

Recherche de substrats et de ligands de la glutathion transférase

Prénom, Nom du porteur : Arnaud Hecker, UMR Interactions Arbres/Micro-organismes (IAM) 1136

Partenaires Labex : Pascal Frey ; UMR Interactions Arbres/Micro-organismes (IAM) 1136

Collaborations : David Touboul (ICSN, Gif-dur-Yvette), Cédric Paris (ENSAIA)

Actions thématiques concernées : WP1 WP2 WP3 WP4 Transversal

Résumé —

En raison de leur incapacité à se déplacer, les organismes photosynthétiques terrestres sont soumis à diverses contraintes environnementales (biotiques ou abiotiques) qui modifient l'homéostasie redox cellulaire. Des molécules aux propriétés antioxydantes telles que le glutathion, l'ascorbate, les caroténoïdes, les tocophérols et d'autres métabolites secondaires/spécialisés sont produits pour contrecarrer les éventuels effets toxiques directs ou indirects des espèces réactives de l'oxygène et/ou de l'azote qui sont notamment produites dans ces conditions. Les métabolites secondaires peuvent paradoxalement être également toxiques pour les plantes elles-mêmes et celles-ci ont donc développé un arsenal enzymatique performant pour faire face à ces molécules. Parmi ces enzymes, les glutathion transférases (GST) constituent une grande famille multigénique. L'expansion de la famille de gènes GST chez les plantes peut être liée à leur rôle documenté dans la détoxification de composés toxiques (souvent appelés xénobiotiques) tels que les herbicides chez les espèces annuelles, mais aussi à leur implication dans diverses voies métaboliques, notamment dans la synthèse de métabolites secondaires de défense. De plus, il a été démontré que plusieurs GST interagissent ou modifient les flavonoïdes, les acides gras oxygénés ou les porphyrines. Ces fonctions reposent soit sur la transformation catalytique de substrats, principalement des réactions de conjugaison et de déglutathionylation du GSH, soit sur leur propriété dite de "ligandine" dédiée au transport ou au stockage de divers ligands (non catalysés). Cependant, les substrats/ligands et donc les fonctions physiologiques précises de la plupart des GST sont encore inconnues.

Ce projet de recherche appelé Look4Grail (Looking for Glutathione Transferase substrates and Ligands) est consacré à l'identification des ligands et des substrats d'une sélection de GST de peuplier en utilisant des approches de pêche aux ligands/substrats *in vivo* et *in vitro* couplées à des analyses métabolomiques et à la caractérisation de ces interactions biomoléculaires à la fois au niveau biochimique et structural. Les approches de pêche aux ligands développées ont le potentiel de donner de nouvelles idées sur la fonction des GST in planta ainsi que d'identifier de nouvelles classes de produits naturels inhibiteurs d'enzymes d'intérêt biotechnologique telles que les GST.

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 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 GST 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 GST 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 l'Institut de Chimie des Substances Naturelles (ICSN, <https://icsn.cnrs.fr/recherche/cbsa/ms>) et le Plateau d'Analyse Structurale et Métabolomique (PASM) de l'ENSAIA (Nancy).

(2) Identification de molécules interagissant avec les GST de peuplier ciblées :

Cet axe vise à identifier et caractériser les molécules (ligands et/ou substrats) interagissant avec les GST de peuplier sélectionnées en utilisant des approches de pêche *in vitro* et *in vivo*.

(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 GST 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 —

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

(2) Les extraits de peuplier ont été analysés par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en collaboration avec l'ICSN et la plateforme PASM. D'après ces analyses, une base de données métaboliques regroupant plus de 5 000 molécules a été construite. Elle montre notamment la prévalence des flavonoïdes et des terpénoïdes dans les bourgeons de peuplier (plus de 30%) contrairement aux fruits par exemple (qui n'en contiennent que 8%). Au cours de l'infection de feuille de peuplier par *Mlp*, les résultats obtenus montrent une faible variation du contenu en métabolites spécialisés quelle que soit la méthode d'extraction utilisée (acétate d'éthyle et méthanol 60%). Néanmoins, une centaine de molécules voient leur proportion modifiée significativement au cours de l'infection par *Mlp*. Des analyses plus fines sont actuellement en cours pour déterminer la nature exacte de ces composés.

(3) Des expériences d'identification des molécules interagissant avec les GST 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 GST d'intérêt pour différents extraits ou classes de molécules.

Plus particulièrement, les extraits de bourgeons semblent induire une forte réaction des GST. Des expériences d'isolement par fractionnement utilisant la technique de chromatographie liquide haute pression (HPLC) et de co-cristallisation des protéines (en lien avec le CRM2) avec les fractions contenant les molécules d'intérêt sont en cours. En utilisant les bases de données obtenues dans l'axe 2, il sera possible de déterminer précisément les métabolites impliqués. Ce même type d'expérience a été mené en utilisant les extraits issus de la cinétique d'infection de feuille de peuplier par *Mlp* (extraits méthanoïques et acétate d'éthyle). Les GST identifiées comme étant différenciellement exprimées au cours de l'infection par de précédentes analyses transcriptomiques ont été mises en contact avec les extraits précédents. Aucune interaction n'a pu être mise en évidence validant la faible variation moléculaire entre les différents extraits obtenus.



Principales conclusions incluant des points-clés de discussion —

Après avoir préparé le matériel biologique nécessaires à des analyses métabolomiques et construit une base de données de molécules, les réseaux métabolomiques correspondants sont en cours d'établissement 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 GST 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 GST d'intérêt tendent à montrer que ces enzymes interagissent préférentiellement avec certains extraits enrichis en métabolites et certaines classes de métabolites.

Perspectives —

Les interactions identifiées entre GST ciblées et métabolites (substrats ou ligands) seront caractérisées biochimiquement et structuralement *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 —

Morette, L., Levasseur, M., Touboul, D., Frey, P., Didierjean, C., Hecker, A. Vers l'élucidation du rôle des glutathion transférases GSTU19 et 20 de peuplier au cours de l'interaction hôte-pathogène entre le peuplier et le champignon *Melampsora larici-populina*. 15^{èmes} journées scientifiques du Réseau Francophone de Métabolomique et Fluxomique (RFMF), 24 au 26 mai 2023, Perpignan.

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.