



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-memoires-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>



**MASTER 2 FAGE « Biologie et Ecologie pour la Forêt, l'Agronomie et
l'Environnement »**

Spécialité BIPE « Biologie des Interactions Plantes/Environnement »

Rôles des glutarédoxines dans la machinerie chloroplastique d'assemblage des centres fer-soufre chez les plantes

Mémoire soutenu à Nancy le 4 septembre 2012

par

Henri Pégeot

Stage réalisé au sein de l'UMR 1136 Interactions Arbres-
Microorganismes. Université de Lorraine-INRA
« Equipe Réponse aux Stress et Régulation Redox »

Travaux dirigés par le Pr Nicolas Rouhier et le Dr Jérémy Couturier

2011/2012

Remerciements

Je tiens à adresser en premier lieu un immense merci à Nicolas pour m'avoir accueilli dans ce laboratoire, pour l'encadrement de qualité et pour toutes les connaissances scientifiques théoriques et pratiques qu'il m'a transmis. Je le remercie pour m'avoir fait confiance, pour tout ce qu'il m'a apporté directement mais aussi indirectement par son exemple et pour m'avoir transmis (ou avoir tenté) une culture de la rigueur et de l'efficacité. Je le remercie aussi également pour plusieurs relectures de ce rapport.

Je tiens à remercier Jérémy pour m'avoir encadré pendant ce stage, pour ses patientes explications, pour m'avoir appris le B.A BA du métier avec tant de rigueur et pour avoir relu ce rapport.

Mes remerciements vont également aux thésards, ces joyeux lurons ont su égayer ce stage. Merci à Edgar pour ton esprit Rock'n'roll dans la vie comme dans la musique. Merci à Pierre-Alexandre dont la gentillesse est apparemment sans limites. Merci à Benji pour la « finesse » de ses blagues et pour sa culture cinématographique truculente. Merci à Anne pour sa compagnie lumineuse. Merci à Yann pour ces sympathiques pauses cigarettes.

J'adresse un chaleureux merci à Kamel pour la lucidité de ses conseils sur mon avenir professionnel et pour ses constants encouragements.

Je tiens également à remercier Mélanie, Karl-Joseph, Arnaud, Jean-Pierre et Eric pour savoir faire vivre ce laboratoire.

Sommaire

1.	Introduction	1
1.1.	Le fer chez les plantes.....	1
1.2.	Les protéines fer-soufre.....	1
1.3.	Assemblage des centres fer-soufre	2
1.4.	Le système SUF-like : machinerie chloroplastique d'assemblage des centres Fe-S chez les plantes.....	3
1.5.	Implication des glutarédoxines de classe II dans l'assemblage des centres Fe-S	4
1.6.	Présentation du travail de recherche	5
2.	Matériels et méthodes	6
2.1.	Clonage	6
2.2.	Réaction de polymérisation en chaîne sur colonie bactérienne	6
2.3.	Mutagenèse dirigée.....	7
2.4.	Production hétérologue chez <i>E. coli</i> des protéines recombinantes.....	8
2.5.	Purification des protéines recombinantes.....	9
2.5.1.	Lyse des cellules bactériennes	9
2.5.2.	Précipitation différentielle au sulfate d'ammonium	9
2.5.3.	Purification des protéines par chromatographie d'exclusion de taille.....	9
2.5.4.	Chromatographie d'échange d'ions	9
2.5.5.	Purification des protéines avec une étiquette poly-histidine par chromatographie d'affinité métallique sur colonne de nickel	10
2.5.6.	Concentration des protéines.....	10
2.6.	Mesure de l'activité cystéine désulfurase de Nfs2.....	10
2.7.	Tests d'interactions protéine-protéine <i>in vitro</i>	11
2.8.	Analyse de l'état d'oligomérisation des protéines	11
3.	Résultats	12
3.1.	Stratégie pour l'expression de protéines chloroplastiques dans <i>E. coli</i>	12
3.2.	Production et purification des protéines recombinantes.....	13
3.3.	Interactions protéine-protéine	16
3.4.	Co-expression des partenaires protéiques dans <i>E. coli</i>	18
3.5.	Analyse de l'état d'oligomérisation par chromatographie d'exclusion de taille.....	18
3.6.	Mesure de l'activité cystéine désulfurase d'AtNfs2	20
4.	Discussion	21
5.	Références bibliographiques	24
6.	Annexes	26

1. Introduction

1.1. Le fer chez les plantes

Le fer constitue un micronutriment essentiel pour les plantes et bien qu'étant le quatrième élément le plus présent de la croûte terrestre, il est très peu disponible dans l'environnement. Le fer existe sous deux formes ioniques interchangeables en solution : l'ion ferrique Fe^{3+} et l'ion ferreux Fe^{2+} . L'ion ferrique est le plus abondant à pH physiologique, néanmoins sa solubilité est de l'ordre de 10^{-17} M à pH 7 alors qu'une concentration située entre 10^{-4} M et 10^{-9} M est requise pour une croissance optimale des plantes (Braun et Killmann, 1999).

D'autre part, le fer est potentiellement toxique par sa capacité à générer un stress oxydant via la réaction de Fenton qui produit des radicaux hydroxyles (OH^\cdot). Ceci implique que le fer doit être lié pour éviter qu'il ne se retrouve sous forme libre dans les cellules. Le fer fait partie de nombreux cofacteurs de métalloprotéines impliquées dans des processus biologiques essentiels à la vie tels que la respiration, la photosynthèse ou encore la synthèse d'ADN. Parmi ces métalloprotéines, les protéines à centre fer-soufre (Fe-S) sont de prime importance. Sa faible disponibilité ainsi que sa toxicité imposent aux organismes une régulation contrôlée de l'homéostasie du fer. Au niveau moléculaire, cela se traduit notamment par des machineries complexes d'assemblage des hèmes et des centres Fe-S.

1.2. Les protéines fer-soufre

Les protéines à centres Fe-S sont trouvées dans tous les règnes du vivant et contiennent principalement des centres de type $[\text{2Fe-2S}]$, $[\text{3Fe-4S}]$ et $[\text{4Fe-4S}]$ (Beinert *et al.*, 1997). Les protéines Fe-S, présentes dans les plastides, les mitochondries, le cytosol et le noyau, sont relativement abondantes et assurent des fonctions variées chez les plantes (Balk et Pilon, 2011). Les centres Fe-S sont de très anciens groupements prosthétiques (ou cofacteurs) modulant la structure et l'activité des protéines et sont communément liés aux protéines par les groupements thiols (SH) des cystéines et plus rarement par des histidines (Figure 1).

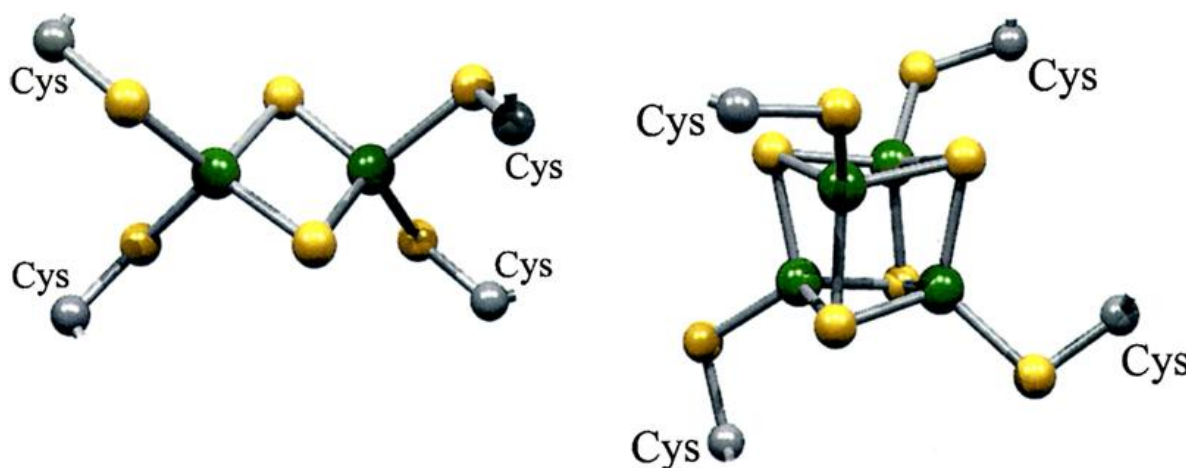


Figure 1 : Structure d'un centre $[\text{2Fe-2S}]$ (gauche) et d'un centre $[\text{4Fe-4S}]$ (droite).

Les atomes de carbone des résidus cystéinyles sont représentés en gris, les atomes de soufre en jaune et les atomes de fer en vert (Frazzon et Dean, 2001).

Ces cofacteurs possèdent des rôles variés (Tableau 1). Ils assurent notamment des fonctions structurales, sont impliqués dans le transfert d'électrons, et peuvent remplir le rôle de centre catalytique et de senseur du fer et de l'oxygène (Beinert *et al.*, 1997). Leur principale fonction, le transfert d'électrons, s'appuie sur la capacité de l'atome de fer à osciller entre les états d'oxydation Fe^{2+} et Fe^{3+} . En effet, selon l'environnement protéique, le potentiel redox des centres Fe-S varie de -500 mV à +300 mV ce qui en fait d'excellents donneurs et accepteurs d'électrons. Cette caractéristique est largement mise à profit dans les chaînes de transport d'électrons chloroplastiques et mitochondriales (Lill, 2009).

L'existence de différents compartiments sub-cellulaires, les besoins de différents centres Fe-S pour les protéines et la toxicité de $\text{Fe}^{2+/3+}$ et de S^{2-} (formes libres) contribuent à expliquer pourquoi des machineries complexes d'assemblage des centres Fe-S ont évoluées.

Fonctions	Exemples	Type de centres Fe-S
Transfert d'électrons	Ferrédoxines	[2Fe-2S]; [3Fe-4S]; [4Fe-4S]
Transfert couplé d'électrons et de protons	Protéine de Rieske Nitrogénase	[2Fe-2S]; [8Fe-7S]
Activation de substrats	(de)Hydratases Enzymes radical SAM Acyl-CoA synthétase	[4Fe-4S] [4Fe-4S]
Structurale	Endonucléase III MutY	[4Fe-4S] [4Fe-4S]
Régulation de l'expression des gènes	Fumarate et nitrate reduction (FNR) iron regulatory protein (IRP) iron sulphur assembly regulatory protein (IscR)	[2Fe-2S] [4Fe-4S]/[2Fe-2S] [4Fe-4S] [2Fe-2S]
Régulation de l'activité enzymatique	Glutamine PRPP Amidotransférase Ferrochélatase	[4Fe-4S] [2Fe-2S]
Donneur de soufre	Biotine synthase	[2Fe-2S]
Réduction de ponts disulfure	Ferrédoxine:thiorédoxine réductase Disulfure réductase	[4Fe-4S] [4Fe-4S]

Tableau 1 : Diversité fonctionnelle des protéines Fe-S (Johnson *et al.*, 2005)

1.3. Assemblage des centres fer-soufre

Les centres Fe-S ont été découverts au début des années 1960 par Helmut Beinert et d'autres lors d'expériences utilisant la résonance paramagnétique électronique. A la fin des années 1960, des chimistes et des biochimistes ont élaborés avec succès des protocoles permettant d'assembler des centres Fe-S au sein d'apoprotéines *in vitro*. Il était alors considéré que ces cofacteurs s'assemblaient de façon non catalytique dans les protéines (Malkin et Rabinowitz, 1966). Cependant, il est apparu dans les années 1990 que leur formation *in vivo* n'est pas spontanée, mais résulte d'un processus de biosynthèse extrêmement contrôlé qui met en œuvre des machineries protéiques complexes.

