10.1074/jbc.M300247200

Carole Colin‡, Catherine Leblanc‡§, Elsa Wagner¶, Ludovic Delage‡, Emmanuelle Leize-Wagner¶, Alain Van Dorsseleer¶, Bernard Kloareg‡, and Philippe Potin‡

From the ‡UMR 1931, CNRS-Laboratoires Goëmar, Station Biologique, BP 74, F-29682 Roscoff Cedex, France and ¶Laboratoire de Spectrométrie de Masse Bio-Organique, UMR 7509, CNRS-Université Louis Pasteur, 25 rue Becquerel, F-67087 Strasbourg Cedex 2, France

Different haloperoxidases, one specific for the oxidation of iodide and another that can oxidize both iodide and bromide, were separated from the sporophytes of the brown alga *Laminaria digitata* and purified to electrophoretic homogeneity. The iodoperoxidase activity was approximately seven times more efficient than the bromoperoxidase fraction in the oxidation of iodide. The two enzymes were markedly different in their molecular masses, trypsin digestion profiles, and immunological characteristics. Also, in contrast to the iodoperoxidase, bromoperoxidases were present in the form of multimeric aggregates of near-identical proteins. Two full-length haloperoxidase cDNAs were isolated from *L. digitata*, using haloperoxidase partial cDNAs that had been identified previously in an Expressed Sequence Tag analysis of the life cycle of this species (1). Sequence comparisons, mass spectrometry, and immunological analyses of the purified bromoperoxidase, as well as the activity of the protein expressed in *Escherichia coli*, all indicate that these almost identical cDNAs encode bromoperoxidases. Haloperoxidases form a large multigenic family in *L. digitata*, and the potential functions of haloperoxidases in this kelp are discussed.

Brown algae from the order Laminariales (kelps) are characterized by a heteromorphic haplodiplophasic life cycle alternating between a microscopic filamentous gametophyte and a macroscopic sporophyte, which can reach several meters in length depending of the species. Kelps' sporophytes accumulate iodine to more than 30,000 times the concentration of this element in seawater, up to levels as high as 1% of dry weight (e.g. see Refs. 2 and 3). Not much is known, however, on the iodine-concentrating mechanisms and on the biological functions of iodine in these kelps and other marine plants. Only one aspect of halogen metabolism, the production of volatile halocarbons, has attracted attention, because these compounds, and in particular the iodinated forms, have a significant impact

on the chemistry of atmosphere (4, 5). In the biology of marine algae, volatile halocarbons are viewed as defense metabolites, i.e. products of the scavenging of activated oxygen species and/or potent biocides (6–10).

Halogen uptake (3) and the production of halo-organic compounds (6, 11) by marine algae are thought to involve vanadium-dependent haloperoxidases. Haloperoxidases catalyze the oxidation of halides, and they are named according to the most electronegative halide that they can oxidize; chloroperoxidases can catalyze the oxidation of chloride, as well as of bromide and iodide, bromoperoxidases (BPOs)¹ react with bromide and iodide, whereas iodoperoxidases (IPOs) are specific of iodide. The ability of vanadium-dependent haloperoxidases to halogenate a broad range of organic compounds of both commercial and pharmaceutical interest, as well as their high stability toward high temperatures, oxidative conditions, and in the presence of organic solvents, makes them good candidates for use in industrial biotransformations (12, 13). These properties have elicited detailed structural and mechanistic studies on several vanadium-dependent haloperoxidases, namely the chloroperoxidase from the fungus *Curvularia inaequalis* (14) and the bromoperoxidases from the red algae *Corallina pilulifera* (15, 16) and *Corallina officinalis* (17, 18) or from the fucal brown algae *Fucus distichus* (19) and *Ascophyllum nodosum* (20).

Various vanadium-dependent haloperoxidase isoforms have been described in Laminariales (21–28), but nothing is known on the structure of these haloperoxidases. To further understand the biochemical and biological functions of haloperoxidases in Laminariales, we now have undertaken the purification and molecular characterization of these enzymes. We show here that *Laminaria digitata* sporophytes feature distinct iodoperoxidase and bromoperoxidase activities and that the bromoperoxidases consist of near-identical proteins on the form of multimeric aggregates. From partial cDNAs displaying homologies with the *F. distichus* vBPO, which were identified in an Expressed Sequence Tag analysis of the life cycle of *L. digitata* (1), we have isolated two full-length haloperoxidase cDNAs from the sporophyte of this species. Sequence comparisons, mass spectrometry, and immunological analyses of the purified bromoperoxidase, as well as the activity of the protein expressed in *Escherichia coli*, all indicate that these almost identical cDNAs encode bromoperoxidases. In addition peptide sequencing and Western blotting show that the primary structure of iodoperoxidase markedly departs from that of bromoperoxidase.

* This work was supported in part by the European Commission "GROWTH Program," Research Project AB, Algal Bioadhesives, Grant G5RD-CT-2001-00542, by a CNRS grant (ATIP Jeunes Equipes 2002) (to P. P.), a Ph.D. grant from the Région Bretagne (to C. C.), and a Ph.D. grant from Brucker-Daltonic (to E. W.). The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

The nucleotide sequence(s) reported in this paper has been submitted to the EBI Data Bank with accession number(s) AJ491786 and AJ491787.

§ To whom correspondence should be addressed. Tel.: 33-2-98292332; Fax: 33-2-98292324; E-mail: leblanc@sb-roscoff.fr.

¹ The abbreviations used are: BPO, bromoperoxidase; vBPO, vanadium-dependent bromoperoxidase; IPO, iodoperoxidase; MS, mass spectrometry; MS/MS, tandem MS; LC, liquid chromatography; EST, expressed sequence tag; UTR, untranslated region.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Plant Material—*L. digitata* young sporophytes (blade length less than 25 cm) were collected from the shore in the vicinity of Roscoff (Brittany, France) and maintained under a 12:12 light-dark cycle in running seawater at 15 °C or immediately frozen in liquid nitrogen and kept at -80 °C. Gametophyte cultures were established and maintained as described previously (29).

Purification of Vanadium-dependent Haloperoxidases—As the algae from the Laminariaceae family are extremely rich in alginates and polyphenolic compounds, an aqueous salt/polymer two-phase system developed by Vilter (30) was used for the extraction of haloperoxidases. Briefly, 120 g of *L. digitata* sporophytes were powdered in liquid nitrogen and extracted using 20% (w/v) K_2CO_3 (100 ml per aliquots of 20-g fresh weight) and 13% (w/v) polyethylene glycol (1550 Da). The two phases were separated by centrifugation at $5,000 \times g$ for 15 min, and 6% (w/v) $(NH_4)_2SO_4$ and 3 volumes of acetone were added to the top phase. After 1 h at -20 °C, the protein extract was pelleted by centrifugation at $10,000 \times g$ for 30 min, dissolved in 50 mM Tris-HCl, pH 9.0, buffer, and dialyzed overnight against the same buffer. The extract was then loaded on a phenyl-Sepharose CL4B hydrophobic interaction column, equilibrated with 30% $(NH_4)_2SO_4$, 50 mM Tris-HCl, pH 9.0. Proteins were eluted by a decreasing linear gradient down to salt-free Tris buffer. The haloperoxidase active fractions were pooled, dialyzed against 50 mM Tris-HCl, pH 9.0, and concentrated by filtration (YM-10; Millipore) on stirred ultracentrifugation cells (model 8200; Millipore). For the final purification of native enzymes, semi-preparative electrophoresis (model 491 Prep Cell; Bio-Rad) or electroelution (model 422 Electro-eluter; Bio-Rad) was used according to the manufacturer's recommendations.

Proteins of *L. digitata* gametophytes were extracted in 50 mM Tris-HCl, pH 9.0, 15 mM $MgCl_2$, 2 mM dithiothreitol buffer, containing 0.5% polyvinylpyrrolidone and 0.5% Igepal CA-630 (Sigma-Aldrich). After sonication (three times, 30 s), the pellet was discarded by centrifugation at $10,000 \times g$ for 10 min, and the protein extract was recovered from the supernatant.

Protein concentrations were determined using the Bio-Rad Coomassie protein assay (31) with bovine serum albumin as standard (Sigma-Aldrich), and the holoenzymes were re-constituted by adding 2 mM $NaVO_3$. Gel electrophoresis was carried out using 9% polyacrylamide slab gels according to Laemmli (32) and using protein molecular mass standards (Bio-Rad). SDS samples were denatured by boiling at 100 °C for 10 min.

Enzyme Activity Assays—Haloperoxidase activities were detected on non-denaturing gels, soaked with 100 mM potassium phosphate buffer, pH 7.4, in the presence of 0.1 mM *o*-dianisidine, 0.45 mM H_2O_2 , and 10 mM potassium iodide, potassium bromide, or potassium chloride for revealing iodoperoxidase, bromoperoxidase, or chloroperoxidase activities, respectively. To detect haloperoxidase activity on denaturing gels, SDS was removed by washing the gel in Tris-glycine buffer containing 0.1% Igepal CA-630 (Sigma-Aldrich).

Bromoperoxidase activity was measured spectrophotometrically by monitoring at 290 nm the conversion of monochlorodimedone (20.0/cm³/mM) into monochlorobromodimedone (0.2/cm³/mM) at pH 6.1 (33). Specific activities are expressed in units per milligram of protein, where one unit of bromoperoxidase activity is defined as the amount required for brominating 1 μ mol of monochlorodimedone per min. Iodoperoxidase activity was recorded at pH 6.2 following the conversion of iodide into triiodide (26.4/cm³/mM) at 350 nm (34). The differences between the non-enzymatic and the non-enzymatic-plus-enzyme reactions were calculated for each sample. The specific activity is expressed in units per milligram of protein, where one unit of iodoperoxidase activity is defined as the amount required for consuming 1 μ mol of H_2O_2 per min. For optimal pH determination, iodoperoxidase specific activities were measured in the same conditions at 20 °C, using the following buffers: 0.1 M sodium acetate, pH 4.0–5.5, or 0.1 M MES, pH 5.5–6.8. For thermostability studies, proteins were maintained at the appropriate temperature for 10 min before the iodoperoxidase assay.

Molecular Weight Determination of the Native Enzymes—Using non-denaturing gel electrophoresis, protein samples were run under a range of acrylamide concentrations from 4 to 14% (35). A molecular size standard curve was established using standard proteins (albumin, aldolase, catalase, ferritin, and urease from Amersham Biosciences), which were electrophoresed under the same conditions. The relative molecular mass of native proteins was also determined by fast protein liquid chromatography/gel filtration chromatography (Superdex 200 HR 10/30 column; Amersham Biosciences) with a mobile phase consisting of 100 mM NaCl in 50 mM Tris-HCl, pH 9.0. Standard proteins

(Amersham Biosciences) were used for column calibration.

Mass Spectrometry Analyses—Phenyl-sepharose haloperoxidase fractions were separated by fast protein liquid chromatography/gel filtration chromatography (Superdex 200 HR) followed by a 9% SDS-PAGE. The in-gel digestion by trypsin was performed on excised activity bands as described by Rabilloud *et al.* (36).

Nanoscale capillary liquid chromatography-tandem mass spectrometric (nano-LC-MS/MS) analyses of the digested proteins were performed using a CapLC capillary LC system (Micromass, Manchester, United Kingdom) coupled to an hybrid quadrupole orthogonal acceleration time-of-flight tandem mass spectrometer (Q-TOF II; Micromass, Manchester, United Kingdom). Chromatographic separations were conducted on a reversed-phase capillary column (Pepmap C18; 75- μ m internal diameter, 15-cm length; LC Packings) with a 200 nl/min flow. LC analyses were performed using a linear gradient from 95% A (H_2O /0.05% HCOOH) to 45% B (acetonitrile/0.05% HCOOH) in 35 min, followed by a linear gradient to 95% B in 1 min, and finally followed by an isocratic step at 95% B during 4 min. Mass data acquisitions were performed using automatic switching between the MS and MS/MS modes. Fragmentation of precursor was performed using collision with argon gas. The collision energy was selected automatically for each precursor ion depending on precursor ion mass (between 20 and 100 eV). The *m/z* scale was calibrated by using the synthetic polyalanine ions.

Micro-LC-MS/MS experiments were performed using an ion trap mass spectrometer Esquire 3000+ operating with an electrospray source in positive mode (Bruker-Daltonik GmbH, Bremen, Germany) coupled to an Agilent 1100 Series capillary LC system (Agilent Technologies, Palo Alto, CA) as described (37). The samples were loaded onto a 0.3×35 -mm ZORBAX SB-C18 enrichment column at a flow rate of 50 μ l/min with H_2O /0.1% HCOOH for 5 min. The trapped tryptic peptides were back-flushed onto the analytical column (0.3×150 -mm; ZORBAX 300 SB-C18) at a flow rate of 4 μ l/min using a linear gradient from 95% A (H_2O /0.1% HCOOH) to 60% B (acetonitrile/0.1% HCOOH) in 60 min followed by a linear gradient to 80% B in 5 min and finally followed by an isocratic step at 80% B for 5 min. For MS experiments (in auto-MS/MS mode) the two most important ions of each MS spectrum were fragmented by applying a resonance frequency on the end-cap electrodes (peak-to-peak amplitude from 0.3 to 2.0 V) matching the frequency of the selected ions. Fragmentation of the precursor ions occurred in the ion trap because of collisions with Helium buffer gas (pressure 5.10^{-3} millibar). Calibration of the ion trap analyzer was performed by using multiply charged ions mixture made with the following peptides: Arg-Leu-enkephalin, angiotensin, Substance P, bombesin, and ACTH.

Mass data collected during the nano- and micro-LC-MS/MS analyses were processed and converted into peak list and MGF (Mascot Generic File) files, respectively, and then submitted to the search software MASCOT (Matrix Science, London, United Kingdom), with a tolerance on mass measurement of 0.5 Da. The peptide sequences were obtained by mass spectrometry *de novo* sequencing. Data from the nano-LC-MS/MS analysis (Q-TOF II) were deconvoluted with the algorithm Maxent3 (Micromass, Manchester, United Kingdom).

cDNA Isolation, Cloning, and Sequencing—The longest of the vBPO EST, LamdiSest169est (NCBI accession number AW400475), identified previously in *L. digitata* sporophytes (1), was subcloned in SacI pBlue-script SK vector (Stratagene, La Jolla, CA). Plasmid DNA was sequenced on both strands using the Vistra Thermosequase core sequencing kit on a Vistra automated DNA sequencer (Amersham Biosciences). The *L. digitata* sporophyte cDNA λ ZAP II library (1) was used as a template in polymerase chain reaction to amplify the 5' end of the BPO cDNA using pBluescript universal primer (forward) and a 5' end-specific primer from the LamdiSest169est (reverse; 5'-CTGCAG-GTTCTCTGCGGCGA-3'). The 1000-bp PCR fragment obtained was cloned in the pCR 2.1-TOPO vector (Invitrogen) and labeled with [α -³²P]dCTP using the Megaprime labeling kit (Amersham Biosciences) to screen the *L. digitata* sporophyte cDNA library. Positive cDNA clones were subcloned by PCR using insert-specific oligonucleotides in the pCR 2.1-TOPO vector (Invitrogen) and were sequenced on both strands.

Sequence and Structural Analyses—Primary sequence analysis and translation were carried out using the DNAMAN program version 4.15. Prediction of protein sorting signal and of signal peptide cleavage site were performed using the TargetP, SignalP, and PSORT programs, respectively; *in silico* tryptic digestion of protein sequences was performed using the PeptideCutter program (programs available on the www.expasy.org server and the www.cbs.dtu.dk/services site). The vBPO protein sequences were aligned using DNAMAN and displayed using GENEDOC (free access on www.psc.edu/biomed/genedoc). The

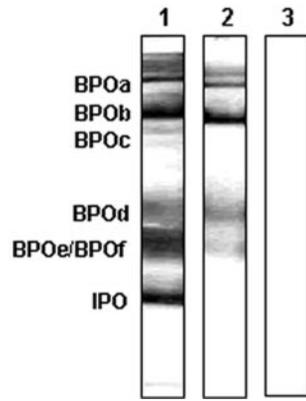


FIG. 1. In-gel haloperoxidase assay of protein extracts from *L. digitata* sporophytes under non-denaturing conditions. Polyacrylamide gels were loaded with haloperoxidase fractions (1.6 μg of proteins) and stained for iodoperoxidase activity (lane 1), bromoperoxidase activity (lane 2), and chloroperoxidase activity (lane 3). Bromoperoxidase activity bands are referred to as BPOa–f, and the iodoperoxidase band is indicated as IPO.

protein structure from *L. digitata* vBPO was predicted using the SWISS-MODEL program based on the three-dimensional structure of *A. nodosum* vBPO (NCBI accession number 1Q19A). The three-dimensional representations were visualized by the Swiss-PdbViewer software (free access on www.expasy.org server).

Southern Analyses—Genomic DNA was isolated from frozen *L. digitata* sporophytes as described by Apt *et al.* (38). Digested DNA (5 $\mu\text{g}/\text{lane}$) was electrophoresed on a 0.8% agarose gel and blotted onto nylon filters. The vBPO intragenic probe was prepared from an 800-bp *EcoRI-SacI* fragment of LamdiSest169est (corresponding to Leu-182–Leu-412 in vBPO1; see Fig. 5). Southern blot hybridization, probe labeling, and detection were performed using the Gene Images random prime labeling module kit according to the manufacturer's recommendations (Amersham Biosciences).

Immunoblotting—Denatured proteins were resolved on a 9% SDS-PAGE and transferred onto a nitrocellulose membrane (Bio-Rad). Immunoblotting and ECL detection were performed using the ECL Western blotting System (Amersham Biosciences). The polyclonal antibodies against the vBPO isoenzyme-I from *A. nodosum* were kindly supplied by H. Vilter (34) and used at a 1:2,500 dilution. A polyclonal antipeptide to vBPO of *L. digitata* was raised in rabbits against a synthetic peptide (see Fig. 5) by Eurogentec and used at 1:1,700 dilution.

Expression of *L. digitata* vBPO in *E. coli*—An 1836-bp fragment from the putative mature protein v-BPO1 was amplified using the primers 5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTTCTACGAGGAGC-CTCCCTCCCGAGCC-3' (forward) and 5'-GGGGACCACTTTGTACAA-GAAAGCTGGGTCTAGAGCTCGGTGTGTCCTGGAG-3' (reverse; *AttP1* and *AttP2* recombination sites of the Gateway system are underlined; Invitrogen). The PCR product was inserted into the pDEST17 expression vector and amplified in DH5 α *E. coli* strain for DNA replication and sequence verifications and in *E. coli* BL21-SI (Novagen, Darmstadt, Germany) for expression studies. A 2-ml overnight preculture of the transformed bacteria was used to inoculate a 250-ml culture of LBON medium (LB medium without salts) containing 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of ampicillin. Recombinant bacteria were grown at 37 $^{\circ}\text{C}$ until 0.5 A_{600} and then with 150 mM NaCl for 16 h at 30 $^{\circ}\text{C}$ in the presence or in the absence of 3% ethanol (39). Cytoplasmic and membrane proteins, hereafter referred to as the cytoplasmic fraction, were extracted from the bacterial pellet by solubilization in B-PER detergent (Pierce), and the extract was supplemented with 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (anti-protease protection) and 2 mM NaVO_3 . Aggregated proteins from inclusion bodies were solubilized by 6 M urea in 50 mM Tris, pH 8.0.

RESULTS

Purification of Haloperoxidases from *L. digitata* Sporophytes—Haloperoxidases from *L. digitata* were extracted using an aqueous salt/polymer two-phase system (30) and analyzed by non-denaturing electrophoresis followed by an in-gel activity assay (Fig. 1). Haloperoxidase activities were apparent only after adding orthovanadate to the protein extract, indicating that these enzymes are vanadium-dependent. Whereas no chloroperoxidase activity was detected, at least six major bands

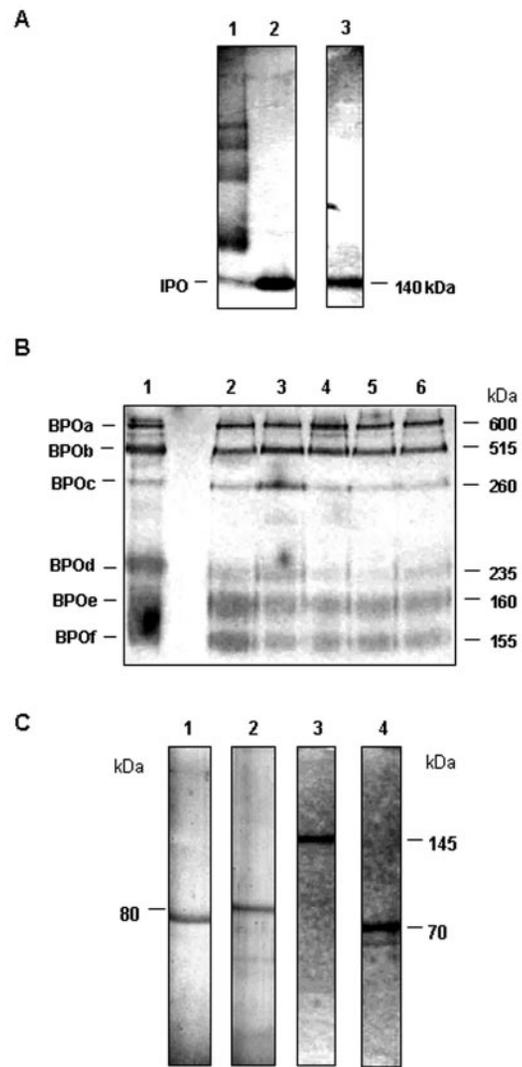


FIG. 2. Purification of iodoperoxidase and bromoperoxidase from *L. digitata* followed by activity staining. A, polyacrylamide gel electrophoresis of the iodoperoxidase fraction under non-denaturing conditions. Lane 1, aqueous salt/polymer two-phase system extract (130 ng) stained for iodoperoxidase activity. Lanes 2 and 3, IPO fraction purified by semi-preparative electrophoresis (130 ng), stained for iodoperoxidase activity and with silver nitrate, respectively. B, polyacrylamide gel electrophoresis under non-denaturing conditions of the bromoperoxidase fractions. Lane 1, phenyl-Sepharose partially purified extract, from which five distinct bromoperoxidase activity bands, annotated in the left of the gel, were extracted by electroelution from another gel run under identical conditions. Lanes 2–6, PAGE patterns of the proteins electroeluted from the BPOa, BPOb, BPOc, BPOd, and BPOe–f bands, respectively. The gel was loaded with 200 ng of proteins and stained for bromoperoxidase activity. The relative molecular masses of native enzymes indicated on the right were established as described under “Experimental Procedures.” C, SDS-PAGE analyses of the purified IPO (lanes 1 and 2) and BPO (lanes 3 and 4) from *L. digitata*. Proteins were denatured in the absence (lanes 1 and 3) or in the presence of β -mercaptoethanol (lanes 2 and 4). Each lane was loaded with 30 ng of IPO and 100 ng of BPO and stained with silver nitrate. The relative molecular masses indicated on the right were established using a standard protein kit.

(referred to as BPOa–f) with bromoperoxidase activity were revealed in the presence of either bromide or iodide. A single enzyme activity specific for the oxidation of iodide (referred to as IPO) was apparent (Fig. 1).

Haloperoxidases were further fractionated by hydrophobic interactions on a phenyl-Sepharose CL4B column. The IPO activity was then purified to homogeneity by semi-preparative electrophoresis (Fig. 2A). The bands with BPO activity were excised from the non-denaturing electrophoresis gel and elec-

TABLE I

Bromoperoxidase and iodoperoxidase activities from L. digitata

IPO and BPO were purified on a phenyl-Sepharose column followed by semi-preparative electrophoresis for IPO and by electroelution for BPO. Specific activities are expressed in units per milligram of protein. One unit of bromoperoxidase activity is defined as the amount required for brominating 1 μmol of monochlorodimedone per min (33). One unit of iodoperoxidase activity is defined as the amount required for consuming 1 μmol of H_2O_2 per min (34).

Sample	Specific activity	
	Bromoperoxidase	Iodoperoxidase
	units/mg	
Gametophyte crude extract	0.7	0.
Sporophyte extract	2.6	10.4
Pure sporophyte BPO	42.	62.
Pure sporophyte IPO	0.	310.

troeluted separately. When re-analyzed by native gel electrophoresis, however, every band again showed a same, complex pattern (Fig. 2B). Under denaturing conditions (SDS-PAGE), IPO ran as a single protein with an apparent molecular mass of 75 kDa and as a protein of ~ 80 kDa in the presence of β -mercaptoethanol (Fig. 2C, lanes 1 and 2). Upon SDS-PAGE analysis, all of the BPOs were also resolved as one single band, each with relative molecular mass of 145 kDa. In the presence of β -mercaptoethanol they again appeared as a single band, yet with a molecular mass of ~ 70 kDa (Fig. 2C, lanes 3 and 4).

Biochemical Properties of Haloperoxidases from *L. digitata*—The specific activities of *L. digitata* haloperoxidases are summarized in Table I. In contrast to the sporophytes, a weak bromoperoxidase activity and no iodoperoxidase activity was detected in the crude protein extracts from the gametophytes of *L. digitata*. The IPO purified from the sporophytes displayed a specific activity of 310 units/mg toward iodide at pH 6.2. The purified BPO fraction had a lower efficiency toward iodide, in the iodoperoxidase assay. The purified haloperoxidases displayed the same pH optimum, at around 5.5 (Fig. 3). At this pH, iodoperoxidase-specific activities were 1200 units/mg for IPO and 180 units/mg for BPOs. Upon heating for 10 min, the purified IPO and BPOs remained fully active up to 60 $^{\circ}\text{C}$ (Fig. 3), with the high molecular mass BPOs retaining the highest activity up to 80 $^{\circ}\text{C}$ (data not shown).

Mass Spectrometry Analyses of Excised BPOs and IPO—Mass spectrometry analyses were carried out for three of the bromoperoxidase bands, BPOb-d, and for the iodoperoxidase. As the N-terminal sequences of these proteins were blocked, they were digested by trypsin and analyzed by nano- or micro-LC-MS/MS. Very similar MS data were obtained for the three BPOs, and among those data, an identical set of eleven peptides was identified in BPOb-d tryptic digests (Table II). As illustrated in Fig. 4, four peptides were fully sequenced, resulting in identical sequences for all of the three BPO bands. None of the eleven peptide masses observed in BPO tryptic digests was found in the IPO tryptic digest, which markedly differed from the BPOs by its mass spectra (Table II) and by the partial sequences obtained by *de novo* sequencing (AVNVA, SAPG(I/L)NG, (I/L)VAADTVNTEAYR).

Molecular and Immunological Characterization of *L. digitata* Bromoperoxidases—In an EST analysis of the life cycle stages of *L. digitata*, one contig from 12 EST reconstructed a partial cDNA showing high homology with the vBPO of *F. distichus* (1). The cDNA library from *L. digitata* sporophytes was thus screened for full-length vBPO cDNAs using a PCR-amplified probe designed from the 5' end of the partial cDNA, yielding several positive clones, which were mapped by restriction analyses. The two longest inserts, referred to as vBPO1 (3379 bp) and vBPO2 (3420 bp), were fully sequenced. They

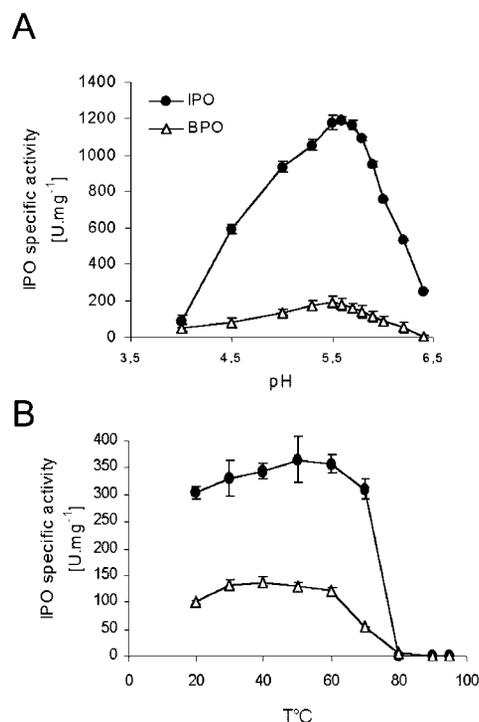


FIG. 3. Iodoperoxidase specific activity of the purified IPO and BPO as a function of pH at 20 $^{\circ}\text{C}$ (A) and as a function of temperature at pH 6.2 (B). Error bars indicate standard deviations ($n = 3$).

encoded two distinct full-length cDNA, with short 5'UTRs (104 and 36 bp, respectively) and with large 3'UTRs (1337 and 1338 bp, respectively).

The two cDNAs had 99.2 and 99.5% identity at the nucleotide and protein levels, respectively. They mainly differed in their 5' ends, vBPO1 presenting a putative 20-amino acid signal peptide with the cleavage site after Gly-20 whereas vBPO2 harbored a longer one (56 amino acids), with the cleavage site located at Gly-56. The putative mature proteins had molecular masses of 68,953 Da (vBPO1) and 68,957 Da (vBPO2), differing by only three amino acids, Ile-75/Val-111, Gly-205/Ser-241, Val-365/Ser-401 (Fig. 5). The vBPO protein sequences from *L. digitata* presented 38 and 40% identity with those from *F. distichus* and *A. nodosum*, respectively (Fig. 5). In particular, *L. digitata* vBPOs differed from the other brown algal bromoperoxidases by longer C-terminal ends, including 17-amino acid-long insertions, between Gly-494 and Gly-511 (numbering of vBPO1). They featured, however, the two catalytic histidine residues, as well as all of the residues known to be involved in the fixation of vanadium (20).

The eleven peptides characterized by LC-MS on the purified bromoperoxidases corresponded with a good accuracy to those identified by *in silico* tryptic digestion of vBPO protein sequences (Table II), and they homogeneously covered 22% of the vBPO mature proteins (Fig. 5). Three of the four peptides fully sequenced by LC-MS/MS were present in both vBPO sequences. The fourth peptide (Fig. 4) was only present in vBPO1. In this sequence vBPO2 departed from vBPO1 by replacement of glycine by serine (Fig. 5). In a Southern blot analysis with the vBPO intragenic probe a large number of hybridization bands was detected in *L. digitata* (Fig. 6). A synthetic peptide (see box in Fig. 5) was used to produce a polyclonal antibody against *L. digitata* vBPOs. This antibody cross-reacted with the purified BPOs but not with the purified IPO. This latter enzyme, however, was specifically recognized by antibodies against the vBPO from *A. nodosum* (Fig. 7).

TABLE II

LC-MS-MS analyses of purified IPO and BPO tryptic digests and comparison with the theoretical tryptic digest of vBPO1 from *L. digitata*

The native electrophoresed bands corresponding to IPO and BPO-d were excised and submitted to in-gel digestion by trypsin. The first two columns refer to the main precursor ions observed by LC-MS for IPO (1st column) and for the BPO bands (2nd column). The observed monoisotopic masses of BPO peptides (2nd column) were compared with the calculated vBPO1 tryptic digest masses (3rd column), and accuracies are reported in the 5th column. The peptides, partially or fully sequenced by LC-MS/MS, are shown in bold.

IPO, MH ⁺ (obs.)	BPO-d, MH ⁺ (obs.)	vBPO1		
		MH ⁺ (calc.)	Tryptic peptide residues	ΔM
<i>Da</i>	<i>Da</i>	<i>Da</i>		<i>ppm</i>
1197.78	1856.96	1856.84	110-124	65
1423.78	3326.80	3326.65	137-168	45
983.58	1371.86	1371.76	198-210	73
1453.82	1350.60	1350.62	287-297	15
875.54	1142.80	1142.55	312-320	219
1646.88	1338.82	1338.76	396-407	45
1524.84	1083.80	1083.55	463-472	231
946.58	1563.80	1563.71	473-486	57
1151.62	1464.80	1464.76	508-520	27
	942.64	942.57	521-529	74
	1350.80	1350.74	555-566	44

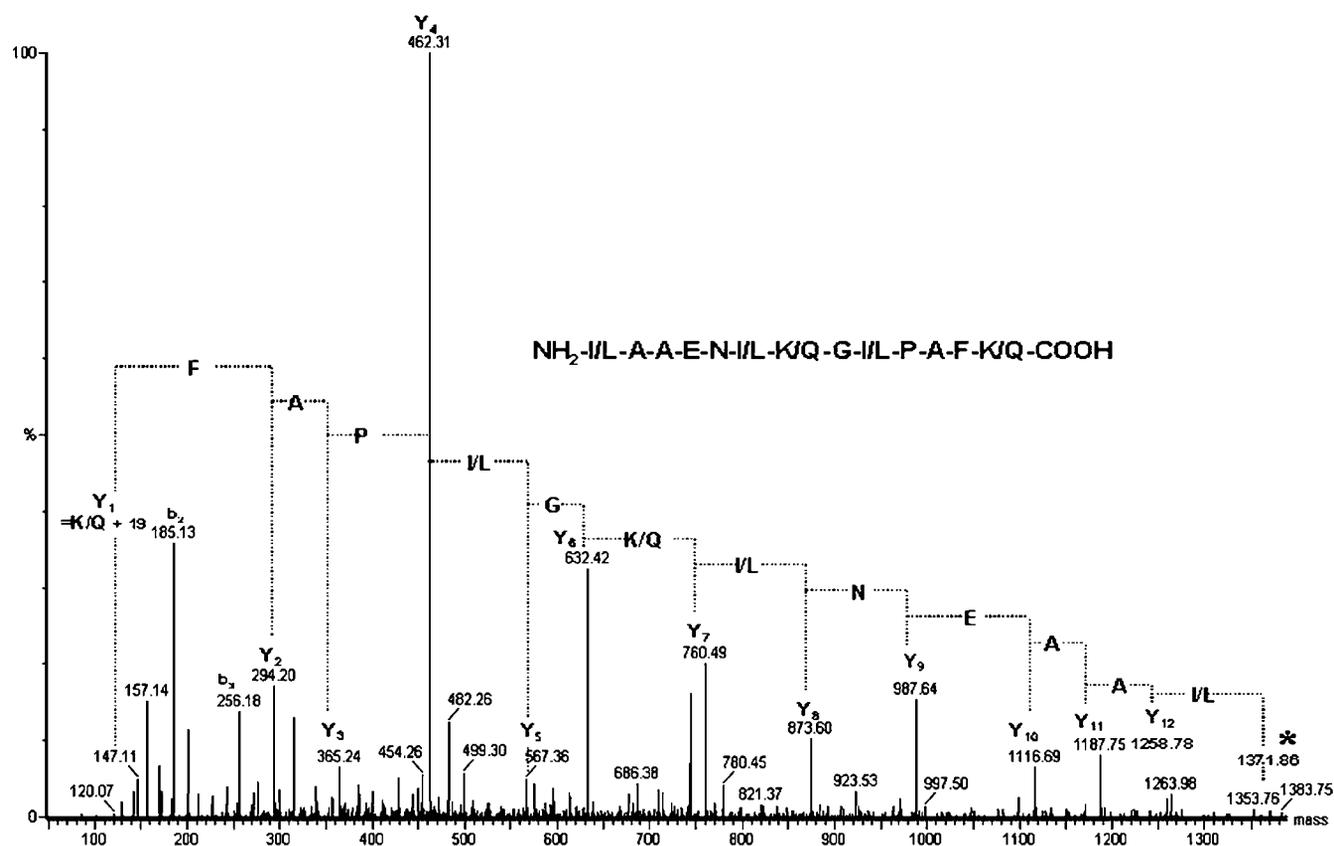


FIG. 4. MS/MS spectrum and deduced amino acids of the 1371.86-Da tryptic peptide from purified BPO. Mass data are the average of seven MS/MS analyses. An asterisk (*) on the right of the spectrum indicates the precursor ion.

Three-dimensional Structure of *L. digitata* Bromoperoxidases—The three-dimensional structure of *L. digitata* vBPO1 (Fig. 8) was modeled from the homo-dimeric structure of *A. nodosum* vBPO (20). The two tertiary structures were highly conserved in their overall folding. The six cysteine residues known to be involved in intramolecular disulphide bridges within the *A. nodosum* monomer (20) were present at similar positions in *L. digitata* bromoperoxidases. The two cysteine residues involved in the dimer interface of the *A. nodosum* enzyme are also conserved in *L. digitata* vBPOs (Cys-3 and Cys-41; numbering of *A. nodosum* vBPO). The 17-amino acid-long insertion in the C-terminal part of *L. digitata* bromoperoxidases appeared as an α -helix in the three-dimensional structure model (Fig. 8).

Expression of v-BPO1 cDNA in *E. coli*—Following overex-

pression of vBPO1 in *E. coli*, a protein with the expected size of 70 kDa was produced in both the inclusion bodies and cytoplasmic protein fractions. Addition of 3% ethanol increased the proportion of overexpressed protein in the cytoplasmic fraction (Fig. 9A). Consistently, bromoperoxidase activity was higher in the latter fraction than in cytoplasmic protein fractions from cultures induced with 150 mM NaCl only (Fig. 9B). The recombinant bromoperoxidase activity consisted of one split band only, with an apparent molecular mass similar to that of the native protein band referred to as BPO-d (Fig. 9B).

DISCUSSION

***L. digitata* Sporophytes Feature Distinct Bromo- and Iodoperoxidases**—We here have separated from the sporophytes of

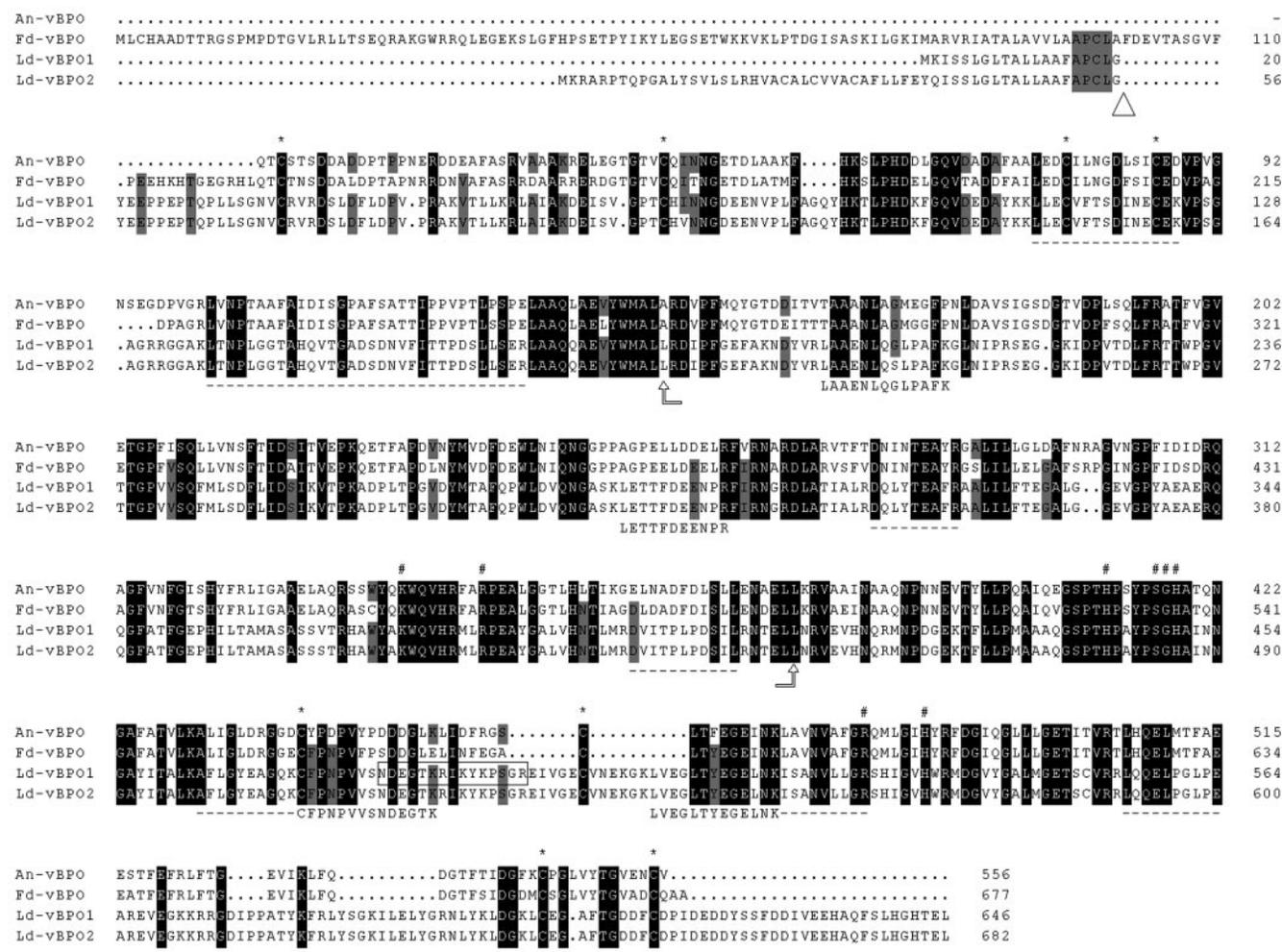


FIG. 5. Multiple amino acid sequence alignment of known vanadium bromoperoxidases from brown algae. *An-vBPO*, *A. nodosum* vBPO (Swiss-Prot accession number P81701); *Fd-vBPO*, *F. distichus* vBPO (NCBI accession number AAC35279); *Ld-vBPO1* and *Ld-vBPO2*, *L. digitata* vBPO1 and vBPO2 (this study) (EBI accession numbers AJ491786 and AJ491787, respectively). The conserved residues in all of the four sequences are shown in white capitals on a black background, and the residues that occur in at least three of the sequences are in black capitals on a gray background. The amino acid residues associated with the active site vanadium cofactor are indicated by the number symbol (#), and the cysteine residues involved in disulphide bridges according to the *An-vBPO* structure (20) are marked with an asterisk (*) above the alignment. The putative cleavage site of signal peptides in *Ld-vBPO* is referred to by a triangle. The seven peptides identified by LC-MS from the purified bromoperoxidases of *L. digitata* are underlined, with the four peptides sequenced by LC-MS/MS out in full below the alignment. The peptide used to produce an antipeptide to the vBPO from *L. digitata* is boxed. Arrows point out the intragenic probe used for Southern blot.

the brown alga *L. digitata* different haloperoxidase fractions, one specific for the oxidation of iodide and another that can oxidize both iodide and bromide (Table I). The iodoperoxidase and bromoperoxidase activities were purified to electrophoretic homogeneity (Fig. 2). They markedly differed in their molecular masses (Fig. 2), trypsin digestion profiles (Table II), and immunological characteristics (Fig. 7). Altogether, it appears that *L. digitata* features distinct iodoperoxidase and bromoperoxidase activities, *i.e.* which are borne by different proteins. At the optimal pH (5.5) the iodoperoxidase from *L. digitata* was completely inactive in the presence of bromide whereas it was 6.7 times more efficient than the bromoperoxidase fraction in the oxidation of iodide (Fig. 3). Although specific iodoperoxidase activities have already been reported in two Laminariaceae, *L. hyperborea* and *L. ochroleuca* (28), this is, to our knowledge, the first complete isolation of a genuine iodoperoxidase. At pH 6.2 (classically used in iodoperoxidase assays), its specific activity was about 3–20 times higher than the other kelp IPOs (28). Based on both immunological relatedness (Fig. 7) and LC-MS/MS peptide sequences, the IPO from *L. digitata* appears to be more closely related to the vBPO from *A. nodosum* than to the vBPOs from *L. digitata*.

