



Looking for Glutathione Transferase substrates and ligands

Responsable scientifique : Arnaud HECKER, UMR Interactions Arbres/Micro-organismes (IAM) 1136

Partenaire Labex : Pascal FREY, UMR Interactions Arbres/Micro-organismes (IAM) 1136

Collaboration : David Touboul (ICSN, Gif-sur-Yvette)

Action thématique concernée : WP1 Transversal

Contexte —

Les glutathion transférases (GST) constituent une famille multigénique d'enzymes largement répandues chez les organismes vivants. Chez les plantes, elles sont notamment impliquées dans la détoxification de composés toxiques exogènes tels que les herbicides, mais aussi dans la synthèse ou le transport de métabolites spécialisés. Des études transcriptomiques ont également montré que l'expression des gènes codant ces enzymes sont fortement régulés lors de stress abiotique et biotique. Du point biochimique, les fonctions portées par ces enzymes reposent soit sur la transformation catalytique de substrats, principalement les réactions de conjugaison du glutathion et de déglutathionylation ; soit sur leur propriété dite " ligandine " dédiée au transport ou au stockage de divers ligands (non catalysés). Toutefois, les substrats/ligands de même que les fonctions physiologiques associées de ces enzymes restent pour la plupart du temps inconnus.

Objectifs —

Ce projet a pour objectif principal d'identifier des ligands et des substrats de quelques GST de peuplier en utilisant des approches de piégeage *in vivo* et *in vitro* de ces molécules et de caractériser les interactions moléculaires identifiées. Les approches qui seront développées auront le potentiel de déterminer précisément les rôles et fonctions de quelques GSTs de peuplier et notamment celles codées par des gènes dont l'expression est fortement régulée lors l'interaction hôte-pathogène entre le peuplier et le champignon biotrophe obligatoire *Melampsora larici-populina* (*Mlp*), de comprendre comment certains métabolites spécialisés sont synthétisés et transportés ou stockés et d'identifier de nouvelles classes de produits naturels valorisables.

Démarche —

Le projet se découpe en trois grands axes :

(1) Purification des GSTs ciblées sous la forme de protéines recombinantes et préparation du matériel biologique
Cet axe est consacré à l'expression et à la purification des GST ciblées après surproduction chez la bactérie *E. coli* qui seront utilisés comme appâts pour la recherche de leurs substrats et ligands. Il comprend également la préparation d'extraits de peuplier enrichis en métabolites spécialisés et leur profilage métabolique en collaboration avec l'équipe « Spectrométrie de Masse » de Institut de Chimie des Substances Naturelles (ICSN, <https://icsn.cnrs.fr/recherche/cbsa/ms>).

(2) Identification de molécules interagissant avec les GSTs de peuplier ciblées

Cet axe vise à identifier et caractériser les molécules (ligands et/ou substrats) interagissant avec les GSTs de peuplier sélectionnées en utilisant des approches de pêche *in vitro* et *in vivo*. Cet axe s'appuiera sur l'expertise de l'équipe « Réponse au stress et régulation redox » de l'UMR IAM pour les approches de pêche *in vitro* et *in vivo* et sur l'équipe « Spectrométrie de Masse » de Institut de Chimie des Substances Naturelles (ICSN pour l'étape complexe et chronophage de l'identification des métabolites.

(3) Études biochimiques et structurales des propriétés de liaison des molécules interagissant avec les GST sélectionnées

Cet axe vise à valider et à décrire au niveau moléculaire les interactions entre les GSTs sélectionnées et les ligands ou substrats identifiés par des approches biochimiques et structurales. Ces travaux seront menés en collaboration avec la plateforme ASIA (<http://a2f.univ-lorraine.fr/en/plateformes-anglais/>) et Claude Didierjean (Univ. Lorraine, CRM2, co-directeur de thèse).

Résultats marquants — (présentés sous forme de puces séparées)

Les résultats obtenus peuvent se répartir selon les mêmes axes que précédemment :

(1) Le matériel biologique nécessaire à la réalisation des analyses a été obtenu (purification des GSTs et extraction des métabolites de feuilles issues d'une cinétique d'infection de feuilles isolées de peuplier par *Mlp*).

(2) Une collaboration avec l'ICSN permettant l'obtention d'une base de données métabolique construite à partir d'extraits provenant d'organes variés de peuplier (feuilles, fleurs, bourgeons, fruits) a été mise en place et a conduit à l'établissement d'une base de données de molécules et de cartes métabolomiques.

(3) Des expériences d'identification de molécules interagissant avec les GSTs d'intérêt à partir de banques de molécules ou d'extraits végétaux concentrés en métabolites spécialisés ont été initiées. Les premiers résultats obtenus montrent une spécificité des GSTs d'intérêt pour différents extraits ou classes de molécules.

Principales conclusions incluant des points-clés de discussion —

Après avoir préparé le matériel biologique nécessaires à des analyses métabolomiques, une base de données de molécules a été constituée et les réseaux métabolomiques correspondants établis pour quelques tissus de peuplier (feuilles, fleurs, bourgeons, fruits). Ces premières analyses ont conduit à la validation simultanée des méthodes d'extraction et des méthodes d'analyses de molécules. L'obtention de ces données constituent une bonne base de travail qui facilitera l'identification à très court terme des molécules (substrats/ligands) interagissant avec les quelques GSTs de peuplier ciblées qui ont été surexprimées chez *E. coli* puis purifiées à homogénéité et dont nous souhaitons préciser le(s) rôle(s) et fonction(s). Les premières expériences d'identification de ligands/substrats issus de banques de molécules ou d'extraits de peuplier interagissant avec les GSTs d'intérêt tendent à montrer que ces enzymes interagissent préférentiellement avec certains extraits enrichis en métabolites et certaines classes de métabolites.

Perspectives —

A très court terme, il est envisagé d'appliquer les différentes approches abordées ci-dessus à des extraits issus de feuilles de peuplier infectées par le champignon *Mlp* (collaboration Pascal Frey, IAM) et aux GSTs codées par des gènes dont l'expression est fortement régulée lors l'interaction hôte-pathogène entre le peuplier. A plus long terme, les interactions identifiées entre GSTs ciblées et métabolites (substrats ou ligands) seront caractérisées biochimiquement et structurellement *via* des méthodes de biologie structurale couplant des technologies originales telles que la technologie SwitchSense disponibles sur la plateforme ASIA (<https://a2f.univ-lorraine.fr/asia/>).

Valorisation —

Nous prévoyons ainsi d'exploiter et de publier ces résultats dans des revues scientifiques de premier plan, évaluées par des pairs, dans les domaines de la biochimie générale et/ou de la biologie végétale et/ou de les présenter au cours de congrès nationaux et internationaux sous la forme de communications orales et/ou de posters.

Effet levier du projet —

Les données qui seront obtenues seront susceptible d'intéresser l'ensemble des équipes de l'UMR 1136 IAM puisqu'elles compléteront les données accumulées ces dernières années sur le pathosystème peuplier-*Mlp*. Elles sont également susceptibles d'intéresser la communauté scientifique du domaine dans la compréhension du stress biotique du peuplier, un prérequis nécessaire avant d'envisager des moyens de lutte contre ce stress biotique important pour la populiculture.