En effet, des études sur les procaryotes ont mis en évidence trois systèmes différents pour la biosynthèse des centres Fe-S. Le système NIF (Nitrogen fixation) est requis chez *Azotobacter vinelandii* et chez d'autres organismes pour la formation du centre métallique de la nitrogénase ainsi que pour d'autres protéines Fe-S impliquées dans la fixation de l'azote. Le système ISC (iron-sulfur cluster) constitue la machinerie d'assemblage des centres Fe-S de

nombreuses bactéries et le système SUF (sulfur mobilization) est propre aux archées et fonctionnent chez d'autres bactéries dans des conditions de stress oxydant et/ou de faible disponibilité en fer (Ayala-Castro *et al.*, 2008, Fontecave et Ollagnier-de-Choudens, 2008). Ces deux dernières machineries ont été transmises aux mitochondries et aux plastides des eucaryotes lors de l'évolution par endosymbiose. Les mitochondries ont conservé le système ISC et les plastides le système SUF. Bien que ces machineries soient différentes, la biosynthèse des centres Fe-S et leur insertion dans une apoprotéine apparaissent obéir à certains principes communs (Figure 2). Les atomes de soufre sont libérés à partir de cystéine par l'action de la cystéine catalytique d'une cystéine désulfurase. Un persulfure est formé sur cette cystéine. Il est ensuite réduit en sulfure et combiné avec du fer pour former un centre Fe-S sur une protéine d'échafaudage. Dans un deuxième temps, le centre Fe-S est transféré à une apoprotéine cible présentant des cystéines libres.

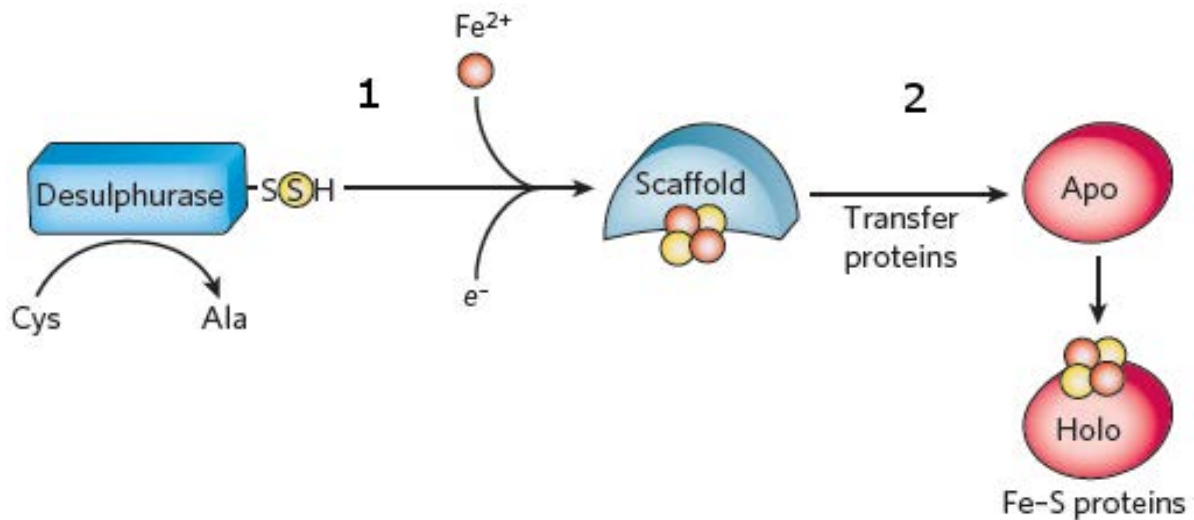


Figure 2 : Schéma représentant le mécanisme d'assemblage des centres Fe-S.

La biosynthèse de protéine Fe-S est divisée en deux grandes étapes, la mobilisation du soufre à partir de la cystéine et du fer pour l'assemblage d'un centre Fe-S sur des protéines d'échafaudage et le transfert du centre Fe-S vers une apoprotéine cible (Lill, 2009).

1.4. Le système SUF-like : machinerie chloroplastique d'assemblage des centres Fe-S chez les plantes

Les protéines à centres Fe-S sont importantes dans le chloroplaste et notamment pour la photosynthèse. Il est d'ailleurs estimé que dans les feuilles jusqu'à 90% du fer se trouve dans le chloroplaste selon les espèces (Terry et Abadía, 1986). A titre d'exemples, la protéine Rieske du cytochrome *b₆f*, trois sous-unités du PSI et la ferrédoxine sont des protéines Fe-S de la chaîne de transport d'électrons chloroplastique. Dans le stroma se trouvent également des protéines Fe-S majeures telles que la glutamate synthase (GOGAT), la nitrite réductase ou encore la sulfite réductase et l'APS réductase (Balk et Pilon, 2011).

Selon la théorie de l'endosymbiose, les chloroplastes proviennent des cyanobactéries. La machinerie chloroplastique d'assemblage des centres Fe-S est probablement héritée de cet ancêtre. En effet, les chloroplastes présentent un système SUF similaire à celui des cyanobactéries (d'où l'appellation SUF-like) mais avec plus de composants et de mécanismes de régulation. Le modèle de fonctionnement de ce système en l'état actuel des connaissances est présenté dans la figure 3.

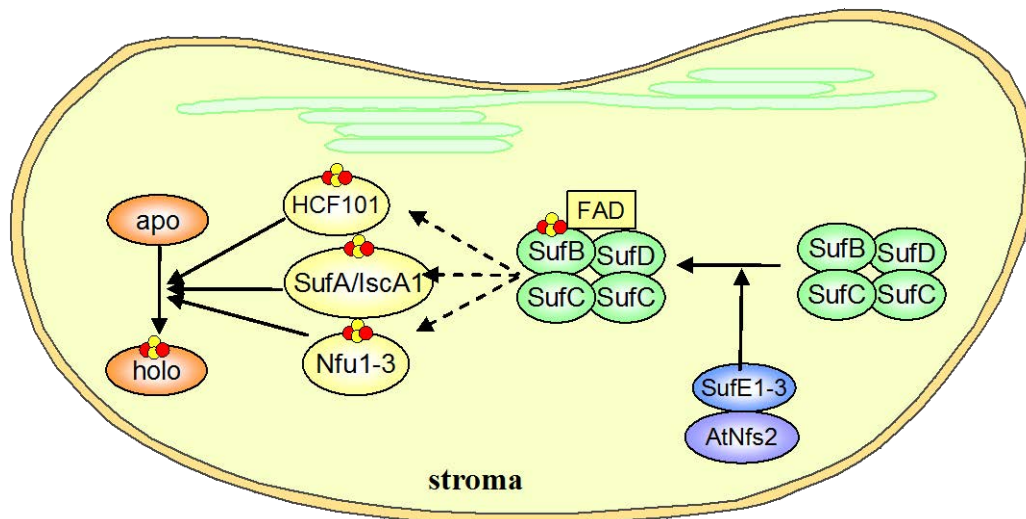


Figure 3: Modèle de fonctionnement de la machinerie chloroplastique d'assemblage des centres Fe-S.

La biogenèse est initiée par la cystéine désulfurase AtNfs2 dépendante du cofacteur pyridoxal L-phosphate (PLP) qui va recruter un atome de soufre d'une cystéine sous forme d'un persulfure au niveau d'une cystéine conservée. Ce persulfure est ensuite transféré à une cystéine conservée d'AtSufE1 (Ye *et al.*, 2006). Un centre Fe-S est ensuite formé sur la protéine d'échafaudage SufB, une flavoprotéine qui forme un complexe avec SufC et SufD (SufBCD). Le centre Fe-S est ensuite transféré vers une apoprotéine acceptrice grâce à des protéines de transfert (NFU1, 2 ou 3, HCF101 ou SufA1). Ces différentes étapes ainsi que le rôle et la position exacte de ces protéines sont à ce jour peu caractérisées. Par analogie avec la machinerie ISC, certaines protéines chaperonnes de type HSP (heat shock protein) pourraient également être nécessaires. Le donneur de fer et d'électrons requis pour la synthèse *de novo* de centres Fe-S, ne sont pas caractérisés à ce jour. La position des glutarédoxines (non représentée) n'est pas clairement déterminée mais elles pourraient agir en tant que protéines d'échafaudage ou de transfert.

1.5. Implication des glutarédoxines de classe II dans l'assemblage des centres Fe-S

Les glutarédoxines (Grxs) sont de petites oxydoréductases, appartenant à la superfamille des thiorédoxines. Elles sont traditionnellement impliquées dans la réduction des ponts disulfure et des protéines glutathionylées (Rouhier *et al.*, 2004). Les Grxs chez les plantes supérieures sont codées par 30 à 40 gènes regroupés en quatre classes (Couturier *et al.*, 2009). La classe II, qui est l'objet de cette étude, comprend 4 sous-classes (GrxS14, S15, S16, S17) dont tous les membres présentent un site actif CGFS (Couturier *et al.*, 2009). Des études phylogénétiques montrent que cette classe est ancienne puisqu'elle est présente chez tous les organismes photosynthétiques, cyanobactéries incluses (Couturier *et al.*, 2009).

L'implication des Grxs dans l'assemblage des centres Fe-S a été montrée en premier lieu à travers la caractérisation d'un mutant pour la Grx5 mitochondriale (type CGFS) chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*. L'extinction de ce gène entraîne l'accumulation de fer dans la cellule et l'inactivation d'enzymes (aconitase, succinate déshydrogénase) nécessitant des centres Fe-S pour fonctionner (Rodriguez-Manzanique *et al.*, 2002). Il a été suggéré ultérieurement par des expériences utilisant du fer radiomarqué que Grx5 facilitait le transfert d'un centre Fe-S d'une protéine d'échafaudage vers l'apoprotéine cible (Muhlenhoff *et al.*, 2003). De plus, Grx5 est capable d'intégrer un centre $[2\text{Fe}-2\text{S}]^{2+}$ (Picciocchi *et al.*, 2007).

De même, les Grxs de classe II chloroplastiques de plantes, GrxS14 et GrxS16, sont capables d'assembler *in vitro* un centre $[2\text{Fe}-2\text{S}]$ assez labile en formant un homodimère avec

deux molécules de glutathion servant de ligets en plus des cystéines du site actif de chaque monomère (Bandyopadhyay *et al.*, 2008). D'autre part, la GrxS14 est capable de transférer rapidement son centre [2Fe-2S] à une ferrédoxine sous forme apoprotéine (Bandyopadhyay *et al.*, 2008). Enfin, la plupart des Grxs de classe II de plantes sont capables de compléter l'essentiel des défauts du mutant *grx5* de levure, ce qui laisse supposer que ces protéines pourraient jouer un rôle similaire chez les plantes (Bandyopadhyay *et al.*, 2008). Tous ces éléments suggèrent que les Grxs de classe II peuvent avoir un rôle soit de protéine d'échafaudage pour l'assemblage initial d'un centre Fe-S, soit de protéine de transfert en contribuant au passage du centre Fe-S de la protéine d'échafaudage à l'apoprotéine cible. Enfin, au travers de leur activité réductase, les Grxs pourraient également jouer un rôle dans le maintien de l'état réduit des cystéines des différents acteurs protéiques de la machinerie d'assemblage des centres Fe-S (Rouhier *et al.*, 2010).

1.6. Présentation du travail de recherche

L'équipe de recherche « Réponse aux stress et régulation redox » (UMR 1136 Interactions Arbres-Micro-organismes Univ. de Lorraine/INRA) nouvellement dirigée par le Pr Nicolas Rouhier est spécialisée dans l'étude des systèmes de régulation redox chez les plantes. L'étude des Grxs est un des thèmes centraux de recherche de cette équipe depuis 2000.

Outre leur rôle dans la machinerie d'assemblage des centres Fe-S, des données récentes obtenues chez les levures indiquent que les Grxs participent à la régulation du métabolisme du fer, vraisemblablement à travers la perception du statut en fer des cellules. Cette fonction est réalisée par la régulation de facteurs de transcription à travers l'interaction avec des protéines de la famille BolA (Kumanovics *et al.*, 2008, Rouhier, 2010). La présence d'un domaine BolA dans la protéine SufE1 suggérant son interaction avec les Grxs de classe II a été l'observation initiale à ce projet. Des études réalisées par double hybride en levure avant mon arrivée au laboratoire ont d'une part confirmé l'interaction de GrxS14 avec SufE1 mais également avec Nfs2.