The BPOs of L. digitata Are Multimeric Proteins—Given that the IPO was resolved as one single band with an apparent molecular mass of 80 kDa in the presence of SDS and β -mercaptoethanol (Fig. 2C), down from one 140-kDa band in native conditions (Fig. 2A), it is likely that this enzyme is a dimeric protein. Like *A. nodosum* vBPO (20), the bromoperoxidases from *L. digitata* also appear as dimeric proteins, with apparent molecular masses of 70 kDa in the complete denaturing conditions and of 145 kDa in the presence of SDS only (Fig. 2C). However, under non-denaturing conditions, purified bromoperoxidases consisted of six major bands, ranging from 155–600 kDa in sizes (Fig. 2B), indicating that they further reassociate into multimeric proteins. This observation is supported by mass spectrometry analyses (Table II), which show that the bromoperoxidase bands vBPOb–d actually consist of the same protein or of structurally very close proteins that cannot be separated by one-dimensional electrophoresis.

The crystal structure analysis of the bromoperoxidase from the red alga *C. officinalis* shows that this protein is organized as an assembly of six homodimers (17). It was suggested recently (28) that brown algal haloperoxidases also tend to aggregate into forms with a high molecular mass. We here show

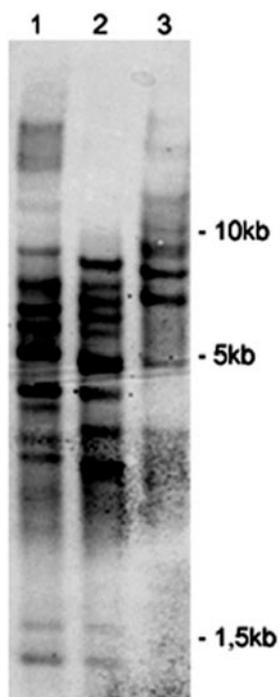


FIG. 6. Southern blot hybridization of *L. digitata* genomic DNA with an intragenic probe from *L. digitata* vBPO cDNA. Lanes 1-3 contain *L. digitata* genomic DNA digested with *Sal*I, *Sal*I/*Xho*I, and *Xho*I, respectively. The intragenic probe is shown in Fig. 5.

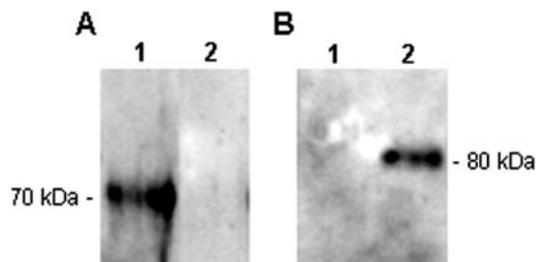


FIG. 7. Western blot hybridization of the purified bromo- (lane 1) and iodoperoxidase (lane 2). Each lane contains 200 ng of protein, treated with SDS and β -mercaptoethanol. Blots were stained with antibodies directed against *L. digitata* vBPO (A) or against *A. nodosum* vBPO (B).

unequivocally that *L. digitata* vBPOs consist of dimers that, in solution, spontaneously self-associate into higher molecular mass oligomers. It follows that so-called bromoperoxidase isoforms (23, 24) may actually be different reassociation states of the same protein or of closely related proteins. It is worth noting here, however, that under non-denaturing conditions the recombinant bromoperoxidase vBPO1 ran as one double band with an apparent molecular mass similar to that of the BPOd native band, ~235 kDa. This observation suggests that the recombinant protein lacks some post-translational modifications, which are not essential for activity but which are important for reaggregation into a multimeric protein.

Bromoperoxidases Form a Multigenic Family in *L. digitata*—From sequence tags with homology to brown algal bromoperoxidases, we here have characterized two full-length cDNAs from *L. digitata*, vBPO1 and vBPO2. A body of convergent evidence shows that vBPO1 and vBPO2 encode bromoperoxidases identical or very similar to the proteins referred above to as vBPOa-f. (i) The mature proteins feature all of the residues known to be involved in the bromoperoxidase active site (Fig. 5), including the additional histidine residue essential for bromoperoxidase activity (18, 20). (ii) They are immunologically

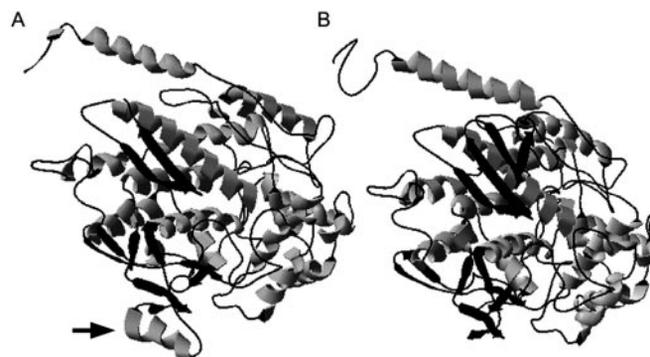


FIG. 8. Structure model of the vBPO1 monomer from *L. digitata* (A) compared with the ribbon-type representation of the vBPO monomer from *A. nodosum* (B). Secondary structure assignments: α -helices are shown in gray, and β -strands and coils are shown in black. The N- and C-terminal ends of *L. digitata* vBPO1 protein (amino acid residues 1-42 and 583-646, respectively) were not modeled because of the lack of homology with the vBPO protein of *A. nodosum*. The additional α -helix in *L. digitata* vBPO1 is marked by an arrow.

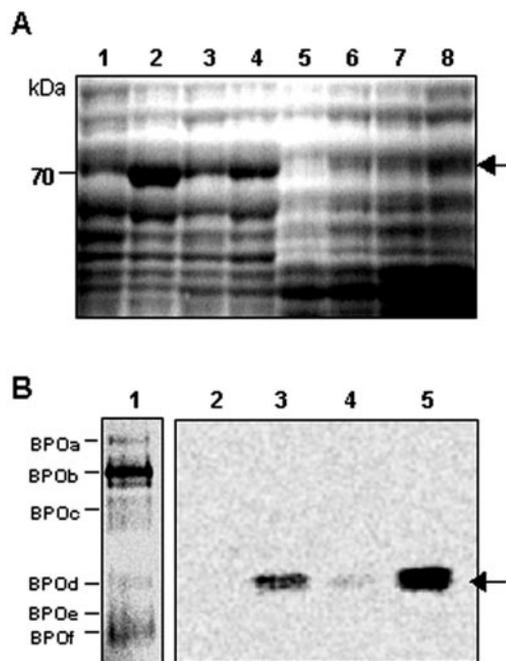


FIG. 9. Expression of *L. digitata* vBPO1 in *E. coli*. A, denaturing SDS-PAGE analysis (8% polyacrylamide) of *E. coli* protein extracts (25 μ g), stained with Coomassie Blue, from inclusion bodies fractions (lanes 1-4) and from cytoplasmic fractions (lanes 5-8), under the following culture conditions: lanes 1 and 5, uninduced culture; lanes 2 and 6, culture induced with 150 mM NaCl; lanes 3 and 7, uninduced culture supplemented with 3% EtOH; lanes 4 and 8, culture induced with 150 mM NaCl and supplemented with 3% EtOH. B, in-gel iodoperoxidase assay of the purified BPO extract (100 ng) from *L. digitata* (lane 1) and of the recombinant protein extracts (50 μ g) from the cytoplasmic fractions, under the following culture conditions: lane 2, uninduced culture; lane 3, culture induced with 150 mM NaCl; lane 4, uninduced culture supplemented with 3% (v/v) EtOH; lane 5, culture induced with 150 mM NaCl and supplemented with 3% (v/v) EtOH. Note that, in the original gels, the bromoperoxidase activity did appear as one double band. Arrows indicate the bromoperoxidase bands.

related to the purified BPOs (Fig. 7). (iii) They harbor the very peptides that were found by LC-MS/MS in the purified fractions (Fig. 5). (iv) The protein produced from vBPO1 in *E. coli* featured bromoperoxidase activity (Fig. 9).

Although the bromoperoxidases from *L. digitata* and those of fucal algae markedly diverge in their primary sequences (Fig. 5), they are superimposable in their monomeric three-

dimensional structure (Fig. 8). It is, therefore, likely that the conserved cysteine residues in *L. digitata* sequences are involved with the enzyme dimerization (20) and that, as in the case of other bromoperoxidases, these fold into multimeric, extremely robust proteins. As proposed for the other bromoperoxidases (17, 20), protein multimerization may result in a higher thermostability in terms of activity (Fig. 3).

In contrast to the fungi *C. inaequalis* and *Embellisia didymospora*, where only one copy of a vanadium-dependent chloroperoxidase gene was identified (40, 41), Southern blot analysis (Fig. 6) indicated the presence of a high copy number of BPO genes in *L. digitata*. vBPO1 and vBPO2 are very similar in their 3'UTR and 5'UTR regions, suggesting that they have arisen by a recent gene duplication. Minor differences were found indeed among the various purified BPOs upon trypsin degradation and LC-MS analyses (data not shown), indicating that these proteins present subtle differences in their primary sequences or post-translational modifications. In particular, as reported earlier in *L. digitata* (42), only one of the bromoperoxidase fractions (BPOb) was found to bind to ConA (data not shown). Altogether, it appears that bromoperoxidases form a large multigenic family in *L. digitata*.

Potential Functions of Haloperoxidases in *L. digitata*—Several lines of indirect evidence suggest that haloperoxidases are involved in the uptake of iodine in kelps. (i) The uptake of iodine by *L. digitata* gametophytes was enhanced in the presence of an *A. nodosum* vBPO (3). (ii) Both the vBPO expression (as seen from EST analysis (1)) and activity (this study) are high in *L. digitata* sporophytes, which accumulate high levels of iodine, compared with the gametophytes, which do not. We, therefore, have proposed that this protein is involved with iodine uptake in *L. digitata* (1). However, we here show that *L. digitata* sporophytes also feature a iodoperoxidase, specialized in the oxidation of iodide and with no activity toward bromide (Table I). Because the concentration of bromide (3 mM) is in seawater several orders of magnitude higher than those of iodide (0.25 μ M), the iodoperoxidase is more likely than the bromoperoxidase to account for the uptake of iodide from seawater.

It remains that *L. digitata* features a high number of vBPO genes (Fig. 6), which, based on their high proportion in the cDNA library (2% of transcripts (1)) and the occurrence of corresponding products in the sporophytes (see Fig. 1 and Table I), are constitutively expressed. These findings raise the question of the functions of bromoperoxidases in this alga. Because Laminariales feature bromine concentrations in the millimolar range (2), they may be involved in the metabolism of bromide. They nevertheless may also be involved in the metabolism of iodide, when iodide concentrations are high compared with those of bromide, *i.e.* in intracellular compartments. In this respect, it is worth noting here that vBPO1 and vBPO2 have different signal peptides, indicating that these two bromoperoxidases probably have different subcellular locations. Further information on the respective biological functions of halogen-oxidizing enzymes in kelps must now, however, await the complete characterization of iodoperoxidase(s), as well as a detailed investigation of the localization and expression of haloperoxidases in these algae.

Acknowledgments—We are grateful to F. Zal and C. Boyen for helpful discussions, to S. Boulben and S. Genicot for technical assistance, to

Hans Vilter for supplying the antibodies against the vBPO isoenzyme-I from *A. nodosum*, and to Agilent Technologies for providing the capillary LC system for MS analyses.

REFERENCES

- Crépeineau, F., Roscoe, T., Kaas, R., Kloareg, B., and Boyen, C. (2000) *Plant Mol. Biol.* **43**, 503–513
- Saenko, G. N., Kravtsova, Y. Y., Ivanenko, V. V., and Sheludko, S. I. (1978) *Mar. Biol.* **47**, 243–250
- Küpper, F. C., Schweigert, N., Ar Gall, E., Legendre, J.-M., Vilter, H., and Kloareg, B. (1998) *Planta* **207**, 163–171
- Carpenter, L. J., Malin, G., Küpper, F. C., and Liss, P. S. (2000) *Global Biogeochem. Cycles* **14**, 1191–1204
- O'Dowd, C. D., Jimenez, J. L., Bahreini, R., Flagan, R. C., Seinfeld, J. H., Hämeri, K., Pirjola, L., Kulmala, M., Jennings, G. S., and Hoffmann, T. (2002) *Nature* **417**, 632–636
- Wever, R., Tromp, M. G. M., Krenn, B. E., Marjani, A., and Van Tol, M. (1991) *Environ. Sci. Technol.* **25**, 446–449
- Pedersen, M., Collen, J., Abrahamsson, K., and Ekdahl, A. (1996) *Sci. Mar.* **60**, 257–263
- Ohsawa, N., Ogata, Y., Okada, N., and Itoh, N. (2001) *Phytochemistry* **58**, 683–692
- Borchardt, S. A., Allain, E. J., Michels, J. J., Stearns, G. W., Kelly, R. F., and McCoy, W. F. (2001) *Appl. Env. Microbiol.* **67**, 3174–3179
- Potin, P., Bouarab, K., Salaün, J.-P., Pohnert, G., and Kloareg, B. (2002) *Curr. Opin. Plant Biol.* **5**, 308–317
- Butler, A. (1998) *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2**, 279–285
- Vilter, H. (1995) in *Metal Ions in Biological Systems* (Sigel, H., and Sigel, A., eds) Vol. 31, pp. 325–362, Marcel Dekker, Inc., New York
- Butler, A., Carter, J. N., and Simpson, M. T. (2001) in *Handbook on Metalloproteins* (Bertini, I., Sigel, A., and Sigel, H., eds) pp. 153–179, Marcel Dekker, Inc., New York
- Messerschmidt, A., and Wever, R. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 392–396
- Shimonishi, M., Kuwamoto, S., Inoue, H., Wever, R., Ohshiro, T., Izumi, Y., and Tanabe, T. (1998) *FEBS Lett.* **428**, 105–110
- Ohshiro, T., Hemrika, W., Aibara, T., Wever, R., and Izumi, Y. (2002) *Phytochemistry* **60**, 595–601
- Isupov, M. N., Dalby, A. R., Brindley, A. A., Izumi, Y., Tanabe, T., Murshudov, G. N., and Littlechild, J. A. (2000) *J. Mol. Biol.* **299**, 1035–1049
- Carter, J. N., Beatty, K. E., Simpson, M. T., and Butler, A. (2002) *J. Inorg. Biochem.* **91**, 59–69
- Vreeland, V., Ng, K. L., and Epstein, L. (1998) *Mol. Biol. Cell* **9**, 1043
- Weyand, M., Hecht, H.-J., Kiess, M., Liaud, M.-F., Vilter, H., and Schomburg, D. (1999) *J. Mol. Biol.* **293**, 595–611
- de Boer, E., Tromp, M. G. M., Plat, H., Kreen, B. E., and Wever, R. (1986) *Biochim. Biophys. Acta* **872**, 104–115
- Soedjak, H. S., and Butler, A. (1990) *Biochemistry* **29**, 7974–7981
- Jordan, P., and Vilter, H. (1991) *Biochim. Biophys. Acta* **1073**, 98–106
- Jordan, P., Kloareg, B., and Vilter, H. (1991) *J. Plant Physiol.* **137**, 520–524
- Hara, I., and Sakurai, T. (1998) *J. Inorg. Biochem.* **72**, 23–28
- Almeida, M., Humanes, M., Silva, J. A., Melo, R., and Frausto da Silva, J. J. R. (1996) in *Plant Peroxidases: Biochemistry and Physiology* (Obinger, C., Burner, U., Ebermann, R., Penel, C., and Greppin, H., eds) pp. 146–152, University of Geneva, Geneva, Switzerland
- Almeida, M., Humanes, M., Melo, R., Silva, J. A., Frausto da Silva, J. J. R., Vilter, H., and Wever, R. (1998) *Phytochemistry* **48**, 229–239
- Almeida, M., Filipe, S., Humanes, M., Maia, M. F., Melo, R., Severino, N., da Silva, J. A. L., Frausto da Silva, J. J. R., and Wever, R. (2001) *Phytochemistry* **57**, 633–642
- Ar Gall, E., Asensi, A., Marie, D., and Kloareg, B. (1996) *Eur. J. Phycol.* **31**, 369–380
- Vilter, H. (1994) *Methods Enzymol.* **228**, 665–672
- Bradford, M. M. (1976) *Anal. Biochem.* **72**, 248–254
- Laemmli, U. K. (1970) *Nature* **227**, 680–685
- Hager, L. P., Morris, D. R., Brown, F. S., and Eberwein, H. (1966) *J. Biol. Chem.* **241**, 1769–1777
- Vilter, H. (1984) *Phytochemistry* **23**, 1387–1390
- Hedrick, J. L., and Smith, A. J. (1968) *Arch. Biochem. Biophys.* **126**, 155–164
- Rabilloud, T., Strub, J.-M., Luhe, S., Van Dorsselaer, A., and Lunardi, J. (2001) *Proteomics* **1**, 699–704
- Sauber, C., Mandel, F., Van Dorsselaer, A., Schaeffer, C., and Wagner, E. (2002) Agilent Technologies, Palo Alto, CA, www.chem.agilent.com/scripts/LiteraturePDF.asp?WHID-27796
- Apt, K. E., Clendennen, S. K., Powers, D. A., and Grossman, A. R. (1995) *Mol. Gen. Genet.* **246**, 455–464
- Thomas, J. G., and Baneyx, F. (1997) *Prot. Exp. Purif.* **11**, 289–296
- Simons, B. H., Barnett, P., Vollenbroek, E. G. M., Dekker, H. L., Muijsers, A. O., Messerschmidt, A., and Wever, R. (1995) *Eur. J. Biochem.* **229**, 566–574
- Barnett, P., Hemrika, W., Dekker, H. L., Muijsers, A. O., Renirie, R., and Wever, R. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 23381–23387
- Jordan, P., and Vilter, H. (1990) *Electrophoresis* **11**, 653–655

**CHAPITRE 2 : CARACTERISATION MOLECULAIRE DES vHPOs PURIFIEES CHEZ
L. DIGITATA – COUPLAGE AVEC UNE APPROCHE PROTEOMIQUE**

Cette étude a été réalisée en collaboration avec le Dr Emmanuelle Leize-Wagner et son étudiante en thèse, Elsa Wagner, de l'UMR 7509 (CNRS-Université Louis Pasteur) du laboratoire de Spectrométrie de Masse Bio-Organique de Strasbourg. Une grande partie de ces résultats sont décrits dans l'article 1 et dans l'article 2.

I- Bromoperoxydases putatives chez *L. digitata*

A partir des données EST sur *L. digitata* (Crépineau et coll., 2000), nous avons réalisé un criblage sur la banque d'ADNc de sporophytes en utilisant une sonde, amplifiée par PCR, spécifique de l'extrémité 5' de l'ADNc partiel présentant une homologie de séquence avec la vBPO de *F. distichus*. Nous avons ainsi obtenu plusieurs clones positifs et établi pour chacun leur carte de restriction. Les deux ADNc les plus longs, vBPO1 (3,379 pb) et vBPO2 (3,420 pb), séquencés entièrement, correspondent à deux ADNc distincts, avec une courte extrémité 5' non codante (104 pb et 36 pb, respectivement) et une longue extrémité 3' non codante (1,337 pb et 1,338 pb, respectivement) (**Figure 38**). Nous avons également isolé, à partir d'une banque génomique de *L. digitata*, un clone (BPO #B ; Cf Résultats, Chapitre 3) correspondant à l'ADNc vBPO1. La zone en amont de l'ATG putatif (~600 pb) a été amplifiée et séquencée, confirmant ainsi que vBPO1 et vBPO2 correspondent à des ADNc entiers. Les deux ADNc présentent entre eux 99.2 % et 99.5 % d'identité nucléotidique et protéique, respectivement. Ils diffèrent principalement par leurs extrémités 5' (**Figure 38**) ; vBPO1 présente un peptide signal putatif de 20 acides aminés avec un site de clivage putatif après le résidu glycine 20, alors que celui de vBPO2, dont le site de clivage putatif est localisé au niveau du résidu glycine 56, est plus long. Les protéines putatives, vBPO1 (68,953 Da) et vBPO2 (68,957 Da), diffèrent seulement par trois acides aminés (Isoleucine 75/Valine 111, Glycine 205/Sérine 241, Valine 365/Sérine 401). Cependant, le poids moléculaire de ces deux protéines putatives correspond à celui des sous-unités de la vBPO purifiée (~70 kDa) (Cf Résultats, Chapitre 1). De plus, les séquences protéiques de bromoperoxydases putatives de

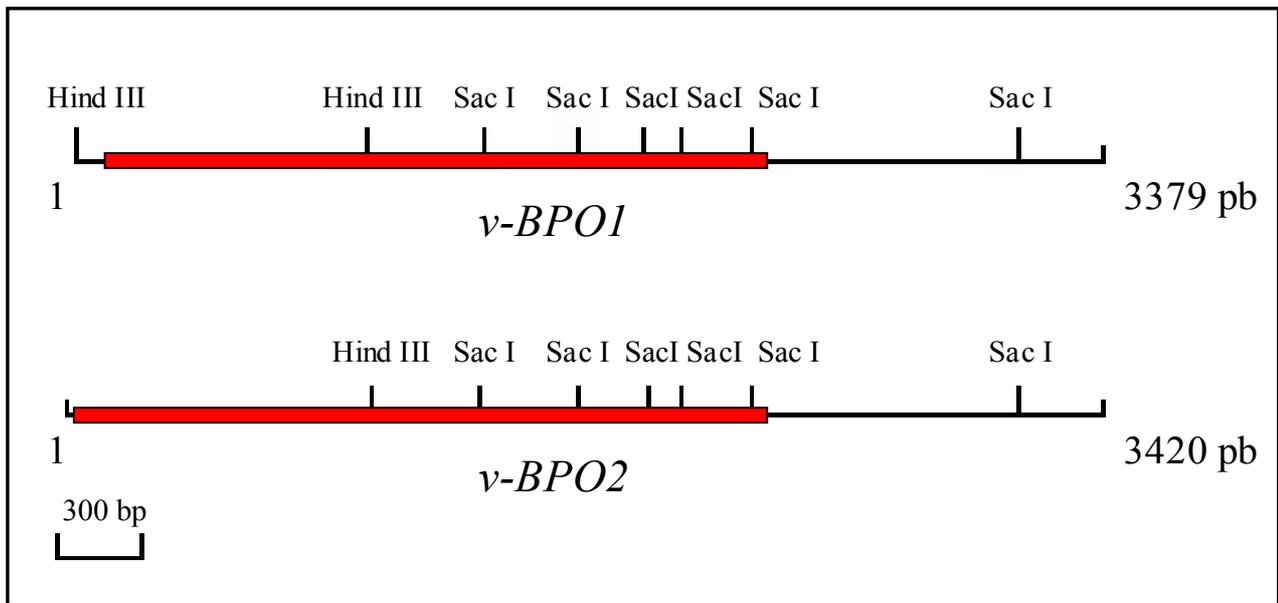


Figure 38 : Cartographie physique des deux ADNc de vBPO identifiés chez *L. digitata*. Les cadres de lecture (ou ORF) putatifs sont représentés en rouge.

L. digitata présentent 38 % et 40 % d'identités avec celles de *F. distichus* et d'*A. nodosum*, respectivement. En particulier, ces vBPOs putatives chez *L. digitata* diffèrent des autres bromoperoxydases d'algues brunes par leurs plus longues extrémités 3' non codantes d'une part, et par une insertion de 17 acides aminés dans la région codante (de la glycine 494 à la glycine 511 chez vBPO1), d'autre part. Cependant, vBPO1 et vBPO2 possèdent le résidu histidine qui serait impliqué dans la liaison covalente avec le vanadate, le résidu histidine catalytique, ainsi que les autres résidus du site actif, conservés chez les autres vBPOs d'algues marines. Les deux ADNc clonés chez *L. digitata* coderaient donc vraisemblablement pour des bromoperoxydases dépendantes du vanadate.

II- Approche protéomique : stratégie de séquençage *de novo* des vHPOs

Nous avons entrepris une approche protéomique dans le but de relier les activités vBPOs purifiées avec les deux séquences de vBPOs putatives (vBPO1 et vBPO2) d'une part, et d'obtenir des informations de séquences sur l'activité vIPO purifiée, d'autre part.

Dans ce contexte, des analyses par spectrométrie de masse en tandem (ou MS/MS) ont été réalisées sur trois bandes présentant une activité bromoperoxydase dépendante du vanadate (vBPOb, vBPOc et vBPOd) (**Figure 31**) et sur la bande correspondant à l'activité iodoperoxydase dépendante du vanadate (vIPO). Ces protéines, extraites d'un gel natif après migration et digérées à la trypsine, sont ensuite analysées en nanoLC-MS/MS par un Q-TOF et en microLC-MS/MS par une trappe ionique. Une première observation montre que les spectres MS et MS/MS de vIPO présentent des profils différents de ceux des vBPOs (**Figure 39**).

Les analyses en LC-MS/MS ont généré jusqu'à 150 peptides fragmentés par échantillon. Faute de logiciel suffisamment performant au début de cette étude, l'interprétation de nos résultats et le séquençage *de novo* ont principalement été réalisés de façon « manuelle ». Ainsi, nous nous sommes principalement intéressés aux spectres MS/MS les plus significatifs en terme d'intensité et de nombre de fragments obtenus (**Figure 39**). Cette approche par séquençage *de novo* nous a permis de caractériser pour les trois activités vBPOs purifiées un ensemble de 24 peptides, soit seulement sur la base de leur m/z, soit sur la base de leur m/z combinée à des informations de séquences (**Tableau 3**). Nous avons obtenu, pour l'activité vIPO purifiée, 11 séquences peptidiques homologues aux vBPOs de *F. distichus* et d'*A.*

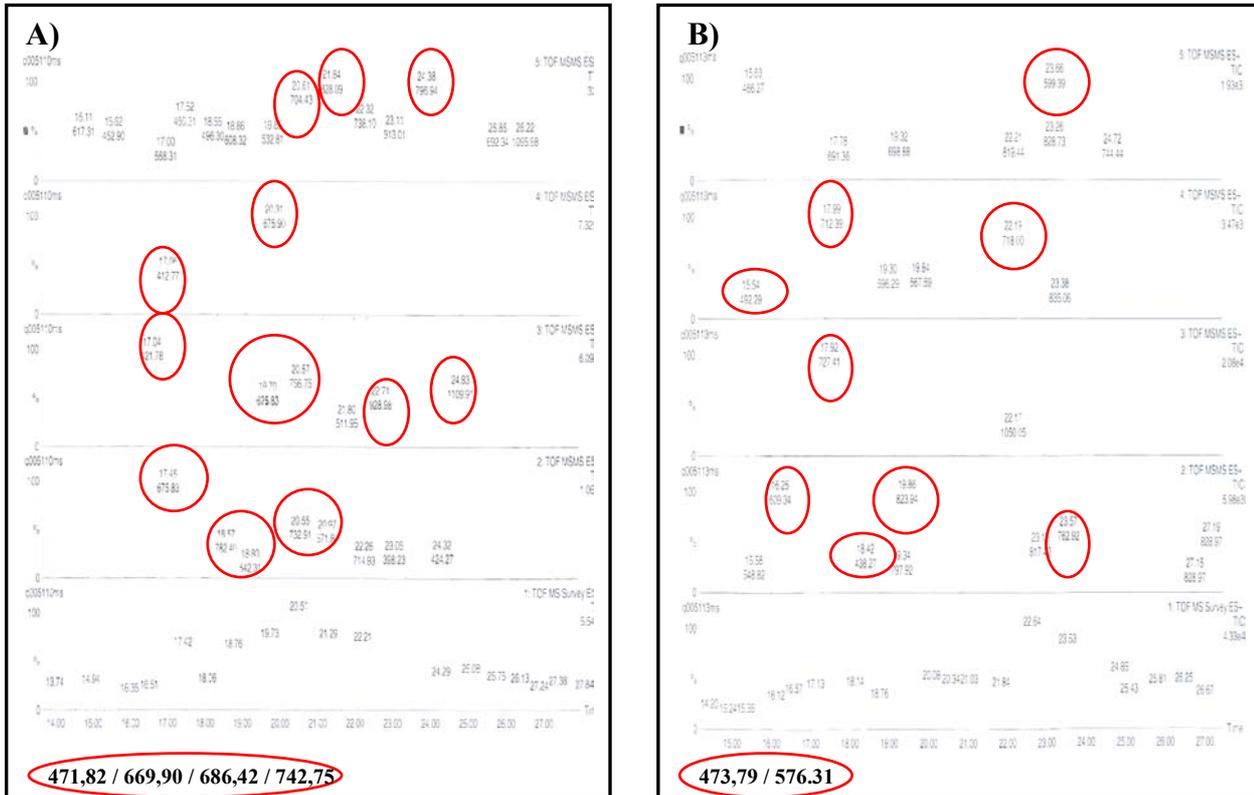


Figure 39 : Exemple de spectres MS et MS/MS des ions précurseurs multi- ou mono-chargés pour les bandes vBPOb (A) et vIPO (B) analysées en Q-TOF. Les m/z des ions précurseurs, visibles ou non (indiqués en bas de chaque spectre) sur les spectres MS/MS et séquencés, *de novo*, de façon manuelle, sont annotées en rouge.

Résidus tryptiques vBPO1	MH+ expérimentaux	MH+ théoriques	Précision (ppm)	Séquences	Résidus tryptiques vBPO1	MH+ expérimentaux	MH+ théoriques	Précision (ppm)	Séquences
19-31	1528.91	1528.80	72	VRDSLDFLDPVPR	284-291	872.58	872.51	80	DLATIALR
21-31	1273.70	1273.63	55	DSLDFLDPVPR	292-300	1142.62	1142.54	70	DQLYTEAFR
79-88	1171.60	1171.52	68	FGQVDEDAYK	359-375	2004.13	2004.01	60	MLRPEAYGALVHNTRL MR (+Mox)
90-104	1742.88	1742.79	52	LLECFTSDINECEK	376-387	1338.84	1338.76	60	DVITPLPDSILR
90-104	1856.96	1856.83	70	LLECFTSDINECEK (+CAM)	443-452	1083.51	1083.54	28	AFLGYEAGQK
90-111	2481.31	2481.17	56	LLECFTSDINECEKVP SGAGR (+CAM)	453-466	1563.81	1563.70	70	CFPNPVVSNDEGTK (+CAM)
117-148	3326.81	3336.64	51	LTNPLGGTAHQVTGA DSDNVFITTPDSLLSER	453-467	1719.91	1719.80	64	CFPNPVVSNDEGTK R (+CAM)
149-163	1779.03	1778.92	62	LAAQAEVYWMALL R (+Mox)	476-485	1176.62	1176.55	59	EIVGECVNEK (+CAM)
178-190	1371.83	1371.76	51	LAAENLQGLPAFK	488-500	1464.84	1464.75	61	LVEGLTYEGELHK
191-201	1127.68	1127.61	62	GLNIPRSEGK	534-546	1506.96	1506.83	86	RLQQLPGLPEAR
197-210	1533.88	1533.78	65	SEGGKIDPVTLFR	535-546	1350.82	1350.73	67	LQQLPGLPEAR
267-277	1350.68	1350.61	52	LETTFDEENPR	571-581	1381.74	1381.78	29	IILELYGRNLYK

Tableau 3 : Résultats obtenus par LC-MS/MS pour les vBPOs purifiées et homologues avec la digestion tryptique *in silico* de la séquence protéique vBPO1. Les masses (en Da) des ions précurseurs sont reportées dans la 2^{ème} et la 7^{ème} colonnes et celles de leurs analogues obtenus à partir de vBPO1 dans la 3^{ème} et la 8^{ème} colonnes. La 1^{ère} et la 6^{ème} colonnes correspondent à la position de chacun de ces peptides. Les séquences peptidiques (5^{ème} et 10^{ème} colonnes) représentées en italique ont été identifiées sur la base des m/z tandis que celles représentées en vert ont été obtenues par des informations significatives en MS/MS. Les différences entre les masses observées et les masses théoriques des peptides sont notées dans la 4^{ème} et la 9^{ème} colonnes. CAM : carbamidométhylation des cystéines ; Mox : méthionine oxydée.

<i>vIPO</i> <i>MFI+</i> <i>expérimentaux</i>	<i>Alignement partiel des peptides</i>	<i>vIPO</i> <i>MFI+</i> <i>expérimentaux</i>	<i>Alignement partiel des peptides</i>
1217.70	Ld- <i>vIPO</i> _Pept1 ... DPQSKLFR	1096.66	Ld- <i>vIPO</i> _Pept6 ...GRPGVLDR
	An- <i>vBPO</i> 150 DPLSQLFR	1396.78	Ld- <i>vIPO</i> _Pept7 NCEIN GRPGVLDR
	Fd- <i>vBPO</i> 269 DPFSQLFR		An- <i>vBPO</i> 383 VAA IN AAQNPNN
			Fd- <i>vBPO</i> 502 VAE IN AAQNPNN
1611.86	Ld- <i>vIPO</i> _Pept2 DFTIDSITVT ...	946.6	Ld- <i>vIPO</i> _Pept8 LAVNVAEGR
	An- <i>vBPO</i> 198 SFTIDSITVE		An- <i>vBPO</i> 472 LAVNVAEGR
	Fd- <i>vBPO</i> 317 SFTIDAITVE		Fd- <i>vBPO</i> 591 LAVNVAEGR
1422.76	Ld- <i>vIPO</i> _Pept3 LVAAD TVNTEAYR	1656.9	Ld- <i>vIPO</i> _Pept9 IDSELG LLLGGETAAVR
1452.78	Ld- <i>vIPO</i> _Pept4 LVAT DTVNTEAYR		An- <i>vBPO</i> 489 FDGIQ LLLGGETITVR
	An- <i>vBPO</i> 274 VTF DNINTEAYR		Fd- <i>vBPO</i> 608 FDGIQ LLLGGETITVR
	Fd- <i>vBPO</i> 393 VSFV DNINTEAYR		
1646.88	Ld- <i>vIPO</i> _Pept5 AISAPGLNGPYADSSR	2098.10	Ld- <i>vIPO</i> _Pept10 ILQOE AVAYPENAA... R
	An- <i>vBPO</i> 295 DAFN RACVNGPFIDIDR	2150.05	Ld- <i>vIPO</i> _Pept11 ... PENAGYEER
	Fd- <i>vBPO</i> 414 CAF SRPGINGPFIDSDR		An- <i>vBPO</i> 505 TLHQE LMTFA EE STFEER
			Fd- <i>vBPO</i> 624 TLHQE LMTFA EE ATFEER

Tableau 4 : Analyses LC-MS/MS de la vIPO purifiée et comparaison avec les séquences protéiques des vBPOs d'*A. nodosum* et de *F. distichus*. Les masses des ions précurseurs sont reportés dans la 1^{ère} et la 3^{ème} colonnes. La 2^{ème} et la 4^{ème} colonnes correspondent aux alignements des peptides identifiés par séquençage *de novo* (Ld-*vIPO*_Pept) avec la vBPO d'*A. nodosum* (An-*vBPO*) et la vBPO de *F. distichus* (Fd-*vBPO*). Les résidus conservés dans toutes les séquences sont représentés en rouge tandis que les résidus présents dans au moins une séquence de vIPO et dans au moins une vBPO sont colorés en vert. La position des peptides de vBPOs est indiquée avant chaque séquence.

GYEEPPEPTQ	PLLSGNVCRV	RDSLDF LDPV	PRAKVTLLKR	40			
LAIKDEISV	GPTCH	■	NNGD	EENVPLFAGQ	YHKTLPHDKF	80	
GQVDEDAYK	LLEC VFTSDI	NECEK VPSGA	GRRGGAKLTN	120	Différences entre vBPO1 et vBPO2 :		
PLGG TAHQVT	GADSD NVFIT	TPD SLLSERL	AAQQA EVYWM	160	Isoleucine 75 / Valine 111		
ALLR DIPFGE	FAKNDYVRLA	AENLQ ■	LPAF	KGLNI PRSEG	200	Glycine 205 / Sérine 241	
GKID PVTLDF	RTTWPGVTTG	PVVSQFMLS	FLIDSIKVT	240	Valine 365 / Sérine 401		
KADPLTPGVD	YMTAFQPWLD	VQNGASK LET	TFDEEN PRFI	280			
RNGRDLATIA	LRDQ LYTEAF	RAALILFTEG	ALGGEVGPYA	320			
EAERQQGFAT	FGEPHILTAM	ASASS	■	TRHA	WYAKWQVHRM	360	
LRPE AYGALV	HNTLMR DVIT	PLPDS ILRNT	ELLNRVEVHN	400			
QRMNPDGEKT	FLLPMAAAQG	SPTHPAYPSG	HAINNGAYIT	440			
ALKA FLGYEA	GQK CFPNPVV	SNDEG TKRIK	YKPSG REIVG	480			
ECVNE KGLV	EGLTYE GELN	KISANVLLGR	SHIGVHWRMD	520			
GVYGALMGET	SCVRR LQOEL	PGLPE AREVE	GKKRRGDIPP	560			
ATYKFRLYS	KILELYGRNL	YKLDGKLC	EG	AFTGDDFCDP	600		
IDEDDYSSFD	DIVEEHAQFS	LHGHT	EL	627			

Figure 40 : Couverture de la séquence de vBPO1 (40 %) par les peptides obtenus par LC-MS/MS (d'après les résultats présentés dans le tableau 3). Les séquences peptidiques soulignées correspondent aux peptides identifiés sur la base de leur m/z tandis que celles représentées en vert correspondent aux peptides pour lesquels nous avons obtenus des informations significatives en MS/MS. Les différences entre les séquences protéiques vBPO1 et vBPO2 sont notées en rouge et présentées à droite de la séquence.

nodosum. Parmi ces séquences, trois paires de peptides de vIPO, de masses différentes, sont homologues (Pept3 et 4, Pept6 et 7 et Pept10 et 11) (**Tableau 4**) ; ce qui suggère l'existence d'au moins deux monomères vIPO.

III- Identification moléculaire des activités vBPOs et vIPO chez *L. digitata*

Les 24 peptides caractérisés lors de l'approche par séquençage *de novo* des activités vBPOs correspondent avec une bonne précision à ceux issus de la digestion trypsique *in silico* de la séquence protéique de vBPO1 et de vBPO2 (**Tableau 3**). En effet, les peptides identifiés permettent de couvrir ~40 % des séquences protéiques de vBPO1 et de vBPO2 (**Figure 40**). Dans la bande correspondant à l'activité vBPOa, nous avons identifié, en particulier, un peptide présent uniquement dans la séquence vBPO1 (**Figure 40**). Cependant, pour les autres vBPOs purifiées, nous n'avons pas pu caractériser de tels peptides ; c'est-à-dire discriminer vBPO1 de vBPO2 qui se différencie uniquement par 3 acides aminés. En parallèle, des résultats préliminaires sur l'expression de *vBPO1* dans *E. coli* indiquent que cet ADNc code pour une bromoperoxydase dépendante du vanadate. Par conséquent, ces données confirment que les deux ADNc de *L. digitata*, *vBPO1* et *vBPO2*, codent pour des bromoperoxydases dépendantes du vanadate identiques ou très similaires à celle(s) dont l'activité est observée sur gel natif d'acrylamide (vBPOa-f).

