

## Etude structure-fonction des glutathion transférases (GSTs) de la classe Phi chez l'arbre modèle *Populus trichocarpa*

Responsable scientifique : Nicolas ROUHIER, UMR Interactions Arbres/Micro-organismes IAM

Partenaires Labex : LERMAB (Stéphane Dumarçay, Christine Gérardin)

Collaborations : LAE (Frédéric Bourgaud, univ Lorraine) ; CRM2 (Claude Didierjean, univ Lorraine)

---

### **Contexte** —

Les 81 glutathion transférases du peuplier constituent un groupe monophylétique d'enzymes pouvant être réparties en dix classes. Ces protéines fournissent en particulier une protection contre des xénobiotiques toxiques ou participent à la synthèse et/ou transport de métabolites secondaires. Elles sont typiquement connues pour catalyser la conjugaison du tripeptide glutathion sur une molécule substrat présentant un groupement fonctionnel polaire pour former un produit de réaction glutathionylé. Cette étape de conjugaison constitue ainsi une étape essentielle du processus de détoxification des xénobiotiques. Les études protéomiques et transcriptomiques ont montré que des GSTs, notamment de la classe Phi, sont souvent fortement induites en réponse aux stress. Toutefois, les substrats et rôles physiologiques de la plupart des GSTs restent méconnus, alors que cette classe apparue au niveau des plantes terrestres a ensuite subi une expansion importante au cours de l'évolution des organismes photosynthétiques.

### **Objectifs** —

Le projet consistait à effectuer une étude fonctionnelle comparative des isoformes de la classe Phi chez le peuplier à l'aide d'une approche structure-fonction afin de mettre en évidence des spécificités expliquant l'expansion de cette classe chez le peuplier et plus généralement chez les plantes.

### **Démarche** —

Le programme de travail était découpé en trois grands axes:

- (i) l'étude des propriétés enzymatiques et structurales des protéines recombinantes après surexpression dans la bactérie *Escherichia coli* et purification. Il s'agissait de tester des substrats connus/présumés, incluant des herbicides/pesticides, métabolites secondaires, composés polluants halogénés ou possédant des cycles aromatiques (criblage de banques de molécules) et d'essayer de résoudre la structure 3D des protéines seules ou en complexe.
- (ii) l'étude des patrons d'expression au niveau transcriptionnel protéique dans les organes de peuplier et dans diverses situations de stress biotique ou abiotique.
- (iii) la recherche de substrats physiologiques (protéines, métabolites, xénobiotiques) à partir d'extraits cellulaires. Cette approche a été initiée par analyse de la thermostabilité des protéines en présence ou en absence de ligands et par compétition enzymatique avec une sonde fluorescente qui inhibe l'activité estérase des enzymes. L'identification des molécules « actives » se fait par spectrométrie de masse couplée ou non à une séparation en phase liquide ou gazeuse et éventuellement par RMN.

### **Résultats marquants** —

- Les huit isoformes de GSTF du peuplier ainsi que différents variants mutés ont été purifiés.
- Les mesures des taux de transcrits dans 7 organes du peuplier indiquent que la plupart des GSTs sont peu exprimées dans les racines et possèdent des profils d'expression assez comparables au niveau des organes aériens qui ne permettent pas réellement de les différencier.

- Après avoir testé différents composés possédant des cycles aromatiques, des herbicides/pesticides, des métabolites secondaires et hormones, il apparaît qu'un certain nombre de molécules identifiées avec des GSTFs d'autres organismes ne sont pas reconnues par les GSTFs de peuplier. Pour les autres molécules et notamment les substrats modèles classiques, nous avons tout d'abord pu mettre en évidence des différences sur le type d'activités catalysées *i.e.* (dé)glutathionylation, peroxidase et ensuite pour un type d'activité donné, des différences d'affinités et d'efficacités catalytiques pour certains couples enzymes/substrats indiquant l'existence de certaines spécificités de reconnaissance.
- Grâce à la résolution des structures 3D de 5 isoformes de GSTF, nous avons pu obtenir des données permettant de valider les observations biochimiques, notamment sur la versatilité de plusieurs résidus du site actif présents dans une boucle impliquée dans la reconnaissance et l'activation du glutathion.

#### ***Principales conclusions incluant des points-clés de discussion —***

L'expansion de la classe GSTF chez le peuplier ne semble pas être liée à des spécificités de territoire d'expression ou de localisation subcellulaire (elles sont toutes prédites cytosoliques), mais plutôt à des différences au niveau des activités biochimiques qui sont permises par des variations au niveau des séquences primaires et tertiaires et notamment par une structure du site actif plutôt flexible et permissive.

#### ***Perspectives —***

Afin d'effectuer une approche de « ligand fishing », d'autres outils ont été générés comme la purification de variants protéiques mutés pour 1 à 3 résidus du site actif pour accommoder un glutathion modifié synthétisé chimiquement. A travers cette approche, on devrait donc pouvoir isoler des métabolites glutathionylés ce qui a été très rarement fait jusqu'à présent.

#### **Valorisation and diffusion**

##### *Associated publications:*

- Pégeot H, Koh CS, Petre B, Mathiot S, Duplessis S, Hecker A, Didierjean C, Rouhier N. (2014) The poplar Phi class glutathione transferase: expression, activity and structure of GSTF1. *Front Plant Sci.* 23;5:712.
- Pégeot H, Mathiot S, Perrot T, Gense F, Hecker A, Didierjean C, Rouhier N. Catalytic versatility in poplar glutathione transferase Phi class: when natural combination of active site loop residues confer dual but opposite biochemical functions. Submitted to *Biochem J.*

PhD thesis of Henri Pégeot, defense the 11th of December.

Poster presentation at the 9th International Workshop - Sulfur Metabolism in Plants (14-17 april 2014 in Freiburg).