Dans un premier temps, mon objectif a été de cloner, produire et purifier les protéines recombinantes correspondant à SufE1 et Nfs2 afin de confirmer ces interactions protéine-protéine et d'obtenir des informations structurales sur les différents partenaires. Dans un second temps, l'effet de la GrxS14 sur l'activité du complexe Nfs2-SufE1 a été examiné. D'une façon générale, l'objectif de ce stage visait à comprendre le rôle des Grx de classe II dans la machinerie chloroplastique d'assemblage des centres Fe-S.

2. Matériels et méthodes

2.1. Clonage

Les séquences codantes ont généralement été clonées dans des plasmides de type pET (Annexes 1 à 3). Dans ces vecteurs, l'expression du gène est sous le contrôle d'un promoteur reconnu par l'ARN polymérase du phage T7. Ce gène, contrôlé par l'opérateur *lac*, a été inséré dans les souches d'expression *E. coli* BL21(DE3). Lorsque l'IPTG est ajouté, il se lie au répresseur *lac* permettant ainsi l'expression de l'ARN polymérase T7 et donc l'expression du gène cible. La co-expression de deux protéines a été réalisée par clonage dans le plasmide pCDFDuet qui contient deux sites multiples de clonages (Annexe 4).

Les séquences codantes des gènes d'intérêt ont été amplifiées par PCR (Polymerase chain reaction) (Iproof, Bio-rad) à partir d'ADNc produits suite à l'extraction d'ARN totaux de rosette d'*Arabidopsis thaliana*. Un couple d'amorces « sens » et « anti-sens » comprenant chacune un site de restriction a été conçu pour l'amplification de chaque gène (Annexe 5). La PCR a été réalisée selon les étapes présentées dans le tableau 2 :

Etape	Température (°C)	durée (s)	Nombres de cycle
Dénaturation initiale	98	30	1
Dénaturation	98	10	35
Hybridation	52	30	
Polymérisation	72	15-30 s/kb	
Polymérisation finale	72	300	1

Tableau 2 : Programme utilisé pour l'amplification des gènes d'intérêt par PCR.

Les fragments d'ADN générés par PCR ont été analysés sur gel d'agarose 1% (annexe 6) contenant du bromure d'éthidium et révélés sous ultra-violet. Ils ont été purifiés à l'aide du kit GFX PCR DNA et gel bet purification (GE healthcare). Ceux-ci ont été ensuite digérés, ainsi que les plasmides dans lesquels ils ont ensuite été insérés, par les enzymes de restriction appropriées puis purifiés à nouveau. Enfin, une étape de ligation (T4 DNA ligase, Fermentas) est effectuée pendant une nuit à 4°C ou pendant 3 heures à température ambiante.

Pour la transformation bactérienne, 5 µL du mélange de ligation sont ajoutés à 40 µL de bactéries *E. coli* DH5α (F- ϕ 80lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17 (rk-, mk+) phoA supE44 λ- thi-1 gyrA96 relA1) thermo-compétentes. Le mélange est placé à 4°C pendant 30 min. Ensuite, un choc thermique à 42°C pendant 40 secondes est appliqué pour favoriser l'entrée du plasmide dans la bactérie. Le mélange est ensuite replacé à 4°C pendant 3 min. 500 µL de SOC sont ajoutés au mélange et le tout est incubé à 37°C sous agitation pendant 1 heure. Le mélange est ensuite étalé sur une boîte contenant du LB (Luria Bertani) agar solide (35g/L) et les antibiotiques appropriés (50µg/ml) afin de sélectionner les bactéries ayant intégrées le plasmide. La boîte est placée à 37°C pendant une nuit pour permettre aux bactéries transformées de se multiplier.

2.2. Réaction de polymérisation en chaîne sur colonie bactérienne

La PCR sur colonie a pour but de sélectionner les clones ayant intégré le plasmide d'intérêt. Une colonie est prélevée sur la boîte de Pétri à l'aide d'un cure-dent qui est trempé dans le mélange PCR (Tableaux 3 et 4).

Réactif	Concentration Initiale	Concentration finale	Volume
dNTP	4 mM	160 µM	0,8 µL
Amorce sens	10 µM	0,25 µM	0,5 µL
Amorce anti-sens	10 µM	0,25 µM	0,5 µL
MgCl ₂	25 mM	1 mM	0,8 µL
Polymérase (Go Taq Promega)		0,5 U	0,04 µL
Tampon 5X			4 µL
H ₂ O stérile			13,36 µL

Tableau 3 : Mélange réactionnel des PCR sur colonie.

Etape	Température (°C)	durée (s)	Nombre de cycle
Dénaturation initiale	95	2	1
Dénaturation	95	45	35
Hybridation	52	45	
Polymérisation	72	1 min/kb	
Polymérisation finale	72	300	1

Tableau 4 : Programme de PCR sur colonie bactérienne.

Les produits PCR sont ensuite déposés sur gel d'agarose à 1% afin de vérifier que les clones testés ont bien intégré le plasmide d'intérêt. Dans le cas d'un résultat positif, l'ADN plasmidique est alors purifié à partir de cultures de 3 ml de LB liquide des clones positifs à l'aide du kit de purification d'ADN plasmidique, GFX Microplasmid Prep Kit (GE Healthcare). Le plasmide est élué dans un volume de 30 ou 50 µL d'H₂O stérile. L'ADN purifié obtenu est ensuite digéré avec les enzymes de restriction appropriées à 37°C pendant 1 heure dans le mélange réactionnel présenté dans le tableau 5.

Réactifs	Volume
Plasmide	5 µL
H ₂ O	29 µL
Tampon 10X	4 µL
Enzyme de restriction 1	1 µL
Enzyme de restriction 2	1 µL

Tableau 5 : Mélange réactionnel utilisé pour la digestion

Le mélange de digestion est déposé sur gel d'agarose à 1% afin de vérifier la présence et la taille de l'insert. Si le fragment est présent à la taille attendue, la séquence de l'insert est contrôlée par séquençage (Beckman Coulter Genomics).

2.3. Mutagenèse dirigée

Une version mutée d'AtNfs2 dans laquelle la cystéine située en position 384 est substituée par une sérine a été générée par mutagenèse dirigée par PCR. La réaction a été réalisée grâce au kit QuikChange Lightning Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent Technologies) en utilisant comme matrice le plasmide pET15b-AtNfs2. Avec ce protocole, le plasmide entier est amplifié avec les amorces mutagènes présentant la substitution souhaitée. Les étapes de la réaction de PCR et le programme utilisé sont présentés dans les tableaux 6 et 7.

Réactif	Concentration initiale	Concentration finale	Volume
dNTP	4 mM	200 μ M	1.25 μ L
Amorce mutagène sens	10 μ M	0,4 μ M	0,7 μ L
Amorce mutagène anti-sens	10 μ M	0,4 μ M	0,7 μ L
Plasmide	0,5 μ L
Polymérase (Iproof)		0,5 U	0,25 μ L
Tampon QCL			5 μ L
DMSO			
H ₂ O stérile			15,85 μ L

Tableau 6 : Mélange réactionnel pour la mutagenèse dirigée par PCR

Etape	Température (°C)	durée (s)	Nombre de cycle
Dénaturation initiale	98	30	1
Dénaturation	98	30	18
Hybridation	55	45	
Polymérisation	72	180	
Polymérisation finale	72	300	1

Tableau 7 : Programme de PCR utilisé pour la mutagenèse dirigée

Le produit de PCR obtenu est ensuite digéré pendant 1 heure à 37°C avec l'enzyme DpnI qui hydrolyse les plasmides natifs méthylés non mutés. Les bactéries compétentes *E. coli* DH5 α sont ensuite directement transformées avec 5 μ L de ce mélange comme précédemment.

2.4. Production hétérologue chez *E. coli* des protéines recombinantes

La souche de bactéries utilisée pour la production des protéines recombinantes est la souche *E. coli* BL21(DE3) (F- ompT hsdSB(rB- mB-) gal dcm (DE3) préalablement transformée avec le plasmide pSBET présentant une résistance à la kanamycine et codant pour les ARNt reconnaissant les codons rares codant pour l'arginine (AGG et AGA). Un mélange de bactéries électro-compétentes et du plasmide recombinant (10 ng) est placé dans une cuvette d'électroporation composée de deux électrodes séparées de deux millimètres. Une décharge électrique de 5 millisecondes à 2800 V est appliquée générant des micropores permettant l'incorporation du plasmide par les bactéries. 500 μ L de milieu LB liquide sont ajoutés au mélange d'électroporation qui est ensuite incubé pendant 1h à 37°C. Le mélange est ensuite étalé sur une boîte contenant du LB agar solide (35g/L) et les antibiotiques appropriés (50 μ g/ml) afin de sélectionner les bactéries ayant intégrées le plasmide. La boîte est incubée pendant la nuit à 37°C.

Le lendemain matin, trois clones sont sélectionnés et cultivés dans 3 ml de LB liquide en présence des antibiotiques appropriés, à 37°C et à 150 rpm jusqu'à ce que la densité optique atteigne 0.6 à 600 nm ce qui correspond à la phase de croissance exponentielle. Un aliquot de 200 μ L est prélevé et conservé à 4°C. La production des protéines recombinantes est induite par ajout d'IPTG (IsoPropyl-beta-Thio-Galactoside) à 100 μ M pendant 4 heures. La production de la protéine d'intérêt est vérifiée sur gel SDS-PAGE (annexe 7). Si une surproduction est observée, 200 ml de LB stérile sont ensemencés à partir de l'aliquot de 200 μ L prélevé avant induction et mis en culture pendant une nuit à 37°C. Le lendemain, le volume de culture est porté à 1,6, 2,4 ou 3,6 L selon la production des bactéries et la quantité

de protéine désirée. Comme lors des tests préliminaires, la production de la protéine est induite par ajout d'IPTG lorsque la culture est en phase exponentielle. Après 4 heures d'induction, les bactéries sont centrifugées à 5000 rpm pendant 15 min (rotor JLA 8.1000, Beckman). Les culots bactériens sont alors resuspendus dans 20 ml de tampon TE-NaCl (30 mM Tris HCl pH 8, 1 mM EDTA, 200 mM NaCl) pour les protéines ne comportant pas d'étiquettes histidine et dans 20 ml de tampon Tris-NaCl-Imidazole (50 mM Tris HCl pH 8, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazole) pour celles en comportant et conservés à -20°C .

2.5. Purification des protéines recombinantes

2.5.1. Lyse des cellules bactériennes

Les membranes et les parois des cellules bactériennes sont lysées aux ultrasons (Sonicator Ultrasonic processor XL, sonde de 1 cm de diamètre) par 3 sonications successives d'1 minute chacune. Le lysat est centrifugé à 18000 rpm pendant 30 min (rotor JA25.50, Beckman) afin de séparer les fractions soluble (surnageant) et insoluble contenant les débris cellulaires et les protéines insolubles (culot).

2.5.2. Précipitation différentielle au sulfate d'ammonium

Cette technique est basée sur la solubilité différentielle des protéines. En effet, selon leur composition, les protéines ont tendance à précipiter lorsque la concentration en sulfate d'ammonium (donc la force ionique) change. Quand la concentration en sel est assez élevée pour priver une protéine des molécules d'eau qui l'hydratent, celle-ci devient insoluble et précipite. C'est ce que l'on appelle le phénomène de relargage (salting-out en anglais). La fraction soluble est tout d'abord amenée à 40% de saturation en sulfate d'ammonium puis centrifugée à 15000 rpm pendant 20 min à 4°C , puis le surnageant obtenu amené à 80% de saturation et centrifugé également à 15000 rpm pendant 20 min à 4°C . Chaque culot est resuspendu dans 10 mL de tampon TE-NaCl et un aliquot est analysé sur gel SDS PAGE 15%.

2.5.3. Purification des protéines par chromatographie d'exclusion de taille

La chromatographie d'exclusion de taille également appelée gel filtration permet de séparer les protéines en fonction de leurs tailles, leurs formes et leurs volumes. En effet, les petites molécules pénètrent dans les billes poreuses tandis que les grosses molécules en sont exclues. Les grosses molécules parcourent donc un trajet plus court que les petites molécules et sont donc éluées en premier.