Le séquençage *de novo*, par analyse LC-MS/MS, de l'activité vIPO purifiée nous a permis d'obtenir des informations de séquences pour la synthèse d'amorces dégénérées. Ainsi, après criblage de la banque d'ADNc de sporophytes de *L. digitata* par une sonde spécifique de l'activité vIPO, nous avons obtenu dix clones. Neuf d'entre eux correspondent au même ADNc, le plus long d'entre eux étant *vIPO1* (3,733 pb). L'autre cDNA, *vIPO2* (4,313 pb), est nettement différent. Ces deux ADNc, entiers, présentent une courte extrémité 5' non codante (137 pb et 215 pb, respectivement) et une longue extrémité 3' non codante (1,724 pb et 3,099 pb, respectivement) (**Figure 41**). Bien qu'ils possèdent seulement 57.5 % d'identité nucléotidique, ils ne présentent qu'un seul nucléotide différent dans leur région commune (991TGC GCC₉₉₆ dans *vIPO1* et 197TGC-CC₂₀₁ dans *vIPO2*), entraînant deux cadres de lecture distincts. *vIPO1* code pour une protéine putative de 624 acides aminés et *vIPO2* correspond à une protéine putative identique, de 333 acides aminés, tronquée dans sa partie N-terminale. Aucun peptide signal n'a pu être prédit pour ces protéines putatives. En ce qui concerne

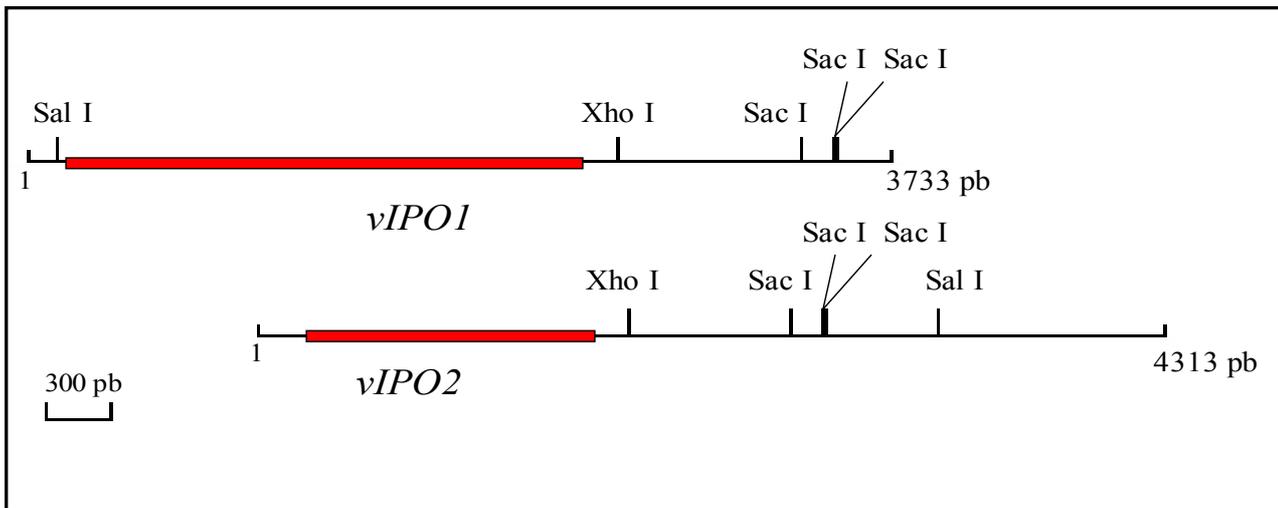


Figure 41 : Cartographie physique des ADNc de vIPO identifiés chez *L. digitata*. Les ORF putatifs sont représentés en rouge.

MKGLAGPAGA	MAVVALGLVP	GGAIGKSLRQ	EPSEPRLSGG	40
VDTAASPSKD	TLKGSLSRKL	QVND DALDV	SGTPAERAAN	80
ALNQRIEFAE	TEFTASEGTL	HLNNGDRSSA	ATFHKSLPHD	120
SLGQVNSEDF	DLMECIAQG	DFDTCELVPA	GDDGRLSNPL	160
GGIAVEMAGA	AGPALTLPPA	SAINSEDLAA	QMAEQYWMAL	200
TRDVPFSQYG	EDEATVAAAD	NLATMPGFAD	IVGVAVDPET	240
RRADPQSQLF	RSSAFGVETG	PFISQLLVKD	FTIDSITVTP	280
MQKTFAPGAD	YMTDYDEWLS	IQNGGSPDSE	ADLDDEDRIY	320
RNSRDL SRLV	ATDTVNTEAY	RAALILLDPD	QGADGRAAIS	360
APGLNGPYAD	SSRQAGFVNY	GVSHLMRLVG	TAE LAQKSAW	400
YQKWNVHMFV	RPEAFGGSIH	NVLLGKLDVE	IAPSLKNTD	440
LLDRVAARNG	EINGRPGVLD	RTYLLSQALP	EGSPTHPSYP	480
AGHATQNGAF	ATVLKALVGL	ERGSVCFNDP	VFPDDEGLTL	520
LPYTGDDGNN	CLTFEGEINK	LAVNVALGRN	MLGVHWRIDS	560
ELG LLLGETA	AVRILQQEAV	AYPENAGYEF	RLMSGKTIRL	600
ETDGTFFIDD	TLCSGDAFMGADLC			630

Figure 42 : Couverture de la séquence de vIPO1 (34 %) par les peptides obtenus par LC-MS/MS (d'après les résultats présentés dans le tableau 4). Les séquences peptidiques soulignées correspondent aux peptides identifiés sur la base de leur m/z tandis que celles représentées en vert correspondent aux peptides pour lesquels nous avons obtenus des informations significatives en MS/MS.

l'ADNc *vIPO2*, il semblerait que ce soit un pseudogène (Cf Résultats, Chapitre 3). Ainsi, pour la suite, nous nous intéresserons uniquement à l'ADNc *vIPO1*.

La séquence protéique *vIPO1* présente 49.4 % et 47.0 % d'identité avec les séquences de *vBPOs* de *F. distichus* et d'*A. nodosum*, respectivement. De plus, elle possède la majorité des résidus conservés au niveau du site actif de ces *vBPOs*, dont le résidu histidine impliqué dans la liaison covalente avec le vanadate et le résidu histidine catalytique.

Après le séquençage de *vIPO1*, nous avons exploité plus finement nos données de LC-MS/MS. Ainsi, 14 peptides caractérisés par séquençage *de novo* de l'activité *vIPO*, dont sept déjà identifiés par leur homologie avec les séquences de *vBPO*, correspondent exactement à ceux issus de la digestion tryptique *in silico* de la séquence protéique *vIPO1* et recouvrent 34 % de cette séquence (**Figure 42**).

Ces résultats mettent donc en évidence que l'ADNc *vIPO1* code pour une iodoperoxydase dépendante du vanadate identique ou similaire à celle purifiée (*vIPO*).

Cependant, le poids moléculaire de la protéine putative *vIPO1* (~75 kDa) étant inférieur à celui de la sous-unité de l'enzyme purifiée (~80 kDa), il semblerait que cette enzyme soit soumise à des modifications post-traductionnelles que nous n'avons pas pu identifier en LC-MS/MS. Bien que nous ayons mis en évidence, par 5' RACE, que *vIPO1* était entier, nous ne pouvons pas exclure l'hypothèse que l'enzyme purifiée corresponde à un autre ADNc possédant une région codante plus longue.

Conclusion

Les données de LC-MS/MS nous ont donc permis d'établir un lien direct entre les activités enzymatiques purifiées à partir de sporophytes et les données moléculaires. Nous avons ainsi d'une part attribué une fonction biochimique aux deux ADNc *vBPO1* et *vBPO2* et d'autre part cloné et séquencé l'ADNc *vIPO1* codant pour une activité spécifique iodoperoxydase.

Ces résultats sont utilisés dans une revue (**Annexe 6**), qui discute l'efficacité du couplage entre la génomique, la biologie moléculaire et la biochimie pour l'étude des macroalgues marines.

CHAPITRE 3: EVOLUTION DES vHPOs ET SPECIFICITE BIOCHIMIQUE

Les résultats présentés dans ce chapitre sont décrits dans l'**article 2**.

I- Les vHPOs chez *L. digitata* : des familles multigéniques

L'hybridation de l'ADN génomique de *L. digitata* (*Southern blot*) avec une sonde intragénique de *vBPO1-2* met en évidence la présence d'un grand nombre de copies de gènes homologues (**Figure 43 A**). Les analyses LC-MS/MS sur les activités vBPO purifiées ont également montré des différences mineures de séquences et/ou de masses entre des peptides homologues et donc l'existence de plusieurs isoformes très proches. De la même façon, le *Southern blot* hybridé avec une sonde intragénique de *vIPO1* présente plusieurs bandes. Cependant, ce profil est différent et possède moins de bandes que celui obtenu avec la sonde intragénique de *vBPO1-2* (**Figure 43 B**). L'analyse LC-MS/MS de l'activité vIPO purifiée indique qu'au moins deux monomères différents de vIPO, mais extrêmement proches, coexistent (*Cf Résultats, Chapitre 2*).

Tous ces résultats montrent que les vBPOs et les vIPOs forment deux familles multigéniques distinctes chez *L. digitata*.

Les familles multigéniques sont générées, la plupart du temps, par duplication de gènes. Ainsi, dans la famille des vBPOs, les similitudes de séquences entre les extrémités 3' et 5' de *vBPO1* et *vBPO2* suggèrent que ces deux gènes sont issus d'une duplication très récente. Cependant, parfois le gène dupliqué peut ne pas être fonctionnel et évoluer en pseudogène. Ce gène peut ne pas être transcrit ou, s'il l'est, peut ne pas être traduit. Dans le deuxième cas, une mutation affecte la traduction et induit, soit des mutations non sens, soit un décalage du cadre de lecture. Il est donc probable que l'ADNc *vIPO2* corresponde à un pseudogène. Ainsi, bien que la probabilité soit très faible, il est possible de synthétiser des ADNc qui correspondent à des ARNm qui ne seront pas traduits (Cappai et coll., 1992).

Actuellement, nous avons identifié au moins quatre gènes différents de vBPOs chez *L. digitata* et établi leur carte physique plus ou moins complète (**Figure 44**). Le gène *BPO #2*,

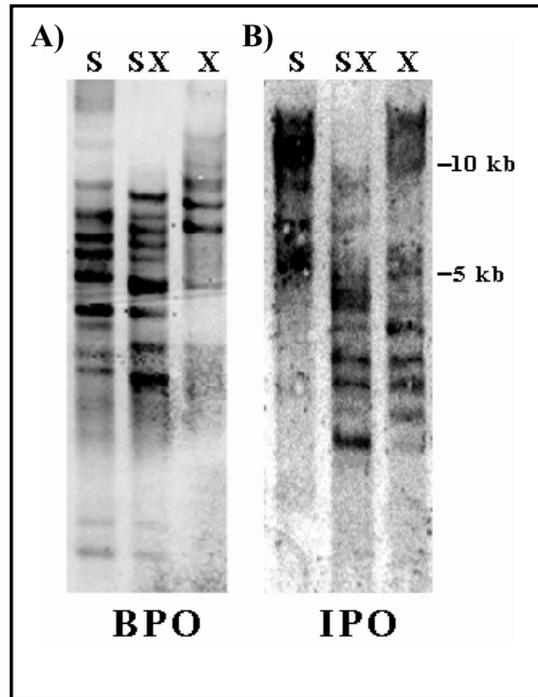


Figure 43 : Hybridation de l'ADN génomique (*Southern blot*) de *L. digitata* digéré par les enzymes de restriction *SalI* (S), *SalI/XhoI* (SX) et *XhoI* (X) avec une sonde intragénique de *vBPO1* (A) ou de *vIPO1* (B).

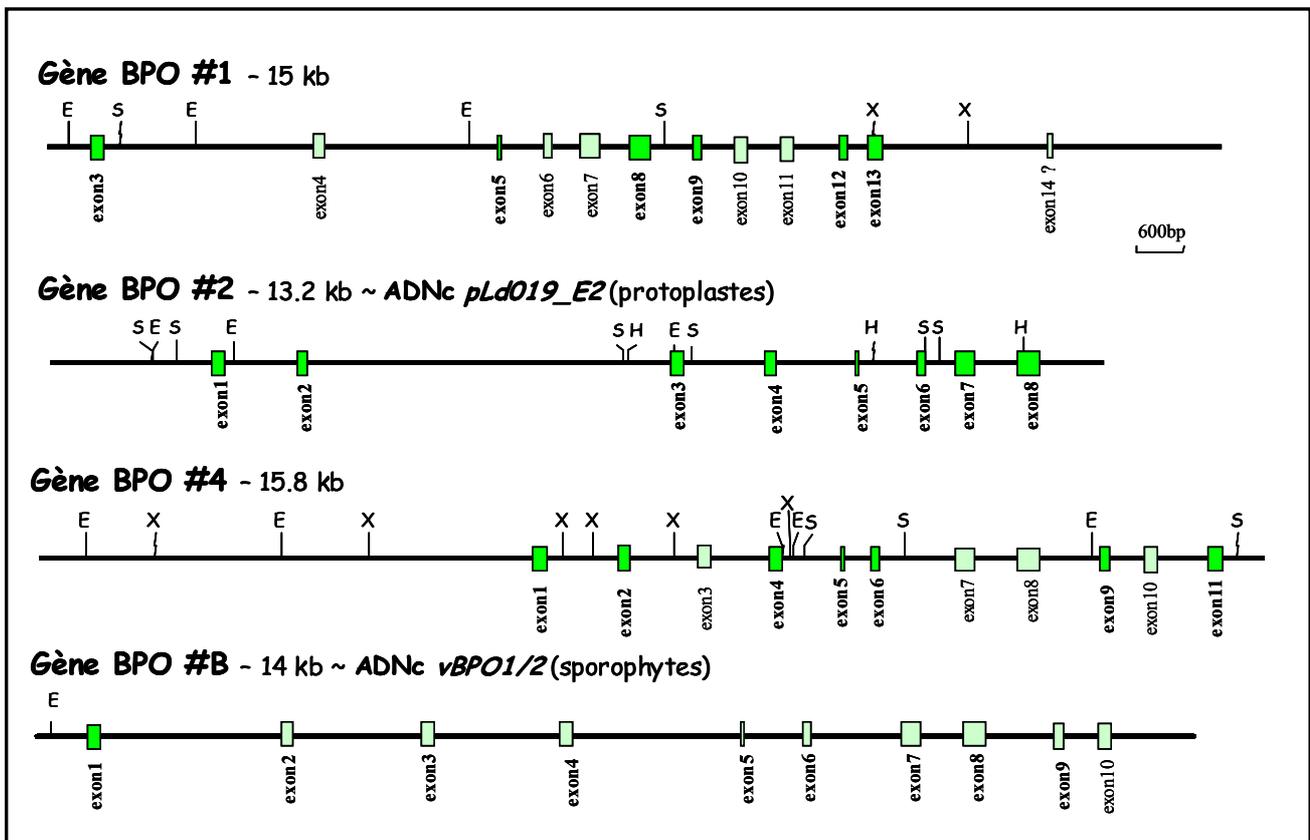


Figure 44 : Cartographie physique des quatre gènes *vBPO* de *L. digitata* actuellement identifiés.

en particulier, correspondrait à un ADNc de vBPO, *pLd-vBPO*, identifié à partir d'une approche EST menée au laboratoire sur des protoplastes de *L. digitata* au cours de la thèse de Vincent Roeder (Roeder et coll., *non publié*). Le gène *BPO #B* coderait pour l'ADNc *vBPO1*. L'une des caractéristiques principales de ces gènes réside en leur nombre important d'introns (au moins 13) et en la complexité de leur structure, d'où la difficulté d'obtenir des informations de séquences totales.

II- Evolution des vHPOs chez les algues marines

Par une simple comparaison des séquences protéiques entre les vCPOs de champignons, les différentes vBPOs d'algues marines et la vIPO de *L. digitata*, il semble difficile d'imaginer une origine commune entre toutes ces vHPOs. Cependant, la conservation des résidus au niveau de leur site actif et leur mécanisme d'action laisse supposer l'existence de contraintes évolutives divergentes plutôt que des évolutions convergentes. L'existence d'un ancêtre commun proche entre les différentes vCPOs est bien établie par l'analyse phylogénétique (**Figure 45**). En ce qui concerne les algues marines, les vHPOs présenteraient une origine monophylétique de laquelle aurait divergé deux lignées sœurs (**Figure 45**) : celle des algues brunes et celle des algues rouges. Étrangement, la vIPO ne se regroupe pas avec les vBPOs de *L. digitata*, mais avec les vBPOs des Fucales (**Figure 45**). Ceci suggère l'existence de plusieurs duplications de gènes, suivi d'évolutions indépendantes de ces copies de gènes. Chez *L. digitata*, ce phénomène n'a pas seulement donné naissance à deux familles multigéniques différentes, mais également à deux fonctions biochimiques distinctes.

Bien que les Laminariales et les Fucales forment deux groupes bien distincts dans les phylogénies nucléaires, de récentes évolutions convergentes pourraient expliquer l'homologie entre la vIPO et les vBPOs de Fucales. Une seconde hypothèse, plus probable, serait qu'une duplication de gènes ait eu lieu chez *L. digitata* en même temps que la séparation entre les Fucales et les Laminariales et que les vBPOs de *L. digitata* aurait divergé plus rapidement, tandis que la vIPO et les vBPOs de Fucales auraient conservé les caractéristiques de l'ancêtre commun des vHPOs d'algues brunes.

D'ailleurs, nous avons constaté que les vBPOs de *L. digitata* possédaient des structures quaternaires très complexes (*Cf Résultats, Chapitre 1*). Par contre, la structure de vIPO, plus proche de celles des vBPOs des autres algues brunes, semble plus simple. Cependant, bien

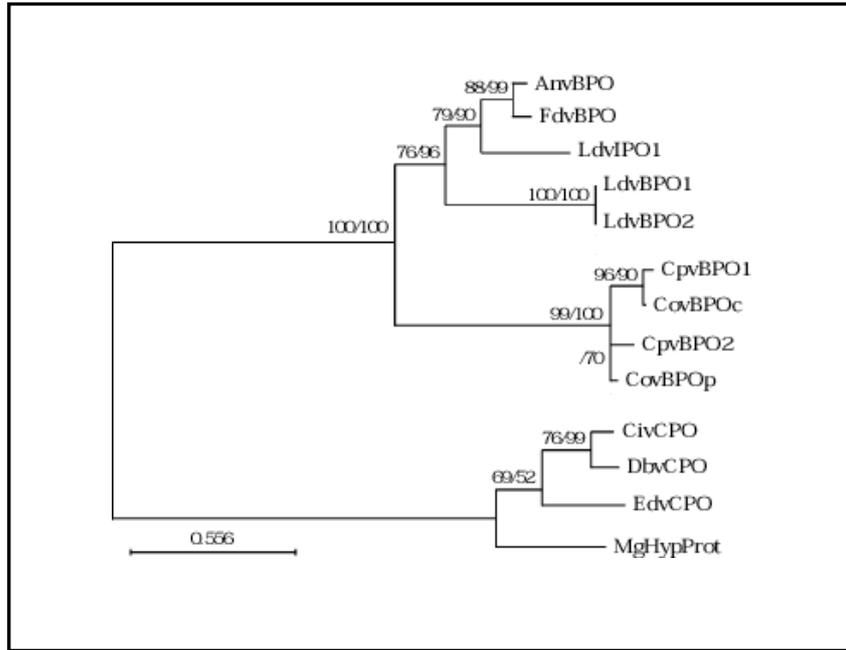


Figure 45 : Arbre phylogénétique fondé sur la comparaison des séquences protéiques des vHPOs par la méthode du plus proche voisin (ou *Neighbor-Joining method*) avec la matrice de Dayhoff.

Pour cette analyse nous avons utilisé une portion de séquence de 137 acides aminés couvrant la région du site actif.

Ed-vCPO, v-CPO d'*Embellisia didymospora* ; **Db-vCPO**, v-CPO de *Drechslera biseptata* ; **Ci-vCPO**, v-CPO de *C. inaequalis* ; **Co-vBPOp**, v-BPO de *C. officinalis* obtenu par séquençage protéique ; **Co-vBPOc**, v-BPO cloné de *C. officinalis* ; **Cp-vBPO1**, v-BPO1 de *C. pilulifera* ; **Cp-vBPO2**, v-BPO2 de *C. pilulifera* ; **Ld-vBPO1**, v-BPO1 de *L. digitata* ; **Ld-vBPO2**, v-BPO2 de *L. digitata* ; **Ld-vIPO1**, v-IPO1 de *L. digitata* ; **Fd-vBPO**, v-BPO de *Fucus distichus* ; **An-vBPO**, v-BPO d'*A. nodosum*.

que la nature dimérique de vIPO soit incontestable (*Cf Résultats, Chapitre 1*), l'assemblage des sous-unités reste plus obscure. En effet, la présence d'au moins deux monomères de vIPO, très similaires (*Cf Résultats, Chapitre 2*), suggère l'existence de deux homodimères, d'un hétérodimère ou d'un mélange constitué d'homodimères et de l'hétérodimère. De plus, comme nous travaillons sur une population d'algues et non un individu, nous ne pouvons pas exclure l'effet du polymorphisme.

Néanmoins, étant donné le caractère hydrophobe des sous-unités et leur homologie de séquence, il est plus probable que l'activité vIPO soit représentée par deux homodimères très similaires.

III- Structure du site actif et spécificité pour les halogénures

Les homologies de séquences protéiques entre les vHPOs de *L. digitata* et la vBPO d'*A. nodosum* nous ont permis de modéliser la structure tridimensionnelle de la vBPO1 et de la vIPO1 de *L. digitata* en prenant comme référence la structure cristallisée de la vBPO d'*A. nodosum*. Les résidus impliqués dans le mécanisme d'oxydation des halogénures étant conservés au niveau du site actif (**Figure 46**), les vHPOs de *L. digitata* possèderaient la même machinerie catalytique que les autres vHPOs.

Des études cinétiques sur les vHPOs de *L. digitata* montrent que la vIPO, en comparaison avec la vBPO, possède une plus grande affinité pour l'iodure mais surtout un pouvoir catalytique 100 fois plus élevé pour l'oxydation de l'iodure (**Tableau 5**). De plus, nous avons mis en évidence que le bromure, à de fortes concentrations, est un inhibiteur compétitif de l'iodure chez la vIPO (**Figure 47**). Ainsi, dans le cas de la vIPO, le bromure se fixerait sur le même site que l'iodure mais de manière non productive en terme d'activité bromoperoxydase.

Par comparaisons structurales des homodimères, nous pouvons observer que l'entrée du tunnel du site actif de la vIPO, comme celle du site des vBPOs, est riche en résidus chargés et hydrophobes. Dans d'autres structures comme celles des haloalcane déhalogénases, des amylases, des peroxydases et des myeloperoxydases, de tels résidus sont connus pour former des sites de fixation pour les halogénures. Chez les vHPOs, nous pouvons donc penser que

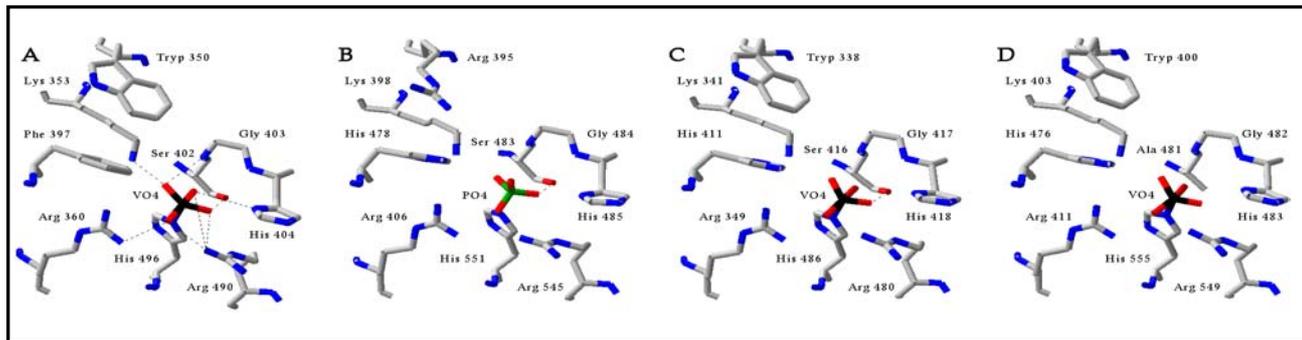


Figure 46 : Comparaison de la structure du site actif des différents vHPOs. A) vCPO de *C. inaequalis*. B) vBPO de l'algue rouge *C. pilulifera*. C) vBPO d'*A. nodosum*. D) vIPO de *L. digitata*.

Enzyme	Activité iodoperoxydase			Activité bromoperoxydase		
	$k_m^{I^-}$ (mM)	$kcat^{I^-}$ (s ⁻¹)	$kcat^{I^-}/k_m^{I^-}$ (s ⁻¹ · mM ⁻¹)	$k_m^{Br^-}$ (mM)	$kcat^{Br^-}$ (s ⁻¹)	$kcat^{Br^-}/k_m^{Br^-}$ (s ⁻¹ · mM ⁻¹)
vIPO purifiée	2.5	462	185	-	-	-
vBPO purifiée	18.1	38	2	0.5	75	150

Tableau 5 : Paramètres cinétiques des vBPO et vIPO purifiées.

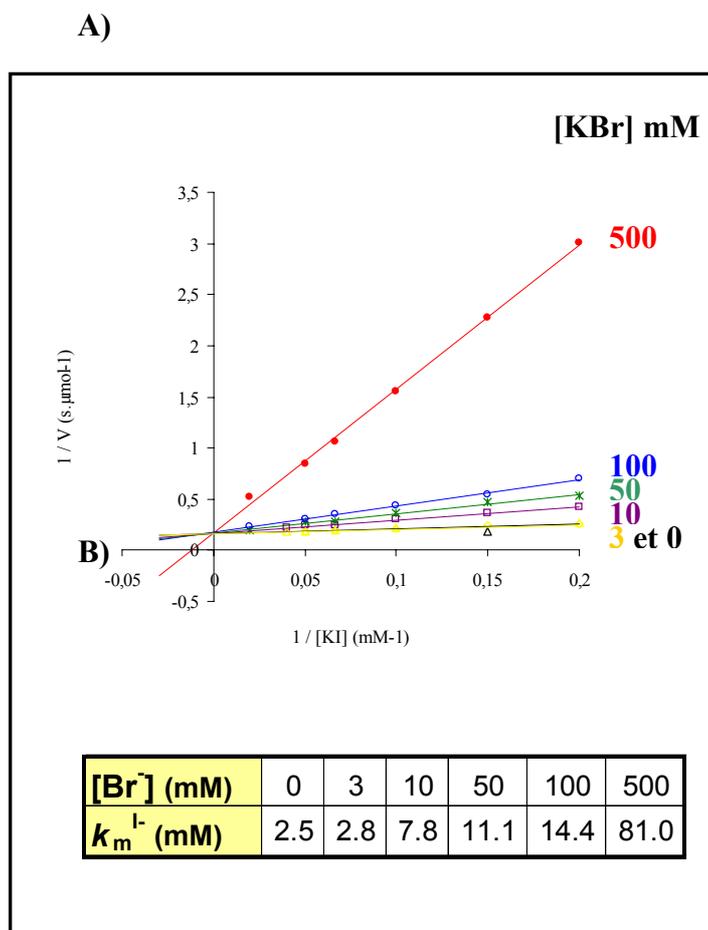


Figure 47 : Inhibition compétitive par le bromure de l'oxydation de l'iodure par la vIPO purifiée, à pH 6,2.

A) Représentation de Lineweaver-Burk à différentes concentrations en bromure
 B) Variation du $k_m^{I^-}$ en fonction de la concentration en bromure.

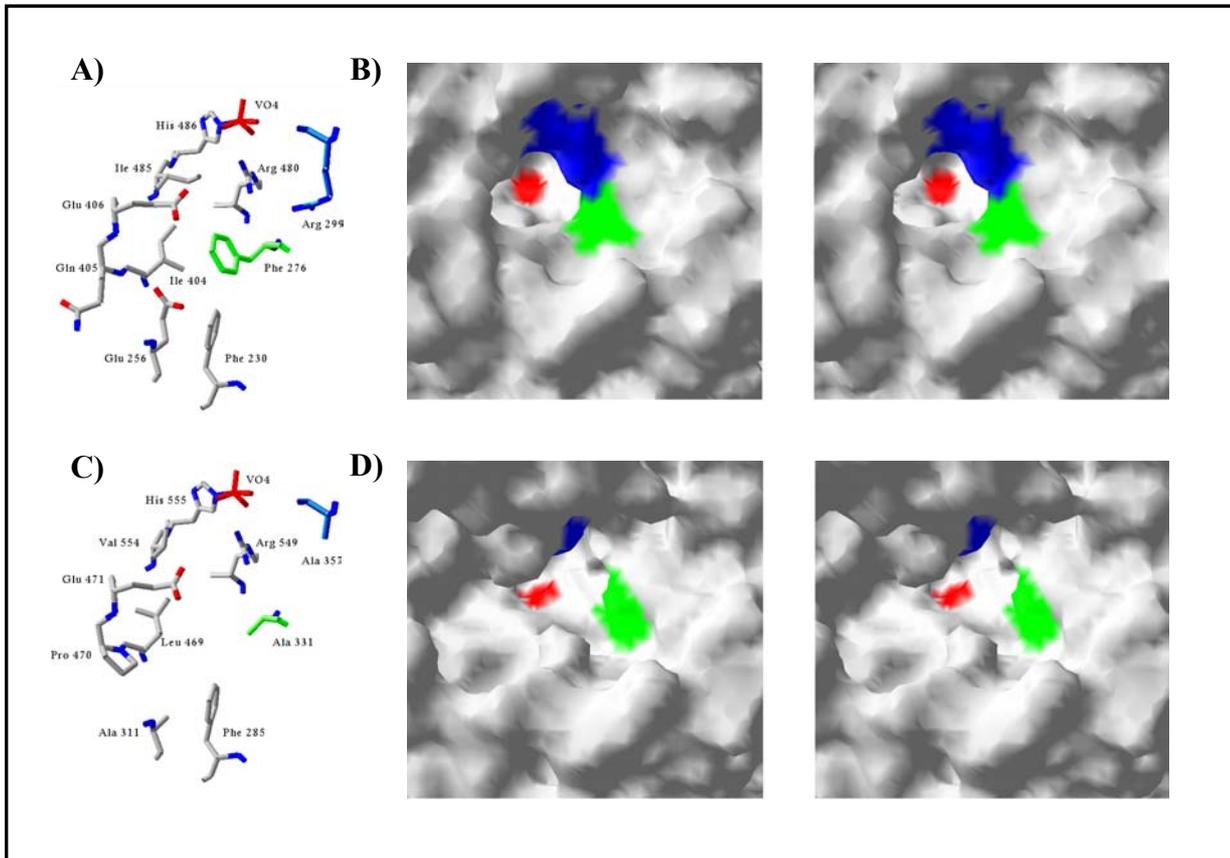


Figure 48 : Structure de l'entrée du tunnel du site actif chez la vBPO d'*A. nodosum* (A, B) et la vIPO de *L. digitata* (C, D). (A, C) Les résidus sont colorés en fonction des atomes, le vanadate en rouge et les résidus différents entre les vBPO et vIPO en bleu et en vert. (B, D) Vue stéréoscopique de l'entrée du tunnel (les codes couleur sont les mêmes que précédemment).

l'entrée du tunnel constitue le site de fixation des halogénures. De plus, le tunnel de la vIPO, étant plus large que celui des vBPOs (**Figure 48**) et sachant que le bromure possède un rayon électronique plus petit que celui de l'iodure, une mauvaise fixation du bromure au niveau de ce site putatif pourrait expliquer l'absence d'oxydation du bromure et donc la spécificité de cette enzyme pour l'iodure.

Une seconde explication pour les différences de spécificité envers les halogénures peut être proposée en considérant l'environnement électrochimique du vanadate. En effet, la différence majeure, au niveau du site actif, réside en la présence d'un résidu alanine dans la vIPO (Ala481^{vIPO1}) à la place d'un résidu sérine, conservé dans toutes les autres vHPOs (**Figure 46**). Cette différence est d'autant plus frappante que le résidu sérine forme l'une des liaisons hydrogène les plus fortes avec le vanadate et serait impliqué dans la neutralisation des charges négatives des atomes d'oxygène de ce cofacteur. Ainsi, dans la vIPO, la neutralisation du vanadate serait plus faible que dans les vCPOs et les vBPOs, suggérant que le vanadate est moins susceptible d'oxyder les halogénures les plus électronégatifs, comme le bromure.

Conclusion

La spécificité stricte de la vIPO pour l'oxydation de l'iodure serait donc due à une altération de la topologie du site de fixation des halogénures, combinée à une modification de l'électronégativité au niveau du site actif. D'un point de vue évolutif, la vIPO ayant gardé la capacité de fixer le bromure, il semble plus probable qu'une bromoperoxydase soit l'ancêtre des vHPOs chez les algues brunes. La perte de la capacité de bromination serait donc à l'origine de la spécificité de la vIPO pour l'iodure et donc de l'émergence d'une nouvelle fonction biochimique au sein des algues brunes.

IV- Article 2

« Vanadium-dependent iodoperoxidases in *Laminaria digitata*, a novel biochemical function diverging from brown algal bromoperoxidases. »

Soumis dans *Journal of Molecular Biology*

Vanadium-dependent iodoperoxidases in *Laminaria digitata*, a novel biochemical function diverging from brown algal bromoperoxidases.

Carole COLIN¹, Catherine LEBLANC¹, Gurvan MICHEL¹, Elsa WAGNER², Emmanuelle LEIZE-WAGNER², Alain Van DORSSELAER², Philippe POTIN^{1*}

¹ UMR 7139, CNRS-Laboratoires Goëmar-Université Pierre & Marie Curie, Station Biologique, BP 74, F-29682 Roscoff Cedex, France.

² Laboratoire de Spectrométrie de Masse Bio-Organique, UMR 7509, CNRS-Université Louis Pasteur, 25 rue Becquerel, F-67087 Strasbourg Cedex 2, France

* Corresponding author: Tel.: 33-2-98292331; Fax: 33-2-98292324; E-mail: potin@sb-roscoff.fr.

Running title: vanadium iodoperoxidases from *Laminaria digitata*

Footnotes

Abbreviations used: HPO, haloperoxidase; vHPO, vanadium-dependent HPO; vCPO, vanadium-dependent chloroperoxidase; vBPO, vanadium-dependent bromoperoxidase; vIPO, vanadium-dependent iodoperoxidase; MS, mass spectrometry; MS/MS, tandem MS; LC, liquid chromatography; UTR, untranslated region.

The nucleotide sequence reported in this paper has been submitted to the EBI Data Bank with accession no. **AJ619804**.

Summary

The brown alga *Laminaria digitata* features a distinct vanadium-dependent iodoperoxidase (vIPO) activity, which has been purified to electrophoretic homogeneity. Steady-state analyses at pH 6.2 are reported for vIPO ($K_m^{I^-} = 2.5$ mM; $k_{cat}^{I^-} = 462$ s⁻¹) and for previously characterized vanadium-dependent bromoperoxidase in *L. digitata* ($K_m^{Br^-} = 18.1$ mM; $k_{cat}^{Br^-} = 38$ s⁻¹). Although the vIPO enzyme is specific for the oxidation of iodide, competition experiments with halides indicate that bromide is a competitive inhibitor with respect to the fixation of iodide. A full-length cDNA was cloned and shown to be actively transcribed in *L. digitata*, to encode the vIPO enzyme. Mass spectrometry analyses of tryptic digests of vIPO indicated the presence of at least two very similar proteins, in agreement with Southern analyses showing that vIPO form a multigenic family in *L. digitata*. From phylogenetic analyses, vIPO shares a close common ancestor with brown algal vanadium-dependent bromoperoxidases. Based on the three-dimensional structure model of vIPO active site and in comparisons to those of others vanadium-dependent haloperoxidases, we propose hypothesis to explain the evolution of a strict specificity for iodide in *L. digitata* vIPO.

Keywords: vanadium; haloperoxidase; iodoperoxidase; halide specificity; *Laminaria digitata*.

Introduction

Haloperoxidases (HPOs) catalyze, in the presence of hydrogen peroxide, the oxidation of halides (X^- : iodide, bromide or chloride) to their corresponding hypohalous acids or a related electron oxidized halogenating intermediate such as OX^- , X_3^- and X^+ . A variety of halocarbons can subsequently be generated if the appropriate nucleophilic acceptors are present¹. On the basis of the cofactor requirement, three major classes of HPOs are known: HPOs containing no prosthetic group, the heme-containing HPOs and the vanadium-dependent HPOs (vHPOs) that bind a vanadate ion (HVO_4^{2-})². Enzymes representing these two latter classes differ in at least two aspects: catalytic mechanism and stability. Heme-containing HPOs catalyze the formation of hypohalous acid by a redox mechanism whereas in vHPOs the vanadate group does not change its redox state but may function as a Lewis acid in a substrate-inhibited bi-bi ping-pong mechanism^{3; 4}. Unlike heme-containing HPOs, vHPOs possess a high level of thermostability, and a good tolerance for organic solvents, as well as for high concentrations of their substrates and products⁵.

HPOs have been classified as chloro- (CPO), bromo- (BPO) and iodoperoxidase (IPO) and this nomenclature is based on the most electronegative halide, which can be oxidized by hydrogen peroxide. Among vHPOs, vCPO activities have been characterized in terrestrial fungi^{6; 7}, vBPOs have been mainly described in marine algae⁵, but also identified from lichens⁸. However, at the molecular and structural levels, studies have essentially been focused on the fungal *Curvularia inaequalis* vCPO, on the brown algal *Ascophyllum nodosum* vBPO and the red algal *Corallina officinalis* vBPO, which native X-ray crystallographic structures have been solved⁹. Moreover, kinetic and structural studies of peroxide-bound forms and mutants of vCPO have been developed, as well as mutants of *C. officinalis* vBPO^{9; 10; 11}. All these studies have shown the importance of several residues involved in binding vanadate into the active site. The vanadium cofactor is coordinated, in a trigonal bipyramidal geometry, through hydrogen interactions with its four oxygen atoms and a covalent bond with NE2 of a histidine residue. Another histidine residue may participate as a proton donor/acceptor during the enzymatic reaction⁹. The mechanism proposed by Messerschmidt *et al.*¹² for the vCPO halogenation reaction and developed by Hemrika *et al.*¹³ has been reinforced by structural studies on algal vBPOs^{9; 14}. Upon coordination of peroxide, a peroxovanadium intermediate may be formed during catalysis prior oxidation of halide by vHPO.

The halide-binding site at the vanadium center is less probable¹⁵. In vBPO, an extra histidine was first proposed to alter the protonation state of the bound peroxide, preventing the attack by chloride¹⁶. This residue was recently shown to be involved into the formation and activation of the peroxovanadate intermediate before bromide or iodide oxidation, but its mutation into alanine did not

suppress iodoperoxidase activity in *C. officinalis* vBPO¹¹. In *A. nodosum* vBPO, the serine residue which is hydrogen bound to the vanadate cofactor was proposed to also covalently bind bromide¹⁷, but this hypothesis has led to controversial discussions¹⁸. In *C. inaequalis* vCPO, the mutation of the homologous serine residue into alanine has significantly decreased chloride oxidation, but has minor effects on bromination kinetic parameters¹⁰. Thus the origin of the halide selectivity remains one of the interesting, yet unanswered questions.

In this context, we have recently cloned and characterized vBPO activities in *Laminaria digitata* and we have shown that this brown alga also featured a distinct vanadium-dependent haloperoxidase, referred to as vIPO, which exclusively oxidized iodide¹⁹. In an effort to elucidate the differences of halide specificity in vHPOs, we have pursued the molecular and biochemical characterization of the vIPO activity in *L. digitata*. In this report, we described for the first time a vIPO full-length cDNA and analyzed its three-dimensional structure model as well as its active site by comparison with others vHPOs. We showed that, whereas vHPOs share a close common ancestor in marine algae, the presence of specific residues in vIPO might be one structural explanation of its specificity for iodide oxidation and of the emergence of this novel biochemical function among brown algal vBPOs.

Results

Mass spectrometry analysis of purified vIPO activity from *L. digitata*

In a previous work, a vIPO activity was purified to electrophoretic homogeneity in *L. digitata*, and preliminary mass spectrometry analyses were carried out on the corresponding single band resolved on SDS-PAGE¹⁹. In this work, we further analyzed LC-MS/MS data, showing that among sequenced peptides, eleven presented sequence homologies with *A. nodosum* and *F. distichus* vBPOs (Table 1). Moreover, three pairs of vIPO peptides with significant distinct masses were homologous to each other (Pept3 and 4; Pept6 and 7; Pept10 and 11; Table 1).

Steady-state kinetic analyses and competition studies with halides

Iodoperoxidase specific activity measurements were performed, as a function of iodide concentration, on purified vIPO (Figure 1A) and vBPO (data not shown) from *L. digitata*, showing typical Michaelis-Menten kinetics in the initial part of the plot. Iodide kinetic parameters have been then calculated from the rate of triiodide formation at pH 6.2 for both enzymes (Table 2). For vBPO,

specific bromide kinetic constants have also been determined from the rate of monochlorodimedone bromination (Table 2).

Although *vIPO* displayed no oxidative activity in the presence of bromide, its specific activity at fixed concentration of iodide (6.1 mM) decreased over a concentration of 50 mM bromide and was completely abolished at ~1 M bromide (Figure 1B). In contrast, the *vIPO* specific activity at 6.1 mM iodide was not affected by the presence of chloride in the same range of concentrations (Figure 1B). The double-reciprocal plots of the initial rates of triiodide formation at pH 6.2 versus iodide concentration, at various fixed bromide concentrations, displayed lines with common intercepts of the y-axis (Figure 1C).

Molecular characterization and transcription of *L. digitata vIPO* gene

After screening of the *L. digitata* sporophyte cDNA library by a 5' end specific *vIPO* probe, nine positive clones were mapped by restriction analyses and sequenced in both directions. As they corresponded to the same cDNA, the longest one was referred to as *vIPO1* (3733 bp). *vIPO1* was a full-length cDNA with a short 5'UTR (137 bp) and a large 3' UTR (1724 bp) (Figure 2A). 5' RACE analyses did not extend further its 5' end. *vIPO1* encoded a putative protein of 624 amino acids. No putative signal peptide was predicted and the molecular mass of the mature *vIPO1* calculated from the amino acid sequence was 66,326 Da.

Fourteen peptide masses characterized by LC-MS from the purified *vIPO* activity corresponded with a good accuracy to those identified by *in silico* tryptic digestion of *vIPO1* (Table 3), homogeneously covering 34% of the protein sequence. Nine of these peptides, partially or fully sequenced by LC-MS/MS, were identical to the corresponding peptides of *vIPO1* and seven of them were first identified based on their homologies with other *vBPO* sequences (see Table 1).