La solution protéique issue de la précipitation différentielle au sulfate d'ammonium est déposée à la surface d'une colonne de type ACA44 ou ACA34 (Pall-BioSeptra, Ø5cm, h80cm) selon la masse moléculaire de la protéine à purifier. La colonne est préalablement équilibrée dans du TE-NaCl. Le profil d'élution est obtenu par mesure de l'absorbance à 280 nm des fractions recueillies. Après analyse sur gel SDS PAGE 15%, les fractions d'intérêt sont regroupées.

2.5.4. Chromatographie d'échange d'ions

La chromatographie d'échange d'ions permet de séparer les protéines en fonction de leur charge. Cette étape permet d'augmenter le niveau de pureté de la protéine suite à la chromatographie d'exclusion de taille. L'échantillon protéique a dans un premier temps été

dialysé dans une cellule de concentration AMICON équipé d'une membrane YM10 (Millipore) qui laisse passer les molécules de poids moléculaire inférieur à 10 kDa dans le but de diminuer la concentration en NaCl en deçà de 1 mM. L'échantillon est ensuite chargé sur une colonne DEAE-Sepharose fast flow (Pharmacia Biotech, Ø25mm, h 15cm) équilibrée dans du tampon TE. La résine est lavée avec du TE jusqu'à ce que l'absorbance à 280 nm en sortie de colonne soit nulle. La protéine recombinante est alors éluée dans le même tampon à l'aide d'un gradient de NaCl allant de 0 à 400 mM. Les fractions recueillies sont analysées par mesure de l'absorbance à 280 nm et sur gel SDS-PAGE 15%. Les fractions d'intérêt sont regroupées.

2.5.5. Purification des protéines avec une étiquette poly-histidine par chromatographie d'affinité métallique sur colonne de nickel

Cette méthode de purification est basée sur l'affinité spécifique entre les étiquettes poly-histidines ajoutées du côté N- ou C-terminal des protéines et les ions Ni^{2+} immobilisés sur une matrice hydrophile par chélation.

Ainsi, la fraction soluble est déposée sur une colonne contenant des billes d'agarose chargées avec du nickel et préalablement équilibrée avec le tampon Tris-NaCl-Imidazole. La présence de faible concentration d'imidazole dans le tampon a pour but d'éliminer la fixation aspécifique de certaines protéines d'*E. coli* naturellement riches en histidine. Le chlorure de sodium est utilisé pour éviter les interactions électrostatiques entre les protéines. La colonne est ensuite lavée avec le même tampon jusqu'à ce que l'absorbance à 280 nm en sortie de colonne soit nulle. La protéine étiquetée est ensuite éluée avec le tampon d'élution (50 mM Tris HCl pH 8, 300 mM NaCl, 250 mM imidazole).

2.5.6. Concentration des protéines

Après purification, la protéine est concentrée par ultrafiltration sous pression d'azote de 5 bars dans une cellule de concentration AMICON équipée d'une membrane YM10 et dialysée contre un tampon 30 mM Tris HCl pH 8. Connaissant le coefficient d'extinction molaire et la masse moléculaire de la protéine recombinante déterminés grâce au logiciel protparam (<http://web.expasy.org/protparam/>), la mesure de l'absorbance de la solution protéique à 280 nm permet d'obtenir sa concentration molaire et massique via la loi de Beer-Lambert.

2.6. Mesure de l'activité cystéine désulfurase de Nfs2

L'activité cystéine désulfurase de la protéine Nfs2 a été mesurée selon le protocole décrit précédemment légèrement modifié (Outten *et al.*, 2003). Le milieu réactionnel de 400 µl contenait 50 mM Tris HCl pH 7,5, 5 mM MgCl_2 , 100 mM NaCl, et 10 µM PLP. Deux sources différentes de pouvoir réducteur ont été utilisées : du dithiothréitol (DTT) à 500 µM ou du glutathion réduit (GSH) à 500 µM couplé à son système de régénération physiologique (200 µM NADPH et 0,5 unité de glutathion réductase (GR, baker yeast, SIGMA)). La réaction est ensuite initiée par l'ajout de 500 µl de L-cystéine et le tout est incubé à 25°C pendant 30 min. La réaction est ensuite stoppée par l'ajout de 50 µl de *N,N*-diméthyl-*p*-phenylenediamine 20 mM préparé dans 7,2 mM HCl. L'addition de 50 µl de FeCl_3 30 mM préparé dans 1,2 M HCl, suivie d'une incubation à 25°C pendant 20 min conduit à la formation de bleu de méthylène dont l'absorbance est mesurée à 670 nm. La quantité de soufre formée est déterminée par l'utilisation d'une courbe étalon préalablement réalisée avec des concentrations connues en soufre variant de 1 à 100 µM.

2.7. Tests d'interactions protéine-protéine *in vitro*

500 µg d'une protéine recombinante portant une étiquette poly-histidine et 500 µg d'une deuxième protéine recombinante non étiquetée sont incubés dans du tampon 30 mM Tris HCl pH 8.0 dans un volume total de 500 µL pendant 30 min sous agitation (150 rpm) à température ambiante. Ensuite, 100 µL de HIS-SELECT® Nickel Affinity Gel (SIGMA) sont incubés 10 min avec le mélange protéique dans les mêmes conditions que précédemment. Une centrifugation de 30 secondes à 5000 rpm permet ensuite d'éliminer les protéines non fixées sur le gel d'affinité. Trois lavages successifs avec un tampon 30 mM Tris HCl pH 8 contenant 100, 300 ou 500 mM de NaCl sont effectués et le surnageant est à chaque fois éliminé par centrifugation (30 secondes, 5000 rpm). L'élution est finalement réalisée avec un tampon Tris HCl pH 8.0 contenant 250 mM d'imidazole. Un aliquot de fractions correspondant à chaque surnageant est analysé sur gel SDS-PAGE.

2.8. Analyse de l'état d'oligomérisation des protéines

Des expériences de gels filtrations analytiques ont été réalisées afin de déterminer les masses moléculaires apparentes des protéines recombinantes purifiées. Les analyses ont été faites à l'aide d'une colonne S200, 10/300 (GE Healthcare) couplée à un système *Akta Purifier* et calibrée à l'aide de marqueurs protéiques entre 29 et 700 kDa (SIGMA). 100 µg de chaque protéine dans un tampon 30 mM Tris-HCl pH 8 et 200 mM NaCl ont été déposés puis élués avec un débit de 0.3 ml min⁻¹. Le profil d'élution est établi en mesurant l'absorbance à 280 nm et 215 nm.

3. Résultats

3.1. Stratégie pour l'expression de protéines chloroplastiques dans *E. coli*

Les trois protéines ciblées au cours de cette étude sont codées par des gènes présents dans le génome nucléaire et leur adressage dans le chloroplaste est lié à l'existence d'une extension du côté N-terminal de la protéine. Afin de se rapprocher d'une situation physiologique, toutes ces protéines ont été produites sous forme mature c'est-à-dire sans cette séquence d'adressage chloroplastique. Le site de clivage exact n'étant généralement pas connu, le site de coupure est déterminé à partir de programmes de prédiction tels que TargetP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>) (Emanuelsson *et al.*, 2000), de l'analyse fine des structures secondaires prédites et d'alignements de séquence avec des orthologues présents chez des organismes eucaryotes ou procaryotes et ne présentant pas une localisation chloroplastique. L'importance du clivage pour la production de la protéine recombinante et sa solubilité a été démontrée précédemment dans l'équipe dans de très nombreux cas. Puisque c'est une étape critique, différentes troncatures sont réalisées pour les protéines pour lesquelles la production et/ou la solubilité ne sont pas jugées satisfaisantes. Alors que je n'ai rencontré aucune difficulté pour les protéines AtGrxS14 et AtNfs2, il a fallu effectuer trois constructions différentes pour AtSufE1 (Figure 4).

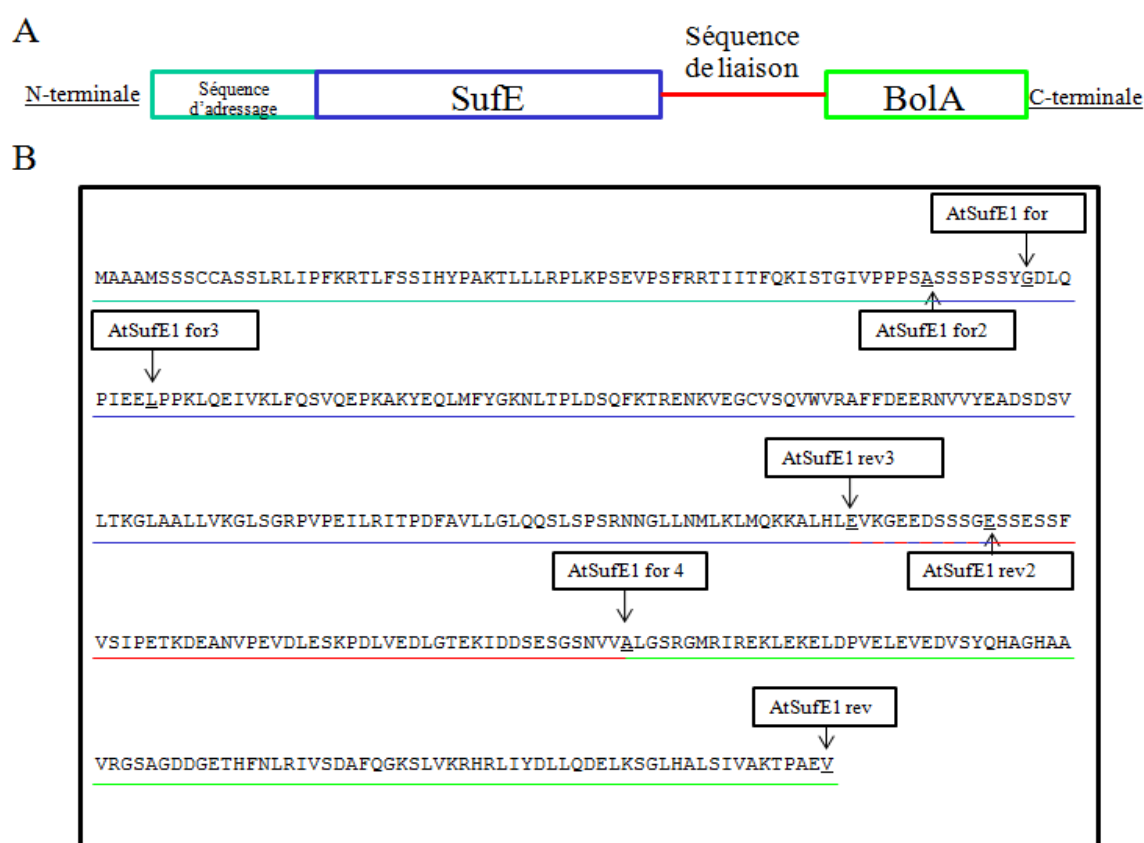


Figure 4 : Organisation modulaire de la protéine AtSufE1

A : Représentation schématique des différents domaines de la protéine AtSufE1.

B : Positionnement des amorces utilisées pour le clonage puis la production des différentes versions d'AtSufE1. Le code couleur délimitant les domaines d'AtSufE1 est identique en A et B.

Pour le clonage par PCR, l'amorce AtSufE1 rev a donc été combinée avec les amorces AtSufE1 for, for2 ou for3 afin de produire trois versions de protéines dépourvues des 74, 66 et

82 premiers acides aminés respectivement. Pour des raisons de solubilité, la version 1 a été écartée, alors que toutes les expériences présentées ci-dessous ont été effectuées avec la version 2. Vers la fin de ce stage, la version 3 a été clonée afin de produire une protéine plus courte du côté N-terminal. En effet, n'ayant pas trouvé de conditions de cristallisation pour la version 2, le site de coupure a été dernièrement évalué à nouveau après comparaison de séquence entre le domaine SufE d'AtSufE1 et les protéines pour lesquelles la structure 3D a été résolue (*E. coli* et *Salmonella typhimurium*) (Goldsmith-Fischman *et al.*, 2004). Ces alignements suggèrent que la présence d'une extrémité N-terminale plus longue et potentiellement non structurée pourrait générer une certaine flexibilité rédhibitoire pour la cristallogénèse.

Comme décrit précédemment, la protéine AtSufE1 est constituée de deux domaines protéiques distincts nommés SufE et BolA (Figure 4A). Afin d'étudier la contribution relative de chacun des domaines pour les interactions avec AtGrxS14 et AtNfs2, chaque module a été indépendamment produit sous forme recombinante. Dans ce cas également, les sites de coupure sont cruciaux et sont déterminés là encore grâce à des alignements de séquences et en évitant d'interrompre des structures secondaires. La séquence codant le domaine BolA a été clonée avec les amorces AtSufE1 for4 et AtsufE1 rev et la production de la protéine n'a posé aucun problème particulier (Figure 4B). Pour le domaine SufE, quatre versions combinant les amorces AtSufE1 for2 ou for3 avec les amorces AtSufE1 rev2 ou rev3 ont été clonées ou sont en cours de clonage. En particulier, il a été décidé de réduire l'extrémité C-terminale (grâce à l'amorce rev3) puisque les protéines recombinantes produites initialement étaient soit insolubles soit avaient tendance à précipiter lors de la purification et de la congélation.

3.2. Production et purification des protéines recombinantes

La production et la purification des protéines recombinantes ont représenté une partie conséquente de ce stage. A titre d'exemple, la purification de protéines avec ou sans étiquette histidine est présentée ci-dessous.

Un gel SDS-PAGE correspondant aux différentes étapes de purification de la protéine His-AtNfs2 par chromatographie d'affinité sur billes de nickel est présenté en figure 5. Il est intéressant de noter que His-AtNfs2 est majoritairement soluble (comparer les pistes 2 et 3). L'absence de contaminants dans la fraction d'élution témoigne d'un degré de pureté important après seulement une seule étape de purification.

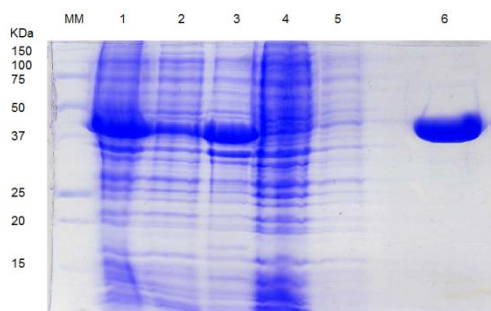


Figure 5 : Analyse des étapes de purification de la protéine recombinante His-AtNfs2 par électrophorèse sur gel d'acrylamide 15%. La position de la protéine recombinante est indiquée par la flèche. **MM.** Marqueur de poids moléculaire. **1.** Fraction protéique totale. **2.** Fraction insoluble. **3.** Fraction soluble. **4.** Fraction passant à travers la colonne. **5.** Fraction de lavage. **6.** Fraction d'élution.

L'exemple de la purification d'AtGrxS14 a été pris pour illustrer une purification en quatre étapes pour les protéines sans étiquette poly-histidine. Après lyse des cellules, séparation des fractions soluble et insoluble et précipitation différentielle au sulfate d'ammonium, la fraction contenant la majorité de la protéine d'intérêt est séparée par chromatographie d'exclusion de taille (Figure 6A). Le profil d'élution, correspondant à l'absorbance à 280 nm, présente trois pics distincts (Figure 6A). Les fractions constituant le deuxième pic sont colorées et possèdent une bande d'absorption à 430 nm caractéristique de la

présence d'un centre Fe-S. L'analyse sur gel SDS-PAGE (Figure 6B) permet de déterminer que le pic incluant les fractions 5 à 15 correspond au volume d'exclusion de la colonne et que les pics englobant les fractions 30 à 40 et 50 à 60 respectivement contiennent AtGrxS14. Conformément aux purifications d'autres Grxs contenant des centres Fe-S, il apparaît que le deuxième et le troisième pic correspondent respectivement à la protéine AtGrxS14 sous forme de dimère et de monomère. La fraction monomérique est déjà quasiment pure. Bien que la fraction monomérique soit déjà quasiment pure, la purification des deux formes est poursuivie par une chromatographie d'échange d'ions afin d'éliminer les quelques contaminants restants et les acides nucléiques (Figures 6C et D).

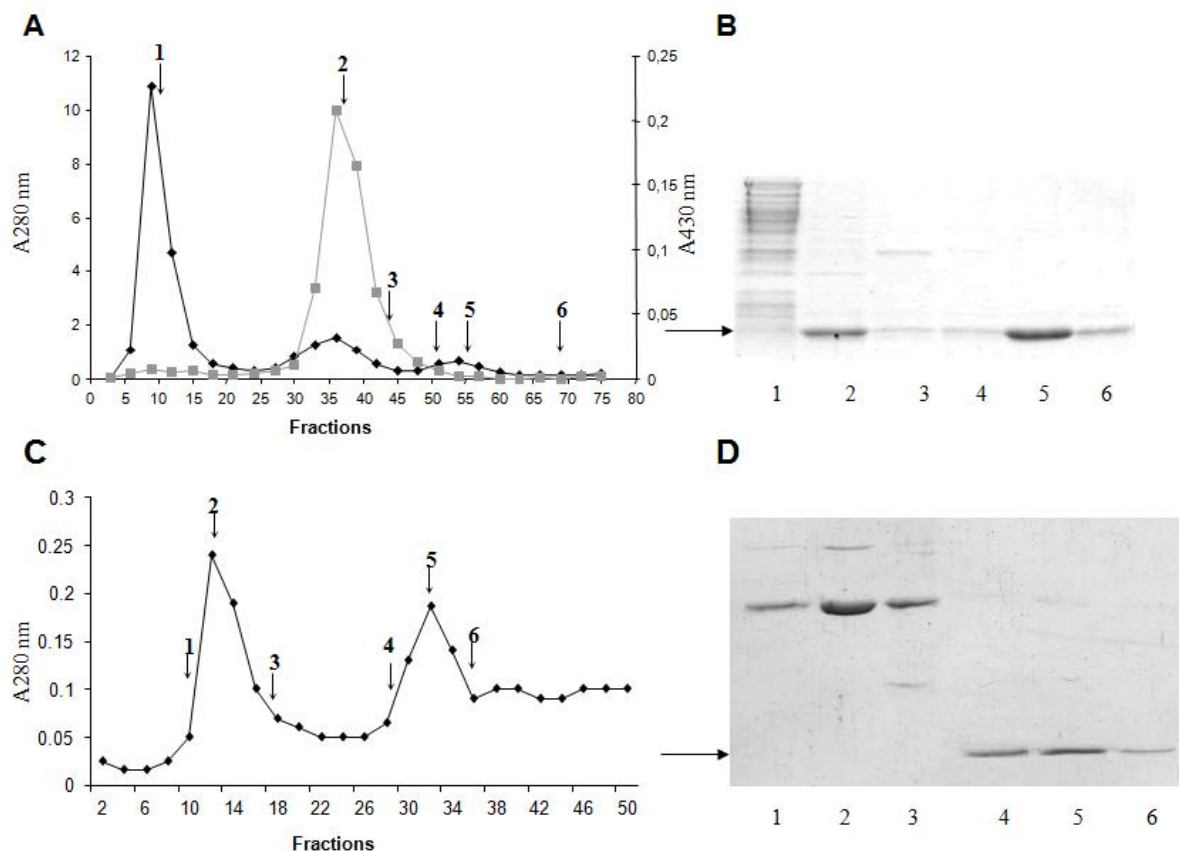


Figure 6 : Purification de la protéine AtGrxS14.

A, Profil d'élution obtenu à 280 nm après chromatographie d'exclusion de taille (résine de type ACA44). **B**, Analyse des fractions d'élution par électrophorèse dénaturante sur gel d'acrylamide 15%. **C**, Profil d'élution obtenu à 280 nm après chromatographie d'échange d'ions sur colonne de type DEAE pour les fractions [30-40] issues de la chromatographie d'exclusion de taille. **D**, Analyse des fractions de chromatographie d'échange d'ions par électrophorèse dénaturante sur gel d'acrylamide 15%.

Suite à leur purification, nous avons essayé de résoudre la structure 3D des protéines pour lesquelles aucune donnée structurale n'était disponible, en collaboration avec le laboratoire CRM² (UMR UHP-CNRS 7036), spécialiste de cristallographie aux rayons X. Un récapitulatif des protéines produites et cristallisées est présenté dans le tableau 7. Au total, huit protéines différentes ont été purifiées à homogénéité, celles précédées de la mention His possèdent une étiquette poly-histidines du côté N-terminal. Les rendements obtenus varient de 0,8 à 32,3 mg de protéine recombinante par litre de culture. Des cristaux ont été obtenus pour deux des cinq protéines testées.

Protéines	Plasmides (pET)	AA	ϵ 280 nm	Poids moléculaire	Rendement (mg/L)	Cristaux
AtNfs2	12a	429	40590	46892	3,1	-
His-AtNfs2	15b	449	40590	49055	13,7	oui
His-AtSufE1-v2	28a	326	14440	35897	12,3	non
BolA(AtSufE1)	12a	96	2980	10621	18,0	oui
His-BolA(AtSufE1)	15b	116	2980	12784	9,0	non
His-SufE(AtSufE1)-v1	15b	183	11460	20319	0,8	non
His-AtGrxS14	15b	131	8605	14709	32,3	-
AtGrxS14	12a	111	8605	12546	8,7	-

Tableau 7 : Tableau récapitulatif des caractéristiques principales des protéines recombinantes

Afin évaluer leur pureté, 5 μ g des différentes protéines recombinantes produites ont été déposés sur gel SDS-PAGE (Figure 7). Toutes présentent un degré de pureté satisfaisant, AtGrxS14 (piste 8) présentant néanmoins quelques contaminants protéiques. A l'exception d'AtNfs2 et de His-AtNfs2 (piste 1) qui migrent autour de 40 kDa alors que leur masse moléculaire théorique est d'environ 47 et 49 kDa, la migration des protéines sur gel SDS-PAGE (Figure 7) correspond généralement bien à leurs poids moléculaires théoriques (Tableau 7). En dépit de cette migration atypique, nous avons vérifié que la masse d'His-AtNfs2 est bien celle attendue par spectrométrie de masse (non montré).

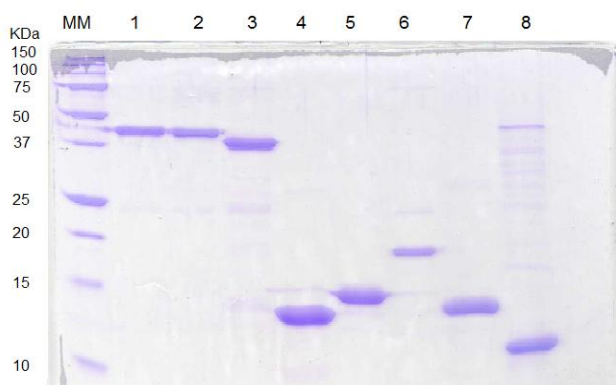


Figure 7 : Gel SDS-PAGE 15% des protéines recombinantes purifiées. MM : Marqueur de poids moléculaire. 1. His-AtNfs2, 2. AtNfs2. 3. AtSufE1. 4. BolA(AtSufE1) 5. His-BolA(AtSufE1). 6. His-SufE(AtSufE1). 7. His-AtGrxS14. 8. AtGrxS14.

La structure de la protéine AtNfs2 a été résolue par cristallographie. Conformément aux résultats obtenus en chromatographie d'exclusion de taille, la protéine est dimérique (Figure 8A). Au niveau du site actif de la protéine où a lieu l'activité de désulfuration, la cystéine 384 dite catalytique est persulfurée c'est-à-dire qu'elle présente un soufre additionnel provenant de la cystéine « substrat » (Figure 8B). Cette cystéine se situe dans la boucle entre le brin β 16 et l'hélice α 15 et fait face à son coenzyme, le phosphate de pyridoxal. Celui-ci est lié de façon covalente à la lysine 241 se situant au cœur de l'hélice α 10. Cette liaison se fait entre le $-N\epsilon H_2$ de la lysine et le $-C=O$ du phosphate de pyridoxal avec le départ d'une molécule d'eau.