The expression of iodoperoxidase gene was examined by Northern-blot analyses in sporophytes of *L. digitata*. Based on hybridization with intragenic probe of *vIPO1* a major transcript around 4 kb and a minor one at 2.5 kb were observed, whereas, by comparison, only one strong band at 3.5 kb was detected for *L. digitata vBPO1* transcripts. With a 5' end *vIPO1* specific probe, a single lower signal appeared at 4 kb (Figure 2B).

In a Southern blot analysis with *vIPO1* intragenic probe (Figure 3), several hybridization bands were detected in *L. digitata*, but were less numerous than those hybridized with *L. digitata vBPO* intragenic probe. Moreover, the two hybridization patterns were significantly different, when compared *IPO1* or *vBPO* specific probes¹⁹.

Comparisons and phylogenetic analyses of vHPOs

The deduced amino acid sequence of *L. digitata* vIPO1 was aligned with available protein sequences of vHPOs (Fig 4). It shared 37.1 % and 27.2 % identities with *L. digitata* vBPO1 and *C. officinalis* vBPO, respectively, while it was closer from *A. nodosum* vBPO and *F. distichus* vBPO with 49.4 % and 47.0 % sequence identities, respectively. As the overall sequence similarities between fungal vCPOs and others vHPOs from brown and red algae were very low, a phylogenetic tree was built by neighbor-joining analysis based on comparisons of amino acid sequences around the conserved active site region (Figure 5). Another tree based on parsimony presented the same topology and the corresponding bootstrap values were thus also indicated in the neighbor-joining tree. The exclusion of fungal proteins from the phylogenetic analyses resulted in identical topology of the neighbor joining and parsimony subtrees, with higher bootstrap values (data not shown). Fungal vCPOs formed a monophyletic cluster. Interestingly, a hypothetical protein predicted from the genome of the ascomycetous fungus *Magnaporthe grisea* grouped at the basis of the cluster formed by fungal vCPOs. Most distantly related, the algal vHPOs formed another monophyletic cluster, subdivided into two different subgroups, the brown and the red algal proteins. In the *Corallina* spp. cluster, vBPO1 and vBPO2 from *C. pilulifera* did not group together, but branched each other with their orthologues in *C. officinalis*. As expected from sequence comparisons, *L. digitata* vIPO1 emerged inside the brown algal vBPOs, more closely related to those of fucalean algae than to vBPO from the same species, and this branching is well supported by high bootstrap values.

The residues conserved between *L. digitata* vIPO1 and *A. nodosum* vBPO are essentially involved in the secondary structures of this latter bromoperoxidase. Almost all the residues in the active site and those involved in vanadate binding were also conserved (Figure 4 and see Figure 6). The six-cysteine residues, involved in intramolecular disulphide bridges within the *A. nodosum* vBPO monomer¹⁴, were present at similar position in vIPO1 and in other brown algal vBPOs (Figure 4). However, in the N-terminal region of vIPO1, the two-cysteine residues, involved in the dimer interface of *A. nodosum* vBPO, were not observed (Figure 4; Cys3^{AnvBPO} and Cys41^{AnvBPO}).

Three-dimensional model of *L. digitata* vIPO

Considering the high sequence identity and the conservation of the overall secondary structure organization, the fold of vIPO enzyme is certainly similar to that of *A. nodosum* vBPO. As already obtained for vBPO of *L. digitata*¹⁹, a model for the vIPO1 monomer was constructed based on the crystal structure of *A. nodosum* vBPO¹⁴. Figure 6 compared the regions of the active site of *C. inaequalis* vCPO²⁰, *C. officinalis* vBPO¹⁸, *A. nodosum* vBPO and the modellized *L. digitata* vIPO1. In vIPO1, the residues involved in the vanadium-binding site were located in a broad channel at the

top of the four-helix bundles. One half of this channel was lined with predominantly polar residues, including His476^{vIPO1}, His483^{vIPO1} and Arg549^{vIPO1}, while the other half of the channel presented hydrophobic residues: Trp400^{vIPO1}, Pro474^{vIPO1}, and Thr475^{vIPO1} (Figure 6). The putative His483^{vIPO1} catalytic residue formed a strong putative hydrogen bond to the carboxylic group of Asp333^{vIPO1}, like in the vBPO structures, while this catalytic residue was hydrogen bonded to the carbonyl group of Trp289^{vCPO} and Ala290^{vCPO} in vCPO. Similarly to vBPOs, vIPO1 featured an additional histidine residue near the active site (His478^{CovBPO}, His411^{AnvBPO} and His476^{vIPO1}) (Figure 6) while a phenylalanine, Phe397^{vCPO}, was present at this position in vCPO. In the vicinity of the vanadate cofactor, vIPO1 essentially differed from vBPOs and vCPO by the replacement of a serine by an alanine residue, Ala481^{vIPO1}. This serine is invariant in vBPOs and vCPO and its hydroxyl group forms a strong hydrogen bond with the vanadate cofactor (Figure 6). In vIPO1, the presence of an alanine abolished such a polar interaction, leaving Lys403^{vIPO1} as the main residue neutralizing the negatively charged vanadate cofactor.

Similarly to *A. nodosum* vBPO, *L. digitata* vIPO has been shown to form a dimer in solution¹⁹. The structure of the former bromoperoxidase has revealed that residues from both monomers constituted the active site¹⁴. Our model of the vIPO dimer suggested significant differences at the entrance of the active site funnel (Figure 7). Two bulky residues present in vBPO, Phe276^{AnvBPO} and Arg299^{AnvBPO}, were substituted by alanine residues (Ala331^{vIPO1} and Ala357^{vIPO1}). These changes led to an enlargement of the active site funnel entrance in vIPO in comparison to vBPO of *A. nodosum*.

Discussion

L. digitata vIPO form a multigenic family

The vIPO activity was previously purified from *L. digitata* sporophytes to electrophoretic homogeneity. Gel filtration chromatography and SDS-PAGE analyses indicated that vIPO is a dimeric protein in solution¹⁹. To obtain internal peptides in order to clone a full-length vIPO cDNA, the purified vIPO was submitted to limited proteolysis using trypsin and analyzed by LC-MS/MS. Unexpectedly several distinct peptides displayed homologous sequences (Table 1), suggesting the presence of at least two different, but closely related iodoperoxidase monomers in *L. digitata* sporophytes. Even if we cannot exclude the hypothesis of one heterodimeric enzyme, it seems more likely that the vIPO activity corresponds to at least two very similar homodimeric enzymes.

Using degenerated primers designed from internal peptides, we succeeded to characterize one full-length cDNA, referred to as *vIPO1*. Comparisons with LC-MS/MS data (Table 3) and Northern

blot analyses (Figure 2) indicated that this gene is actively transcribed to encode one of the subunits forming the dimeric vIPOs. The transcription studies of *vIPO* genes, using conserved intragenic region as a probe, suggested either a rapid maturation of mRNA or the presence of another smaller homologous transcript (Figure 2). However, given the similarities of peptides obtained from LC-MS/MS studies (Table 1), several *vIPO* genes are likely to be transcribed simultaneously to mRNAs of similar sizes in *L. digitata* sporophytes. The predicted mass of translated *vIPO1* cDNA suggested post-translational regulations of the protein, to be in accordance with observed masses of vIPO monomers.

Sequence comparisons between vIPO1 and vBPO from *A. nodosum* suggested that the two proteins have a similar overall folding. For instance, the three intramolecular disulphide bridges, shown to be present in *A. nodosum* monomer¹⁴, are likely to be conserved in vIPO monomer, as the cysteine residues involved in these covalent bonds are also conserved in its protein sequence (Figure 4). This is in agreement with the slight difference of apparent molecular masses observed for purified vIPO monomers in the absence or presence of β -mercaptoethanol¹⁹. However, in contrary to *A. nodosum* homodimeric vBPO, the two monomers of vIPO are linked in a non-covalent way according to SDS-PAGE analyses¹⁹ and, effectively, the two cysteine residues involved in intersubunit covalent bonds¹⁴ are not present in vIPO1 sequence, as for *Corallina* vBPOs (Figure 4).

Evolution of vHPO genes and divergence of vIPO in *L. digitata*

Structural comparisons of different vHPOs have already suggested a common ancestor for these enzymes²¹. From only sequence comparisons, it should be difficult to conclude for a unique origin of all vHPOs, but highly conserved overall protein structures and identical active site and mechanisms let suppose some common evolutionary constraints, instead of convergent evolutions. The occurrence of a close common ancestor for all vCPOs is well supported by phylogenetic analyses (Figure 5) and a new putative vCPO have been identified in the ascomycetous fungi *M. grisea*, according to its homology with others fungal vCPOs. Moreover, all marine algal vHPOs, i.e. vBPO and vIPO1, presented a monophyletic origin, from which have diverged two sister groups, the brown algal enzymes and the red algal vBPOs, belonging to two independent nuclear lineages²². Inside these two clusters, some discrepancies with nuclear evolution and speciation appeared, and paralogous genes are not always closely related as noted for *C. pilulifera*. In the same way, vIPO1 does not branch with *L. digitata* vBPOs but is closer to vBPOs from fucallean algae, as already suggested from immunological cross-reactions¹⁹. These topologies suggested the occurrence of several gene duplications, followed by independent gene copy evolutions. In *L. digitata*, this phenomenon would have given rise not only to two different gene families, as shown by Southern

blot hybridisations, but also to distinct biochemical properties (see Figure 3 and ¹⁹). Given that Fucales and Laminariales are well-separated brown algal clusters in nuclear phylogenies ²³, recent convergent evolutions could explain the relationships between vIPO1 and vBPOs from Fucales. Another hypothesis supposed that, after a gene duplication in *L. digitata* contemporaneous to the separation between Fucales and Laminariales, *L. digitata* vBPOs would have diverged rapidly, in agreement with a relatively recent and large multigenic family ¹⁹, whereas both vIPO1 and fuclean vBPOs would have conserved more ancestral characteristics of brown algal vHPO.

Active site structure and specificity for halides

The conservation in *L. digitata* vIPO1 of most of the residues involved in catalysis and vanadate binding in vCPO and vBPO strongly suggests that vIPO shares overall catalytic machinery with these vanadium-dependent haloperoxidases. Although the iodoperoxidase activity purified to the electrophoretic homogeneity ¹⁹ corresponds to at least two closely related vIPOs, as shown by LC-MS/MS experiments, the protein preparation behaves as a homogenous enzyme and follows the Michaelis-Menten law (Figure 1), with kinetic parameters comparable to those reported for iodoperoxidase activities in *L. hyperborea* and *L. ochroleuca* ²⁴. In comparison to the *L. digitata* vBPO ($K_m^{I^-} = 18.1$ mM; $k_{cat}^{I^-} = 38$ s⁻¹), vIPO displays a better affinity to iodide ($K_m^{I^-} = 2.5$ mM), but above all a much greater catalytic turn-over ($k_{cat}^{I^-} = 462$ s⁻¹), leading to k_{cat}/K_m ratio for iodide ~100 fold greater than for vBPO (Table 2). The competition experiments indicate that chloride does not bind to vIPO. In contrast, the presence of bromide at high concentration completely abolishes the iodoperoxidase activity. The Lineweaver-Burke plots (Figure 1C) indicate that this inhibition by bromide is competitive with respect to the iodide oxidation. Therefore, bromide binds to *L. digitata* vIPO at the same site than iodide, but in a non-productive manner.

Halides typically bind to basic residues, but also to hydrophobic pockets. Such hydrophobic interactions were observed in haloalkane dehalogenases ²⁵, amylases ²⁶, peroxidases ²⁷ and myeloperoxidases ²⁸. As in the various structures of vHPOs ^{14; 18; 20}, in the modelized vIPO structure, the active site funnel entrance, located ahead of the vanadium-binding site, is rich into charged residues and hydrophobic patches, suggesting that this region has a potential role in the binding of bromide and iodide. Moreover, the cavity funnel entrance in vIPO is much larger than in *A. nodosum* vBPO, essentially due to the presence of several alanine residues, instead of bulkier residues in vBPOs (Figure 7). This larger cleft is likely to explain the incorrect binding of bromide into the active site, leading to an absence of oxidation. In the same way, a smaller interaction surface, as observed in vBPO funnel entrance, seems to increase the enzyme affinity for smaller halides, such as bromide, compared to iodide, and the efficiency of the bromination reaction (Table 2).

A second explanation, not exclusive, for different halide specificities, can be proposed concerning the electrochemical environment of the vanadium cofactor. The most striking difference in the catalytic region of vIPO is an alanine, Ala481^{vIPO1}, instead of an invariant serine at the same position in vCPO and vBPOs (Figure 6). This alanine suppresses one of the hydrogen bonds involving the negatively charged oxygen atoms of the vanadate cofactor in vCPO and vBPOs. In the peroxide form of *C. inaequalis* vCPO, the serine maintains this polar interaction even after the formation of the peroxovanadate¹². The charge neutralization of the vanadate cofactor in *L. digitata* vIPO is thus lower than in vCPOs and vBPOs, suggesting that the peroxovanadate is less susceptible to oxidize highly electronegative halides. This assumption is consistent with the significant decrease of the chloride oxidation resulting from the mutation of Ser402^{vCPO} into an alanine residue in *C. inaequalis* vCPO¹⁰. In the context of this chloroperoxidase, this mutation is innocuous enough to abolish the possibility to oxidize the most electronegative halide, i.e. chloride, while maintaining the possibility to oxidize bromide and iodide. Therefore, the absence of a polar residue at the position 481 in *L. digitata* vIPO1 is likely to explain the inability of *L. digitata* vIPO to oxidize bromide, even if this halide is able to bind to the active cleft, while maintaining the capacity of this enzyme to oxidize the less electronegative iodide.

Taken together, the strict specificity of *L. digitata* vIPO for iodide has likely arisen from an alteration of the halide binding site topology combined with the fine tuning of the vanadate cofactor electronegativity. In an evolutionary point of view, because bromide is still able to compete with iodide in the active site of vIPO, it seems more probable that the ancestral vHPO enzyme in brown algal lineage would have been a bromoperoxidase, suggesting a secondary lost of bromination capability in vIPO, given rise to a novel biochemical function. Up to now, site-directed mutagenesis approaches have been employed to identify important residues in halogenation, essentially on the fungal vCPO and once on red algal vBPO, and were limited to the residues directly involved in hydrogen bonding of vanadate^{9; 10; 11}. Similar approaches extended to brown algal vBPOs and vIPO and to others interesting residues on active site funnel entrance should open new opportunities to investigate halogenation mechanistic and to understand halogen specificities. Together with high-resolution structure determination of a vIPO/halide complex, it will allow to identify halide binding sites and their relevance to the catalytic mechanism of halogenation. With the availability of new functional approaches, it might also allow to understand the emergence of a new biological function with a strict specificity to improve iodine transport in kelps.

Materials and Methods

Plant material- DNA, RNA and vanadium-dependent haloperoxidase purifications

L. digitata sporophytes were collected from the shore in the vicinity of Roscoff (Brittany, France), and frozen in liquid nitrogen. Genomic DNA and total RNA were prepared according to Apt *et al.* ²⁹. The strategies used for the *L. digitata* vBPO and vIPO purifications and MS/MS analyses were described previously ¹⁹.

Enzyme activity assays and steady-state kinetic experiments

Bromo- and iodoperoxidase specific activities were measured for purified vBPO and vIPO fractions as already described ¹⁹. Steady state kinetic reactions were performed in the presence of different iodide, bromide and chloride concentrations. Sodium sulphate was used to maintain a constant ionic strength of 550 mM in the final solution.

cDNA isolation, cloning and sequencing

The *L. digitata* sporophytes cDNA λ ZAP II library ³⁰ was used as a template polymerase chain reaction (PCR) to amplify a cDNA fragment using two degenerated primers (forward; 5'-GACACSGTBAACACSGAGGCBTAT-3' and reverse; 5'-GGCVACGTTVACVGC-3') designed from LC-MS/MS data. A 600-pb PCR fragment was cloned in the pCR 2.1-TOPO vector (Invitrogen) and sequenced on both strands using the ABI prism 3100 genetic analyser (Applied Biosystems). The *L. digitata* sporophytes cDNA library was used a second time to obtain a 5' end fragment of the cDNA using a cDNA λ ZAP II specific primer (forward) and a specific primer from the cloned cDNA fragment (reverse; 5'-ACGCCGTAGTTGACGAAGC-3'). The 220-pb PCR fragment obtained was cloned in the pCR 2.1-TOPO vector and labelled with [α -³²P] dCTP using the Megaprime labelling kit (Amersham Biosciences) to screen the *L. digitata* sporophytes cDNA library. After *in vivo* excision (Stratagene), cDNA clones were sequenced on both strands.

The 5' end cDNA was obtained using the 5' rapid amplification of cDNA ends (RACE) system. First-strand cDNA synthesis and RACE PCRs were performed using the SMART RACE cDNA amplification kit (Clontech) and vIPO1 specific primers (primerRACE1, 5'-CTTGTGGAACGTGGCGGCGGATGA-3' or primerRACE2, 5'-TCGGAGTTGATCGCTGAGGCCGGA-3') according to the manufacturer's recommendations. The RACE products were purified using a QIAquick gel extraction kit (QIAGEN), cloned into the pCR 2.1-TOPO vector (Invitrogen) and fully sequenced.

Primary sequence, structural and phylogenetic analyses

The vIPO1 sequence was obtained from trace data using SequencherTM program version 4.0 (Gene Codes Corporation) and analysed by DNAMAN program version 4.15. Peptide signal was predicted by different programs, SignalP, PSORT and TargetP, and *in silico* digestion by trypsin was performed using the PeptideCutter program (programs available on the www.expasy.org server). The amino acid sequences of vCPOs, vBPOs and vIPO1 were aligned first using MAFFT³¹ (available on bioinformatics.uams.edu/mafft/) and then manually using the GENEDOC software (free access on www.psc.edu/biomed/genedoc). The three-dimensional structures of *C. inaequalis* vCPO (PDB accession no. **1VNC**), *C. officinalis* (PDB accession no. **1QHB**) and *A. nodosum* vBPO (PDB accession no. **1QI9**) were used as guides to ensure that homologous regions were compared. Protein sequence alignments were displayed using ESPript³².

For phylogenetic analyses, when all the sequences were analyzed, only the most conserved portion of the alignment was taken into account, in the region of the active site (see Figure 4), leading to a total of 136 amino acids used for distance-based methods and of 103 amino acids (89 amino acid informative positions) for parsimony analyses. When excluding vCPO sequences, 541 amino acid sites were used in distance-based methods and 492 amino acids (373 informative) for parsimony analyses. Distance matrix and maximum-parsimony methods³³ were applied using the Phylo-Win software package³⁴. The neighbor-joining method³⁵ was performed with PAM distance corrected for multiple substitutions according to Dayhoff's matrix and bootstrap analyses were used to provide confidence estimates for the phylogenetic tree topologies³⁶.

A three-dimensional model for the monomer of vIPO1 was generated by the swiss-model homology-modelling server using the chain A of the structure of *A. nodosum* vBPO as template (PDB accession no. **1QI9**). The model of the homodimeric vIPO was generated by superposing the vIPO1 monomer model to each chain of *A. nodosum* vBPO dimer using Swiss-Pdb Viewer³⁷ (free access on the www.expasy.org/spdbv/ server).

Southern and Northern blot analyses-

Southern analysis was performed as already described¹⁹. For Northern analyses, total RNA (10 µg/lane) was separated by agarose gel electrophoresis, blotted onto nylon filters and hybridized with ³²P-labelled random-primed probes prepared according to the manufacturer's recommendations (Amersham). Northern hybridizations were performed at 42°C overnight with 50% formamide, 7% SDS, 250 mM NaCl, 120 mM Na(PO₄) pH 7.2. Membranes were washed for 10 min at 42°C successively in 2x SSC, 0.1% SDS and in 1x SSC, 0.1% SDS. A 531-bp 3'end specific probe of vBPO1 was prepared by PCR (AAATGGTTGAGACGCCTTGG forward primer;

GCCTTACGCCACGCTTATAA reverse primer) from full-length cDNA¹⁹. Two different *vIPO1* DNA probes were obtained by PCR using the following primers : a 416-bp 5'end *vIPO1* specific probe (in Figure 2 referred to as # 1, CCAGAGGAGGACACCATACAC forward, GTTAAGGTGGAGCGTGCCT reverse) and a 773-bp *vIPO1* intragenic probe (# 2, CCGGAGCAGACTACATGAC forward, GTTGACGGCCAGCTTGTT reverse).

Acknowledgements

This work was supported in part by the European Commission “GROWTH Program”, Research Project AB, Algal Bioadhesives, G5RD-CT-2001-00542, by a Ph.D. grant from the Région Bretagne (to C. C.) and a Ph.D. grant from Brucker-Daltonic (to E.W). We are grateful to Agilent Technologies for providing capillary LC system for MS analyses.

References

1. Gribble, G. W. (2003). The diversity of naturally produced organohalogens. *Chemosphere* **52**, 289-297.
2. Littlechild, J. A. (1999). Haloperoxidases and their role in biotransformation reactions. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **3**, 28-34.
3. de Boer, E. & Wever, R. (1988). The reaction mechanism of the novel vanadium-bromoperoxidase. A steady-state kinetic analysis. *J. Biol. Chem.* **263**, 12326-12332.
4. Arber, J. M., de Boer, E., Garner, C. D., Hasnain, S. S. & Wever, R. (1989). Vanadium K-edge X-ray absorption spectroscopy of bromoperoxidase from *Ascophyllum nodosum*. *Biochemistry* **28**, 7968-7973.
5. Vilter, H. (1995). Vanadium-dependent haloperoxidases. In *Metal ions in biological systems* (Sigel, H. & Sigel, A., eds.), Vol. 31, pp. 325-362. Marcel Dekker, Inc., New York, Basel, Hong Kong.
6. Vollenbroek, E. G. M., Simons, L. H., van Schijndel, J. W., Barnett, P., Balzar, M., Dekker, H. L., van der Linden, C. & Wever, R. (1995). Vanadium chloroperoxidases occur widely in nature. *Biochem. Soc. Trans.* **23**, 267-271.
7. Barnett, P., Hemrika, W., Dekker, H. L., Muijsers, A. O., Renirie, R. & Wever, R. (1998). Isolation, characterization, and primary structure of the vanadium chloroperoxidase from the fungus *Embellisia didymospora*. *J. Biol. Chem.* **273**, 23381-23387.
8. Plat, H., Krenn, B. E. & Wever, R. (1987). The bromoperoxidase from the lichen *Xanthoria parietina* is a novel vanadium enzyme. *Biochem. J.* **248**, 277-279.
9. Butler, A., Carter, J. N. & Simpson, M. T. (2001). Vanadium in proteins and enzymes. In *Handbook on Metalloproteins* (Bertini, I., Sigel, A. & Sigel, H., eds.), pp. 153-179. Marcel Dekker, Inc., New York, Basel.
10. Tanaka, N., Hasan, Z. & Wever, R. (2003). Kinetic characterization of active site mutants Ser402Ala and Phe397His of vanadium chloroperoxidase from the fungus *Curvularia inaequalis*. *Inorg. Chim. Acta* **356**, 288-296.
11. Carter, J. N., Beatty, K. E., Simpson, M. T. & Butler, A. (2002). Reactivity of recombinant and mutant vanadium bromoperoxidase from the red alga *Corallina officinalis*. *J. Inorg. Biochem.* **91**, 59-69.
12. Messerschmidt, A., Prade, L. & Wever, R. (1997). Implications for the catalytic mechanism of the vanadium-containing enzyme chloroperoxidase from the fungus *Curvularia inaequalis* by X-ray structures of the native and peroxide form. *Biol. Chem.* **378**, 309-315.
13. Hemrika, W., Renirie, R., Macedo-Ribeiro, S., Messerschmidt, A. & 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.

14. Weyand, M., Hecht, H.-J., Kiess, M., Liaud, M.-F., Vilter, H. & Schomburg, D. (1999). X-ray structure determination of a vanadium-dependent haloperoxidase from *Ascophyllum nodosum* at 2.0 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **293**, 595-611.
15. Butler, A. (1999). Mechanistic considerations of the vanadium haloperoxidases. *Coord. Chem. Rev.* **187**, 17-35.
16. Renirie, R., Hemrika, W. & Wever, R. (2000). Peroxidase and phosphatase activity of active-site mutants of vanadium chloroperoxidase from the fungus *Curvularia inaequalis*. Implications for the catalytic mechanisms. *J. Biol. Chem.* **275**, 11650-11657.
17. Dau, H., Dittmer, J., Epple, M., Hanss, J., Kiss, E., Rehder, D., Schulzke, C. & Vilter, H. (1999). Bromine K-edge EXAFS studies of bromide binding to bromoperoxidase from *Ascophyllum nodosum*. *FEBS Lett.* **457**, 237-240.
18. Isupov, M. N., Dalby, A. R., Brindley, A. A., Izumi, Y., Tanabe, T., Murshudov, G. N. & Littlechild, J. A. (2000). Crystal structure of dodecameric vanadium-dependent bromoperoxidase from the red alga *Corallina officinalis*. *J. Mol. Biol.* **299**, 1035-1049.
19. Colin, C., Leblanc, C., Wagner, E., Delage, L., Leize-Wagner, E., van Dorsselaer, A., Kloareg, B. & Potin, P. (2003). The brown algal kelp *Laminaria digitata* features distinct bromoperoxidase and iodoperoxidase activities. *J. Biol. Chem.* **278**, 23545-23552.
20. Messerschmidt, A. & Wever, R. (1996). X-ray structure of a vanadium-containing enzyme: Chloroperoxidase from the fungus *Curvularia inaequalis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93**, 392-396.
21. Littlechild, J. A., Garcia-Rodriguez, E., Dalby, A. R. & Isupov, M. N. (2002). Structural and functional comparisons between vanadium haloperoxidase and acid phosphatase enzymes. *J. Mol. Recognit.* **15**, 291-296.
22. Bhattacharya, D. & Medlin, L. (1998). Algal phylogeny and the origin of land plants. *Plant Physiol.* **116**, 9-15.
23. Draisma, S. G. A., Peters, A. F. & Fletcher, R. L. (2003). Evolution and taxonomy in the Phaeophyceae: effects of the molecular age on brown algal systematics. In *Out of the Past* (Norton, T. A., ed.). The British Phycological Society.
24. Almeida, M., Filipe, S., Humanes, M., Maia, M. F., Melo, R., Severino, N., da Silva, J. A. L., Frausto da Silva, J. J. R. & Wever, R. (2001). Vanadium haloperoxidases from brown algae of the Laminariaceae family. *Phytochemistry* **57**, 633-642.
25. Verschueren, K. H., Kingma, J., Rozeboom, H. J., Kalk, K. H., Janssen, D. B. & Dijkstra, B. W. (1993). Crystallographic and fluorescence studies of the interaction of haloalkane dehalogenase with halide ions. Studies with halide compounds reveal a halide binding site in the active site. *Biochemistry* **32**, 9031-9037.
26. Machius, M., Wiegand, G. & Huber, R. (1995). Crystal structure of calcium-depleted *Bacillus licheniformis* alpha-amylase at 2.2 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **246**, 545-559.

27. Fukuyama, K., Sato, K., Itakura, H., Takahashi, S. & Hosoya, T. (1997). Binding of iodide to *Arthromyces ramosus* peroxidase investigated with X-ray crystallographic analysis, ¹H and ¹²⁷I NMR spectroscopy, and steady-state kinetics. *J. Biol. Chem.* **272**, 5752-5756.
28. Fiedler, T. J., Davey, C. A. & Fenna, R. E. (2000). X-ray crystal structure and characterization of halide-binding sites of human myeloperoxidase at 1.8 Å resolution. *J. Biol. Chem.* **275**, 11964-11971.
29. Apt, K. E., Clendennen, S. K., Powers, D. A. & Grossman, A. R. (1995). The gene family encoding the fucoxanthin chlorophyll proteins from the brown alga *Macrocystis pyrifera*. *Mol. Gen. Genet.* **246**, 455-464.
30. Crépineau, F., Roscoe, T., Kaas, R., Kloareg, B. & Boyen, C. (2000). Characterisation of complementary DNAs from the expressed sequence tag analysis of life cycle stages of *Laminaria digitata* (Phaeophyceae). *Plant Mol. Biol.* **43**, 503-513.
31. Katoh, K., Misawa, K., Kuma, K. & Miyata, T. (2002). MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Res.* **30**, 3059-3066.
32. Gouet, P., Robert, X. & Courcelle, E. (2003). ESPript/ENDscript: Extracting and rendering sequence and 3D information from atomic structures of proteins. *Nucleic Acids Res.* **31**, 3320-3323.
33. Fitch, W. M. (1971). Toward defining the course of evolution: minimum change for a specific tree topology. *Syst. Zool.* **20**, 406-416.
34. Galtier, N., Gouy, M. & Gautier, C. (1996). SEAVIEW and PHYLO_WIN: two graphic tools for sequence alignment and molecular phylogeny. *Comput. Appl. Biosci.* **12**, 543-548.
35. Saitou, N. & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**, 406-425.
36. Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* **39**, 783-791.
37. Guex, N. & Peitsch, M. C. (1997). SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis* **18**, 2714-2723.

Table 1. LC-MS/MS analyses of purified vIPO tryptic digests and comparison with *A. nodosum* and *F. distichus* vBPO protein sequences.

vIPO (obs) MH ⁺	Partial peptide alignment	vIPO (obs) MH ⁺	Partial peptide alignment
1217.70	d-vIPO_Pept1 ... DPQSKLFR	1096.66	d-vIPO_Pept6 ...GRPGVLDLDR
	n-vBPO 150 DFLSQLFR	1396.78	d-vIPO_Pept7 NGEIN GRPGVLDLDR
	d-vBPO 269 DFFSQLFR		n-vBPO 383 VAAIN AAQNPNE
			d-vBPO 502 VAEIN AAQNPNE
1611.86	d-vIPO_Pept2 DFTIDSITV T...	946.6	d-vIPO_Pept8 LAVNVAFGR
	n-vBPO 198 SFTIDSITV E		n-vBPO 472 LAVNVAFGR
	d-vBPO 317 SFTIDAITV E		d-vBPO 591 LAVNVAFGR
1422.76	d-vIPO_Pept3 LVAADITV NTEAYR	1656.9	d-vIPO_Pept9 IDSELG LLGETAAVR
1452.78	d-vIPO_Pept4 LVAADITV NTEAYR		n-vBPO 489 FDGIQ GLLLGETITVR
	n-vBPO 274 VTFIDN INTEAYR		d-vBPO 608 FDGIQ GLLLGETITVR
	d-vBPO 393 VSFVDN INTEAYR		
1646.88	d-vIPO_Pept5 AAISAPGL NGFYADSSR	2098.10	d-vIPO_Pept10 ILQQE AVAYPENAR
	n-vBPO 295 DAFNRA GVNGFFIDIDR	2150.05	d-vIPO_Pept11 ...PENAGYEFR
	d-vBPO 414 GAFSR PGINGFFIDSDR		n-vBPO 505 TLHQE LMTFAEESTFEFR
			d-vBPO 624 TLHQE LMTFAEESTFEFR

Precursor ions obtained by LC-MS/MS are reported in the 1st and 3rd columns. The 2nd and 4th columns correspond to partial peptide sequence alignments of *de novo* sequenced vIPO peptides (Ld-vIPO_Pept) and vBPOs. Conserved residues in all sequences are in white capitals on a black background; residues that occur in at least one vIPO peptide sequences and at least one vBPO are in black capitals on a gray background. An-vBPO, vBPO from *A. nodosum* (GenBank accession no. [P81701](#)); Fd-vBPO, vBPO from *F. distichus* (GenBank accession no. [AAC35279](#)). Peptide positions are indicated before each sequence.

Table 2. Kinetic parameters of purified *L. digitata* vIPO and vBPO obtained from the rates of triiodide formation at pH 6.2 and monochlorodimedone bromination at pH 6.1.

Enzyme	Iodide kinetics			Bromide kinetics		
	$K_m^{I^-}$ (mM)	$kcat^{I^-}$ (s ⁻¹)	$kcat^{I^-}/K_m^{I^-}$ (s ⁻¹ .mM ⁻¹)	$K_m^{Br^-}$ (mM)	$kcat^{Br^-}$ (s ⁻¹)	$kcat^{Br^-}/K_m^{Br^-}$ (s ⁻¹ .mM ⁻¹)
IPO	2.5	462	185	-	-	-
BPO	18.1	38	2	0.5	75	150

Table 3. Correspondences between observed LC-MS data from the purified vIPO tryptic digests and the theoretical digests of vIPO1 from *L. digitata*

vIPO (obs.)	vIPO1 (calc.)		
MH ⁺	MH ⁺	Tryptic peptide residues	ΔM
<i>Da</i>	<i>Da</i>		μm
2451,13	2451,14	86-107	4
1217,70*	1217,66 (1 MC)	242-251	33
1061,58	1061,54	243-251	38
1880,08	1880,02	252-269	32
1611,86*	1611,79 (MSO)	270-283	43
1452,78*	1452,73	325-341	34
1524,84	1524,80	342-356	26
1646,68*	1646,81	357-373	79
1594,84	1594,78 (MSO)	374-386	38
1197,78	1197,71	427-437	58
2025,19	2025,14 (1 MC)	427-444	25
1396,78*	1396,73	449-461	36
1656,96*	1656,91	558-573	30
2098,10*	2098,02	574-591	38

The monoisotopic masses of purified vIPO observed by LC-MS (1st column) were compared with the calculated vIPO1 tryptic digest masses (2nd column); accuracies are indicated in the 4th column. Residues positions are reported in the 3rd column. The peptides, partially or fully sequenced by LC-MS/MS, are shown in bold, and those already mentioned in Table 1 were marked with an asterisk. Abbreviations: MSO, oxidation of methionine to sulfoxide; MC, miss cleavage.

Figure legends

Figure 1. Iodoperoxidase specific activity of the purified *L. digitata* vIPO and effect of bromide or chloride.

(A) Iodoperoxidase specific activity of the purified vIPO as a function of iodide or (B) as a function of bromide (◆-◆) or chloride (*-*) concentrations (the iodide concentration is fixed at 6.1 mM). (C) Primary double reciprocal plot of the rate of triiodide formation as a function of iodide concentration at fixed bromide concentration at pH 6.2. 500 mM KBr (●-●), 100 mM KBr (○-○), 50 mM KBr (*-*), 10 mM KBr (□-□), 3mM KBr (Δ-Δ) and 0 mM KBr (◇-◇). Each line is the linear least squares fit to data. For each bromide concentration, K_m^{-1} of vIPO is reported in the table under the plot.

Figure 2. Transcription analysis of *vIPO1* and *vBPO1* genes from *L. digitata*.

(A) Physical map of *vIPO1* cDNA showing Open Reading Frames (black arrows) and the position of the two different DNA probes (gray squares), used for hybridizations; probe # 1 is specific of the 5' end region and probe # 2 corresponds to conserved active site region of vIPO1. (B) Northern blot hybridizations of total RNA, with a 3'end *vBPO1* specific probe (first lane) and with the # 1 and # 2 *vIPO1* probes (see above).

Figure 3. Southern blot hybridization of *L. digitata* genomic DNA with an intragenic probe from *vIPO1* cDNA. *L. digitata* genomic DNA was digested with *SalI*, *SalI/XhoI*, *XhoI* (lanes 1 to 3 respectively).

Figure 4. Multiple amino acid sequence alignment of algal vBPOs and vIPO1.

An-vBPO, vBPO from *A. nodosum* (GenBank accession no. **P81701**); Ld-vBPO1, vBPO1 from *L. digitata* (GenBank accession no. **CAD37191**); Ld-vIPO1, vIPO1 from *L. digitata* (This study); Co-vBPO, vBPO from *C. officinalis* (GenBank accession no. **1QHBA**). Conserved residues in all four sequences are in white capitals on a black background, residues that occur in at least three sequences are in bold black capitals and surrounded by black boxes. Secondary structures (α -helices and β strands) of the An-vBPO and Co-vBPO are indicated on top and bottom lines, respectively, according to their resolved crystal structures^{14; 18}. Upon the alignment, the portion used for phylogenetic analyses is flanked by *white triangles* and the six cysteine residues involved in intramolecular disulphide bridges in An-vBPO structure are marked with an *asterisk*. Below the alignment, the vanadate H-bonding residues are indicated with a *black triangle up*, the covalent link of the vanadate

group with a *black solid circle*, the extra-histidine residue of the vBPO class with a *black triangle down* and the catalytic histidine residue with a *star*.

Figure 5. Phylogeny of vanadium-dependent haloperoxidases.

The topology shown here is the tree obtained using the Neighbor-Joining method (with the Dayhoff's PAM matrix), with 137 amino acids used in the analyses, covering the active site region (see Figure 4). The scale bar represents the expected number of changes per sequence position. Numbers at the nodes refer to the bootstrap values (100 replicates) in distance and maximum-parsimony analyses, respectively. Absence of data indicates that the node was not reliable. Ed-vCPO, vCPO from *Embellisia didymospora* (GenBank accession no. [CAA72344](#)); Db-vCPO, vCPO from *Drechslera biseptata* (GenBank accession no. [CAA72008](#)); Ci-vCPO, vCPO from *C. inaequalis* (GenBank accession no. [1VNC](#)); Mg-HypProt, hypothetical protein from *Magnaporthe grisea* (GenBank accession no. [EAA54225](#)); Co-vBPOp, vBPO from *C. officinalis* obtained by protein sequencing (GenBank accession no. [1QHBA](#)); Co-vBPOc, cloned vBPO from *C. officinalis* (GenBank accession no. [AAM46061](#)); Cp-vBPO1, vBPO1 from *C. pilulifera* (GenBank accession no. [BAA31261](#)); Cp-vBPO2, vBPO2 from *C. pilulifera* (GenBank accession no. [BAA31262](#)); Ld-vBPO1, vBPO1 from *L. digitata* (GenBank accession no. [CAD37191](#)); Ld-vBPO2, vBPO2 from *L. digitata* (GenBank accession no. [CAD37192](#)); Ld-vIPO1, vIPO1 from *L. digitata* (this study); Fd-vBPO, vBPO from *Fucus distichus* (GenBank accession no. [AAC35279](#)); An-vBPO, vBPO from *A. nodosum* (GenBank accession no. [P81701](#)).

Figure 6. Comparison of the active site structure of different algal vHPOs.

(A) *C. inaequalis* vCPO (PDB accession no. [1VNC](#)), (B) *C. officinalis* vBPO (PDB accession no. [1QHB](#)), (C) *A. nodosum* vBPO (PDB accession no. [1QI9](#)) and (D) the modellized *L. digitata* vIPO1. In the center of the picture, are represented vanadate (A, C and D) or the inorganic phosphate (B). Residues are drawn in atom colors and dashed lines indicate hydrogen-bonding contacts with vanadate.

Figure 7. Structures of active site funnel entrances of the crystallized *A. nodosum* vBPO (A, B) and the modellized *L. digitata* vIPO (C, D).

(A, C) Residues are drawn in atom colors excepted vanadate that appears in red and the main different residues between vBPO and vIPO that are colored in green and blue. (B, D) Stereo view representations of the funnel entrance surface. For color codes residues, see above.