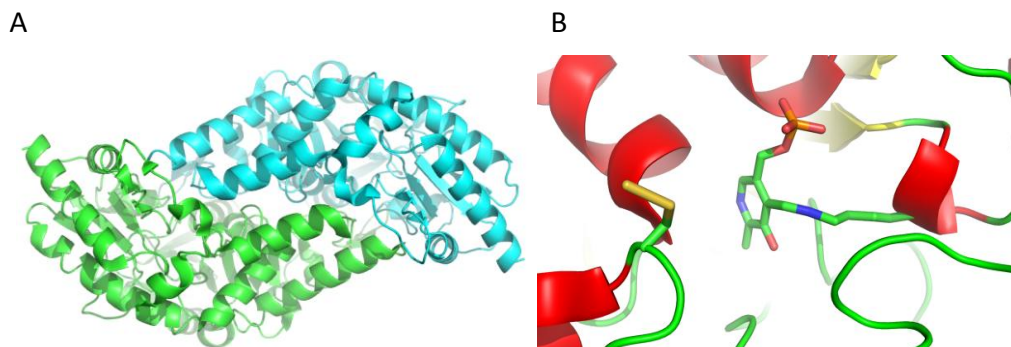


Figure 8 : Structure tridimensionnelle d'AtNfs2.

A. Représentation en mode rubans et flèches de la protéine AtNfs2 à l'aide du logiciel PyMol. La protéine est composée de 431 acides aminés et elle s'agence sous la forme d'un dimère où sont représentés en vert et en bleu les monomères A et B respectivement. La protéine est bien structurée avec la présence de 16 hélices α qui entourent les feuillet β centraux de la protéine et de 17 brins β dont 11 brins participent à ces deux feuillet β anti-parallèles. B. Représentation en mode rubans et flèches par le biais du logiciel PyMol du site actif d'un monomère de la protéine AtNfs2. Sont représentés en rouge les hélices α , par des flèches jaunes les brins β et en vert les boucles.

3.3. Interactions protéine-protéine

La capacité des protéines à interagir a été testée *in vitro* en incubant des quantités équivalentes d'une protéine étiquetée avec une protéine non étiquetée. Dans tous les cas, le mélange initial a été séparé sur gel SDS PAGE (Figure 9, piste 1) et comparé aux protéines isolées. La piste 2 représente les protéines non fixées sur les billes d'agarose recouvertes de nickel, les pistes 3, 4, 5 et 6 les lavages avec des concentrations salines croissantes et la piste 7, l'élution effectuée en présence d'imidazole.

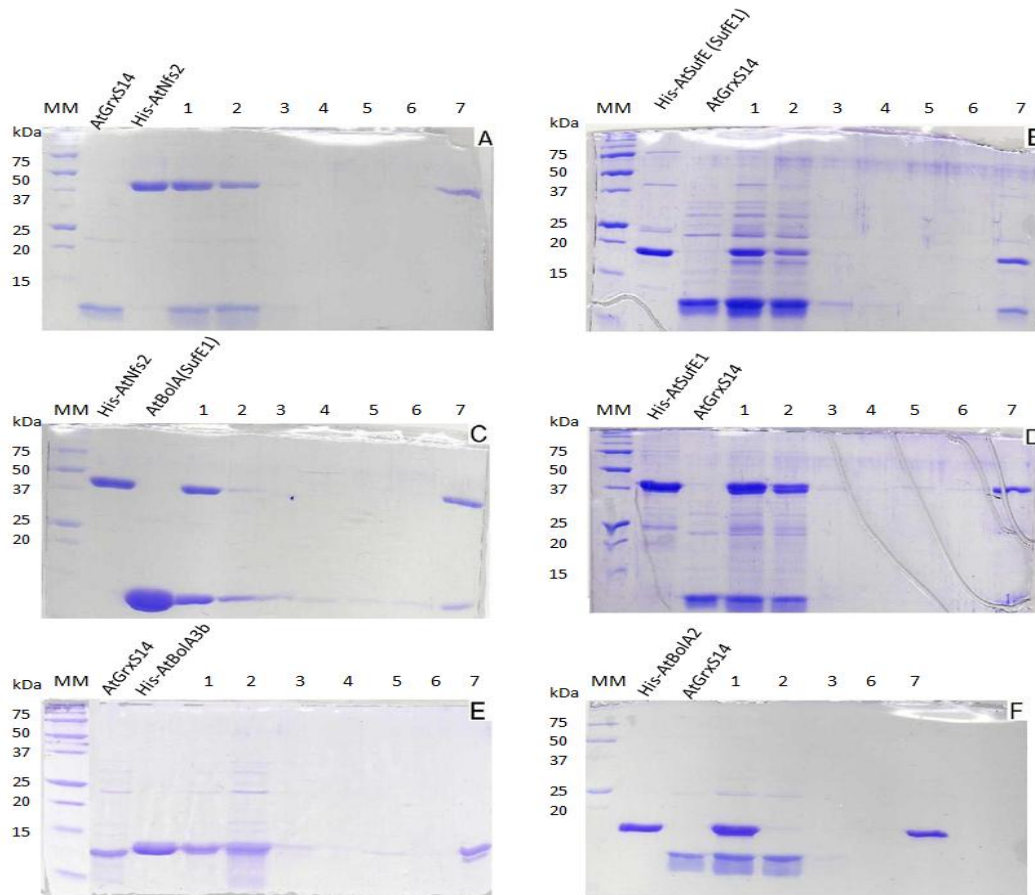


Figure 9 : Analyse des interactions sur gels SDS-PAGE dénaturants.

A : AtGrxS14 et His-AtNfs2 ; **B :** His-SufE(AtSufE1) et AtGrxS14 ; **C :** His-AtNfs2 et BolaA (AtSufE1) ; **D :** His-AtSufE1 et AtGrxS14 ; **E :** AtGrxS14 et His-AtBolaA3 ; **F :** His-AtBolaA2 et AtGrxS14. **MM :** Marqueur de poids moléculaire. **1 :** Mélange protéique. **2 :** Surnageant (non fixé sur gel). **3 :** Lavage sans NaCl. **4 :** Lavage avec NaCl 100 mM. **5 :** Lavage avec NaCl 300 mM. **6 :** Lavage avec NaCl 500 mM. **7 :** Elution avec 250 mM d'imidazole.

Dans ces conditions expérimentales, une interaction stable a été détectée entre AtGrxS14 et le domaine SufE d'AtSufE1 (Figure 9B) ; AtNfs2 et le domaine BolaA d'AtSufE1 (Figure 9C) ; AtGrxS14 et AtSufE1 (Figure 9D) ; AtGrxS14 et AtBolaA3 (Figure 9E) mais pas entre AtGrxS14 et AtNfs2 (Figure 9A) et entre AtBolaA2 et AtGrxS14 (Figure 9F). Les protéines BolaA2 et BolaA3, qui sont chloroplastiques, ont été initialement utilisées pour valider la mise au point de ce test. En effet, de nombreuses évidences obtenues au laboratoire par des approches de BiFc (Bimolecular fluorescence complementation), ou de double-hybride en levure indiquent que ces protéines interagissent (résultats non montrés). Toutes les combinaisons possibles n'ont pas encore été testées car certaines versions des protéines n'étaient pas disponibles au moment où ont été effectués ces tests, mais les résultats sont prometteurs. A l'avenir, ce type de test pourrait permettre de former des quantités suffisantes de complexe pour des essais en cristallographie.

3.4. Co-expression des partenaires protéiques dans *E. coli*

Une alternative aux tests d'interaction effectués avec les 2 partenaires purifiés indépendamment a été de co-exprimer les partenaires directement dans *E. coli* grâce à des vecteurs dédiés de type pCDFDuet. Comme l'approche précédente, un seul des 2 partenaires possède une étiquette poly-histidine et la purification s'effectue par chromatographie d'affinité métallique sur colonne de nickel. Les combinaisons testées sont His-AtSufE1/AtNfs2, His-AtNfs2/AtSufE1, His-AtGrxS14/AtNfs2, His-AtGrxS14/AtSufE1 et His-AtGrxS14/AtBolA2. De manière surprenante, seule une interaction a été observée entre His-AtGrxS14/AtBolA2 dans les conditions expérimentales utilisées (Figure 10).

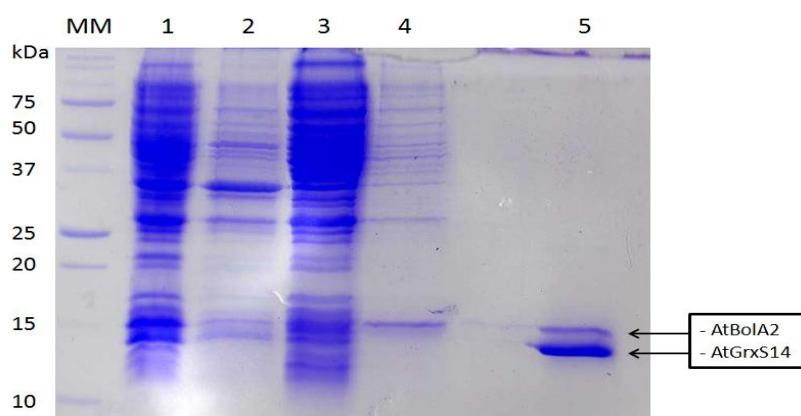


Figure 10 : Analyse sur gel SDS-PAGE 15% des étapes de purification du complexe His-AtGrxS14/AtBolA2. MM : Marqueur de poids moléculaire. 1 : Fraction protéique totale. 2 : Fraction insoluble. 3 : Fraction soluble. 4 : Fraction non retenue 5 : Fraction éluée.

Bien que la production ne soit pas très intense, la figure 10 montre que His-AtGrxS14 et AtBolA2 sont toutes deux produites (piste 1), qu'elles sont majoritairement solubles (piste 3) et qu'elles sont éluées conjointement (piste 5). Une partie d'AtBolA2 n'a pas été retenue (piste 4) mais cela pourrait être lié à un excès de cette protéine par rapport à AtGrxS14.

3.5. Analyse de l'état d'oligomérisation par chromatographie d'exclusion de taille

Des travaux précédents avaient mis en évidence l'interaction physique entre AtNfs2 et AtSufE1 (Ye *et al.*, 2006). Outre le fait de confirmer cette interaction à l'aide du test développé précédemment, l'objectif était d'estimer la composition du complexe et de le purifier. Au préalable, l'état d'oligomérisation de chaque protéine a été analysé sur une colonne de chromatographie d'exclusion de taille Sephadex S200 couplée à un appareil *Akta Purifier*. Les résultats indiquent qu'AtSufE1 et AtNfs2 forment des dimères puisqu'elles sont éluées à des tailles approximativement deux fois supérieures à la taille attendue pour un monomère (Figure 11 et Tableau 8).

Dans un second temps, His-AtSufE1 et AtNfs2 ont été incubées à concentration équimolaire puis purifiées par chromatographie d'affinité. L'état d'oligomérisation du mélange protéique ainsi obtenu a ensuite été analysé comme précédemment. Le profil obtenu est plus complexe puisque le pic principal présente plusieurs épaulements correspondant à des masses de 280, 200, 90 et 37 kDa. Dix fractions couvrant l'intégralité de ces pics ont été analysées par gel SDS PAGE. Dans les oligomères de plus de 200 kDa, les deux protéines sont présentes,

AtNfs2 étant plus abondant si l'on considère qu'elles réagissent de manière équivalente avec le bleu de coomassie utilisé pour colorer les gels. Dans les oligomères de moins de 200 kDa, His-AtSufE1 est plus abondante, voire seule dans le pic correspondant à une masse de 37 kDa. Ceci indique que des hétéro-complexes ont été formés mais qu'il existe vraisemblablement une certaine hétérogénéité.

Afin de rendre ce complexe plus homogène et de stabiliser des intermédiaires réactionnels, des variants protéiques où les cystéines catalytiques ont été substituées en sérine ont été construits et purifiées (AtNfs2 C384S) ou sont en cours de clonage (AtSufE1 C66S).

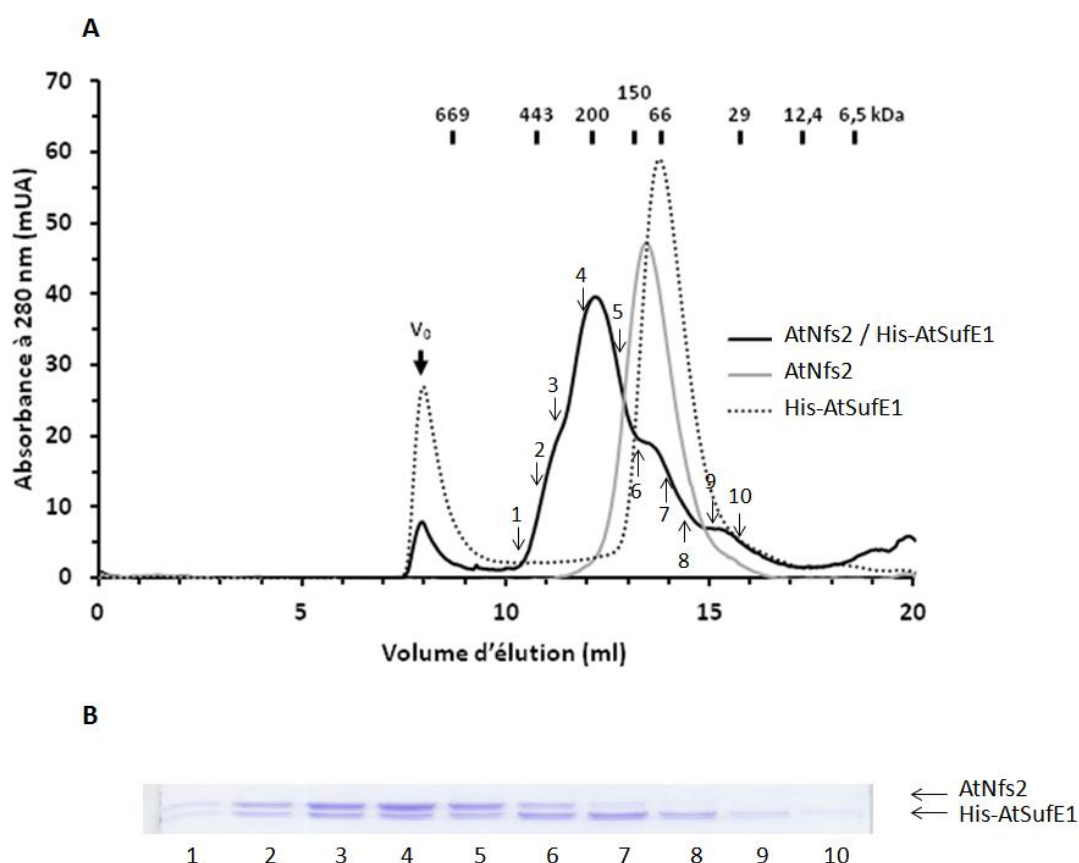


Figure 11 : Etats d'oligomérisation des protéines AtNfs2 et AtSufE1

A, Profils d'élution d'AtNfs2, d'His-AtSufE1 et du complexe His-AtSufE1/AtNfs2 obtenus en gels filtrations analytiques. **B**, Analyse sur gel SDS-PAGE des fractions d'élution de His-AtSufE1/AtNfs2.

Protéines	Poids moléculaire théorique (Da)	Volume d'élution (ml)	GF (kDa)
AtNfs2	46892	13,44	94
His-AtSufE1	35897	13,97	73
His-AtSufE1-AtNfs2		11,35	280-300
		12,2	200
		13,56	90
		15,10	37

Tableau 8 : Récapitulatif du poids moléculaire théorique, du volume d'élution et du volume apparent des protéines séparées sur colonne Sephadex S200.

3.6. Mesure de l'activité cystéine désulfurase d'AtNfs2

L'activité cystéine désulfurase d'AtNfs2 a été évaluée en mesurant la quantité de soufre libéré à partir de la cystéine. En présence de *N,N*-diméthyl-*p*-phénylènediamine et de chlorure de fer, le soufre libre conduit à la formation de bleu de méthylène pouvant être quantifié par la mesure de l'absorbance à 670 nm.

Tout d'abord, l'influence d'AtSufE1 sur l'activité d'AtNfs2 a été évaluée en présence de deux systèmes donneurs d'électrons différents, un réducteur chimique, le DTT et un système mimant des conditions physiologiques impliquant le NADPH, la GR et le GSH (Figure 12A). Ainsi, quelque soit le système réducteur utilisé, on observe qu'en présence d'AtSufE1, l'activité d'AtNfs2 est augmentée d'un facteur proche de 9. D'autre part, le système physiologique couplant NADPH, GR et GSH est sensiblement aussi efficace que le DTT puisque l'activité d'AtNfs2 est seulement 1,24 fois plus importante en présence de DTT. A partir de cette observation, l'activité cystéine désulfurase a par la suite été mesurée en présence du système physiologique.

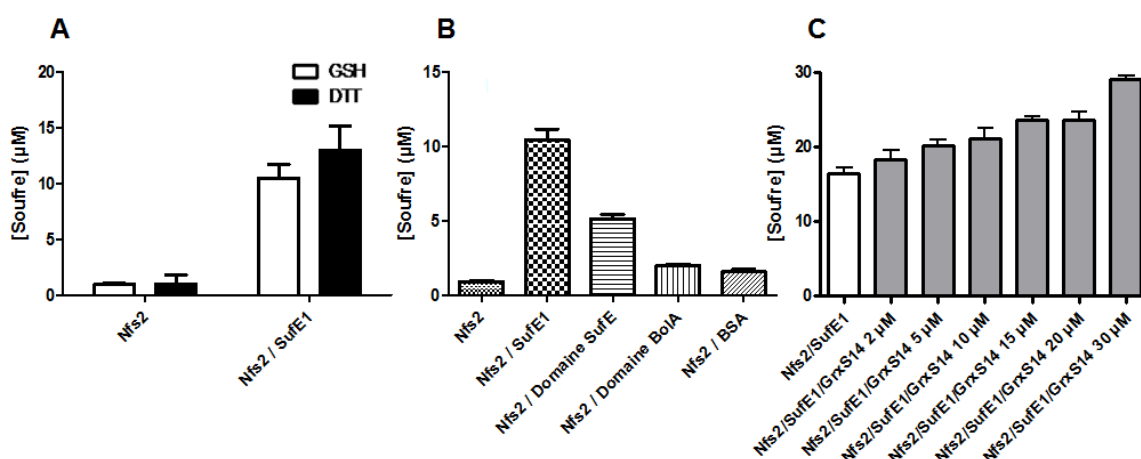


Figure 12 : A, Activité cystéine désulfurase d'AtNfs2 en présence ou en absence d'AtSufE1 et dans 2 conditions de pouvoir réducteur. B, Effet des domaines d'AtSufE1 sur l'activité cystéine désulfurase d'AtNfs2 en présence du système NADPH/GR/GSH. C, Influence de la concentration d'AtGrxS14 sur l'activité cystéine désulfurase d'AtNfs2 en présence d'AtSufE1 et du système NADPH/GR/GSH.

L'importance des domaines SufE et BoleA d'AtSufE1 pour l'activation de l'activité d'AtNfs2 par AtSufE1 a également été évalué en comparaison avec l'albumine de sérum bovin (BSA), utilisée comme témoin (Figure 12B). L'activité cystéine désulfurase d'AtNfs2 en présence du domaine SufE de AtSufE1 est trois fois plus importante qu'en présence du domaine BoleA ou de la BSA. Toutefois, l'activation de l'activité d'AtNfs2 par le domaine SufE seul n'est pas aussi forte qu'en présence d'AtSufE1, indiquant que le domaine BoleA pourrait avoir un rôle structural dans l'interaction Nfs2/SufE1.

Enfin, l'augmentation d'activité cystéine désulfurase d'AtNfs2 obtenue en présence de concentrations croissantes d'AtGrxS14 suggère qu'AtGrxS14 pourrait participer à la régénération de la cystéine catalytique d'AtNfs2 ou AtSufE1 en réduisant soit les persulfures soit des adduits glutathion formés au cours de la réaction (Figure 12C).

4. Discussion

Le but de ce travail de recherche était d'étudier à l'aide d'approches biochimiques et structurales le rôle des Grx de classe II dans la biogenèse chloroplastique des centres Fe-S chez les plantes supérieures, en se focalisant en particulier sur leur action vis-à-vis du complexe cystéine désulfurase, formé d'AtNfs2 et AtSufE1.

Initialement, des expériences de double hybride en levure à grande échelle ou de co-immunoprécipitation ont montré que les protéines de type BOLA interagissent avec les Grxs dites de classe II ou monothiol (Giot *et al.*, 2003, Kumanovics *et al.*, 2008). Contrairement à ce qui a été proposé initialement (Huynen *et al.*, 2005), les protéines BOLA ne sont pas des réductases pour les Grxs et des analyses biochimiques et spectroscopiques plus récentes ont montré que ces deux protéines forment des hétéro-dimères liant un centre [2Fe-2S] (Li *et al.*, 2009, Li *et al.*, 2012). Chez les plantes, des Grxs de classe II et des protéines BOLA sont présentes dans les compartiments sub-cellulaires majeurs (chloroplastes, mitochondries, cytosol et noyau) (Bandyopadhyay *et al.*, 2008). De manière très intéressante, la protéine SufE1 possède un domaine BOLA du côté C-terminal, ce qui nous a conduits à examiner la possibilité que les Grxs chloroplastiques puissent interagir avec SufE1.

Dans un premier temps, des expériences de double hybride en levure effectuée avant le début de mon stage ont effectivement montré qu'AtGrxS14, mais pas AtGrxS16 l'autre Grx chloroplastique de classe II, pouvait interagir avec SufE1 et de manière plus surprenante avec Nfs2, un partenaire connu de SufE1. Afin de confirmer ces interactions par d'autres méthodes, nous avons envisagé de travailler avec des protéines recombinantes. La production et la purification d'AtNfs2, AtGrxS14 et du domaine BOLA d'AtSufE1 avec ou sans étiquette poly-histidine se sont avérées relativement simples. Cela a d'ailleurs d'ores et déjà permis de résoudre la structure tridimensionnelle de deux de ces protéines. Ces structures ne sont pas tellement innovantes en soi mais cela constitue un premier pas pour l'élucidation de la structure des protéines en complexe. En raison de problèmes de solubilité et/ou de stabilité, la purification d'AtSufE1 et de son domaine SufE s'est avérée plus complexe. Pour le moment, les protéines peuvent être purifiées mais ne cristallisent pas. Les sites de coupures de la séquence d'adressage et des domaines de SufE1 initialement choisis sont certainement à l'origine de ces difficultés. De nouvelles constructions ont récemment été définies en se basant sur la structure 3D de la protéine SufE d'*E. coli*, afin que les extrémités N- et C-terminales s'alignent parfaitement sans affecter les structures secondaires du domaine SufE.

Les tests d'interaction protéine-protéine réalisés avec les protéines produites de manière isolée ont permis de confirmer l'interaction AtNfs2/AtSufE1 et l'interaction d'AtGrxS14 avec AtSufE1 mais pas avec AtNfs2. Les expériences de co-expression n'ont pour l'instant pas permis de confirmer ces différentes interactions. Afin d'expliquer ces résultats discordants, plusieurs hypothèses peuvent être avancées. Tout d'abord, les niveaux de production obtenus avec le vecteur pCDFDuet sont plus faibles qu'avec les vecteurs de type pET. D'autre part, les deux protéines partenaires potentielles pourraient être également produites en quantités trop différentes, modifiant ainsi l'équilibre pour la formation d'hétéro-complexe par rapport à des homo-complexes. Enfin, les concentrations salines utilisées dans les tampons de purification ou de réaction sont différentes. Ceci constitue un point non négligeable étant donné l'importance de la concentration en sels dans les interactions protéine-protéine. Dans tous les cas, la confrontation de ces différentes méthodes met en lumière l'importance des conditions expérimentales dans l'étude des interactions entre protéines *in vitro*. Selon toute logique, on aurait pu penser que l'approche de co-expression aurait du être la méthode de choix mais il reste probablement des ajustements à réaliser. Des résultats contraires ont été obtenus avec le couple AtGrxS14/AtBOLA2 utilisé comme garant

de la fonctionnalité des tests, à savoir qu'une interaction était visible après co-expression mais pas lors des expériences d'interaction faites avec les protéines isolées. Cependant, l'explication la plus probable dans ce cas pourrait être un encombrement stérique défavorable pour l'interaction et/ou une désorganisation structurale liés à la présence de la queue poly-histidine. En effet, pour l'expérience de co-expression/co-purification, c'est AtGrxS14 qui était étiquetée, alors que pour l'expérience de reconstitution du complexe, c'est AtBola2 qui était étiquetée. L'autre explication est que, dans le cas de la co-expression, l'hétéro-complexe purifié renfermait un centre Fe-S, qui était très visible du fait de la coloration brune associée.