FIGURE 1

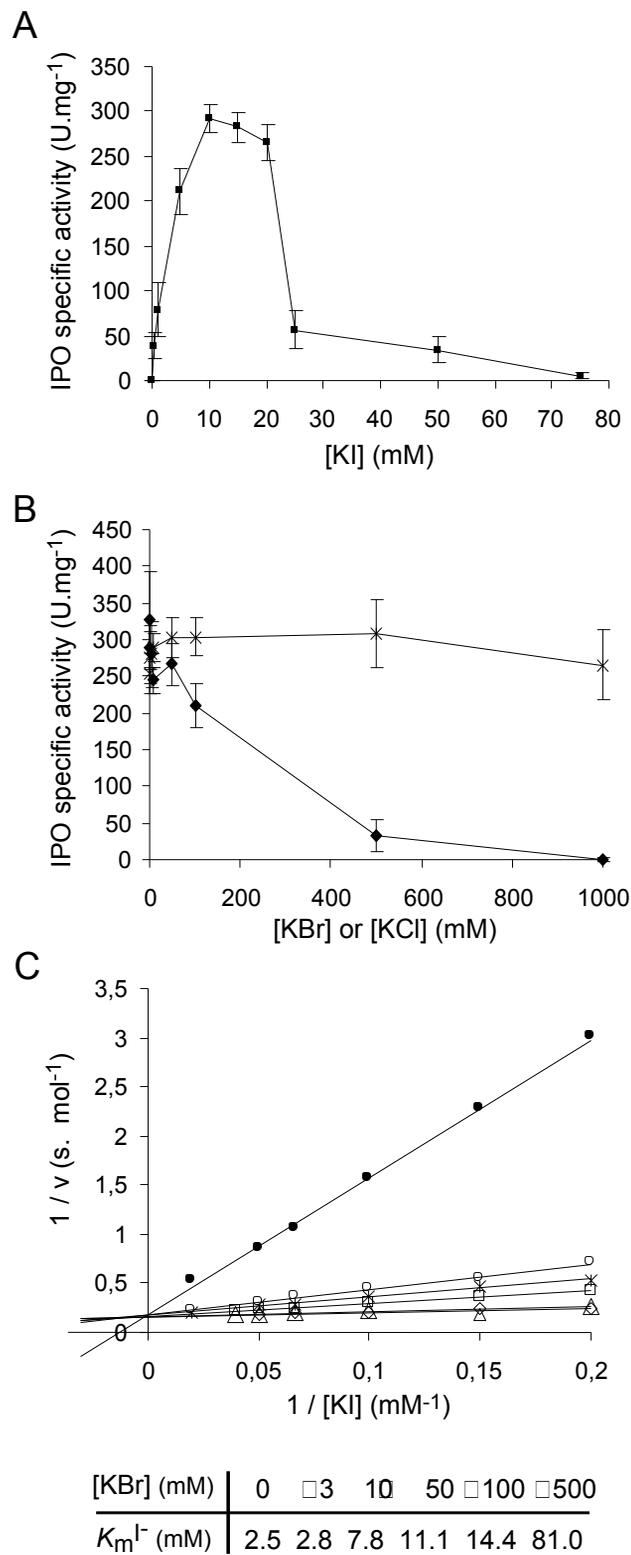


FIGURE 2

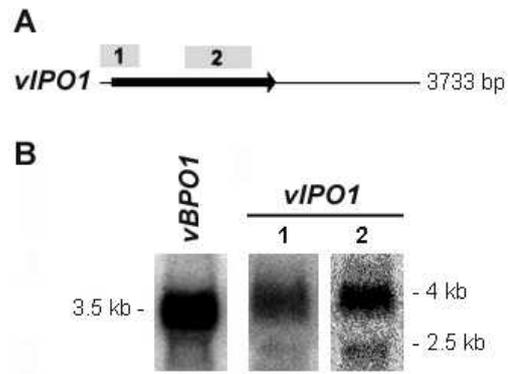


FIGURE 3

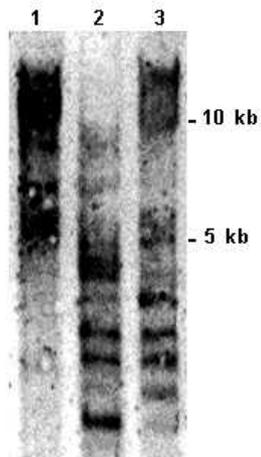


FIGURE 4

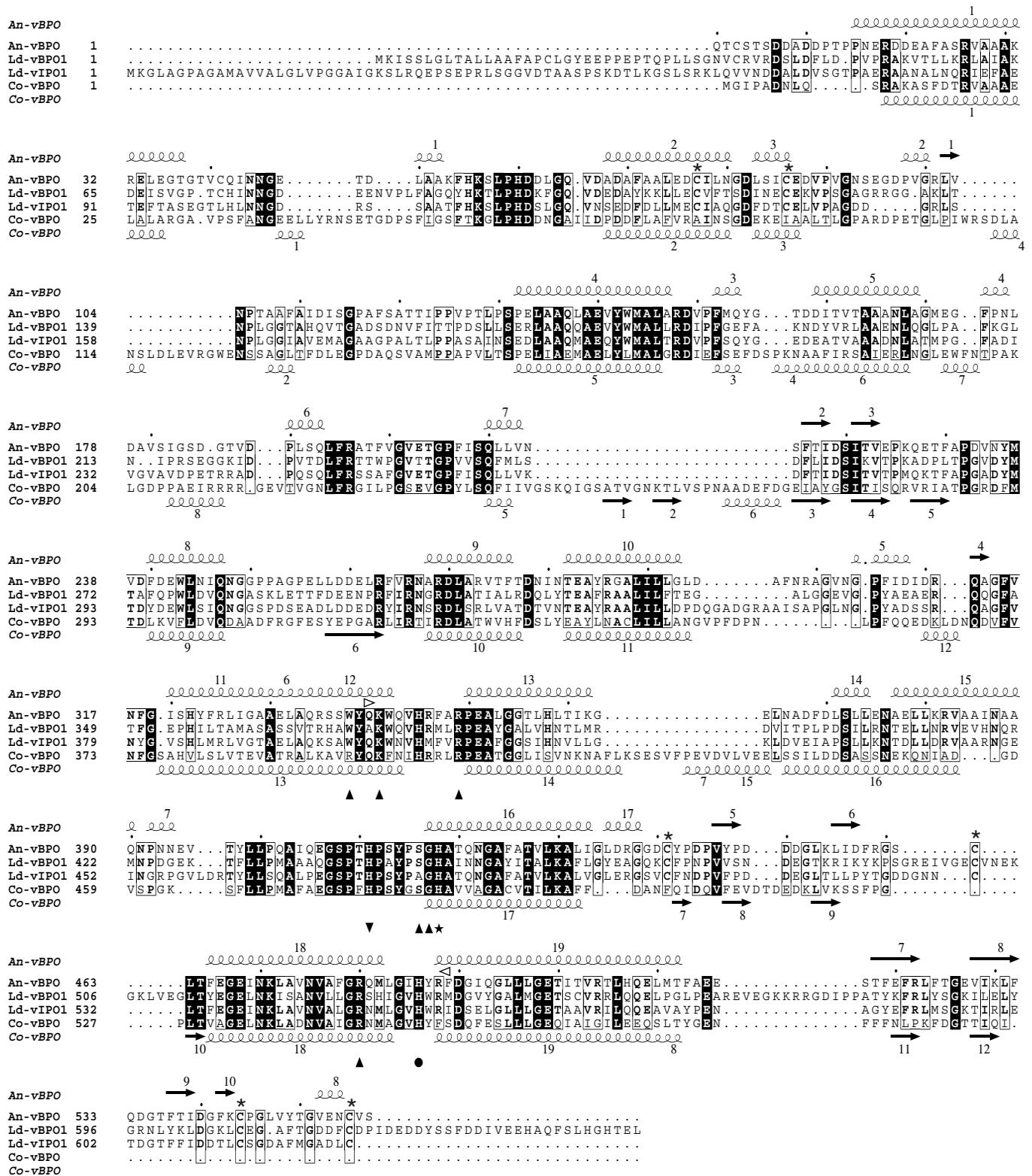


FIGURE 5

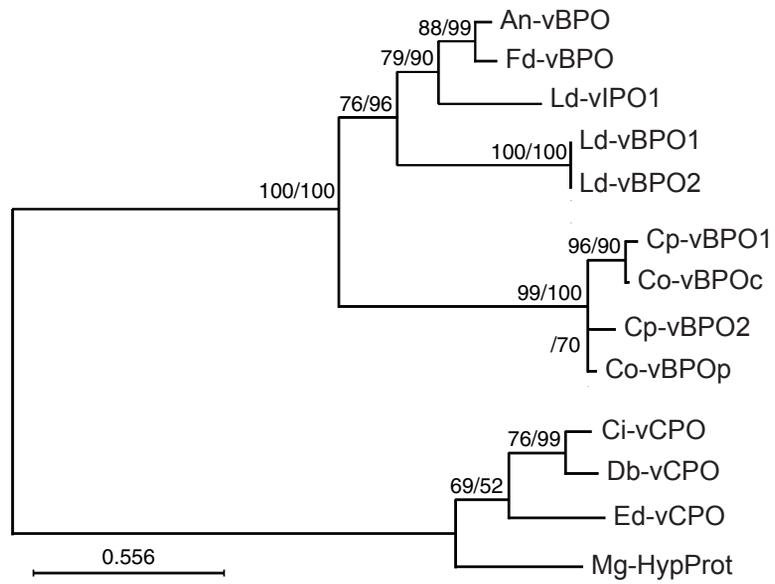


FIGURE 6

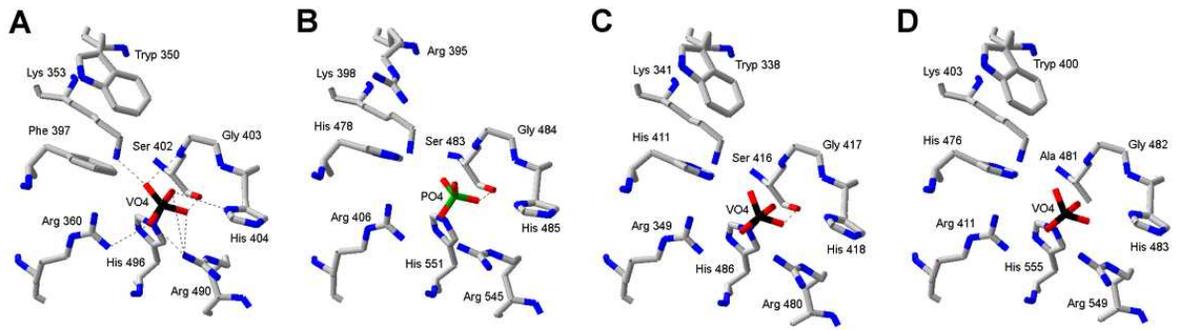
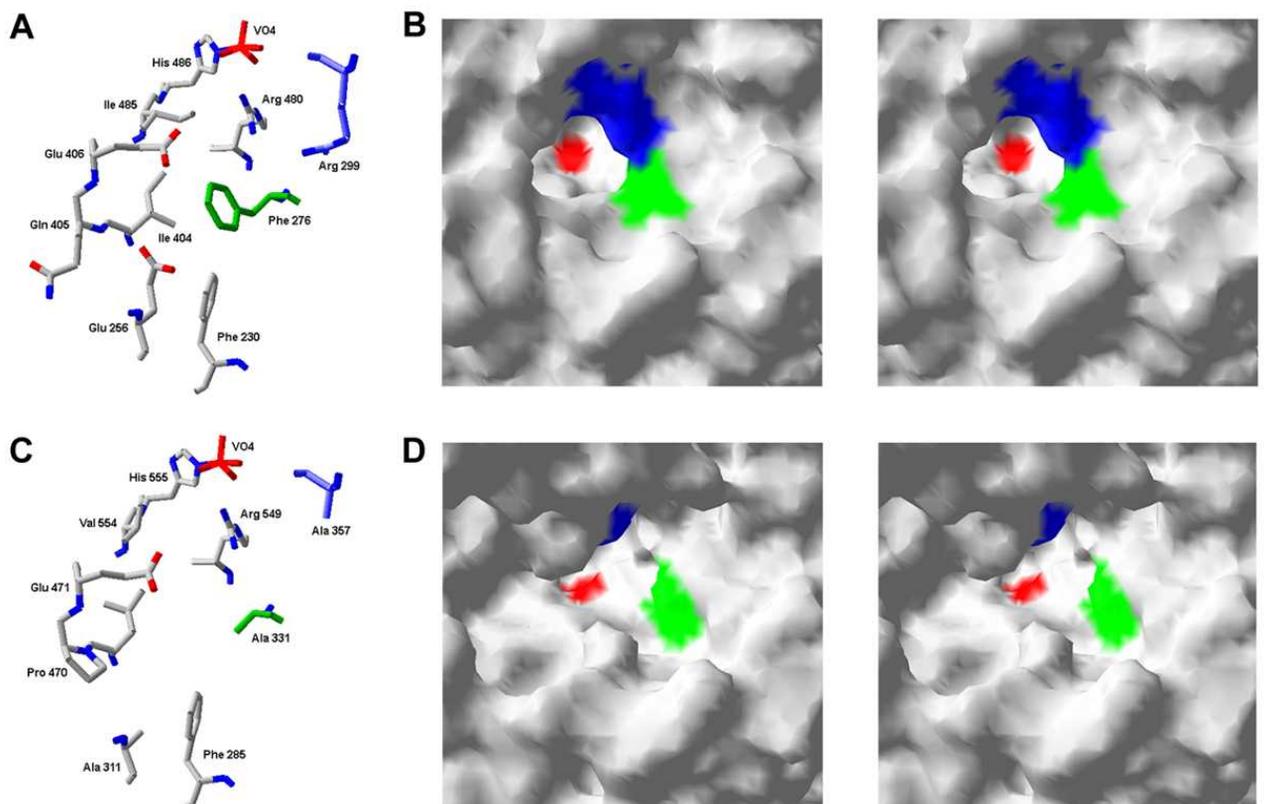


FIGURE 7



**CHAPITRE 4 : ROLES DES vHPOs : UN LIEN ENTRE LE METABOLISME
HALOGENE ET LES MECANISMES DE DEFENSE ?**

Ce chapitre ne faisant pas l'objet d'article, nous présenterons tout d'abord les résultats, qui seront suivis d'une discussion.

I- Résultats

A. Expression des vHPOs chez *L. digitata*

L'expression des gènes de vHPOs a été analysée par *Northern blot* chez les sporophytes de *L. digitata* (**Figure 49**).

L'hybridation des ARN totaux avec un fragment spécifique de l'extrémité 3' de *vBPO1* révèle un transcrite de ~3.5 kb qui correspond à la taille des deux ADNc *vBPO1* et *vBPO2* (3,379 pb et 3,420 pb, respectivement).

En comparaison, deux transcrits sont observés après hybridation avec une sonde intragénique de *vIPO*, le plus abondant étant de ~4 kb. En utilisant une sonde spécifique de l'extrémité 5' ou de l'extrémité 3' non codante de *vIPO1*, seule la bande à 4 kb apparaît mais avec une intensité d'hybridation plus faible. Aucun transcrite n'est détecté après hybridation avec une sonde spécifique de l'extrémité 3' non codante de *vIPO2*.

La bande à ~2.5 kb, qui disparaît en utilisant une sonde de l'extrémité 3' non codante, correspondrait vraisemblablement à la maturation du transcrite *vIPO* de 4 kb. Cependant nous ne pouvons pas exclure qu'il puisse représenter un autre transcrite plus court. Enfin, les différences de niveaux d'expression après hybridation avec une sonde intragénique et une sonde spécifique de l'extrémité 3' de *vIPO1* mettent en évidence l'existence de plusieurs transcrits *vIPOs*. Ceci pourrait expliquer la différence entre le poids moléculaire de la protéine putative *vIPO1* et celui de la *vIPO* purifiée (*Cf Résultats, Chapitre 2*).

Le gène de *vBPO*, *pLd-vBPO*, fortement exprimé dans les protoplastes (correspondant à des cellules en état de stress intense), est au contraire faiblement transcrite dans les sporophytes, en

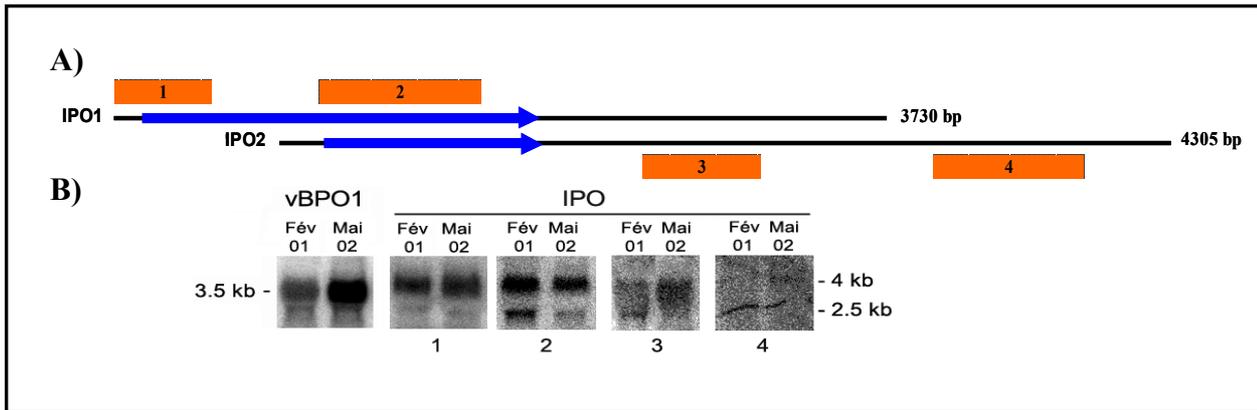


Figure 49 : Expression des vHPOs chez les sporophytes de *L. digitata*.

A) Cartographie schématique des ADNc *vIPO1* et *vIPO2* et localisation des sondes nucléotidiques, numérotées de 1 à 4, utilisées pour les *Northern blots*. **B)** *Northern blot* réalisé à partir d'ARN totaux extraits d'algues récoltées en février 2001 et en mai 2002, avec une sonde spécifique de la partie 3' de *vBPO1-2* et les sondes *vIPO*, notées de 1 à 4, indiquées en (A).

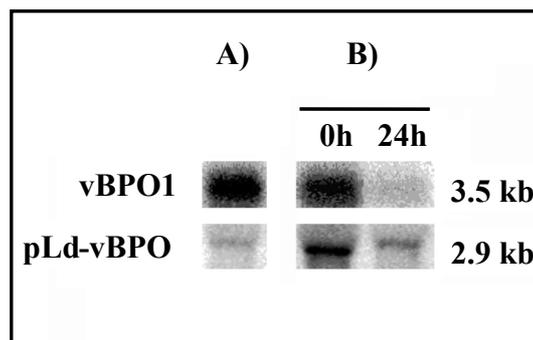


Figure 50 : Expression des vBPOs chez les sporophytes (A) et les protoplastes (B) de *L. digitata*.

Les analyses en *Northern blot* ont été réalisées en utilisant des sondes spécifiques de l'extrémité 3' non codante de *vBPO1-2* ou de *pLd-vBPO*.

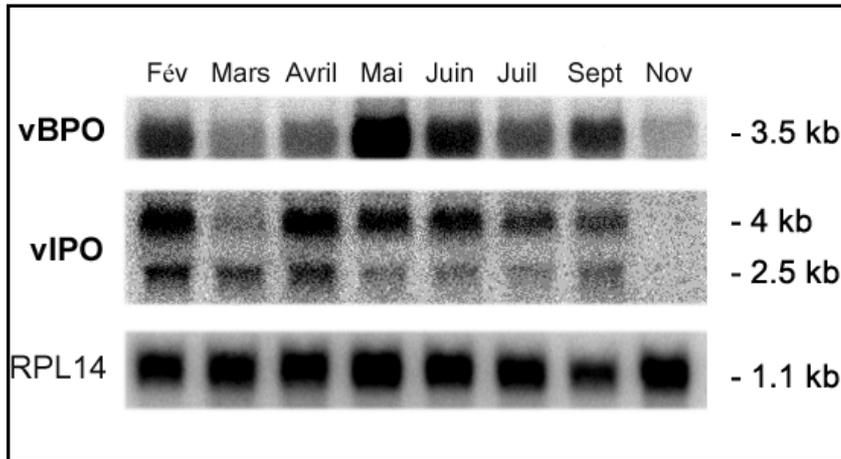


Figure 51 : Expression des gènes de bromoperoxydases (vBPO) et d'iodoperoxydases (vIPO) dans des sporophytes de *L. digitata* récoltés sur la grève au cours de l'année. Les *Northern blots* ont été réalisés en utilisant des sondes intragéniques. Pour contrôle, les mêmes profils d'ARN totaux ont été hybridés avec une sonde de protéine ribosomale RPL14.

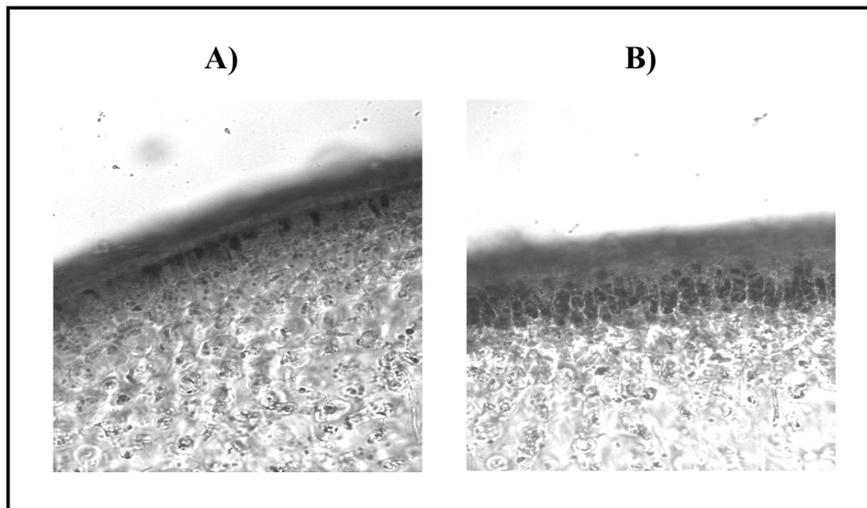


Figure 52 : Coupes de thalle de sporophytes de *L. digitata* et détection des activités peroxydases, en présence d'o-dianisidine (0.1 mM) et après élicitation (B) ou non (A) par des oligo-gulonates.

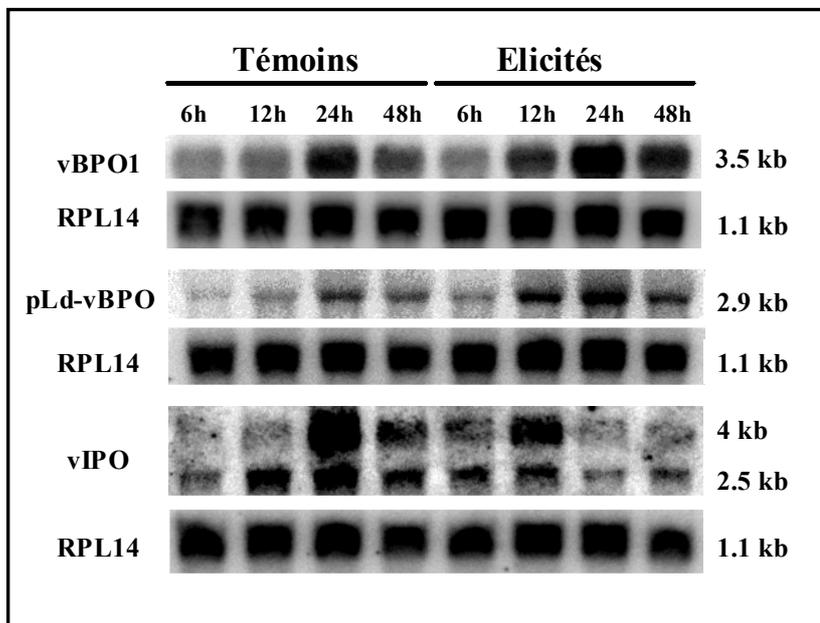


Figure 53 : Cinétique d'expression des gènes de vBPO chez des sporophytes de *L. digitata* élicités ou non (témoins) par des oligo-gulonates. Les deux sondes de vBPO utilisées pour les *Northern blots* sont spécifiques de l'extrémité 3' de vBPO1-2 ou de pLd-vBPO, tandis que la sonde de vIPO1 est intragénique. Pour contrôle, les mêmes profils d'ARN totaux ont été hybridés avec une sonde de protéine ribosomale RPL14.

conditions normales (**Figure 50**). A l'inverse, le transcrit *vBPO1* est plus faiblement représenté dans l'ARN total préparé à partir de protoplastes.

L'analyse en *Northern blot* de l'expression des vHPOs, chez des sporophytes sauvages récoltés sur la grève, met en évidence que le niveau d'expression des transcrits varie nettement au cours de l'année (**Figure 51**). Il semblerait que l'expression de ces transcrits ait tendance à augmenter au printemps et au début de l'été

B. Régulation des vHPOs

1. Elicitation par les oligo-guluronates

Systématiquement, l'application d'oligo-guluronates sur les sporophytes de *L. digitata* se traduit, dès les premières minutes (1 à 3 minutes), par une augmentation rapide et transitoire de la concentration en peroxyde d'hydrogène (de l'ordre d'une dizaine de μM) dans l'eau de mer, où sont incubées les algues.

Chez les sporophytes de *L. digitata* élicités par des oligo-guluronates une augmentation des activités peroxydases, *in vivo*, est détectée au niveau du cortex (**Figure 52**).

Dans les sporophytes de *L. digitata* élicités par des oligo-guluronates, les gènes de *vBPOs* (*vBPO1-2* ou *pLd-vBPO*) sont fortement induits 12 à 24 heures après élicitation (**Figure 53**). Les transcrits de *vIPO* sont induits plus précocement suite à cette même élicitation (induction 6 à 12 heures après élicitation) (**Figure 53**). Cependant, chez les sporophytes non élicités mais simplement manipulés au cours de l'expérience, nous constatons également une forte augmentation de l'expression des transcrits de *vBPOs* et de *vIPO* entre 12 et 24 heures.

Nous avons également suivi, par *Western blot*, les niveaux protéiques des vBPO et vIPO dans les sporophytes de *L. digitata*, après élicitation ou non par des oligo-guluronates. Nous avons observé, dans certains cas, par hybridation avec l'anticorps spécifique anti-vBPO1 de *L. digitata*, une augmentation de la quantité des vBPOs, dès 6 heures après élicitation (**Figure 54**). Par contre, l'hybridation avec l'anticorps anti-vBPO d'*Ascophyllum*

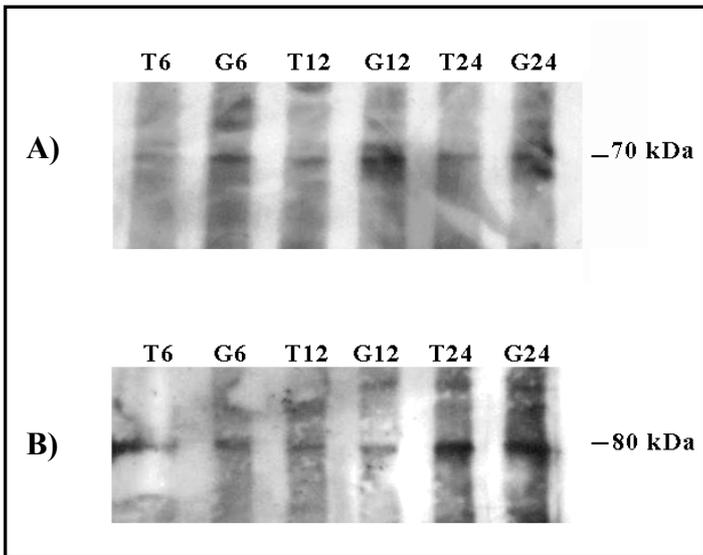


Figure 54 : Suivi en *Western blot* des vBPO et vIPO chez des sporophytes de *L. digitata* élicités (G) ou non (T) par des oligogulonates. A) Hybridation avec l'anticorps anti-vBPO1. B) Hybridation avec l'anticorps anti-vBPO d'*Ascophyllum nodosum*.

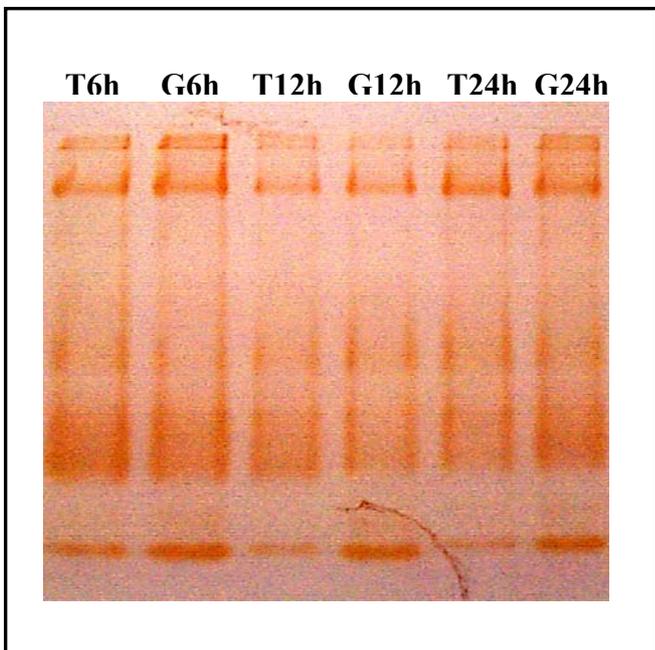


Figure 55 : Suivi des activités vHPOs suite à une élicitation des sporophytes par des oligogulonates.

T : témoins ; G : élicités.

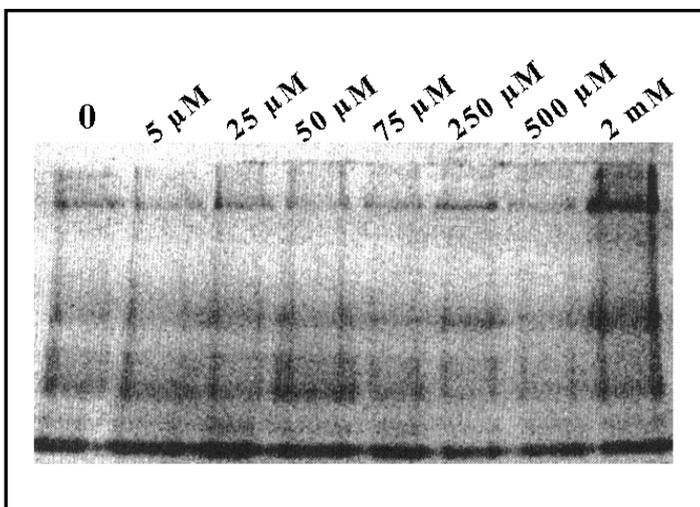


Figure 56 : Détection des activités vHPOs une heure après l'application, sur les sporophytes de *L. digitata*, de diverses concentrations en peroxyde d'hydrogène (de 0 à 2 mM).

nodosum (spécifique de vIPO chez *L. digitata* ; *Résultats, Chapitre 1*) semble indiquer que la quantité de vIPO ne varie pas suite à une élicitation par les oligo-guluronates (**Figure 54**). Cependant une nette augmentation de vIPO est observée dans les échantillons après 24 heures mais indépendamment de l'élicitation.

Chez les sporophytes de *L. digitata*, le profil, sur gel natif, des activités vHPOs, suite à une élicitation par les oligo-guluronates est relativement variable selon les expériences. Nous avons effectué des suivis cinétiques des activités vHPOs jusqu'à 48 heures après élicitation et la majorité des expériences menées semble indiquer que le niveau, relativement élevé, et le profil des activités vBPOs et de l'activité vIPO ne changent pas suite à l'élicitation. Cependant dans certains cas nous avons pu observer l'augmentation des activités vHPOs, et en particulier de l'activité vIPO, dès 6 heures après élicitation et ceci jusqu'à 24 heures (**Figure 55**).

2. Autres effecteurs potentiels

Nous avons observé, chez les sporophytes de *L. digitata*, l'évolution des activités vHPOs après application de différentes concentrations en peroxyde d'hydrogène (de 5 μ M à 2 mM). Une heure après l'ajout de 2 mM de peroxyde d'hydrogène les activités vHPOs augmentent, et surtout les activités vBPOs (**Figure 56**).

Nous avons analysé la régulation des activités vHPOs après l'application de divers produits intervenant dans le métabolisme lipidique ou susceptibles de le perturber. L'application de 200 μ M de clofibrate sur les sporophytes de *L. digitata* induit, au bout de 10 minutes, un burst oxydant d'amplitude comparable mais plus tardif que celui observé chez l'algue élicitée par les oligo-guluronates (**Figure 57 A**). A une concentration plus faible, de 100 μ M, le clofibrate déclenche encore un burst oxydant. Par contre, en dessous de 50 μ M, aucune augmentation significative de la concentration en peroxyde d'hydrogène n'a pu être détectée. De plus, une augmentation de l'activité des vHPOs, et surtout de l'activité vIPO, est observée 4 heures après l'application du clofibrate (**Figure 57 B**). L'intensité de la détection augmentant avec les concentrations en clofibrate, cette activation des vHPOs paraît être dose-dépendante.

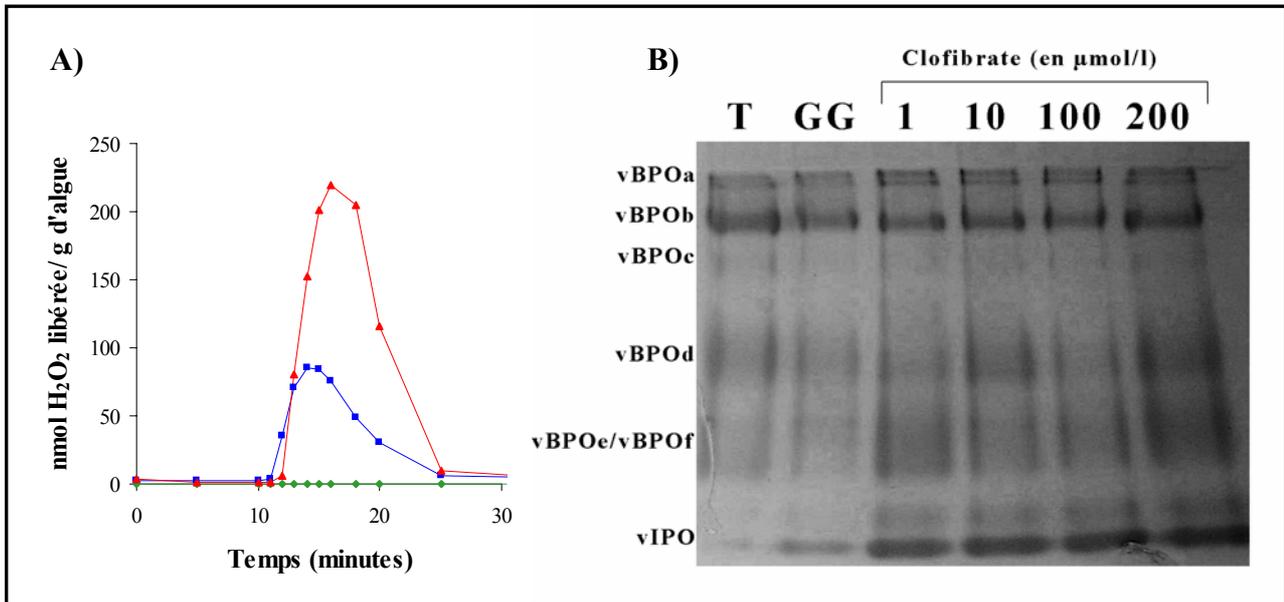


Figure 57 : Effet de l'application du clofibrate sur les sporophytes de *L. digitata*. **A)** Cinétique d'émission du peroxyde d'hydrogène (en vert : témoin ; en bleu : clofibrate 100 μM ; en rouge : clofibrate 200 μM). **B)** Suivi des activités vHPOs 4 heures après élicitation par des oligogulonates ou diverses concentrations en clofibrate.

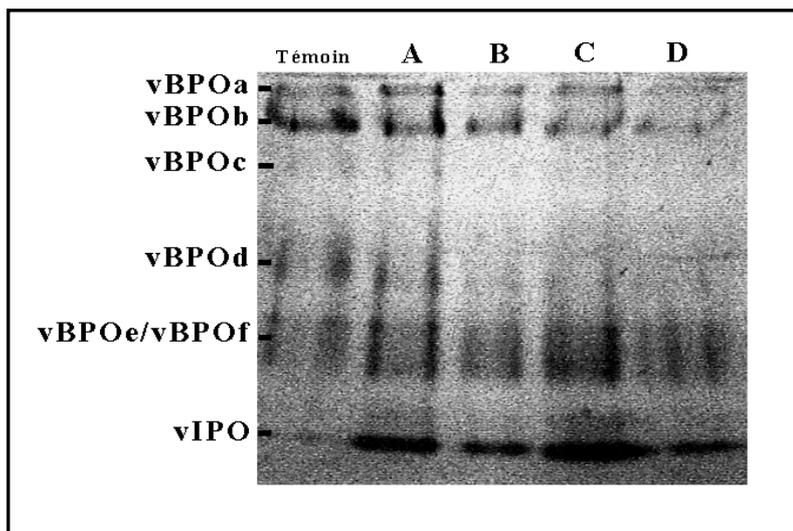


Figure 58 : Effet de l'application de différentes oxylipines sur les activités vHPOs des sporophytes de *L. digitata*. **(A)** 5-pregnen-3- β -ol-20-one, **(B)** 12 β -hydroxy- Δ^4 -pregnen-3-one, **(C)** 11 β -hydroxyprogestérone et **(D)** 12-hydroxystéaric. Les activités vHPOs sont détectées 8 heures après application des oxylipines.

De la même façon, l'effet de quatre oxylipines (ou acides gras hydroxylés) a été testé sur le burst oxydant et sur les activités vHPOs. Bien que ces composés n'induisent pas de burst oxydant chez *L. digitata*, l'activité vIPO semble augmenter 8 heures après application des oxylipines testées (**Figure 58**).

II- Discussion

A) Transcription des vHPOs chez *L. digitata*

L'étude de la transcription des vHPOs, et en particulier celle de la vIPO, suggère que les ARNm sont rapidement maturés et que des transcrits homologues sont présents. En effet, chez *L. digitata*, les vHPOs forment des familles multigéniques (*Cf Résultats, Chapitre 3*). L'existence de plusieurs transcrits suppose donc des fonctions différentes, des régulations différentes ou/et des localisations sub-cellulaires distinctes. Cette troisième hypothèse est renforcée par la présence de deux transcrits très similaires chez *L. digitata*, vBPO1 et vBPO2, qui possèdent des peptides signaux différents (*Résultats, Chapitres 2*).

L'étude du transcriptome de *L. digitata* (Crépineau et coll., 2000) avait permis de mettre en évidence que les transcrits correspondant aux ADNc vBPO1-2 (représentant 2.4 % des ARNm totaux) faisaient partie des ARNm fortement exprimés. Par contre, lors de cette étude aucune EST correspondant à l'ADNc vIPO1 n'avait été identifiée. En effet, chez des sporophytes, en conditions normales, les transcrits vBPO1-2 semblent constitutifs alors que le niveau de transcription des vIPOs paraît relativement faible (voir notamment Figure 53, Témoins à 6 heures).

B) Rôle des vHPOs dans l'absorption de l'iode chez *L. digitata*

Nous avons pu mettre en évidence une variation de l'expression des vHPOs de *L. digitata* au cours de l'année avec une tendance à l'augmentation au printemps et au début de l'été. Des travaux récents ont montré que les teneurs en iode, dans cette algue, diminuaient au cours de l'été et augmentaient en hiver (Ar Gall et coll., *non publié*). Ces résultats suggèrent donc qu'en été, lors des périodes de stress abiotiques (stress lumineux et de température), la

mobilisation de l'iode est accrue, ce qui suppose des niveaux de *turn-over* élevés et donc une absorption plus importante de cet élément. Les gènes d'haloperoxydases seraient donc plus fortement exprimés durant l'été pour contribuer d'une part, dans le cas particulier de la vIPO, au maintien du stock d'iodure intracellulaire. L'activation d'une vIPO, spécifique de l'iode, permettrait dans ces conditions, de concentrer plus efficacement et plus rapidement des iodures. La probabilité que cette enzyme soit impliquée, de façon prédominante, dans l'absorption de l'iode est d'autant plus grande que cette enzyme corticale et pariétale est absente chez les gamétophytes qui ne concentrent pas l'iode (*Résultats, Chapitre I*). Outre sa capacité exceptionnelle à concentrer l'iodure, *L. digitata*, et les algues en général, ont la propriété de produire de fortes quantités de composés organiques volatiles halogénés et notamment lors des périodes d'exposition lumineuse (Carpenter et coll., 1999). Dans ce contexte, l'induction de l'expression des vHPOs et en particulier des vBPOs durant l'été pourrait également contribuer à une augmentation de la production de composés halogénés en réponse au stress.

Cependant, il ne faut pas oublier, que pour cette étude, les algues sauvages ont été récoltées à marée basse, c'est-à-dire quand l'émission des VHOC est la plus élevée (Carpenter et coll., 1999). Ces résultats correspondent donc à des tendances et nous ne pouvons, bien sûr, pas exclure des variations de transcription journalières.

C. Rôle des vHPOs dans la défense

1. Les vBPOs : des enzymes de détoxification des espèces activées de l'oxygène ?

Chez *L. digitata*, l'expression des vHPOs est induite lors du stress oxydant provoqué par l'élicitation des algues par des oligo-gulonates. En particulier, les activités vBPOs augmentent rapidement en présence d'une quantité de peroxyde d'hydrogène similaire à celle rencontrée dans l'apoplasme lors d'un burst oxydant. De plus, nous avons pu mettre en évidence que ces activités peroxydases étaient confinées au niveau du cortex, c'est-à-dire dans la région où se situe le burst oxydant (Küpper et al., 2001). De par le mécanisme d'action des vHPOs, conduisant à la consommation de peroxyde d'hydrogène, l'induction de ces enzymes, lors d'un stress oxydant, et particulièrement des vBPOs, renforce l'idée de leur rôle direct dans la détoxification des espèces activées de l'oxygène (Manley et coll, 2001).

Cette notion d'enzyme antioxydante est renforcée par l'approche EST menée sur des protoplastes de sporophytes de *L. digitata*, qui a permis d'identifier les transcrits différenciellement exprimés lors d'un stress extrême (absence de paroi cellulaire et importante concentration en espèces activées de l'oxygène dans le milieu extérieur) (Roeder et coll., *non publié*). Un transcrit de vBPO, *pLd-vBPO*, représente le 2^{ème} transcrit le plus différenciellement exprimé dans les protoplastes (après une *Heat-shock protein 70*). Par contre, les transcrits *vBPO1-2*, bien qu'abondants, ne semblent pas surexprimés par rapport aux sporophytes. Le transcrit *pLd-vBPO* serait donc plus particulièrement recruté lors de stress oxydant intense. Bien que les vBPOs constituent les principales enzymes antioxydantes détectées par cette étude, des enzymes intervenant dans le système thiorédoxine connu comme régulateur de potentiel redox et intervenant en réponse à un stress oxydant sont également induites. Des transcrits de phospho gluconate déshydrogénase, protecteur putatif des cellules lors d'un stress oxydant, sont également différenciellement détectés (Roeder et coll., *non publié*). Par contre, aucun autre transcrit d'enzymes clé de détoxification chez les animaux ou les plantes telles la catalase, la superoxyde dismutase, la glutathion peroxydase ou l'ascorbate peroxydase (Mittler, 2002) n'a été identifié dans les protoplastes de *L. digitata* (Roeder et coll., *non publié*).

Ainsi, un mécanisme original et particulier de détoxification du peroxyde d'hydrogène, lors d'un stress, faisant intervenir le métabolisme halogéné, via l'activation des vHPO, aurait été développé chez *L. digitata*.

2. Les vHPOs : des enzymes impliquées dans la défense ?

Chez *L. digitata*, suite à l'élicitation par des oligo-gulonates, le burst oxydant est accompagné d'un important efflux d'iodure et de VHOC principalement iodés (Küpper, 2001). Bien que ces composés halogénés peuvent être considérés comme les produits de la détoxification du peroxyde d'hydrogène, via les vHPOs, ils possèdent aussi des propriétés antimicrobiennes (pour revue, Neidleman et Geigert, 1986). De plus, il a été mis en évidence que les composés iodés et bromés pouvaient tuer des spores d'*Acrochaete operculata*, pathogène de l'algue rouge *Chondrus crispus* (Bouarab et coll., *non publié*). Ainsi, chez *L. digitata*, les vHPOs, qui sont induites suite à une élicitation, peuvent être considérées, via la production de VHOC, comme des enzymes impliquées dans les mécanismes de défense contre un pathogène.

Au début de ma thèse, j'ai participé à la construction, par PCR, d'une banque d'ADNc soustractive construite à partir de sporophytes de *L. digitata* élicités ou non par des oligo-guluronates. Ce travail avait pour but d'identifier des gènes induits lors des mécanismes de défense et a été poursuivi dans le cadre de la thèse de Vincent Roeder. Ainsi, ce dernier a montré que le transcrit *vBPO1* représente 12.8 % des transcrits analysés correspondant au 3^{ème} transcrit différentiellement exprimé lors de l'élicitation par les oligo-guluronates (Roeder et coll., *communication personnelle*). Ce résultat confirme donc ceux obtenus par *Northern blot* et l'implication des *vBPOs* dans les mécanismes de défenses. Par contre aucun transcrit de *vIPO* n'a été détecté par cette approche. Cependant, il faut noter que la banque soustractive a été construite à partir d'ARNm extraits, chez des sporophytes, 3 et 6 heures après élicitation. Le transcrit de *vIPO* étant induit 6 à 12 heures après élicitation par les oligo-guluronates, cette enzyme pourrait donc également intervenir dans la réponse de défense chez *L. digitata*.

3. Les *vHPOs* : lien avec la signalisation lipidique ?

En réponse à des stress biotiques ou abiotiques, les cellules sont sous le contrôle d'un ensemble de molécules régulatrices qui permettent de les protéger. Entre autre, chez les plantes et les animaux, la voie des oxylipines est l'une des cascades de signalisation et d'activation mise en place suite à un stress (Blée, 1998 et 2002 ; Howe et Schillmiller, 2002). Ainsi, les oxylipines sont des molécules biologiquement actives générées par le métabolisme oxydatif des acides gras polyinsaturés. De la même façon, de nombreuses macroalgues marines produisent des oxylipines qui interviendraient comme phéromones sexuelles mais également dans les mécanismes de défense contre un pathogène (Schnitzler et coll., 2001 ; Bouarab, 2000 ; Pohnert et Boland, 2002).

Chez les plantes et les animaux, le clofibrate perturbe le métabolisme lipidique en stimulant la β -oxydation des acides gras par prolifération des peroxysomes. Ce composé induit donc une importante production d'espèces activées de l'oxygène et en particulier de peroxyde d'hydrogène (Lopez-Huertas et coll., 2000 ; Corpas et coll., 2001). Toutes les enzymes qui concourent à l'homéostasie lipidique, à la synthèse de signaux de défense (peroxyde d'hydrogène, oxylipines) et à la détoxification du peroxyde d'hydrogène sont alors induites, comme les phospholipases, les lipoxygénases, les hydroxylases d'acides gras (P-450), la

xanthine oxydase, l'acylCoA oxydase, la NADPH oxydase, la superoxyde dismutase, l'ascorbate peroxydase... (Pinot et coll., 1997 ; Tijet et coll., 1998 ; Barros et coll. 2003).

Chez les sporophytes de *L. digitata*, l'application de clofibrate provoque un burst oxydant et une induction des activités vHPOs et en particulier de l'activité vIPO. En considérant les vHPOs comme des enzymes antioxydantes, l'augmentation de leur activité peut être induite suite à cette production massive de peroxyde d'hydrogène.

Cependant, Küpper et collaborateurs (2001) ont montré que l'élicitation de *L. digitata* par des oligoguluronates entraînait une cascade de réactions dont l'activation d'une phospholipase A₂, ce qui suggère que, chez cette algue, des acides gras libres jouent un rôle similaire, à celui établi chez les plantes ou les animaux dans les mécanismes de défense (Chandra et coll., 1996 ; pour revues Laxalt et Munnik, 2002 ; Chakraborti, 2003). Ainsi, il se pourrait que chez *L. digitata*, les vHPOs soient induites via le métabolisme lipidique, et plus particulièrement la voie des oxylipines. En effet, nous avons montré que l'application de diverses oxylipines provoque une induction « tardive » des activités vHPOs et surtout de l'activité vIPO, ce qui suggère une régulation transcriptionnelle de ces enzymes par la voie des oxylipines.

D. Les vHPOs : des enzymes induites par divers stress abiotiques

Au cours de nos expériences, les variations d'activités vHPOs chez certaines algues sauvages mais également chez les algues en culture, indiquent que ces enzymes peuvent être affectées par divers stress « non contrôlés ». En effet, comme les facteurs abiotiques induisant des augmentations de l'émission des VHOC semblent variés (Carpenter et coll., 1999 ; Abrahamsson et coll., 2003), ceux responsables de l'activation des vHPOs peuvent également être de divers types : variation de luminosité, variation de température, émergence, confinement des algues conduisant à l'anoxie, simple manipulation de l'algue...

E. Les différents niveaux putatifs de régulation

Les vHPOs constituant des familles multigéniques (*Cf Résultats, Chapitre 3*), l'étude de leur régulation est assez complexe et peut paraître contradictoire en comparant les différents niveaux putatifs de régulation : transcriptionnel, traductionnel et post-traductionnel (en observant directement l'activité).

Ainsi, bien que l'induction de l'expression des vHPOs chez *L. digitata* ait clairement été établie suite à un stress oxydant provoqué par l'application d'oligo-gulonates, on ne peut pas exclure d'autres niveaux de régulation qui ne peuvent pas être détectés *in vitro*.

(1) En premier lieu, certaines vHPOs, présentes de façon constitutive, pourraient être directement activées, *in vivo*, par leurs substrats.

En effet, le stress oxydant entraîne une importante concentration en peroxyde d'hydrogène apoplastique, un des substrats des vHPOs. Nous pouvons donc envisager que certaines vHPOs, antioxydantes, soient directement activées par le peroxyde d'hydrogène. De la même façon, l'activité de ces enzymes pourraient être régulée par les variations de concentration en halogénures.

Dans le cas de la vIPO, bien que son rôle putatif consiste en l'absorption et en l'accumulation d'iodure, cette enzyme est tellement spécifique en présence d'iodure et efficace du point de vue de l'activité (*turn-over* élevé) (*Résultats, Chapitres 1 et 3*), qu'il ne semble pas étonnant de ne pas retrouver de transcrits de vIPO dans les banques EST et/ou d'observer des niveaux de transcription relativement bas dans les sporophytes de *L. digitata*.

(2) Le vanadate, cofacteur indispensable pour l'activité des vHPOs, peut aussi être considéré comme un régulateur post-traductionnel putatif.

Dans ce contexte, Itoh et collaborateurs (1996) ont montré que l'augmentation estivale de l'activité vBPO chez l'algue rouge *Corallina pilulifera* résulte de la capacité de l'enzyme à incorporer du vanadium.

D'autre part, des études de biochimie réalisées sur la vCPO du champignon *Curvularia inaequalis* ont montré que l'affinité de l'enzyme pour le vanadate est plus élevée en présence de peroxyde d'hydrogène (Renirie et coll., 2000 a).

Ainsi, quand la concentration en peroxyde d'hydrogène augmente *in vivo*, c'est-à-dire lors d'un stress oxydant, les faibles concentrations en vanadate dans l'eau de mer, qui sont alors sous forme peroxovanadate, vont pouvoir être plus efficacement utilisées par les vHPOs.

Au cours de l'extraction, les vHPOs de *L. digitata* perdent leur vanadate qui doit donc être ajouté postérieurement dans l'extrait protéique pour rétablir les activités. Les activités observées sur gel natif correspondent donc à des enzymes possédant, *in vitro*, des quantités de vanadate équivalentes. Ainsi, il nous est impossible d'observer une éventuellement régulation, *in vivo*, de l'activité spécifique par le vanadate. Ceci pourrait expliquer que, dans certains cas, nous n'observons aucune différence au niveau de l'activité, entre des échantillons élicités ou non.

Conclusion

Ces premier résultats présentent les tendances de régulations au sein de la famille des vBPOs et au sein de la famille des vIPOs et convergent vers la même idée : les vHPOs, chez *L. digitata*, sont impliquées dans les mécanismes de défense et induites en réponse à divers stress et particulièrement lors de stress oxydants. En effet, l'induction d'une nouvelle forme de vBPO, pLd-vBPO, semble spécifique des protoplastes de *L. digitata*, donc lors de conditions oxydantes. De plus, il se pourrait que les vHPOs, et en particulier les vIPOs, via les mécanismes de défense, soient directement ou indirectement impliquées dans la voie des oxylipines.

Cependant, l'étude de la régulation des différents vHPOs, au sein de chaque famille, paraît relativement complexe. En effet, ces enzymes semblent régulées différemment et par de nombreux effecteurs. De plus, nous avons mis en évidence des régulations au niveau transcriptionnel, cependant, d'autres régulations telles que des régulations via leurs substrats (peroxyde d'hydrogène et halogénures) et/ou leur cofacteur paraissent vraisemblables.

CONCLUSIONS ET

PERSPECTIVES

I. Les vHPOs : des enzymes clé du métabolisme halogéné chez *L. digitata*

A. Les vHPOs de *L. digitata* : des spécificités distinctes pour les halogénures

Au cours de notre étude, nous avons mis en évidence que le métabolisme halogéné, via l'activité des vHPOs, jouait un rôle important chez *L. digitata*. Chez cette algue brune, les vHPOs constituent deux familles multigéniques bien distinctes : la famille des vBPOs et la famille des vIPOs, possédant sans doute des fonctions biologiques et des localisations différentes au sein de l'organisme.

Chez le sporophyte de *L. digitata*, nous avons montré l'existence d'un profil relativement complexe d'activités vHPOs constitué de plusieurs activités vBPOs pouvant oxyder le brome et l'iode, et d'une activité vIPO spécifique de l'iode. La purification de ces activités à l'homogénéité électrophorétique nous a conduit à la conclusion que ces deux activités étaient portées par deux protéines distinctes : une vBPO et une vIPO qui diffèrent par leur poids moléculaire, leur profil peptidique après digestion à la trypsine, leur caractéristique immunologique, mais surtout par leur spécificité pour les halogénures et leurs paramètres cinétiques enzymatiques. En effet, la vIPO présente une affinité pour l'iodure et une efficacité pour son oxydation bien plus élevées que celles de la vBPO.

Avant cette étude, aucune autre activité vIPO n'ayant été totalement purifiée et caractérisée, la purification et le clonage de ces activités vHPOs ont fait l'objet d'un brevet européen (Leblanc et coll., 2003, European patent n° 03290518.4 daté du 04/03/03). En effet, ces enzymes, extrêmement thermostables et actives dans de nombreux solvants, peuvent présenter un intérêt fort dans divers domaines d'application. Ainsi, elles peuvent être utilisées, lors des synthèses chimiques, dans la production de composés organiques halogénés biologiquement actifs (pesticides, médicaments), mais également dans le piégeage spécifique des halogènes pour le traitement des eaux. C'est en particulier le cas de la vIPO qui, à la différence d'une vBPO, est capable d'oxyder l'iode en présence de fortes concentrations en brome. De plus, ces enzymes interviennent probablement dans les mécanismes de fixation de l'algue à un substrat rocheux, et peuvent entrer dans la composition de produits adhésifs.

B. Vers une compréhension de l'efficacité du mécanisme d'absorption de l'iode chez *L. digitata*

1. Présence d'une vIPO pariétale et corticale

Le stade gamétophyte de *L. digitata* qui ne concentre pas d'iode, contrairement au sporophyte (~65 nmol/g/min) (Küpper et coll., 1998), ne possède pas d'activité vIPO mais seulement de faibles activités vBPO dont le profil est similaire à celui observé chez le sporophyte. De plus, des travaux sur les gamétophytes de *L. digitata* avaient mis en évidence, qu'après un apport externe considérable de vBPO d'*Ascophyllum nodosum* et de peroxyde d'hydrogène, les gamétophytes acquéraient la capacité d'absorber de l'iodure (~3 nmol/g/min) (Küpper et coll., 1998). Küpper avait ainsi suggéré qu'une vHPO était impliquée dans le mécanisme d'absorption de l'iode. Ces travaux ainsi que des études préliminaires en collaboration avec Bruno Fievet (de l'IRSN d'Octeville) ont effectivement montré que le mécanisme d'absorption de l'iodure suit une cinétique Michaëlienne, ce qui indique l'intervention d'une enzyme.

Tous ces résultats convergent vers l'idée que la vIPO pariétale et corticale est impliquée dans l'absorption de l'iode chez *L. digitata*, via l'oxydation de cet élément dans la paroi cellulaire. En effet, l'iodure dans l'eau de mer étant 10,000 fois moins concentré que le bromure, seule une vIPO, spécifique de l'iode peut intervenir efficacement dans l'absorption de l'iodure. Bien que l'expression de cette activité vIPO soit très faible, l'enzyme présente un *turn-over* suffisamment élevé pour être extrêmement efficace même en faible quantité.

La vIPO de *L. digitata* que nous avons purifiée a donc, sans doute, un rôle central dans le système de concentration d'iode le plus performant connu à ce jour.

Cependant, seules des études physiologiques permettraient de valider complètement cette hypothèse. Ainsi, il serait possible, par exemple, de comparer, *in vitro*, les flux nets et isotopiques d'iode radioactif entre l'eau de mer et l'algue, chez des sporophytes et/ou des gamétophytes après ajout dans le milieu extérieur de vBPO ou de vIPO purifiées.

2. L'oxydation par la vIPO doit être couplée à un mécanisme de réduction intracellulaire

La présence d'une vIPO pariétale nous permet de comprendre l'extrême efficacité du mécanisme d'absorption, cependant le système d'accumulation de l'iode chez *L. digitata* reste incomplet. En effet, bien que l'implication de la vIPO dans l'absorption de l'iode, via son oxydation dans la paroi semble indéniable, ce mécanisme doit être couplé à un autre système intracellulaire relativement efficace qui permettrait la réduction de l'acide hypo-iodé ou de l'iode moléculaire intracellulaire. En effet, l'iode, sous cette forme oxydée, lipophile et indissociable au pH de l'eau de mer, diffuserait de façon facilitée à travers la membrane plasmique (Küpper et coll., 1998). Ainsi, la concentration d'iode oxydé intracellulaire doit être maintenue la plus basse possible afin de conserver un gradient de concentration entre l'extérieur et l'intérieur de la cellule favorable à l'entrée de cette espèce chimique.

Typiquement, les HPOs fonctionnent dans le sens de l'oxydation des halogénures. Cependant, il a été montré que l'oxydation de l'iodure par la HRP, une HPO à hème, était inhibée en présence d'EDTA, de peroxyde d'hydrogène et de radical hydroxyle. Dans ces conditions, l'enzyme est capable de réduire l'iode moléculaire en iodure (Chang et Bumpus, 2001). Bien qu'il soit suggéré que l'EDTA, inhibiteur non compétitif, provoquerait un changement de conformation de l'HRP (Banerjee, 1989), le mécanisme d'action de l'enzyme pour la réduction de l'iode moléculaire n'a pas été étudié.

Ainsi chez l'algue brune *L. digitata*, nous pouvons envisager l'existence d'une vHPO intracellulaire, et en particulier une vBPO, pouvant réduire l'iode moléculaire en iodure et ainsi conserver un gradient de concentration d'iode oxydé relativement bas pour permettre la diffusion de l'iode moléculaire à travers la membrane.

3. Intervention des vBPOs dans l'oxydation de l'iodure

Nous pouvons noter que les deux séquences protéiques putatives de vBPOs caractérisées (vBPO1 et vBPO2) présentent deux peptides signaux putatifs différents, ce qui

suggère que les vBPOs possèdent des localisations dans ou à l'extérieur du cytoplasme (organites, paroi) distinctes et éventuellement des rôles différents.

Dans un premier temps, il semblerait que l'iode pouvant atteindre 5 % du poids sec chez les jeunes sporophytes de *L. digitata*, soit compartimenté, sous forme d'iodure, dans la cellule (Küpper et coll., 1998). Dans cette algue, la concentration intracellulaire d'iodure étant relativement élevée par rapport à celle du bromure, des vHPOs intracellulaires, et notamment des vBPOs, peuvent intervenir dans l'oxydation de l'iodure pour sa compartimentation subcellulaire. Cependant, cette compartimentation de l'iodure suggère comme précédemment un mécanisme de réduction de l'iodure, au niveau subcellulaire.

De plus, certaines des vBPOs semblent être pariétales. En effet, bien que nos expériences sur les activités vHPOs chez des protoplastes semblent indiquer que seule l'activité vIPO est pariétale, il faut noter que ce sont les parois des couches de cellules les plus externes qui sont les mieux digérées au cours de cette expérience. Ainsi, des vBPOs pariétales peuvent être présentes dans des couches de cellules plus internes du thalle et contribuer au transfert, dans l'algue (Amat et Srivastava, 1985), de l'iode préalablement absorbé, via les vIPOs, dans les couches de cellules corticales les plus externes.

Afin de mieux comprendre le rôle biologique des différentes vHPOs chez *L. digitata*, il sera donc nécessaire d'analyser la répartition subcellulaire et au niveau du thalle de ces enzymes par des techniques d'immunolocalisation (par microscopie confocal ou microscopie électronique).

C. Implication des vHPOs dans l'étude du cycle biogéochimique de l'iode

Etant donné la biomasse importante des laminaires sur les côtes, la participation de ces macroalgues dans le cycle de l'iode suscite un vif intérêt, d'une part en raison du rôle des composés halogénés sur la couche d'ozone atmosphérique et d'autre part en cas de présence d'iode radioactif en mer qui serait liée aux activités nucléaires ou médicales. En effet, étant donné les fortes concentrations intracellulaires d'iodures, ces algues peuvent être marquées significativement ainsi que les VHOC qu'elles produisent. Dans ce contexte, il est essentiel de connaître le devenir de cet élément dans l'environnement et en particulier de déterminer les

échanges dynamiques entre l'eau de mer et les macroalgues. Indirectement, l'analyse de ces phénomènes via des études cinétiques et de régulations des vHPOs permettraient de mieux comprendre ces transferts. Ces études permettraient ainsi de modéliser de façon plus précise les flux d'iode au sein du compartiment « algues ».

L. digitata représente à ce jour la seule espèce chez laquelle des activités vBPOs mais également une activité vIPO ont été purifiées et caractérisées. Cette algue brune constitue donc un modèle unique pour l'étude du métabolisme halogéné d'autant plus qu'elle est facilement manipulable au laboratoire, où son cycle de vie est maîtrisé.

Ainsi, à plus long terme, les vHPOs caractérisées chez *L. digitata* constitueront un outil biologique puissant pour évaluer l'implication des laminaires, dans le cycle biogéochimique des halogènes et en particulier dans le cycle de l'iode.

II. Les vHPOs : des enzymes impliquées dans les réponses au stress oxydant et les mécanismes de défense

Chez l'algue brune *L. digitata*, les vHPOs, qui consomment du peroxyde d'hydrogène en mobilisant le stock d'iode intracellulaire et en produisant ainsi des VHOC, peuvent être directement considérées comme des enzymes antioxydantes. Ainsi, ces enzymes constitutives peuvent intervenir immédiatement lors d'un burst oxydant. Cependant, nous avons aussi mis en évidence l'induction d'un transcrite de vBPO, certainement spécialisé dans la détoxification du peroxyde d'hydrogène, en condition de stress oxydant particulier (protoplastes).

Les vHPOs peuvent également être considérées comme des enzymes impliquées dans les mécanismes de défense. En effet, nous avons clairement mis en évidence l'induction de ces enzymes après élicitation par des oligo-gulonates, qui miment l'attaque d'un pathogène et déclenchent des réponses de défense chez *L. digitata* (Küpper et coll., 2001). Cette élicitation provoque, via l'activation des vHPOs, une augmentation de la production de VHOC, principalement iodés, considérés comme des signaux de défense (Küpper, 2001). Dans ce contexte, l'accumulation préférentielle d'iodure et la production majoritaire de VHOC iodés peuvent constituer, chez *L. digitata*, une amélioration du système de défense, sachant que les composés iodés inhibent de façon plus efficace que les composés bromés ou chlorés la croissance de bactéries toxiques associées aux laminaires (Küpper et Potin, *non*

publié). Cette observation est également valable pour *Acrochaete operculata*, le pathogène de l'algue rouge *Chondrus crispus* (Bouarab et coll., *non publié*).

De plus, les gènes de vHPOs, et en particulier ceux des vIPOs, semblent être induits par la voie des oxylipines. Ces enzymes ainsi activées peuvent alors intervenir dans les mécanismes de défense via la production de VHOC iodés sans lien direct avec le métabolisme lipidique. Cependant, il se pourrait que cette production de VHOC iodés dérivent de l'halogénéation, via l'activation de vIPO, d'acides gras libres et/ou de lipides hydroxylés après dégradation de la membrane plasmique par des phospholipases. Cette origine lipidique du squelette carboné des VHOC a effectivement déjà été suggéré par Küpper (2001).

Afin de mieux comprendre le rôle spécifique des diverses vHPOs dans les mécanismes de défense, il sera nécessaire d'analyser leur activité et leur expression dans différentes conditions physiologiques telles que des stress abiotiques : la dessiccation, le stress lumineux, les variations de température, les variations de salinité... mais également des stress biotiques c'est-à-dire en présence ou non de pathogène tel que l'endophyte de *L. digitata*, *Laminariocolax tomentosoides*. Il sera également intéressant de suivre l'évolution de l'activité de ces enzymes suite à des stress pouvant être liés à l'activité humaine tels que l'application de polluants ou de pesticides.

Cependant, ces enzymes constituant des familles multigéniques très conservées, l'étude du rôle respectif de leurs différents représentants est relativement complexe. De plus, les vHPOs semblent répondre à divers stress ; ce qui indique que le suivi de leur expression dépend donc de l'état physiologique de chaque algue. La reproductibilité des expériences peut donc être délicate. La technique de *Northern blot* présente certaines limites pour l'étude de transcrits faiblement représentés et/ou très homologues. Des analyses en RT-PCR (pour *Reverse Transcriptase-PCR*) ou en PCR en temps réel (ou PCR quantitative) seront plus adéquates pour étudier plus spécifiquement la régulation des différents membres des deux familles multigéniques et pour rechercher des facteurs d'induction de ces enzymes. Cependant, le clonage de nouveaux gènes, et particulièrement de nouvelles vIPOs, paraît indispensable avant de débiter une telle étude.

En parallèle, la caractérisation structurale des différents gènes de vBPO et la recherche des gènes de vIPO permettront d'analyser les séquences promotrices des deux familles d'enzymes afin de localiser d'éventuelles zones régulatrices.

A plus grande échelle, des études de transcriptome, notamment par des filtres à ADN haute densité disponibles au laboratoire, vont aussi permettre de corréler l'expression de réseaux de gènes avec celle des vHPOs. Ainsi, des voies métaboliques activées simultanément avec les vHPOs seront identifiées suite à l'élicitation par les oligo-guluronates (Thèse d'Audrey Cosse). De plus, en conjonction avec des études de profilage métabolique par LC-MS et la détection spécifique de composés iodés par ICP-MS (pour *Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometer* ou spectromètre de masse quadripolaire à source plasma), il sera possible de corréler l'expression de réseaux de gènes avec le métabolisme halogéné.

Bien que l'intervention des vBPOs dans les phénomènes de pontages chimiques ait récemment été établie, des techniques d'ARN interférence sont actuellement mises en œuvre au laboratoire pour tester directement le rôle de ces gènes dans l'adhésion et le renforcement de la paroi dans des systèmes adaptés pour la microinjection, comme le zygote de *Fucus* ou les spores d'*Ectocarpus*. En parallèle, des études similaires peuvent être envisagées en ciblant des transcrits de vIPOs, afin d'évaluer l'efficacité de ces enzymes pariétales dans le pontage de la paroi.

Enfin, la caractérisation d'inhibiteurs spécifiques, encore inconnus pour les vHPOs, permettrait de tester plus directement (*in vitro* ou *in vivo*) la fonction biologique de ces enzymes dans l'halogénéation de composés carbonés et le renforcement de la paroi suite à un stress, et bien sûr dans l'absorption de l'iode.

III. Modélisation de la structure tridimensionnelle de vIPOs : vers une compréhension du mécanisme d'action des vHPOs

A l'aide de la protéomique, nous avons pu relier les activités vBPOs et les activités vIPOs à des séquences protéiques. Ainsi, la première structure de vIPO connue à l'heure actuelle a pu être modélisée. Pour la première fois nous avons donc pu comparer des

structures de vCPOs et de vBPOs avec le modèle structural de la vIPO. Cette modélisation nous a permis d'établir des pistes pour la compréhension de la spécificité de ces enzymes envers les halogénures.

Néanmoins, l'analyse des structures tridimensionnelles des vHPOs natives de *L. digitata* sera une source d'informations complémentaires et plus fiables que la modélisation pour valider ces hypothèses. Il paraît donc indispensable de cristalliser et d'obtenir des informations de structure à partir des vBPO et vIPO purifiées.

La capacité des vHPOs à oxyder les halogénures impliquerait non seulement des modifications ponctuelles au niveau du site actif, entraînant des variations de son potentiel électronégatif, mais également des modifications au niveau de l'entrée du site actif. En effet, l'étude des résidus à proximité du site de fixation du vanadate indique que le potentiel électronégatif du site actif augmente d'une vCPO à une vIPO. De plus, l'entrée du tunnel du site actif, région de fixation putative des halogénures, augmente également en taille d'une vCPO à une vIPO. Ces deux particularités combinées peuvent expliquer la spécificité plus ou moins importante des vHPOs pour les halogénures.

Ainsi, la comparaison de la séquence protéique de la vIPO à celle des autres vBPO et vCPO connues, couplée aux modélisations tridimensionnelles de cette enzyme, nous a permis d'identifier des résidus pouvant être impliqués dans la fixation des halogènes et dans la spécificité de la vIPO pour l'iode.

La détermination de la structure tridimensionnelle des vHPOs et en particulier de la vIPO native en complexe avec les différents partenaires de la réaction d'oxydation (vanadate, peroxyde d'hydrogène et halogénure) permettra d'établir les bases moléculaires de leur mécanisme catalytique et de leur spécificité respective pour les halogénures. Il sera également possible d'enregistrer et d'analyser des données d'EXAFS (pour *X-ray-Absorption Fine Structure* ; méthode de spectroscopie des rayons X) à partir des vHPOs en présence de leurs substrats, ce qui permettra d'obtenir des informations précises sur l'environnement du vanadate et surtout sur celui de l'halogénure au sein de ces enzymes.

A l'heure actuelle, les squelettes carbonés à l'origine des composés halogénés restent inconnus. Il sera donc intéressant, en utilisant les enzymes purifiées, de cribler, *in vitro*, un ensemble des composés carbonés et d'analyser les composés halogénés produits. Dans un

second temps, la caractérisation structurale de complexes avec des substrats carbonés et/ou des inhibiteurs spécifiques sera également une étape clé vers la compréhension de la synthèse de ces composés halogénés et du mécanisme d'halogénéation.

A plus long terme, quand la surexpression des gènes d'algues brunes et en particulier de ceux de *L. digitata* sera maîtrisée, les résidus, potentiellement impliqués dans les vHPOs dans la catalyse et la fixation des halogénures, devront être mutés par leur équivalent dans les autres vHPOs. Ainsi, il sera intéressant de conférer à la vIPO une spécificité étendue au brome et/ou au chlore ou inversement d'obtenir des vBPOs et des vCPOs mutantes spécifiques de l'oxydation de l'iode.

IV. Evolution des vHPOs : vers une spécificité de ces enzymes pour l'oxydation des halogénures ?

A partir des séquences protéiques de vHPOs préalablement caractérisées et des vBPOs et de la vIPO de *L. digitata*, nous avons pu établir un scénario pour l'évolution des vHPOs chez les algues brunes et en particulier pour l'apparition de la vIPO.

Ainsi, chez *L. digitata*, les vBPOs et la vIPO proviendraient d'un évènement de duplication ancestrale contemporain de la spéciation. L'acquisition de la spécificité d'oxydation de la vIPO pour l'iodure se serait produite dans un second temps. De plus, la vitesse évolutive des vBPOs de *L. digitata* serait plus grande, que celles de la vIPO et des vBPOs des autres algues brunes qui auraient conservées plus d'homologie avec l'ancêtre commun.

Cette étude évolutive couplée à des données cinétiques nous permettent de suggérer que la vIPO, toujours capable de fixer le bromure, dériverait du même ancêtre que les vBPOs, mais qu'elle aurait perdu la capacité à oxyder le bromure. Cet ancêtre commun serait donc vraisemblablement une vBPO.

La vIPO constituant l'un des membres d'une famille multigénique, il sera intéressant de rechercher d'autres séquences de vIPO afin de valider le scénario évolutif en ce qui concerne les vBPOs et vIPOs. De plus cette analyse phylogénétique pourrait être renforcée par l'identification moléculaire d'HPOs chez d'autres algues marines. Ainsi, des études sont actuellement en cours, au sein de l'équipe de Philippe Potin, sur les vHPOs de l'algue brune, *Fucus serratus* (travail de Ludovic Delage) et sur les vHPOs de l'algue rouge *Chondrus*

crispus (travail d'Audrey Cosse). L'étude de diverses vHPOs appartenant à des algues marines situées à des niveaux différents sur l'estran et ayant une histoire évolutive distincte (algues brunes / algues rouges) permettrait, ensuite, de mieux comprendre les pressions de sélection et éventuellement les facteurs ayant entraînés ou non un relâchement de la fonction vBPO pour aboutir à une enzyme spécifique de l'oxydation de l'iodure.

En élargissant cette hypothèse à l'ensemble des vHPO, les vHPOs auraient ainsi pu évoluer, progressivement, par perte de fonctions, c'est-à-dire perte de la capacité d'oxydation du chlorure pour les vBPOs puis perte de la fonction d'oxydation du bromure pour les vIPOs. Cependant sachant qu'aucune vCPO n'a été identifiée ailleurs que dans le milieu terrestre, elles auraient pu, quant à elles, avoir eu une évolution spécifique à partir d'une vBPO ancestrale avec gain de fonction ultérieur.

Toujours est-il que l'identité des trois classes d'enzymes (vCPO, vBPO et vIPO) définies sur la base d'une réaction chimique, en l'occurrence suivant l'halogénure le plus électronégatif qu'elles sont capables d'oxyder, ne semble pas aussi stricte. Ainsi, des modulation fines de la spécificité de ces enzymes envers les différents halogénures auraient été introduites au cours de l'évolution, ce qui auraient conduit à des gestions différentes des halogénures suivant les organismes, avec des algues ayant développé le métabolisme bromé (algues rouges et certaines algues brunes) et d'autres le métabolisme iodé (laminaires). Néanmoins, l'évolution des vHPOs a conduit à des fonctions biologiques différentes avec des systèmes de défense et de détoxification efficaces.

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

- Abrahamsson K, Choo K-S, 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.
- Aguilera J, Dummermuth A, Karsten U, Schriek R and Wiencke C (2002). Enzymatic defences against photooxidative stress induced by ultraviolet radiation in Arctic marine macroalgae. *Polar Biol.* **25**(6): 432-441.
- Albert CJ, Thukkani AK, Heuertz RM, Slungaard A, Hazen SL and Ford DA (2003). Eosinophil peroxidase-derived reactive brominating species target the vinyl ether bond of plasmalogens generating a novel chemoattractant, alpha-bromo fatty aldehyde. *J Biol Chem.* **278**(11): 8942-8950.
- Almeida M, Filipe S, Humanes M, Maia MF, Melo R, Severino N, da Silva JAL, Frausto da Silva JJR and Wever R (2001). Vanadium haloperoxidases from brown algae of the Laminariaceae family. *Phytochemistry* **57**: 633-642.
- Almeida M, Humanes M, Melo R, Silva JA, Frausto da Silva JJR and Wever R (2000). Purification and characterisation of vanadium haloperoxidases from the brown alga *Pelvetia canaliculata*. *Phytochemistry* **54**: 5-11.
- Almeida M, Humanes M, Melo R, Silva JA, Frausto da Silva JJR, Vilter H and Wever R (1998). *Saccorhiza polyschides* (Phaeophyceae; Phyllariaceae) a new source for vanadium-dependent haloperoxidases. *Phytochemistry* **48**: 229-239.
- Almeida M, Humanes M, Silva JA, Melo R and Frausto da Silva JJR (1996). *Phyllariopsis brevipes*- a brown algae with vanadium-dependent iodoperoxidases. *Plant Peroxidases: Biochemistry and Physiology*. C Obinger, U Burner, R Ebermann, C Penel and H Greppin. Geneve, University of Geneve: 146-152.
- Amachi S, Kamagata Y, Kanagawa T and Muramatsu Y (2001). Bacteria mediate methylation of iodine in marine and terrestrial environments. *Appl. Env. Microbiol.* **67**(6): 2718-2722.
- Amat MA (1985). Physiology of iodine uptake and distribution in *Laminaria saccharina* (Phaeophyta). *Thèse de doctorat*, Université Pierre et Marie Curie, Paris, France.
- Amat MA and Srivastava LM (1985). Translocation of iodine in *Laminaria saccharina* (Phaeophyta). *J. Phycol.* **21**: 330-333.
- Andersson MA and Allenmark SG (1998). Asymmetric sulfoxidation catalyzed by a vanadium bromoperoxidase: Substrate requirements of the catalyst. *Tetrahedron* **54**(50): 15293-15304.
- Andersson MA, Willetts A and Allenmark SG (1997). Asymmetric Sulfoxidation Catalyzed by a Vanadium-Containing Bromoperoxidase. *J. Org. Chem.* **62**(24): 8455-8458.
- Apt KE, Clendennen SK, Powers DA and Grossman AR (1995). The gene family encoding the fucoxanthin chlorophyll proteins from the brown alga *Macrocystis pyrifera*. *Mol. Gen. Genet.* **246**: 455-464.
- Arber JM, de Boer E, Garner CD, Hasnain SS and Wever R (1989). Vanadium K-edge X-ray absorption spectroscopy of bromoperoxidase from *Ascophyllum nodosum*. *Biochemistry* **28**: 7968-7973.
- Attieh JM, Hanson AD and Saini HS (1995). Purification and characterization of a novel methyltransferase responsible for biosynthesis of halomethanes and methanethiol in *Brassica oleracea*. *J. Biol. Chem.* **270**(16): 9250-9257.
- Baden DG and Corbett MD (1980). Bromoperoxidases from *Penicillium capitatus*, *Penicillium lamourouxii* and *Rhizocephalus phoenix*. *Biochem. J.* **187**(1): 205-211.
- Baker JM, Sturges WT, Sugier J, Sunnenberg G, Lovett AA, Reeves CE, Nightingale PD and Penkett SA (2001). Emissions of CH₃Br, organochlorines, and organoiodines from temperate macroalgae. *Chemosphere* **3**(1): 93-106.
- Ballschmitter K (2003). Pattern and sources of naturally produced organohalogens in the marine environment: biogenic formation of organohalogens. *Chemosphere* **52**(2): 313-324.
- Banerjee RK (1989). Mechanism of horseradish peroxidase-catalyzed conversion of iodine to iodide in the presence of EDTA and H₂O₂. *J. Biol. Chem.* **264**(16): 9188-9194.
- Barnett P, Hemrika W, Dekker HL, Muijsers AO, Renirie R and Wever R (1998). Isolation, characterization, and primary structure of the vanadium chloroperoxidase from the fungus *Embellisia didymospora*. *J. Biol. Chem.* **273**(36): 23381-23387.
- Barros MP, Granbom M, Colepicolo P and Pedersén M (2003). Temporal mismatch between induction of superoxide dismutase and ascorbate peroxidase correlates with high H₂O₂ concentration in seawater from clofibrate-treated red algae *Kappaphycus alvarezii*. *Arch. Biochem. Biophys.* **420**(1): 161-168.
- Black WAP (1948). The seasonal variation in chemical constitution of some of the sub-littoral seaweeds common to

- Scotland, *Laminaria cloustonii*, *L. digitata*, *L. saccharina*, and *Saccorhiza bulbosa*. *J. Soc. Chem. Ind. (London)* **67**: 165-176.
- Blée E (1998). Phytooxylipins and plant defense reactions. *Prog. Lipid Res.* **37**: 33-72.
- Blée E (2002). Impact of phyto-oxylinins in plant defense. *Trends Plant Sci.* **7**(7): 315-322.
- Bollag DM, Rozycki MD and Edelman SJ (1996). *Protein Methods, second edition*, Wiley-Liss Publishing.
- Borchardt SA, Allain EJ, Michels JJ, Stearns GW, Kelly RF and McCoy WF (2001). Reaction of acylated homoserine lactone bacterial signalling molecules with oxidized halogen antimicrobials. *Appl. Env. Microbiol.* **67**(7): 3174-3179.
- Bouarab K (2000). Bases biochimiques et cellulaires des interactions plante-pathogène dans le système *Chondrus crispus - Acrochaete operculata*. *Thèse de doctorat*, Université Pierre et Marie Curie, Paris, France.
- Bradford MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.
- Breivik K, Alcock R, Li Y-F, Bailey RE, Fiedler H and Pacyna JM (2004). Primary sources of selected POPs: regional and global scale emission inventories. *Environ. Pollut.* **128**(1-2): 3-16.
- Brindley AA, Dalby AR, Isupov MN and Littlechild JA (1998). Preliminary X-ray analysis of a new crystal form of the vanadium-dependent bromoperoxidase from *Corallina officinalis*. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* **54**(Pt 3): 454-457.
- Butler A (1998). Vanadium haloperoxidases. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2**: 279-285.
- Butler A (1999). Mechanistic considerations of the vanadium haloperoxidases. *Coord. Chem. Rev.* **187**: 17-35.
- Butler A and Tschirret-Guth RA (1997). On the Selectivity of Vanadium Bromoperoxidase. *Mechanisms of Biohalogenation and Dehalogenation*. DB Janssen, K Soda and R Wever, Proceedings of the Royal Netherlands Academy of Arts and Sciences: 55-69.
- Butler A and Walker JV (1993). Marine Haloperoxidases. *Chem. Rev.* **93**: 1937-1944.
- Butler A, Carter JN and Simpson MT (2001). Vanadium in proteins and enzymes. *Handbook on Metalloproteins*. I Bertini, A Sigel and H Sigel. New York, Basel, Marcel Dekker, Inc.: 153-179.
- Butler DM, Østgaard K, Boyen C, Evans LV, Jensen A and Kloareg B (1989). Isolation conditions for high yields of protoplasts from *Laminaria saccharina* and *L. digitata* (Phaeophyceae). *J. Exp. Bot.* **40**: 1237-1246.
- Campos MLAM, Nightingale PD and Jickells TD (1996). A comparison of methyl iodide emissions from seawater and wet depositional fluxes of iodine over the southern North Sea. *Tellus* **48**: 106-114.
- Cappai R, Kaslow DC, Peterson MG, Cowman AF, Anders RF and Kemp DJ (1992). Cloning and analysis of the RESA-2 gene : a DNA homologue of the ring-infected erythrocyte surface antigen gene of *Plasmodium falciparum*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **54**(2): 213-221.
- Carpenter LJ (2003). Iodine in the marine boundary layer. *Chem. Rev.*: DOI: 10.1021/cr0206465; <http://pubs.acs.org/new/2003/articles.html>.
- Carpenter LJ, Malin G, Küpper FC and Liss PS (2000). Novel biogenic iodine-containing trihalomethanes and other short-lived halocarbons in the coastal East Atlantic. *Global Biogeochem. Cycles* **14**: 1191-1204.
- Carpenter LJ, Sturges WT, Liss PS, Penkett SA, Alicke B, Hebestreit K and Platt U (1999). Short-lived alkyl iodides and bromides at Mace-Head, Ireland: links to biogenic sources and halogen oxide production. *J. Geophys. Res.* **104**: 1679-1689.
- Carter JN, Beatty KE, Simpson MT and Butler A (2002). Reactivity of recombinant and mutant vanadium bromoperoxidase from the red alga *Corallina officinalis*. *J. Inorg. Biochem.* **91**(1): 59-69.
- Casny M, Rehder D, Schmidt H, Vilter H and Conte V (2000). A (17)O NMR study of peroxide binding to the active centre of bromoperoxidase from *Ascophyllum nodosum*. *J. Inorg. Biochem.* **80**(1-2): 157-160.
- Chakraborti S (2003). Phospholipase A(2) isoforms: a perspective. *Cell Signal* **15**(7): 637-665.
- Chandra S, Heinsteins PF and Low PS (1996). Activation of Phospholipase A by Plant Defense Elicitors. *Plant Physiol.* **110**(3): 979-986.

- Chang HC and Bumpus JA (2001). Iodide oxidation and iodine reduction mediated by horseradish peroxidase in the presence of ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) : the superoxide effect. *Proc. Natl. Sci. Counc. Repub. China, B, Life Sci.* **25**(2): 82-89.
- Chatfield RB and Crutzen PJ (1990). Are there interactions of iodine and sulfur species in marine photochemistry ? *J. Geophys. Res.* **95**: 22319-22341.
- Chen YP, Lincoln DE, Woodin SA and Lovell CR (1991). Purification and properties of a unique flavin-containing chloroperoxidase from the capitellid polychaete *Notomastus lobatus*. *J. Biol. Chem.* **266**(35): 23909-23915.
- Clague MJ and Butler A (1995). On the Mechanism of cis-Dioxovanadium (V) Catalyzed Oxidation of Bromide by Hydrogen Peroxide: Evidence for a Reactive Binuclear Vanadium (V)-Peroxo Species. *J. Am. Chem. Soc.* **117**: 3475-3484.
- Cleland WW (1973). Derivation of rate equations for multisite ping-pong mechanisms with ping-pong reactions at one or more sites. *J. Biol. Chem.* **248**(24): 8353-8355.
- Collén J, Ekdahl A, Abrahamsson K and Pedersén M (1994). The involvement of hydrogen peroxide in the production of volatile halogenated compounds by *Meristiella gelidium*. *Phytochemistry* **36**(5): 1197-1202.
- Corellou F, Potin P, Brownlee C, Kloareg B and Bouget F-Y (2000). Inhibition of the establishment of zygotic polarity by protein tyrosine kinase inhibitors leads to an alteration of embryo pattern in *Fucus*. *Dev. Biol.* **219**(2): 165-182.
- Corpas FJ, Barroso JB and del Rio LA (2001). Peroxisomes as a source of reactive oxygen species and nitric oxide signal molecules in plant cells. *Trends Plant Sci.* **6**(4): 145-150.
- Cotter ESN, Booth NJ, Canosa-Mas CE and Wayne RP (2001). Release of iodine in the atmospheric oxidation of alkyl iodides and the fates of iodinated alkoxy radicals. *Atmos. Environ.* **35**: 2169-2178.
- Coughlin P, Roberts S, Rush C and Willetts A (1993). Biotransformation of alkenes by haloperoxidases: Regiospecific bromohydrin formation from cinnamyl substrates. *Biotechnol. Lett.* **15**: 907.
- Crépineau F, Roscoe T, Kaas R, Kloareg B and Boyen C (2000). Characterisation of complementary DNAs from the expressed sequence tag analysis of life cycle stages of *Laminaria digitata* (Phaeophyceae). *Plant Mol. Biol.* **43**: 503-513.
- Dairi T, Nakano T, Aisaka K, Katsumata R and Hasegawa M (1995). Cloning and nucleotide sequence of the gene responsible for chlorination of tetracycline. *Biosci. Biotech. Biochem.* **59**: 1099-1106.
- Dangeard P (1928). Sur le dégagement de l'iode chez les algues marines. *C. R. Acad. Sciences Paris* **186**: 892-894.
- Dangeard P (1957). L'iode des algues, les ioduques, l'iodovolatilisation. *Le botaniste* **41**: 187-207.
- Daniels R, Vanderleyden J and Michiels J (2004). Quorum sensing and swarming migration in bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **sous presse**.
- Dau H, Dittmer J, Epple M, Hanss J, Kiss E, Rehder D, Schulzke C and Vilter H (1999). Bromine K-edge EXAFS studies of bromide binding to bromoperoxidase from *Ascophyllum nodosum*. *FEBS Lett.* **457**(2): 237-240.
- de Boer E, Boon K and Wever R (1988b). Electron paramagnetic resonance studies on conformational states and metal ion exchange properties of vanadium bromoperoxidase. *Biochemistry* **27**: 1629-1635.
- de Boer E, Keijzers CP, Klaassen AAK, Reijerse EJ, Collison D, Garner CD and Wever R (1988a). 14N-coordination to VO₂⁺ in reduced vanadium bromoperoxidase, an electron spin echo study. *FEBS Lett.* **235**(1-2): 93-97.
- de Boer E, Plat H, Tromp MGM, Wever R, Franssen MCR, 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.
- de Boer E, van Kooyk Y, Tromp MGM, Plat H and Wever R (1986). Bromoperoxidase from *Ascophyllum nodosum*: a novel class of enzymes containing vanadium as a prosthetic group? *Biochim. Biophys. Acta* **869**(1): 48-53.
- De Mot R, De Schrijver A, Schoofs G and Parret AHA (2003). The thiocarbamate-inducible *Rhodococcus* enzyme ThcF as a member of the family of α/β hydrolases with haloperoxidative side activity. *FEMS Microbiol. Lett.* **224**(2): 197-203.
- Dembitsky VM (2003). Oxidation, epoxidation and sulfoxidation reactions catalysed by haloperoxidases. *Tetrahedron* **59**(26): 4701-4720.

- Dembitsky VM and Srebnik M (2002). Natural halogenated fatty acids: their analogues and derivatives. *Prog. Lipid Res.* **41**(4): 315-367.
- Donaldson LA (2001). Lignification and lignin topochemistry - an ultrastructural view. *Phytochemistry* **57**(6): 859-873.
- Dummermuth AL, Karsten U, Fisch KM, König GM and Wiencke C (2003). Responses of marine macroalgae to hydrogen-peroxide stress. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **289**(1): 103-121.
- Dyrssen D, Fogelqvist E, Krysell M and Sturm R (1990). Release of halocarbons from an industrial estuary. *Tellus* **42B**: 162-169.
- Everett RR, Kanofsky JR and Butler A (1990a). Mechanistic investigations of the novel non-heme vanadium bromoperoxidases. Evidence for singlet oxygen production. *J. Biol. Chem.* **265**(9): 4908-4914.
- Everett RR, Soedjak HS and Butler A (1990b). Mechanism of dioxygen formation catalyzed by vanadium bromoperoxidase. Steady state kinetic analysis and comparison to the mechanism of bromination. *J. Biol. Chem.* **265**(26): 15671-15679.
- Falick AM, Hines WM, Medzihradzky KF, Baldwin MA and Gibson BW (1993). Low-mass ions produced from peptides by high-energy collision-induced dissociation in tandem mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **4**(11): 882-893.
- Fenical W (1982). Natural products chemistry in the marine environment. *Science* **215**: 923-928.
- Fogelqvist E (1985). Carbon tetrachloride, tetrachloroethylene, 1,1,1 trichloroethane and Bromoform in arctic seawater. *J. Geophys. Res.* **90**(C5): 9181-9193.
- Fogelqvist E and Krysell M (1986). The anthropogenic and biogenic origin of low molecular weight halocarbons in a polluted fjord, the Idefjorden. *Mar. Pollut. Bull.* **17**(8): 378-382.
- Franzen S, Roach MP, Chen YP, Dyer RB, Woodruff WH and Dawson JH (1998). The unusual reactivities of *Amphrite ornata* dehaloperoxidase and *Notomastus lobatus* chloroperoxidase do not arise from a histidine imidazole proximal haem iron ligand. *J. Am. Chem. Soc.* **120**: 4658-4661.
- Furtmüller PG, Arnhold J, Jantschko W, Pichler H and Obinger C (2003). Redox properties of the couples compound I/compound II and compound II/native enzyme of human myeloperoxidase. *Biochem. Biophys. Res. Commun* **301**(2): 551-557.
- Furtmüller PG, Jantschko W, Regelsberger G and Obinger C (2001). Spectral and kinetic studies on eosinophil peroxidase compounds I and II and their reaction with ascorbate and tyrosine. *Biochim. Biophys. Acta* **1548**(1): 121-128.
- Furtmüller PG, Jantschko W, Regelsberger G, Jakopitsch C, Arnhold J and Obinger C (2002). Reaction of lactoperoxidase compound I with halides and thiocyanate. *Biochemistry* **41**(39): 11895-11900.
- Ghosh A, Shieh JJ, Pan CJ, Sun MS and Chou JY (2002). The catalytic center of glucose-6-phosphatase. HIS176 is the nucleophile forming the phosphohistidine-enzyme intermediate during catalysis. *J Biol Chem.* **277**(36): 32837-32842.
- Givskov M, de Nys R, Manefield M, Gram L, Maximilien R, Eberl L, Molin S, Steinberg PD and Kjelleberg S (1996). Eukaryotic interference with homoserine lactone-mediated prokaryotic signalling. *J. Bacteriol.* **178**(22): 6618-6622.
- Greenwood NN and Earnshaw A (1997). *Chemistry of the Elements*, School of Chemistry University of Leeds, U. K.
- Gribble GW (2003). The diversity of naturally produced organohalogenes. *Chemosphere* **52**: 289-297.
- Gschwend PM, MacFarlane JK and Newman KA (1985). Volatile halogenated organic compounds released to seawater from temperate marine macroalgae. *Science* **227**: 1033-1035.
- Hager LP, Morris DR, Brown FS and Eberwein H (1966). Chloroperoxidase. II. Utilization of halogen anions. *J. Biol. Chem.* **241**: 1769-1777.
- Happell JD and Wallace DWR (1996). Methyl iodide in the Greenland/Norwegian Seas and the tropical Atlantic Ocean: Evidence for photochemical production. *Geophys. Res. Lett.* **23**: 2105-2108.
- Harper DB and Hamilton JTG (1988). Biosynthesis of chloromethane in *Phellinus pomaceus*. *J. Gen. Microbiol.* **134**: 2831-2839.
- Hatfield RD, Ralph J and Grabber J (1999). Cell wall cross-linking by ferulates and diferulates in grasses. *J. Sci. Food Agric.* **79**: 403-407.

- Haug A, Larsen B and Smidsrød O (1974). Uronic acid sequence in alginate from different sources. *Carbohydrate Res.* **32**: 217-225.
- Hecht HJ, Sobek H, Haag T, Pfeifer O and van Pée K-H (1994). The metal-ion-free oxidoreductase from *Streptomyces aureofaciens* has an alpha/beta hydrolase fold. *Nat. Struct. Biol.* **1**: 532-537.
- Hemrika W and Wever R (1997). A new model for the membrane topology of glucose-6-phosphatase: the enzyme involved in von Gierke disease. *FEBS Lett.* **409**(3): 317-319.
- Hemrika W, Renirie R, Dekker HL, Barnett P and Wever R (1997). From phosphatases to vanadium peroxidases: a similar architecture of the active site. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**(6): 2145-2149.
- 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.
- Hewson WD and Hager LP (1980). Bromoperoxidases and halogenated lipids in marine algae. *J. Phycol.* **16**: 340-345.
- Hofmann B, Tölzer S, Pelletier I, Altenbuchner J, van Pée K-H and Hecht HJ (1998). Structural investigation of the cofactor-free chloroperoxidases. *J. Mol. Biol.* **279**: 889-900.
- Hormes J, Kuetgens U, Chauvistre R, Schreiber W, Anders N, Vilter H, Rehder D and Weidemann C (1988). Vanadium K-edge absorption spectrum of bromoperoxidase from *Ascophyllum nodosum*. *Biochim. Biophys. Acta* **956**(3): 293-299.
- Howe GA and Schillmiller AL (2002). Oxylipin metabolism in response to stress. *Curr. Opin. Plant Biol.* **5**(3): 230-236.
- Ishikawa K, Mihara Y, Gondoh K, Suzuki E and Asano Y (2000). X-ray structures of a novel acid phosphatase from *Escherichia blattae* and its complex with the transition-state analog molybdate. *EMBO J.* **19**(11): 2412-2423.
- 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 alga *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**(11): 5194-5200.
- Itoh N, Kawanami T, Liu J-Q, Dairi T, Miyakoshi M, Nitta C and Kimoto Y (2001). Cloning and biochemical characterization of Co²⁺-activated bromoperoxidase-esterase (perhydrolase) from *Pseudomonas putida* IF-3 strain. *Biochim. Biophys. Acta* **1545**(1-2): 53-66.
- Itoh N, Sasaki H, Ohsawa N, Shibata MS and Miura J (1996). Bromoperoxidase in *Corallina pilulifera* is regulated by its vanadate content. *Phytochemistry* **42**(2): 277-281.
- Itoh N, Tsujita M, Ando T, Hisatomi G and Higashi T (1997). Formation and emission of monohalomethanes from marine algae. *Phytochemistry* **45**: 67-73.
- Johnson RS, Martin SA, Biemann K, Stults JT and Watson JT (1987). Novel fragmentation process of peptides by collision-induced decomposition in a tandem mass spectrometer: differentiation of leucine and isoleucine. *Anal. Chem.* **59**(21): 2621-2625.
- Kawanami T, Miyakoshi M, Dairi T and Itoh N (2002). Reaction Mechanism of the Co²⁺-Activated Multifunctional Bromoperoxidase-Esterase from *Pseudomonas putida* IF-3. *Arch. Biochem. Biophys.* **398**(1).
- Keller S, Wage T, Hohaus K, Hölzer M, Eichhorn E and van Pée K-H (2000). Purification and partial characterization of tryptophan 7-halogenase (PrnA) from *Pseudomonas fluorescens*. *Angew. Chem. Int. Ed.* **39**: 2300-2302.
- Kirner S, Hammer PE, Hill DS, Altmann A, Fischer I, Weislo LJ, Lanahan M, van Pée K-H and Ligon JM (1998). Functions encoded by pyrrolnitrin biosynthetic genes from *Pseudomonas fluorescens*. *J. Bacteriol.* **180**: 1939-1943.
- Kolb CE (2002). Iodine's air of importance. *Nature* **417**(6889): 597-598.
- Kostrewa D, Grüninger-Leitch F, D'Arcy C, Mitchell D and Van Loon APGM (1997). Crystal structure of phytase from *Aspergillus ficuum* at 2.5 Å resolution. *Nat. Struct. Biol.* **4**: 185.
- Krenn BE, Izumi Y, Yamada H and Wever R (1989). A comparison of different (vanadium)bromoperoxidases; the bromoperoxidase from *Corallina pilulifera* is also a vanadium enzyme. *Biochim. Biophys. Acta* **998**: 63-68.
- Krysell M and Nightingale PD (1994). Low molecular weight halocarbons in the Humber and Rhine estuaries determined

- using a new purge and trap gas chromatographic method. *Cont. Shelf Res.* **14**: 1331-1329.
- Küpper FC (2001). Biology and biochemistry of host-pathogen interactions in marine brown algae. *Thèse de doctorat*, Université de Paris XI, Orsay, France - University of Konstanz, Germany. Hartung-Gorre Verlag Konstanz.
- Küpper FC, Kloareg B, Guern J and Potin P (2001). Oligoalginates elicit an oxidative burst in the brown alga Kelp *Laminaria digitata*. *Plant Physiol.* **125**: 278-291.
- Küpper FC, Müller DG, Peters AF, Kloareg B and Potin P (2002). Oligoalginate recognition and oxidative burst play a key role in natural and induced resistance of sporophytes of laminariales. *J. Chem. Ecol.* **28**(10): 2057-2081.
- Küpper FC, Schweigert N, Ar Gall E, Legendre J-M, Vilter H and Kloareg B (1998). Iodine uptake in Laminariales involves extracellular, haloperoxidase-mediated oxidation of iodide. *Planta* **207**: 163-171.
- Kusthardt U, Hedman B, Hodgson KO, Hahn R and Vilter H (1993). High-resolution XANES studies on vanadium-containing haloperoxidase: pH-dependence and substrate binding. *FEBS Lett.* **329**(1-2): 5-8.
- Kylin H (1929). Über das Vorkommen von Jodiden, Bromiden und Jodidoxidasen bei Meeresalgen. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **186**: 50-84.
- Laniewski K, Dahlén J, Borén H and Grimvall A (1999). Determination of group parameters for organically bound chlorine, bromine and iodine in precipitation. *Chemosphere* **38**(4): 771-782.
- Laternus F (2001). Marine macroalgae in polar regions as natural sources for volatile organohalogenes. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* **8**(2): 103-108.
- Laxalt AM and Munnik T (2002). Phospholipid signalling in plant defence. *Curr. Opin. Plant Biol.* **5**(4): 332-338.
- Leblanc C, Colin C, Delage L, Roeder V, Potin P and Kloareg B (2003). Haloperoxidases from the brown algal kelp *Laminaria digitata*, methods of preparation and uses thereof. European patent # 03290518.4.
- Ligtenbarg AGJ, Hage R and Feringa BL (2003). Catalytic oxidations by vanadium complexes. *Coord. Chem. Rev.* **237**(1-2): 89-101.
- Liss PS (1986). The air-sea exchange of low molecular weight halocarbon gases. *The role of air-sea gas exchange in geochemical cycling*. P Buat-Ménard and D Reidel, Norwell, Mass.: 113-127.
- Littlechild JA (1999). Haloperoxidases and their role in biotransformation reactions. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **3**: 28-34.
- Littlechild JA and Garcia-Rodriguez E (2003). Structural studies on the dodecameric vanadium bromoperoxidase from *Corallina* species. *Coord. Chem. Rev.* **237**(1-2): 65-76.
- Littlechild JA, Garcia-Rodriguez E, Dalby AR and Isupov MN (2002). Structural and functional comparisons between vanadium haloperoxidase and acid phosphatase enzymes. *J. Mol. Recognit.* **15**: 291-296.
- Liu TN, M'Timkulu T, Geigert J, Wolf B, Needleman SL, Silva D and Hunter-Cevera JC (1987). Isolation and characterization of a novel nonheme chloroperoxidase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **142**(2): 329-333.
- Loo JA, Edmonds CG and Smith RD (1993). Tandem mass spectrometry of very large molecules. 2. Dissociation of multiply charged proline-containing proteins from electrospray ionization. *Anal. Chem.* **65**(4): 425-438.
- Lopez-Huertas E, Charlton WL, Johnson B, Graham IA and Baker A (2000). Stress induces peroxisome biogenesis genes. *EMBO J.* **19**(24): 6770-6777.
- Lovelock JE (1973). Halogenated hydrocarbons in and over the atlantic. *Nature* **241**: 194-196.
- 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**(2): 209-219.
- Malin G, Küpper FC, Carpenter LJ, Baker A, Broadgate W, Kloareg B and Liss PS (2001). Trace gas production by seaweeds: Defense, oxidative stress, signalling and atmospheric significance. *J. Phycol.* **37**(suppl. #3): 32.
- Mallick N and Mohn FH (2000). Reactive oxygen species : response of alga cells. *J. Plant Physiol.* **157**(2): 183-193.
- 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.

- Manefield M, Welch M, Givskov M, Salmond GP and Kjelleberg S (2001). Halogenated furanones from the red alga, *Delisea pulchra*, inhibit carbapenem antibiotic synthesis and exoenzyme virulence factor production in the phytopathogen *Erwinia carotovora*. *FEMS Microbiol. Lett.* **205**(1): 131-138.
- Maniatis T, Fritsch EF and Sambrook J (1989). *A laboratory manual. The standard Molecular Biology cookbook*, Cold Spring Harbor Press.
- Manley SL (2002). Phyto-genesis of halomethanes: A product of selection or a metabolic accident? *Biochemistry* **60**: 163-180.
- Manley SL and Barbero PE (2001). Physiological constraints on bromoform (CHBr₃) production by *Ulva lactuca* (Chlorophyta). *Limnol. Oceanogr.* **46**: 1392-1399.
- Manley SL and Dastoor MN (1988). Methyl iodide production by kelp and associated microbes. *Mar. Biol.* **98**: 477-482.
- Marchand M, Caprais JC and Pignet P (1988). Hydrocarbons and halogenated hydrocarbons in coastal waters of the western Mediterranean (France). *Mar. Environ. Res.* **25**: 131-159.
- Martinez JS, Carroll GL, Tschirret-Guth RA, Altenhoff G, Little DR and Butler A (2001). On the regiospecificity of vanadium bromoperoxidase. *J. Am. Chem. Soc.* **123**: 3289-3294.
- Maximilien R, de Nys R, Holmström C, Gram L, Givskov M, Crass K, Kjelleberg S and Steinberg PD (1998). Chemical mediation of bacterial surface colonisation by secondary metabolites from the red alga *Delisea pulchra*. *Aquat. Microb. Ecol.* **15**: 233-246.
- McConnell OJ and Fenical W (1980). Halogen chemistry of the red alga *Bonnemaisonia*. *Phytochemistry* **19**(2): 233-247.
- McCormick JRD (1997). Tetracyclines. *Antibiotics*. D Gottlieb and PD Shaw. Berlin, Springer. **2**: 113-122.
- McCulloch A (2003). Fluorocarbons in the global environment: a review of the important interactions with atmospheric chemistry and physics. *J. Fluorine Chem.* **123**(1): 21-29.
- 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.
- Messerschmidt A, Prade L and Wever R (1997). Implications for the catalytic mechanism of the vanadium-containing enzyme chloroperoxidase from the fungus *Curvularia inaequalis* by X-ray structures of the native and peroxide form. *Biol. Chem.* **378**: 309-315.
- Mittler R (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci.* **7**(9): 405-410.
- Molina MJ and Rowland FS (1974). Stratospheric Sink for Chlorofluoromethanes: Chlorine Catalysed Destruction of Ozone. *Nature* **249**: 810-814.
- Montone RC, Taniguchi S and Weber RR (2003). PCBs in the atmosphere of King George Island, Antarctica. *Sci. Total Environ.* **308**(1-3): 167-173.
- Moore CA and Okuda RK (1996). Bromoperoxidase activity in 94 species of marine algae. *J. Nat. Toxins* **5**(3): 265-305.
- Moore RM and Zafiriou OC (1994). Photochemical production of methyl iodide in seawater. *J. Geophys. Res.* **99**: 16415-16420.
- Moore RM, Tokarczyk R, Tait VK, Poulin M and Green C (1995). Marine phytoplankton as a natural source of volatile organohalogens. *Naturally-Produced Organohalogens*. A Grimvall and EWB de Leer. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers: 283-294.
- Morris DR and Hager LP (1966). Chloroperoxidase. I. Isolation and properties of the crystalline glycoprotein. *J. Biol. Chem.* **241**(8): 1763-1768.
- Mtolera M, Collén J, Pedersén M, Ekdahl A, Abrahamsson K and Semesi A (1996). Stress Induced Production of Volatile Halogenated Organic Compounds in *Eucheuma denticulatum* (Rhodophyta) caused by elevated pH and high light intensity. *J. Eur. Phycol.* **31**: 89-95.
- Murphy CD (2003). New frontiers in biological halogenation. *J. Appl. Microbiol.* **94**(4): 539-548.
- Murphy CD, Moss SJ and O'Hagan D (2001). Isolation of an Aldehyde Dehydrogenase Involved in the Oxidation of Fluoroacetaldehyde to Fluoroacetate in *Streptomyces cattleya*. *Applied and Environmental Microbiology*. **67**(10): 4919-4921.

- Neidleman SL and Geigert J (1986). *Biohalogenation : Principles, Basic Roles and Applications*. Chichester.
- Neuwald AF (1997). An unexpected structural relationship between integral membrane phosphatases and soluble haloperoxidases. *Protein Sci.* **6**(8): 1764-1767.
- Ni X and Hager LP (1998). cDNA cloning of *Batis maritima* methyl chloride transferase and purification of the enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**: 12866-12871.
- Nightingale PD, Malin G and Liss PS (1995). Limnol. Oceanogr. Production of chloroform and other low-molecular-weight halocarbons by some species of macroalgae. *Limnol. Oceanogr.* **40**: 680-689.
- Nyvall P, Corre E, Boisset C, Barbeyron T, Rousvoal S, Scornet D, Kloareg B and Boyen C (2003). Characterization of mannuronan C-5-epimerase genes from the brown alga *Laminaria digitata*. *Plant Physiol.* **133**(2): 726-735.
- O'Brien PJ (2000). Peroxidases. *Chem. Biol. Interact.* **129**(1-2): 113-139.
- O'Dowd CD, Jimenez JL, Bahreini R, Flagan RC, Seinfeld JH, Hämeri K, Pirjola L, Kulmala M, Jennings GS and Hoffmann T (2002). Marine aerosol formation from biogenic iodine emissions. *Nature* **417**: 632-636.
- O'Hagan D, Schaffrath C, Cobb SL, Hamilton JTG and Murphy CD (2002). Biosynthesis of an organofluorine molecule. *Nature* **416**: 279.
- Ohsawa N, Ogata Y, Okada N and Itoh N (2001b). Physiological function of bromoperoxidase in the red marine alga, *Corallina pilulifera*: production of bromoform as an allelochemical and the simultaneous elimination of hydrogen peroxide. *Phytochemistry* **58**(5): 683-692.
- Ohsawa N, Tsujita M, Morikawa S and Itoh N (2001a). Purification and characterization of a monohalomethane-producing enzyme S-adenosyl-L-methionine: halide ion methyltransferase from a marine microalga, *Pavlova pinguis*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **65**(11): 2397-2404.
- Pearson JP (2002). Early activation of quorum sensing. *J. Bacteriol.* **184**(10): 2569-2571.
- Pedersén M, Collén J, Abrahamsson K and Ekdahl A (1996). Production of halocarbons from seaweeds: an oxidative stress reaction? *Sci. Mar.* **60**(Supl. 1): 257-263.
- Pinot F, Bosch H, Salaün J-P, Durst F, Mioskowski C and Hammock BD (1997). Epoxide hydrolase activities in the microsomes and the soluble fraction from *Vicia sativa* seedlings. *Plant Physiol. Biochem.* **35**: 103-110.
- Plat H, Krenn BE and Wever R (1987). The bromoperoxidase from the lichen *Xanthoria parietina* is a novel vanadium enzyme. *Biochem. J.* **248**: 277-279.
- Platt U and Honninger G (2003). The role of halogen species in the troposphere. *Chemosphere* **52**(2): 325-338.
- Platt U and Janssen C (1996). Observation and role of the free radicals NO₃, ClO, BrO and IO in the Troposphere. *Faraday Discuss.* **100**: 175-198.
- Pohnert G and Boland W (2002). The oxylipin chemistry of attraction and defense in brown algae and diatoms. *Nat. Prod. Rep.* **19**(1): 108-122.
- Polzin JJ, Rorrer GL and Cheney DP (2003). Metabolic flux analysis of halogenated monoterpene biosynthesis in microplantlets of the macrophytic red alga *Ochtodes secundiramea*. *Biomol. Eng.* **20**: 205-215.
- Potin P, Bouarab K, Küpper FC and Kloareg B (1999). Oligosaccharide recognition signals and defence reactions in marine plant-microbe interactions. *Curr. Opin. Microbiol.* **2**: 276-283.
- Potin P, Bouarab K, Salaün J-P, Pohnert G and Kloareg B (2002). Biotic interactions of marine algae. *Curr. Opin. Plant Biol.* **5**(4): 308-317.
- Prather MJ, McElroy MB and Wofsy SC (1984). Reductions in ozone at high concentrations of stratospheric halogens. *Nature* **312**: 227-231.
- Preobrazhenskaya YV, Voskoboev AI and Burd VN (2003). Phosphatase activity of non-heme chloroperoxidase from the bacterium *Serratia marcescens*. *FEBS Lett.* **536**(1-3): 41-44.
- Rabilloud T, Strub J-M, Luche S, Van Dorsselaer A and Lunardi J (2001). A comparison between Sypro Ruby and ruthenium II tris (bathophenanthroline disulfonate) as fluorescent stains for protein detection in gels. *Proteomics* **1**(5): 699-704.
- Rasmussen TB, Manfield 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.
- Rehder D (2003). Biological and medicinal aspects of vanadium. *Inorg. Chem. Comm.* **6**(5): 604-617.
- Renirie R, Hemrika W and Wever R (2000b). Peroxidase and phosphatase activity of active-site mutants of vanadium chloroperoxidase from the fungus *Curvularia inaequalis*. Implications for the catalytic mechanisms. *J. Biol. Chem.* **275**(16): 11650-11657.
- Renirie R, Hemrika W, Piersma SR and Wever R (2000a). Cofactor and substrate binding to vanadium chloroperoxidase determined by UV-VIS spectroscopy and evidence for high affinity for pervanadate. *Biochemistry* **39**(5): 1133-1141.
- Rezanka T and Dembitsky VM (1999). Brominated fatty acids from lichen *Acorospora gobiensis*. *Phytochemistry* **50**(1): 97-99.
- Rhew RC, Miller BR and Weiss RF (2000). Natural methyl bromide and methyl chloride emissions from coastal salt marshes. *Nature* **403**: 292-295.
- Roche J and Yagi Y (1952). Sur la fixation de l'iode radioactif par les algues et sur les constituants iodés des laminaires. *C. R. Soc. Biol. Paris* **146**: 642-645.
- Roepstorff P and Fohlman J (1984). Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides. *Biomed. Mass Spectrom.* **11**(11): 601.
- Saenko GN, Kravtsova YY, Ivanenko VV and Sheludko SI (1978). Concentration of iodine and bromine by plants in the Seas of Japan and Okhotsk. *Mar. Biol.* **47**: 243-250.
- Saini HS, Attieh JM and Hanson AD (1995). Biosynthesis of Halomethanes and Methanethiol by Higher Plants via a Novel Methyltransferase Reaction. *Plant Cell Environ.* **18**: 1027-1033.
- Sanchez C, Butovich IA, Brana AF, Rohr J, Mendez C and Salas J (2002). The biosynthetic gene cluster for the antitumor rebeccamycin from *Saccharothrix aerocolonigenes* ATCC39243: characterization and generation of indolocarbazole derivatives. *Chem. Biol.* **9**: 519-531.
- Saxena D, Aouad S, Attieh JM and Saini HS (1998). Biochemical characterization of chloromethane emission from the wood-rotting fungus *Phellinus pomaceus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 2831-2835.
- Schnitzler I, Pohnert G, Hay M and Boland W (2001). Chemical defence of brown algae (*Dictyopteris spp.*) against the herbivorous amphipod *Ampithoe longimana*. *Oecologia* **126**: 515-521.
- Shaw PD and Hager LP (1959). Biological chlorination. III. beta-Ketoadipate chlorinase: a soluble enzyme system. *J. Biol. Chem.* **234**: 2565-2569.
- Shaw PD and Hager LP (1961). Chloroperoxidase: a component of the beta-ketoadipate chlorinase system. *J. Biol. Chem.* **236**: 1626-1630.
- Shaw TI (1962). Halogens. *Physiology and biochemistry of algae*. RA Lewin. New York, Academic Press: 247-253.
- Sheffield DJ, Smith AJ, Harry TR and Rogers LJ (1993). Thermostability of the vanadium bromoperoxidase from *Corallina officinalis*. *Biochem. Soc. Trans.* **21**(4): 445S.
- Shimonishi M, Kuwamoto S, Inoue H, Wever R, Ohshiro T, Izumi Y and Tanabe T (1998). Cloning and expression of the gene for a vanadium-dependent bromoperoxidase from a marine macro-alga, *Corallina pilulifera*. *FEBS Lett.* **428**(1-2): 105-110.
- Simons BH, Barnett P, Vollenbroek EGM, Dekker HL, Muijsers AO, Messerschmidt A and Wever R (1995). Primary structure and characterization of the vanadium chloroperoxidase from the fungus *Curvularia inaequalis*. *Eur. J. Biochem.* **229**(2): 566-574.
- Singh J, Nordlie RC and Jorgenson RA (1981). Vanadate: a potent inhibitor of multifunctional glucose-6-phosphatase. *Biochim. Biophys. Acta* **678**(3): 477-482.
- Smith TS and Pecoraro VL (2002). Oxidation of organic sulfides by vanadium haloperoxidase model complexes. *Inorg. Chem.* **41**(25): 6754-6760.
- Soedjak HS and Butler A (1990a). Characterization of vanadium bromoperoxidase from *Macrocystis* and *Fucus*: reactivity of vanadium bromoperoxidase toward acyl and alkyl peroxides and bromination of amines. *Biochemistry* **29**(34): 7974-7981.

- Soedjak HS and Butler A (1990b). Chlorination Catalyzed by Vanadium Bromoperoxidase. *Inorg. Chem.* **29**: 5015-5017.
- Soedjak HS and Butler A (1991). Mechanism of dioxygen formation catalysed by vanadium bromoperoxidase from *Macrocystis pyrifera* and *Fucus distichus* : steady state kinetic analysis and comparison to the mechanism of V-BrPO from *Ascophyllum nodosum*. *Biochim. Biophys. Acta* **1079**: 1-7.
- 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**(39): 12689-12696.
- Spotte S and Bidwell JP (1985). *Artificial Seawaters: Formulas and Methods*, Jones & Bartlett Pub.
- Starr RC and Zeikus JA (1987). UTEX-The culture collection at the University of Texas. *J. Phycol.* **23**(suppl.): S1-S27.
- Stukey J and Carman GM (1997). Identification of a novel phosphatase sequence motif. *Protein Sci.* **6**(2): 469-472.
- Sundaramoorthy M, Ternier J and Poulos TL (1995). The crystal structure of chloroperoxidase: a heme peroxidase-cytochrome P450 functional hybrid. *Structure* **3**(12): 1367-1377.
- Sundström J, Collén J, Abrahamsson K and Pedersén M (1996). Halocarbon Production and in vivo Brominating Activity of *Eucheuma denticulatum*. *Phytochemistry* **42**: 1527-1530.
- Tanaka N, Dumay V, Liao Q, Lange AJ and Wever R (2002). Bromoperoxidase activity of vanadate-substituted acid phosphatases from *Shigella flexneri* and *Salmonella enterica ser. typhimurium*. *Eur. J. Biochem.* **269**(8): 2162-2167.
- 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*. *Inorg. Chim. Acta* **356**: 288-296.
- ten Brink HB, Holland HL, Schoemaker HE, van Lingen H and Wever R (1999). Probing the scope of the sulfoxidation activity of vanadium bromoperoxidase from *Ascophyllum nodosum*. *Tetrahedron Asymm.* **10**: 4563-4572.
- ten Brink HB, Schoemaker HE and Wever R (2001). Sulfoxidation mechanism of vanadium bromoperoxidase from *Ascophyllum nodosum*. *Eur. J. Biochem.* **268**: 132-138.
- ten Brink HB, Tuynman A, Dekker HL, Hemrika W, Izumi Y, Oshiro T, Schoemaker HE and Wever R (1998). Enantioselective Sulfoxidation Catalyzed by Vanadium Haloperoxidases. *Inorg. Chem.* **37**(26): 6780-6784.
- Tijet N, Helvig C, Pinot F, Le Bouquin R, Lesot A, Durst F, Salaün J-P and Benveniste I (1998). Functional expression in yeast and characterization of a clofibrate-inducible plant cytochrome P-450 (CYP94A1) involved in cutin monomers synthesis. *Biochem. J.* **332**: 583-589.
- Toumi R (1994). BrO as a sink for dimethylsulphide in the marine atmosphere. *Geophys. Res. Letters* **21**: 117-120.
- Tromp MGM, Olafsson G, Krenn BE and Wever R (1990). Some structural aspects of vanadium bromoperoxidase from *Ascophyllum nodosum*. *Biochim. Biophys. Acta* **1040**(2): 192-198.
- Truesdale VW and Jones SD (1996). The variation of iodate and total iodine in some UK rainwaters during 1980-1981. *J. Hydrol.* **179**: 67-86.
- Tschirret-Guth RA and Butler A (1994). Evidence for organic substrate binding to vanadium bromoperoxidase. *J. Am. Chem. Soc.* **116**: 411-412.
- Upstill-Goddard RC and Elderfield H (1988). The role of diagenesis in the estuarine budgets of iodine and bromine. *Contin. Shelf Res.* **8**: 405-430.
- Urhahn T and Ballschmiter K (1998). Chemistry of the biosynthesis of halogenated methanes: C1-organohalogenes as pre-industrial chemical stressors in the environment? *Chemosphere* **37**(6): 1017-1032.
- Vairappan CS (2003). Potent antibacterial activity of halogenated metabolites from Malaysian red algae, *Laurencia majuscula* (Rhodomelaceae, Ceramiales). *Biomol. Eng.* **20**: 255-259.
- Vairappan CS, Daitoh M, Suzuki M, Abe T and Masuda M (2001b). Antibacterial halogenated metabolites from the Malaysian *Laurencia* species. *Phytochemistry* **58**(2): 291-297.
- Vairappan CS, Suzuki M, Abe T and Masuda M (2001a). Halogenated metabolites with antibacterial activity from the Okinawan *Laurencia* species. *Phytochemistry* **58**(3): 517-523.
- van de Velde F, Arends IWCE and Sheldon RA (2000b). Biocatalytic and biomimetic oxidations with vanadium. *J. Inorg. Biochem.* **80**(1-2): 81-89.

- van de Velde F, Könemann L, Van Rantwijk F and Sheldon RA (2000a). The rational design of semisynthetic peroxidases. *Biotechnol. Bioeng.* **67**: 87.
- van Pée K-H (1996). Biosynthesis of halogenated metabolites by bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **50**: 375-399.
- van Pée K-H and Lingens F (1985). Purification and molecular and catalytic properties of bromoperoxidase from *Streptomyces phaeochromogenes*. *J. Gen. Microbiol.* **131**(Pt 8): 1911-1916.
- van Pée K-H and Unversucht S (2003). Biological dehalogenation and halogenation reactions. *Chemosphere* **52**(2): 299-312.
- van Pée K-H and Zehner S (2003). Enzymology and molecular genetics of biological halogenation. *The Handbook of Environmental Chemistry* **3**(Part P): 171-199.
- van Schijndel JW, Barnett P, Roelse J, Vollenbroek EGM and Wever R (1994). The stability and steady-state kinetics of vanadium chloroperoxidase from the fungus *Curvularia inaequalis*. *Eur. J. Biochem.* **225**: 151-157.
- van Schijndel JW, Vollenbroek EGM and Wever R (1993). The chloroperoxidase from the fungus *Curvularia inaequalis*; a novel vanadium enzyme. *Biochim. Biophys. Acta* **1161**(2-3): 249-256.
- Verdel EF, Kline PC, Wani S and Woods AE (2000). Purification and partial characterization of haloperoxidase from fresh water algae *Cladophora glomerata*. *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* **125**(2): 179-187.
- Vescina CM, Salice VC, Cortizo AM and Etcheverry SB (1996). Effect of vanadium compounds on acid phosphatase activity. *Biol. Trace Elem. Res.* **53**(1-3): 185-191.
- Vilter H (1983). Peroxidases from Phaeophyceae. IV: Fractionation and location of peroxidase enzymes. *Bot. Marina* **26**: 451-455.
- Vilter H (1984). Peroxidases from Phaeophyceae: a vanadium(V)-dependent peroxidase from *Ascophyllum nodosum*. *Phytochemistry* **23**: 1387-1390.
- Vilter H (1994). Aqueous Two-Phase Systems. *Methods Enz.* **228**: 665-672.
- Vilter H (1995). Vanadium-dependent haloperoxidases. *Metal ions in biological systems*. H Sigel and A Sigel. New York, Basel, Hong Kong, Marcel Dekker, Inc. **31**: 325-362.
- Vogt R, Sander R, von Glasow R and Crutzen PJ (1999). Iodine chemistry and its role in halogen activation and ozone loss in the marine boundary layer: A model study. *J. Atmos. Chem.* **32**: 375-395.
- Vreeland V and Ng KL (1999). Marine Algal Vanadium Peroxidase: Substratum Adhesion and Active Recombinant Catalytic Domain (Abstract # 61). *Peroxidase conference*, Columbus Ohio.
- Vreeland V, Waite JH and Epstein L (1998). Polyphenols and oxidases in substratum adhesion by marine algae and mussels. *J. Phycol.* **34**: 1-8.
- Wagner E (2004). Nouvelles approches de la spectrométrie de masse en tandem pour la caractérisation de biomolécules. Applications à la protéomique. *Thèse de doctorat*, Université Louis Pasteur, Strasbourg, France.
- Wayne RP, Poulet G, Biggs P, Burrows JP, Cox RA, Crutzen PJ, Hayman GD, Jenkin ME, Le Bras G and Moortgat GK (1995). Halogen oxides: Radicals, sources and reservoirs in the laboratory and in the atmosphere. *Atmos. Environ.* **29**(20): 2677-2881.
- Wehofsky M and Hoffmann R (2002). Automated deconvolution and deisotoping of electrospray mass spectra. *J. Mass Spectrom.* **37**(2): 223-229.
- Weinberger F, Friedlander M and Hoppe H-G (1999). Oligoagars elicit an oxidative burst in *Gracilaria conferta* (Rhodophyta). *J. Phycol.* **35**: 747-755.
- Wever R, Krenn BE, de Boer E, Offenberg H and Plat H (1988). Structure and function of vanadium-containing bromoperoxidases. *Prog. Clin. Biol. Res.* **274**: 477-493.
- Wever R, Plat H and de Boer E (1985). Isolation procedure and some properties of the bromoperoxidase from the seaweed *Ascophyllum nodosum*. *Biochim. Biophys. Acta* **830**: 181-186.
- Weyand M, Hecht HJ, Kiess M, Liaud M-F, 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.
- Whitehead NA, Barnard AM, Slater H, Simpson NJ and Salmond GP (2001). Quorum-sensing in Gram-negative bacteria.

FEMS Microbiol. Rev. **25**(4): 365-404.

Wilm MS and Mann M (1994). Ion Processes. *Int. J. Mass Spectrom.* **136**: 167-180.

Winter GEM and Butler A (1996). Inactivation of Vanadium Bromoperoxidase: Formation of 2-Oxohistidine. *Biochemistry* **35**: 11805-11811.

Wong GTF (1991). The marine geochemistry of iodine. *Rev. Aquat. Sci.* **4**(1): 45-73.

Wuosmaa AM and Hager LP (1990). Methyl chloride transferase: a carbocation route for biosynthesis of halometabolites. *Science* **249**: 160-162.

Young EG and Langille WM (1958). The occurrence of inorganic elements in marine algae of the Atlantic provinces of Canada. *Can. J. Bot.* **36**: 301-310.

Yung YL, Pinto JP, Watson RT and Sander SP (1980). Atmospheric bromine and ozone perturbations in the lower stratosphere. *J. Atmos. Sci.* **37**: 339-353.

Zehner S, Wynands I, Schmid C, Tölzer S, Kuschel M, Barth G and van Pée K-H (2000). Design of PCR-primers for the detection of halogenase-encoding regions in bacteria. *100th General Meeting of the American Society for Microbiology*, Los Angeles, USA.

Zeng J and Fenna RE (1992). X-ray crystal structure of canine myeloperoxidase at 3 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **226**(1): 185-207.

ANNEXES

Liste des espèces possédant une activité vHPO

Chloroperoxydases	
<i>Champignons terrestres :</i>	
<p><i>Drechslera biseptata</i> (1)</p> <p><i>Curvularia inaequalis</i> (2)</p> <p><i>Embellisia didymospora</i> (3)</p> <p><i>Botrytis cinerea</i> (4)</p>	
Bromoperoxydases	
<i>Algues vertes marines (Chlorophyta) :</i>	
<p><i>Ulvella lens</i> (5)</p> <p><i>Ulva lactuca</i> (6)</p>	
<i>Algues rouges marines (Rhodophyta) :</i>	
<p><i>Ceramium rubrum</i> (7)</p> <p><i>Chondrus crispus</i> (8)</p> <p><i>Corallina pilulifera</i> (9)</p> <p><i>Corallina officinalis</i> (10)</p> <p><i>Corallina vancouveriensis</i> (11)</p> <p><i>Ochtodes Secundiramea</i> (12)</p>	
<i>Algues brunes marines (Phaeophyta) :</i>	
<p><i>Alaria marginata</i> (13)</p> <p><i>Alaria nana</i> (13)</p> <p><i>Agarum cribosum</i> (13)</p> <p><i>Ascophyllum nodosum</i> (14)</p> <p><i>Carpophyllum marschalocarpum</i> (13)</p> <p><i>Carpophyllum plumosum</i> (13)</p> <p><i>Carpophyllum flexuosum</i> (13)</p> <p><i>Carpophyllum angustifolium</i> (13)</p> <p><i>Chorda filum</i> (15)</p> <p><i>Cystophora retroflexa</i> (13)</p> <p><i>Cystophora torulosa</i> (13)</p>	<p><i>Ecklonia stolonifera</i> (16)</p> <p><i>Ecklonia radiata</i> (13)</p> <p><i>Ecklonia maxima</i> (13)</p> <p><i>Eisenia arborea</i> (13)</p> <p><i>Fucus distichus</i> (17)</p> <p><i>Fucus serratus</i> (15)</p> <p><i>Fucus spiralis</i> (15)</p> <p><i>Fucus vesiculosus</i> (15)</p> <p><i>Glossophora harvei</i> (13)</p> <p><i>Hedophyllum sessile</i> (13)</p> <p><i>Hormosira banksii</i> (13)</p>

<i>Laminaria digitata</i> (18)	<i>Pelvetia canaliculata</i> (15)
<i>Laminaria groenlandica</i> (13)	<i>Pelvetioptis litoralis</i> (13)
<i>Laminaria hyperborea</i> (19)	<i>Postelsia palmaeformis</i> (13)
<i>Laminaria saccharina</i> (18, 19)	<i>Pterygophora californica</i> (13)
<i>Leathesia difformis</i> (13)	<i>Sargassum undulatum</i> (13)
<i>Lessonia variegata</i> (13)	<i>Sargassum spinuligerum</i> (13)
<i>Lessoniopsis littoralis</i> (13)	<i>Splachnidium rugosum</i> (13)
<i>Macrocystis integrifolia</i> (13)	<i>Xiphophora chondrophylla</i> (13)
<i>Macrocystis pyrifera</i> (17)	
<i>Nerocystis lutkeana</i> (13)	
Lichens :	
<i>Xanthoria parietina</i> (20)	
<i>Acrospora gobiensis</i> (21)	
Iodoperoxydases	
Algues brunes marines (Phaeophyta) :	
<i>Pelvetia canaliculata</i> (22)	
<i>Laminaria hyperborea</i> (19)	
<i>Laminaria ochroleuca</i> (19)	
<i>Saccocriza polyschides</i> (23)	
<i>Phyllariopsis brevipes</i> (24)	

(1) Hemrika et coll., 1997. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 94(6):2145-9. (2) van Scijndel et coll., 1993. *Biochim Biophys Acta*. 13;1161(2-3):249-56. (3) Barnett et coll., 1998. *J Biol Chem*. 273;36:23381-23387. (4) Bar-Nun et coll., 2002. *FEMS Microbiol Lett*. 19;217(1):121-4. (5) Ohshiro et coll., 1999. *Phytochem*. 52(7):1211-1215. (6) Flodin et coll., 1999. *Phytochem*. 51(1):135-138. (7) Krenn et coll., 1987. *Biochim Biophys Acta* 912(2):287-291. (8) Bouarab, 2000. Th. Doc. Paris 6. (9) Krenn et coll., 1989. *Biochim Biophys Acta* 998(1):63-68. (10) Yu et Whittaker, 1989. *Biochem Biophys Res Commun*. 160(1):87-92. (11) Everett et coll., 1990. *J Biol Chem*. 265(9):4908-14. (12) Rorrer et coll., 2001. *Biotechnol Bioeng*. 74(5):389-95. (13) Vilter, 1995. *Met Ions Biol Syst*. 31:325-62. (14) de Boer et coll., 1986. *Biochim Biophys Acta* 869(1):48-53. (15) de Boer et coll., 1986. *Biochim Biophys Acta* 872(1-2):104-115. (16) Hara et Sakurai, 1998. *J Inorg Biochem*. 72(1-2):23-8. (17) Soedjak et Butler, 1990. *Biochem*. 29(34):7974-81. (18) Jordan et Vilter, 1991. *Biochim Biophys Acta* 1073(1):98-106. (19) Almeida et coll., 2001. *Phytochem*. 57(5):633-42. (20) Plat et coll., 1987. *Biochem J*. 248(1):277-9. (21) Rezanka et Dembitsky, 1999. *Phytochem*. 50:97-99. (22) Almeida et coll., 2000. *Phytochem*. 54(1):5-11. (23) Almeida et coll., 1998. *Phytochem*. 48(2):229-239. (24) Almeida et coll., 1996. Plant Peroxidases: Biochem. and Physiol., University of Geneve. In: Obinger, C., Burner, U., Eberman, R., Penel, C., Greppin H. (Eds.):46-152.

Caractérisation biochimique et paramètres cinétiques des vHPOs

Tableau 1 : Caractérisation biochimique des vHPOs

Groupe	Espèce	Enzyme	Poids moléculaire			Activité Spécifique			pH opt.	Température		Référence			
			N	SDS	SDS+b	IPO	BPO	CPO		Opt.	Max.				
Algues marines	Fucales	<i>A. nodosum</i>	BPOI	100-400	97/120	67/60	-	60-170	0.49 qd [Cl] ⁺ +++	6.0	20	1h: 80°C 5min: 100°C	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 11		
			BPOII	-	106	70	-	51	-	7.2	20	1h: 80°C			
		<i>P. canaliculata</i>	IPOI (?)	166	-	66	55	2.5	-	6.0	20-40	1h: 60°C	12		
			IPOII (?)	416	-	66 72 157 280	105	5	- - - -	6.5	20-40	1h: 70-80°C			
	<i>F. distichus</i>	BPO	-	65	-	-	1580	-	6.5	-	-	13, 14			
	<i>E. stolonifera</i>	BPO	-	83	-	-	33	-	6.5	40	10min: 80°C	15			
	<i>L. digitata</i>	BPO	-	-	-	43-1140	-	-	-	-	-	16			
	<i>L. saccharina</i>	BPO	108	66+64	-	-	134-615	-	6.0-6.5	-	-	16, 17			
	<i>L. saccharina</i>	BPOI	169	67	-	-	320	12	-	6.1	40	1h: 60-70°C	18		
		BPOII	-	-	-	-	1067	32	-		30	1h: 60-70°C			
		IPOI	-	-	-	-	131	0	-		-	-			
			BPOII	-	67	-	-	300	16		-	-		-	
		<i>L. ochroleuca</i>	IPO I	-	-	-	-	0.3	0		-	-		-	-
			IPOIIa	133	65	-	-	16	0		-	-		-	-
			IPOIIb	-	-	-	-	9	0		-	-		-	-
	<i>M. pyriferus</i>	BPO	-	74	-	-	1730	-	6.0	-	-	13			
	<i>S. polyschides</i>	IPOA1 (?)	113	64	-	-	5.5	-	-	-	50	1h: >70°C	19		
		IPOA2 (?)	129		-	25.7	0.1	-	-						
IPOA3 (?)		132	-		3.9	-	-	-							
IPOV1 (?)		113	-		7.9	-	-	-							
IPOV2 (?)		129	-		43.9	-	-	-							
IPOV3 (?)		132	-		5.4	-	-	-							
IPOP1 (?)		113	-		3.2	-	-	-							
IPOP2 (?)		129	-		17.7	-	-	-							
IPOP3 (?)		132	-		1.2	-	-	-							
<i>P. brevipes</i>	IPO (?)	-	67	-	-	3.2	-	-	6.2	40	1h: >70°C	20			
Rhodophytes	<i>C. officinalis</i>	BPO	790	-	64	-	-	-	6.0-6.2/6.4	30	10min: >90°C	21, 22, 23, 24			
	<i>C. pilulifera</i>	BPO	110	-	64	-	26.3	-	6	60	20min: 65°C	11, 25, 26			
	<i>O. secundiramea</i>	BPO	-	-	-	-	-	-	6.0-6.2	-	-	27			
	<i>C. rubrum</i>	BPO	240	-	-	-	6	-	7.4	-	-	11, 28			
Lichen	<i>X. parietina</i>	BPO	-	-	65	-	79	-	5.5	50	2h: >80°C	29			
Champignon	<i>C. inaequalis</i>	CPO	67	-	67	-	-	7.5	5.5	-	5 min: 90°C	30, 31, 32, 33			

4^{ème} colonne : Estimation de la taille (en kDa) des enzymes en conditions natives (N) et en conditions dénaturantes, en présence (SDS+b) ou non (SDS) de β-mercaptoéthanol.

5^{ème} colonne : Activité spécifique de l'activité iodoperoxydase (IPO) (en μmole de peroxyde d'hydrogène consommé/minute/milligramme de protéine) et activité spécifique de l'activité bromo- (BPO) et chloroperoxydase (CPO) (en μmole de monochlorodimedone bromé ou chloré/minute/milligramme de protéine)

6^{ème} colonne : pH optimum (pH opt.) de l'activité vHPO

7^{ème} colonne : Température optimale (Opt.) de l'activité vHPO et température à partir de laquelle l'enzyme est dénaturée (Max).

Tableau 2 : Paramètres cinétiques des vHPOs

Groupes	Espèces	Enzymes	Paramètres cinétiques									
			Activité IPO			Activité BPO			Activité CPO			
			pH	$K_m \Gamma$ (mM)	$K_m H_2O_2$ (μ M)	pH	$K_m Br^-$ (mM)	$K_m H_2O_2$ (μ M)	pH	$K_m Cl^-$ (mM)	$K_m H_2O_2$ (μ M)	
Algues marines	Phaeophytes	<i>A. nodosum</i>	BPO I	6,1	0,82		6,5	25,8	113	5	344	
			BPO II				7,2	6,7	27			
		<i>P. canaliculata</i>	IPOI (?)	6	2,1	110						
			IPOII (?)	6,5	2,4	200						
		<i>F. distichus</i>				6,5	1,74	18				
		<i>M. pyrifera</i>					6,5	21,2	120			
			BPOproto				6,5	1				
		<i>L. saccharina</i>	BPOI	6,1	3,4	243						
			BPOII	6,1	2,7	273						
	<i>L. hyperborea</i>	IPOI	6,1	3,4	275							
		BPOII	6,1	3,4	275							
	<i>S. polyschides</i>	IPOV1 (?)	6,1	3,25	478							
		IPOV2 (?)	6,1	3,35	494							
		IPOV3 (?)	6,1	5,74	84							
	Rhodophytes	<i>C. officinalis</i>	BPO				6,5	1,3	27			
<i>C. pilulifera</i>		BPO				6,5	10	92				
<i>C. rubrum</i>		BPO				6,5	2					
Lichen	<i>X. parietina</i>	BPO				5,5	28 μ M	870				
Champignon	<i>C. inaequalis</i>	CPO				5	9 μ M		4,5	0,25	10	
	<i>E. didymospora</i>	CPO				5	5 μ M	60	5	1,2	60	

(1) Vilter, 1983. *Bot. Mar.* 27:451-455. (2) Vilter, 1984. *Phytochem.* 23:1387-1390. (3) Wever et coll., 1985. *Biochim. Biophys. Acta* 830:181-186. (4) de Boer et Wever, 1988. *J Biol Chem.* 263(25):12326-12332. (5) Krenn et coll., 1989. *J Biol Chem.* 264(32):19287-19292. (6) Everett et coll., 1990. *J Biol Chem.* 265(9):4908-4914. (7) Everett et coll., 1990. *J Biol Chem.* 265(26):15671-15679. (8) Tromp et coll., 1990. *Biochim Biophys Acta* 1040(2):192-198. (9) Soedjak et Butler, 1990. *Inorg. Chem.* 29:5015-5017. (10) Weyand et coll., 1999. *J Mol Biol.* 293(3):595-611. (11) Krenn et coll., 1989. *Biochim. Biophys. Acta* 998(1):63-68. (12) Almeida et coll., 2000. *Phytochem.* 54(1):5-11. (13) Soedjak et Butler, 1991. *Biochim. Biophys. Acta.* 1079:1-7. (14) Soedjak et Butler, 1990. *Biochem.* 29(34):7974-7981. (15) Hara et Sakurai, 1998. *J Inorg Biochem.* 72(1-2):23-28. (16) Jordan et Vilter, 1991. *Biochim. Biophys. Acta* 1073(1):98-106. (17) de Boer et coll., 1986. *Biochim. Biophys. Acta* 872(1-2):104-115. (18) Almeida et coll., 2001. *Phytochem.* 57(5):633-642. (19) Almeida et coll., 1998. *Phytochem.* 48(2):229-239. (20) Almeida et coll., 1996. *Plant Peroxidases: Biochemistry and Physiology*, University of Geneva. In: Obinger, C., Burner, U., Eberman, R., Penel, C., Greppin H. (Eds.):46-152. (21) Sheffield et coll., 1992. *Phytochem.* 32(1):21-26. (22) Sheffield et coll., 1993. *Biochem Soc Trans.* 21(4):445S. (23) Isupov et coll., 2000. *J Mol Biol.* 299(4):1035-1049. (24) Carter et coll., 2002. *J Inorg Biochem.* 91(1):59-69. (25) Itoh et coll., 1986. *J Biol Chem.* 261(11):5194-5200. (26) Shimonishi et coll., 1998. *FEBS Lett.* 428(1-2):105-110. (27) Rorrer et coll., 2001. *Biotechnol Bioeng.* 74(5):389-395. (28) Krenn et coll., 1987. *Biochim. Biophys. Acta* 912(2):287-291. (29) Plat et coll., 1987. *Biochem J.* 248(1):277-279. (30) Liu et coll., 1987. *Biochem Biophys Res Commun.* 142(2):329-333. (31) van Schijndel et coll., 1993. *Biochim Biophys Acta* 1161(2-3):249-256. (32) van Schijndel et coll., 1994. *Eur J Biochem.* 225:151-157. (33) Barnett et coll., 1998. *J Biol Chem.* 273(36):23381-7.

Analyses structurales des vHPOs

Tableau 1 : Codes PDB et/ou références des vHPOs natives cristallisées et des vHPOs recombinantes

code PDB	Source	Forme enzymatique ou mutation	Date de dépôt	Résolution (Å)	Référence
Chloroperoxydase dépendante du vanadium					
1VNC	<i>C. inaequalis</i>	Native (ion Azide)	01-09-1995	2.10	1
1IDQ	<i>C. inaequalis</i>	Native (VO4)	05-04-2001	2.03	2
1IDU	<i>C. inaequalis</i>	Native (Liaison peroxyde d'hydrogène)	05-04-2001	2.24	2
-	<i>C. inaequalis</i>	Native (tungstate)	-	-	3
1VNE	<i>C. inaequalis</i> recombinante	Asp292Ala	20-01-1999	2.15	4
1VNF	<i>C. inaequalis</i> recombinant	Arg360Ala	20-01-1999	2.35	4, 5
1VNG	<i>C. inaequalis</i> recombinant	His404Ala	20-01-1999	2.20	4
1VNH	<i>C. inaequalis</i> recombinant	His496Ala	20-01-1999	2.11	4
1VNI	<i>C. inaequalis</i> recombinant	Holo-enzyme	20-01-1999	2.15	3, 4
1VNS	<i>C. inaequalis</i> recombinant	Apo-enzyme	14-01-1999	1.66	4
-	<i>C. inaequalis</i> recombinant	Lys353Ala	-	-	5
-	<i>C. inaequalis</i> recombinant	Arg490Ala	-	-	5
-	<i>C. inaequalis</i> recombinant	Ser402Ala	-	-	6
-	<i>C. inaequalis</i> recombinant	Phe397His	-	-	6
Bromoperoxydase dépendante de vanadium					
1QI9	<i>Ascophyllum nodosum</i>	Native (VO4)	11-06-1999	2.0	7
1QHB	<i>Corallina officinalis</i>	Native (PO4)	11-05-1999	2.3	8
1UP8	<i>C. pilulifera</i> recombinant	Native (PO4)			9
-	<i>C. officinalis</i> recombinant	Halo-enzyme	-	-	10
-	<i>C. officinalis</i> recombinant	His480Ala	-	-	10

Liste des structures tridimensionnelles caractérisées (**1^{ère} colonne**, codes PDB ; **4^{ème} colonne**, dates de dépôts des structures ; **5^{ème} colonne**, résolutions des structures) et/ou des mutations réalisées sur les haloperoxydases dépendantes du vanadium (**3^{ème} colonne**).

Les références bibliographiques sont indiquées dans la **6^{ème} colonne**.

(1) Messerschmidt et Wever, 1996. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 9:392-396. (2) Messerschmidt et coll., 1997. *Biol. Chem.* 378:309-315. (3) Messerschmidt et Wever, 1998. *Inorg Chim Acta* 273:160-166. (4) Macedo-Ribeiro et coll., 1999. *J. Biol. Inorg. Chem.* 4(2):209-219. (5) Hemrika et coll., 1999. *J. Biol. Chem.* 274:23820-23827. (6) Tanaka et coll., 2003. *Inorg. Chim. Acta* 356:288-296. (7) Weyand et coll., 1999. *J. Mol. Biol.* 293:595-611. (8) Isopuv et coll., 2000. *J. Mol. Biol.* 299:1035-1049. (9) Garcia-Rodriguez et coll., non publié (10) Carter et coll., 2002. *J. Inorg. Biochem.* 91(1):59-69.

Tableau 2 : Caractéristiques structurales et/ou biochimiques de vHPOs mutées

		vCPO <i>C. inaequalis</i>								vBPO <i>C. officinalis</i>
		Asp292	Arg360	His404	His496	Lys353	Arg490	Ser402	Phe397	His403
Mutation		Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	His	Ala
Activité spécifique	<i>CPO</i>	0.1%	14%	0.1%	0%	1.5%	1.5%	4.4%	29%	0%
	<i>BPO</i>	nd	16% idem qd [Br ⁻] +++	nd	0%	1.6%	0.3% idem qd [Br ⁻] +++	20%	42% augm qd [Br ⁻] +++	4%
	<i>IPO</i>	nd	nd	nd	0%	nd	nd	nd	nd	idem
Paramètres cinétiques	<i>Cl⁻</i>	nd	$k m^{Cl^-} \times 20$	nd	nd	$k m^{Cl^-} +++$	$k m^{Cl^-} +++$	$k m^{Cl^-} \times 10$ $k cat/k m^{Cl^-} = 1/100$	$k m^{Cl^-} \times 15$ $k cat/k m^{Cl^-} = 1/100$	nd
	<i>Br⁻</i>	nd	$k m^{Br^-} +++$ $k cat/k m^{Br^-} = 1/10$	nd	nd	$k m^{Br^-} idem$	$k m^{Br^-} +++$ $k cat/k m^{Br^-} = 1/500$	$k m^{Br^-} idem$ $k cat/k m^{Br^-} = 1/6$	$k m^{Br^-} idem$ $k cat/k m^{Br^-} = 1/10$	nd
	<i>I⁻</i>	nd	-	nd	nd	nd	nd	nd	nd	$k m^{I^-} \times 20$
	<i>H₂O₂</i>	nd	$k m^{H_2O_2} +++$ $k cat/k m^{H_2O_2} = 1/700$	nd	nd	$k m^{H_2O_2} +++$	$k m^{H_2O_2} +++$ $k cat/k m^{H_2O_2} = 1/100$	$k m^{H_2O_2} \times 2$ $k cat/k m^{H_2O_2} = 1/10$	nd	$k m^{H_2O_2} \times 10$
Structure du site actif	<i>Changement</i>	0	0	rupture pont salin Asp292 / Arg490	0	nd	nd	nd	nd	nd
	<i>Conformation du vanadate</i>	idem	idem	idem	tétraédrique	nd	nd	nd	nd	nd
	<i>Occupation du résidu muté</i>	solvant	solvant	Arg490	solvant	nd	nd	nd	nd	nd
Rôle putatif	<i>Liaison au niveau du site actif</i>	PS / Arg360	LH / V	LH / V	LC / V	LH / V	LH / V	LH / V	0	LH / Lys353
	<i>Coordination du Vanadate</i>	-	-	-	+	-	-	-	-	-
	<i>Neutralisation de Vanadate</i>	-	+	-	-	-	+	+	-	-
	<i>Potentiel électrostatique</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>Réaction acide-base / fixation H₂O₂</i>	-	-	+	-	-	-	-	-	-
	<i>Activation du peroxyvanadate</i>	-	-	-	-	+	-	-	+	+

De la 1^{ère} à la 3^{ème} ligne : rapport des activités spécifiques haloperoxydases, après mutation des résidus, par rapport à celle de l'enzyme recombinante non mutée. Pour certaines mutations, l'activité spécifique ne change pas en présence de fortes concentrations en halogénure (notée **idem qd [X] +++**).

De la 4^{ème} à la 7^{ème} ligne : évolution des paramètres cinétiques des enzymes mutantes par rapport à ceux de l'enzyme recombinante non mutée. (+++ pour une augmentation plus de 100 fois supérieure)

De la 8^{ème} à la 10^{ème} ligne : modification structurale de la région du site actif des enzymes mutantes par rapport à celle de l'enzyme recombinante non mutée.

De la 11^{ème} à la 16^{ème} ligne : implication du résidu muté dans une liaison au niveau du site actif (PS, pont salin ; LH, liaison hydrogène ; LC, liaison covalente ; 0, aucune liaison) et rôle putatif de ce résidu muté (-, pas de rôle ; +, rôle)

nd : non déterminé

Préparation du milieu d'enrichissement – le milieu Provasoli

Trois solutions sont tout d'abord préparées séparément.

Préparation pour 10 litres final :

<i>1^{ère} Solution :</i>		
Acide borique	H ₃ BO ₃	1.9 g
Chlorure de fer (III) anhydre	FeCl ₃	52 mg
Sulfate de manganèse	MnSO ₄ , H ₂ O	0.274 g
Sulfate de zinc	ZnSO ₄ , 7 H ₂ O	36 mg
Sulfate de cobalt (II)	CoSO ₄ , 7 H ₂ O	8 mg
EDTA		1.666 g
<i>Dissoudre dans de l'eau millipore</i>		
<i>2^{ème} Solution :</i>		
Vitamine B ₁₂		0.6 mg
Thiamine		34 mg
Biotine		0.4 mg
TRIS		33.334 g
<i>Dissoudre dans de l'eau millipore</i>		
<i>3^{ème} Solution :</i>		
Sulfate d'ammonium ferrique (II)	(NH ₄) ₂ Fe(SO ₄) ₂ , 6 H ₂ O	1.17 g
EDTA		1 g
<i>Dissoudre dans de l'eau millipore</i>		
<i>Mélanger les 3 solutions et y ajouter :</i>		
Nitrate de sodium	NaNO ₃	23.334 g
Glycérophosphate de sodium	C ₃ H ₇ Na ₂ O ₆ P, 5 H ₂ O	3.334 g

Compléter à 10 litres avec de l'eau millipore et ajuster le pH à 7.8.

Autoclaver.

Ajouter 10 ml / l d'eau de mer filtrée autoclavée

Mesures spectrophotométriques des activités haloperoxydases

I. Activité bromoperoxydase

- Ajouter à l'extrait protéique :
 - 100 mM tampon phosphate pH 6.5
 - 0.2 M Na₂SO₄
 - 50 μM monochlorodimédone ($\epsilon=20.2 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)
 - 100 mM KBr

La réaction commence après ajout d'une solution de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) 2 mM

- Mesurer la DO à 290 nm
- Calcul de l'activité spécifique :

$$U = (\Delta DO / t) / (\epsilon * l), \text{ avec } l=1$$

Une unité d'activité (U) est exprimée en μmole de monochlorodimedone bromé / minute

L'activité spécifique est exprimée en μmole de monochlorodimedone bromé / minute / milligramme de protéine

II. Activité iodoperoxydase

Tampon (1l) :

- 0.13 M Na₂HPO₄ (22.497 g/l Na₂HPO₄ dihydrate)
- 0.04 M acide citrique (7.733 g/l acide citrique monohydrate)

Substrats :

- 0.2 M KI (8.3 g/250 ml)
- 24 mM H₂O₂ (0.68 ml/250 ml)

- Ajouter à 30 μl d'extrait protéique : 1 ml de tampon et 30 μl de la solution KI

La réaction commence après ajout de 30 μl de la solution de H₂O₂

- Mesurer la DO à 350 nm

$$U = \Delta DO / \text{min} * 0.151814878$$

Une unité d'activité (U) est exprimée en μmole de peroxyde d'hydrogène consommé / minute

L'activité spécifique est exprimée en μmole de peroxyde d'hydrogène consommé / minute / milligramme de protéine

ANNEXE 6

Revue sous presse dans *Japan Marine Biotechnology*

Genomic analysis of economically important seaweeds

J. Mark Cock¹, Catherine Leblanc¹, Carole Colin¹, Akira F. Peters¹, Delphine Scornet¹, Jonas Collen¹, Vincent Roeder¹, Cecile Hervé¹, Sylvie Roasval¹, Gurvan Michel¹, Philippe Potin¹, Catherine Boyen¹ and Bernard Kloareg¹

(1) Marine Plants and Biomolecules (UMR 7139 CNRS-Goëmar-UPMC),
Station Biologique, Place Georges Teissier, BP74, 29682 Roscoff Cedex, France

Email: cock@sb-roscoff.fr, Tel. : 33 298292360, Fax. : 33 298292324

Abstract Even today, the red and brown algae represent two relatively unexplored branches of the tree of life, particularly in terms of genome analysis. This is one of the reasons why the recent application of genomic approaches, although initially on a relatively small scale, has resulted in a significant acceleration of research progress in the seaweed biology and biotechnology fields. In the Roscoff laboratory, a combination of genomic tools and classical biochemical and molecular approaches has provided significant new insights into important, and often seaweed-specific, processes. Here we review recent work on two of these processes, halide metabolism and cell wall biosynthesis and look forward to future developments in seaweed genomics.

Running title Genomics of economically important seaweeds

Keywords cell wall biosynthesis - expressed sequence tag - genomics - halide metabolism - *Laminaria digitata* - seaweeds

Introduction

Research into the biology of the red and brown macroalgae is driven by a number of factors ranging from their economic interest, for example for alginate and carrageenan production, to their fundamental interest as two of only a handful of eukaryotic lineages that are thought to have independently evolved complex multicellularity. However, until recently very little sequence data were available for these red and brown seaweeds, severely limiting the development of molecular approaches.

This situation changed significantly in 2000 with the publication of expressed sequence tag (EST) data for the brown alga *Laminaria digitata* (Crépineau et al., 2000) and for the red alga *Porphyra yezoensis* (Nikaido et al., 2000). The availability of sequences, to which putative functions could be attached, based on database comparisons, was the starting point for the molecular analysis of several aspects of seaweed biology. Here we review our recent work on two of these processes, halide metabolism and cell wall biosynthesis, in *L. digitata* and discuss future directions for genomic analysis of economically important seaweeds.

Insights into halide metabolism in brown algae

Crépineau et al. (2000) reported 412 and 493 EST sequences for the gametophyte and sporophyte stages of the *L. digitata* life cycle, respectively. Comparison of the EST sequences with public databases allowed putative functions to be assigned to 44% of these sequences and led to the identification of putative homologues of 152 novel genes in the Laminariales. Statistical analysis of the EST data allowed the identification of several transcripts that were significantly more abundant at one stage of the life cycle compared to the other. One of the transcripts, which was significantly more abundant in the sporophyte compared with the gametophyte, was predicted to encode a vanadium-dependant haloperoxidase and the identification of this sequence led to the development of a programme to study halide metabolism in the Roscoff laboratory.

There is evidence that halide metabolism plays an important role in brown algae. For example, kelps are capable of accumulating iodine up to 100,000 times the concentration found in the surrounding seawater and this element can constitute as

much as 1% of dry weight (Saenko et al., 1978; Küpper et al., 1998). From an environmental point of view, the production of volatile halocarbons by seaweeds has been shown to have a significant effect on the atmosphere (Carpenter et al., 2000; O'Dowd et al., 2002) but the physiological role of halide accumulation in seaweeds is poorly understood.

Vanadium-dependant haloperoxidases catalyse the oxidation of halides in the presence of hydrogen peroxide to form hypohalous acids which can then halogenate a wide range of organic molecules. Vanadium-dependant haloperoxidases are thought to play an important role in the accumulation of iodine by laminariales (Küpper et al., 1998). Moreover, the ability of vanadium-dependant haloperoxidases to halogenate a broad range of organic compounds is of interest for many biotechnological applications (Vilter, 1995; Butler et al., 2001).

Vanadium-dependant haloperoxidases are classified according to the most electronegative halide that they can oxidize; chloroperoxidases can catalyze the oxidation of chloride, bromide and iodide, bromoperoxidases (BPOs) react with bromide and iodide, whereas iodoperoxidases (IPOs) specifically oxidise iodide. Several structural and mechanistic studies of BPOs in both red and brown algae have been reported (Shimonishi et al., 1998; Vreeland et al., 1998; Isupov et al., 2000; Ohshiro et al., 2002; Carter et al., 2002) and a chloroperoxidase from the fungus *Curvularia inaequalis* has been characterised (Messerschmidt et al., 1996).

Following the identification of a haloperoxidase EST from *L. digitata*, Colin et al. (2003) showed that this species possesses both IPO and BPO activities. Native gels indicate that both enzymes exist as protein dimers but that the BPO associates as higher order multimeric complexes of up to 600 kDa. Vanadium-dependant haloperoxidase activities were shown to be very low in the *L. digitata* gametophyte, compared with the sporophyte, a result that is consistent with EST data described above.

Using a probe based on the EST, two very similar (99.2% nucleotide identity), full-length BPO cDNA were isolated from *L. digitata*. Liquid chromatography-mass spectroscopy-mass (LC-MS-MS) spectroscopy analysis of purified *L. digitata* BPO was consistent with it being encoded by these two genes (Colin et al., 2003). Similar analysis of purified *L. digitata* IPO showed that it was encoded by a distinct gene and cDNAs corresponding to this gene have been isolated recently (Colin et al., manuscript

in preparation). Southern blot analysis indicates that both BPO and IPO are encoded by large gene families in *L. digitata*.

Current work in our laboratory is aimed at investigating the biological role of HPOs and halides in *L. digitata* (Figure 1). Apart from their probable role in the accumulation of halides from the surrounding seawater, HPOs may be involved in halogenation of organic compounds and in the alteration of cell wall structure, by cross-linking cell wall polyphenols. Preliminary data indicate that accumulated iodide is released from the *L. digitata* thallus following oxidative stress. The released halides may be directly toxic to a potential pathogen or could be used in haloperoxidase reactions for scavenging oxidative species and for the production of halocarbons. HPOs may, therefore, function at two levels in the algae's defence response, indirectly in the accumulation of internal iodine stores and directly by modifying the cell wall and producing biocidal halocarbons.

Cell wall biosynthesis

Cell wall biosynthesis is of considerable interest in brown algae because of their economic importance as a source of cell wall components such as alginates. The EST analysis carried out by Crépineau et al. (2000) identified a number of *L. digitata* genes with putative functions in different aspects of carbon metabolism including genes with predicted roles in cell wall biosynthesis (Moulin et al., 1999; Figure 2). The most interesting of these genes included several sequences that were predicted to encode mannuronan C₅-epimerases. This enzyme catalyses the final step of alginate biosynthesis, the epimerization of α -1,4-D-mannuronic acid to α -1,4-L-guluronic acid, a structural change that modifies the physico-chemical properties of the alginate. The presence of strings of contiguous guluronate residues in the alginate allows an association with calcium that rigidifies the polymer.

Using probes based on the EST sequences, six mannuronan C₅-epimerase cDNAs and an additional eight mannuronan C₅-epimerase genomic clones have been identified (Nyvall et al., 2003). Based on these cloning experiments and on the analysis of gene fragments amplified using the polymerase chain reaction, the mannuronan C₅-epimerase gene family in *L. digitata* is predicted to contain more than 21 members and

this is supported by Southern blot analysis of the *L. digitata* genome. The large size of this gene family suggests that the α -1,4-D-mannuronic acid / α -1,4-L-guluronic acid composition of alginate is highly regulated in *L. digitata* allowing it to modify the rigidity of its cell wall in response to a wide range of conditions. This hypothesis is supported by the recent observation that transcripts of at least one of the mannuronan C₅-epimerase genes accumulate in response to treatment with an elicitor (Boyen et al., unpublished results).

The biochemical function of *L. digitata* mannuronan C₅-epimerase genes was predicted based on their similarity to bacterial AlgG and, to a lesser extent, AlgE mannuronan C₅-epimerases genes. The predicted *L. digitata* proteins share a conserved Tyr-Gly-Phe/Iso-Asp-Pro-His-Asp/Glu motif with the bacterial genes and the first Asp residue of this motif is an essential residue of the catalytic site of module A1 of the AlgE1 epimerase (Svanem et al., 2001). Attempts to confirm the activity of the brown algal mannuronan C₅-epimerases biochemically have been unsuccessful so far due to difficulties encountered in expressing the proteins in an active form in heterologous systems such as *Escherichia coli* or *Pichia pastoris*. Current attempts to overcome this problem include the use of a diatom expression system which may be better adapted to the expression of heterokont proteins.

The evolutionary origin of *L. digitata* mannuronan C₅-epimerases is of interest because the *L. digitata* sequences form a single clade that is most closely related to *Ectocarpus siliculosus* virus (EsV-1; Müller, 1991; Delaroque et al., 2001) protein GP1, the largest of the three proteins that make up the viral coat (Klein et al., 1995). Our current model proposes that GP1 was acquired by lateral transfer to the EsV-1 virus, probably following integration of the virus into the *E. siliculosus* genome (Nyvall et al., 2003).

Future directions

The two examples described above illustrate the potential benefits of applying genomic approaches to the study of marine macroalgae. In our laboratory, the initial EST analysis, carried out on *L. digitata*, has been extended in several ways; by continued sequencing of existing libraries, by sequencing of additional cDNA libraries

corresponding to novel physiological conditions and by extending the analysis to other species of seaweeds. A particularly fruitful approach, which has been applied recently to both *L. digitata* and to the red seaweed *Chondrus crispus*, has been to sequence cDNAs prepared from regenerating protoplasts. Analysis of alterations in the transcriptome in response to the highly stressful removal of the cell wall from these cells has allowed the identification of many genes involved both in the stress response and in cell wall biosynthesis (Collen et al., manuscript in preparation).

Clearly, the current application of genomic approaches to economically important seaweeds has resulted in significant advances in this field. However, in the longer term, the application of post-genomic approaches, in particular the analysis of gene function, will be difficult in these species which, for the most part, are poorly adapted for genetic approaches. This problem is illustrated by the work on *L. digitata* mannuronan C5-epimerases for which it has neither been possible to study their activity *in vivo* nor to express the proteins in a heterologous system.

To provide an efficient means of studying gene function, it will be necessary to develop model organisms that permit the application of genetic approaches. In Roscoff, we are developing the small, filamentous brown alga *Ectocarpus siliculosus* as a genetic model for the brown algae. *E. siliculosus* has been chosen because it can complete its life cycle rapidly under laboratory conditions, because it is sexual and highly fertile and because it possesses a relatively small genome (about 200 Mbp). Several genetic tools such as mutant screens and genetic transformation are being developed. In the coming years, the availability of a combination of genomic and genetic approaches should further accelerate the study of this highly interesting group of organisms, the marine macroalgae.

References

- Butler, A., Carter, J. N., and Simpson, M. T. (2001). in Handbook on Metalloproteins (Bertini, I., Sigel, A., and Sigel, H., eds) pp. 153–179, Marcel Dekker, Inc., New York.
- Carpenter, L. J., Malin, G., Küpper, F. C., and Liss, P. S. (2000). Global Biogeochemical Cycles 14:1191–1204.

- Carter, J.N., Beatty, K.E., Simpson, M.T. and Butler, A. (2002) *J. Inorg. Biochem.* 91:59-69.
- Colin, C., Leblanc, C., Wagner, E., Delage, L., Leize-Wagner, E., van Dorselaer, 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.
- Crepineau, F., Roscoe, T., Kaas, R., Kloareg, B. and Boyen, C. (2000) Characterisation of complementary DNAs from the expressed sequence tag analysis of life cycle stages of *Laminaria digitata* (Phaeophyceae). *Plant Mol Biol.* 43:503-513.
- Delaroque, N., Müller, D.G., Bothe, G., Pohl T., Knippers, R. and Boland, W. (2001) The complete DNA sequence of the *Ectocarpus-siliculosus-Virus* Genome. *Virology* 287:112-132.
- Klein, M., Lanka, S.T.J., Knippers, R. and Müller, D.G. (1995) Coat protein of the *Ectocarpus siliculosus* virus. *Virology* 206:520-526.
- Küpper, F. C., Schweigert, N., Ar Gall, E., Legendre, J.-M., Vilter, H., and Kloareg, B. (1998). *Planta* 207:163–171.
- Isupov, M.N., Dalby, A.R., Brindley, A.A., Izumi, Y., Tanabe, T., Murshudov, G.N. and Littlechild, J.A. (2000) Crystal structure of dodecameric vanadium-dependent bromoperoxidase from the red algae *Corallina officinalis*. *J. Mol. Biol.* 299:1035-1049.
- 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.
- Moulin P, Crépineau F, Kloareg B, Boyen C (1999) Isolation and characterization of six cDNAs involved in carbon metabolism in *Laminaria digitata* (Phaeophyceae). *J Phycol* 35:1237-1245.
- Müller D.G. (1991) Mendelian Segregation of a Virus Genome during Host Meiosis in the Marine Brown Alga *Ectocarpus siliculosus*. *J. Plant Physiol.* 137:739-743.
- Nikaido, I., Asamizu, E., Nakajima, M., Nakamura, Y., Saga, N. and Tabata, S. (2000). Generation of 10,154 expressed sequence tags from a leafy gametophyte of a marine red alga, *Porphyra yezoensis*. *DNA Res.* 7:223-227.
- Nyvall, P., Corre, E., Boisset, C., Barbeyron, T., Rousvoal, S., Scornet, D., Kloareg, B.,

- and Boyen, C. (2003). Characterization of Mannuronan C-5-Epimerase Genes from the Brown Alga *Laminaria digitata*. *Plant Physiol.* 133:726-735.
- O'Dowd, C. D., Jimenez, J. L., Bahreini, R., Flagan, R. C., Seinfeld, J. H., Hämeri, K., Pirjola, L., Kulmala, M., Jennings, G. S., and Hoffmann, T. (2002) Marine aerosol formation from biogenic iodine emissions. *Nature* 417:632–636.
- 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.
- Saenko, G. N., Kravtsova, Y. Y., Ivanenko, V. V. and Sheludko, S. I. (1978). *Mar. Biol.* 47:243–250.
- Shimonishi, M., Kuwamoto, S., Inoue, H., Wever, R., Ohshiro, T., Izumi, Y. and Tanabe, T. (1998) Cloning and expression of the gene for a vanadium-dependent bromoperoxidase from a marine macro-alga, *Corallina pilulifera*. *FEBS letters* 428:105-110.
- Svanem BI, Strand WI, Ertesvag H, Skjak-Braek G, Hartmann M, Barbeyron T, Valla S. (2001). The catalytic activities of the bifunctional *Azotobacter vinelandii* mannuronan C-5-epimerase and alginate lyase AlgE7 probably originate from the same active site in the enzyme. *J Biol Chem.* 276:31542-31550.
- Vilter, H. (1995). In: Sigel, H., Sigel, A., Eds. *Metal Ions in Biological Systems* Vol. 31. Marcel Dekker, Inc., New York, USA pp. 325–362.
- Weyand, M., Hecht, H.-J., Kiess, M., Liaud, M.-F., 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.
- Vreeland, V., Ng, K.L. and Epstein, L. (1998) *Mol. Biol. Cell* 9, 1043.

Figures

Figure 1. Schema showing the putative roles of haloperoxidases in iodine cycling in brown algae. See the text for details.

Figure 2. Schematic representation of carbon metabolism in brown algae showing several enzymes for which putative cDNA clones have been identified by EST sequencing (underlined). The enzymes indicated are carbonic anhydrase (CA), ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase (RUBISCO), phosphoglycerate kinase (PGK), 6-phosphogluconate dehydrogenase (G6PDH) and glucose-6-phosphate dehydrogenase (6PGDH), glycolate oxidase (GLO), and fucose synthase (FS) and mannuronan C5-epimerase (ManC5-E).

Figure 1.

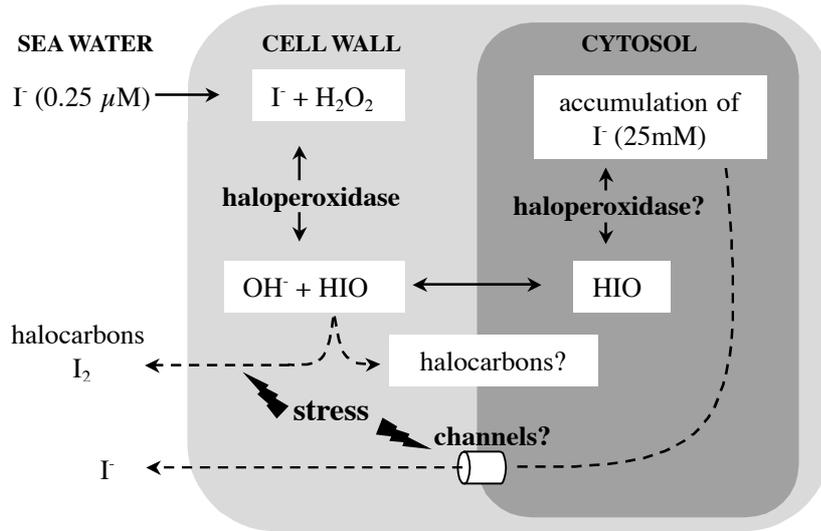


Figure 2.