Afin de disséquer la nature des interactions de manière plus fine et définir les domaines impliqués, différents tests ont d'ores et déjà été réalisés avec les modules d'AtSufE1. Les prédictions de départ étaient qu'AtGrxS14 interagisse avec AtSufE1 grâce au domaine Bola et qu'AtNfs2 interagisse avec AtSufE1 grâce au domaine SufE. Hors, pour le moment des interactions ont été obtenues entre AtNfs2 et le domaine Bola d'AtSufE1 et entre AtGrxS14 et le domaine SufE d'AtSufE1. Il n'est toutefois pas si surprenant que tous les domaines d'une protéine multi-modulaire puissent interagir avec le partenaire protéique. La résolution de la structure de ces protéines en complexe prend encore plus d'importance pour décrire et comprendre les interactions. En regardant la littérature, l'obtention d'une interaction entre AtGrxS14 et AtSufE1 grâce au domaine SufE n'est peut être pas si surprenante puisque l'orthologue Grx4 d'*E. coli* a été co-purifié avec SufE qui ne possède pas de domaine Bola (Bolstad et Wood, 2010). Il reste à présent à déterminer si l'interaction attendue entre les autres domaines existe également.

L'ensemble de ces résultats a été obtenu avec une AtGrxS14 sous forme apo, c'est-à-dire sans son centre Fe-S. Lorsque l'on disposera de conditions anaérobies, grâce à l'acquisition d'une boîte à gant, il sera intéressant d'entreprendre des expériences similaires avec une Grx sous forme holoprotéine. Ces tests suggèrent d'ores et déjà plusieurs rôles possibles pour la GrxS14 dans la biogenèse chloroplastique des centres Fe-S. En interagissant avec le complexe Nfs2/SufE1, GrxS14 pourrait jouer le rôle de protéine d'échafaudage, comme suggéré précédemment grâce à des expériences de transfert de cluster Fe-S (Bandyopadhyay *et al.*, 2008). Des expériences de reconstitution de cluster Fe-S *in vitro* dans AtGrxS14 en présence d'AtNfs2 et AtSufE1 sont envisageables en conditions anaérobies.

D'un autre côté, les résultats suggèrent également que la GrxS14 pourrait réguler le fonctionnement du complexe Nfs2/SufE1, soit en empêchant ou en favorisant leur interaction grâce à sa propre interaction avec SufE1, soit en modifiant l'activité cystéine désulfurase du complexe grâce à son activité disulfure réductase.

Afin de valider cette dernière hypothèse, des tests *in vitro* d'activité cystéine désulfurase ont été mis au point. En premier lieu, j'ai pu confirmer qu'AtSufE1 est un activateur de l'activité cystéine désulfurase d'AtNfs2 (Ye *et al.*, 2006). En effet, l'activité cystéine désulfurase d'AtNfs2 seule initialement assez faible est augmentée environ d'un facteur 9 en présence d'AtSufE1. Lors d'études précédentes, AtSufE1 stimulait l'activité d'AtNfs2 d'un facteur 30 ou 40 et chez *E. coli*, SufE stimule l'activité de SufS, l'orthologue de Nfs2, d'un facteur 7 (Ye *et al.*, 2006). Cette différence d'activité d'un facteur 3 ou 4 est difficilement explicable car la même construction d'AtSufE1 a été utilisée. Cependant, dans nos mains, AtSufE1 n'est pas très stable puisque nous avons observé qu'une partie de la protéine avait tendance à s'agréger lors des expériences de chromatographies d'exclusion de taille analytiques et qu'une perte d'activité d'un même échantillon protéique avait lieu après congélation/décongélation.

En dissociant l'effet des domaines d'AtSufE1, j'ai pu montrer que l'activité cystéine désulfurase d'AtNfs2 est également activée par le domaine SufE d'AtSufE1 mais pas par le domaine Bola, ce qui était attendu compte tenu du fait qu'AtSufE1 est sensée constituer un relai pour le transfert du soufre grâce à la cystéine catalytique de son domaine SufE. La

diminution de l'activité cystéine désulfurase d'AtNfs2 avec le domaine SufE seul par rapport à la protéine entière peut être liée soit à une mauvaise conformation du domaine SufE suite à la coupure, soit à une interaction modifiée avec Nfs2 en raison de l'absence du domaine BolA. Le fait qu'une interaction entre AtNfs2 et le domaine BolA a été observée pourrait favoriser cette seconde hypothèse.

D'autre part, les résultats des mesures d'activité cystéine désulfurase présentent un caractère original car ils montrent que les valeurs d'activités obtenues avec le système réducteur physiologique GSH/GR/NADPH sont quasiment similaires à celles obtenues avec le DTT, un réducteur chimique artificiel, utilisé comme source de pouvoir réducteur. Cela pourrait indiquer que ce système est important physiologiquement pour la réduction du soufre en sulfure. Le glutathion pourrait donc servir à réduire les formes persulfurées d'AtNfs2 et/ou d'AtSufE1. Si des adduits glutathion sont formés sur l'une ou l'autre des protéines, il se pourrait que la GrxS14 réduise ces adduits régulant ainsi l'état d'oxydation de la cystéine catalytique d'AtSufE1 et/ou d'AtNfs2. Les résultats obtenus sont cohérents avec cette hypothèse puisque l'activité cystéine désulfurase d'AtNfs2 augmente avec l'ajout de concentration croissante d'AtGrxS14 dans le milieu réactionnel.

En conclusion, toutes ces approches seront poursuivies en parallèle afin de préciser le rôle des Grxs de classe II dans l'assemblage des centres Fe-S et la nature des interactions et régulations existant à travers leur interaction avec le complexe Nfs2/SufE1.

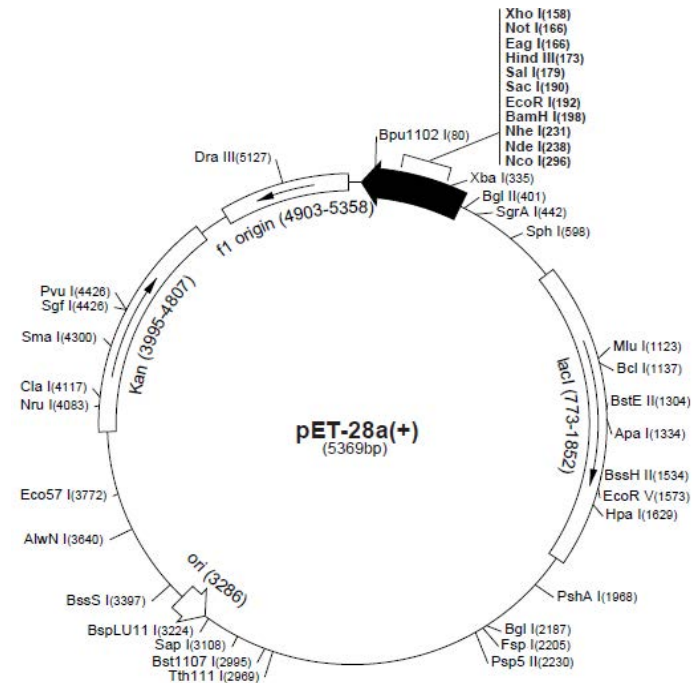
5. Références bibliographiques

- AYALA-CASTRO, C., SAINI, A. & OUTTEN, F. W. 2008. Fe-S cluster assembly pathways in bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev*, 72, 110-25, table of contents.
- BALK, J. & PILON, M. 2011. Ancient and essential: the assembly of iron-sulfur clusters in plants. *Trends Plant Sci*, 16, 218-26.
- BANDYOPADHYAY, S., CHANDRAMOULI, K. & JOHNSON, M. K. 2008. Iron-sulfur cluster biosynthesis. *Biochem Soc Trans*, 36, 1112-9.
- BANDYOPADHYAY, S., GAMA, F., MOLINA-NAVARRO, M. M., GUALBERTO, J. M., CLAXTON, R., NAIK, S. G., HUYNH, B. H., HERRERO, E., JACQUOT, J. P., JOHNSON, M. K. & ROUHIER, N. 2008. Chloroplast monothiol glutaredoxins as scaffold proteins for the assembly and delivery of [2Fe-2S] clusters. *EMBO J*, 27, 1122-33.
- BEINERT, H., HOLM, R. H. & MUNCK, E. 1997. Iron-sulfur clusters: nature's modular, multipurpose structures. *Science*, 277, 653-9.
- BOLSTAD, H. M. & WOOD, M. J. 2010. An *In Vivo* Method for Characterization of Protein Interactions within Sulfur Trafficking Systems of *E. coli*. *Journal of Proteome Research*, 9, 6740-6751.
- BRAUN, V. & KILLMANN, H. 1999. Bacterial solutions to the iron-supply problem. *Trends Biochem Sci*, 24, 104-9.
- COUTURIER, J., JACQUOT, J. P. & ROUHIER, N. 2009. Evolution and diversity of glutaredoxins in photosynthetic organisms. *Cell Mol Life Sci*, 66, 2539-57.
- EMANUELSSON, O., NIELSEN, H., BRUNAK, S. & VON HEIJNE, G. 2000. Predicting Subcellular Localization of Proteins Based on their N-terminal Amino Acid Sequence. *J Mol Biol*, 300, 1005-1016.
- Fontecave, M. & OLLAGNIER-DE-CHOUDENS, S. 2008. Iron-sulfur cluster biosynthesis in bacteria: Mechanisms of cluster assembly and transfer. *Arch Biochem Biophys*, 474, 226-37.
- FRAZZON, J. & DEAN, D. R. 2001. Feedback regulation of iron-sulfur cluster biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98, 14751-14753.
- GIOT, L., BADER, J. S., BROUWER, C., CHAUDHURI, A., KUANG, B., LI, Y., HAO, Y. L., OOI, C. E., GODWIN, B., VITOLS, E., VIJAYADAMODAR, G., POCHART, P., MACHINENI, H., WELSH, M., KONG, Y., ZERHUSEN, B., MALCOLM, R., VARRONE, Z., COLLIS, A., MINTO, M., BURGESS, S., MCDANIEL, L., STIMPSON, E., SPRIGGS, F., WILLIAMS, J., NEURATH, K., IOIME, N., AGEE, M., VOSS, E., FURTAK, K., RENZULLI, R., AANENSEN, N., CARROLLA, S., BICKELHAUPT, E., LAZOVATSKY, Y., DASILVA, A., ZHONG, J., STANYON, C. A., FINLEY, R. L., JR., WHITE, K. P., BRAVERMAN, M., JARVIE, T., GOLD, S., LEACH, M., KNIGHT, J., SHIMKETS, R. A., MCKENNA, M. P., CHANT, J. & ROTHBERG, J. M. 2003. A protein interaction map of *Drosophila melanogaster*. *Science*, 302, 1727-36.
- GOLDSMITH-FISCHMAN, S., KUZIN, A., EDSTROM, W. C., BENACH, J., SHASTRY, R., XIAO, R., ACTON, T. B., HONIG, B., MONTELIONE, G. T. & HUNT, J. F. 2004. The SufE Sulfur-acceptor Protein Contains a Conserved Core Structure that Mediates Interdomain Interactions in a Variety of Redox Protein Complexes. *J Mol Biol*, 344, 549-565.

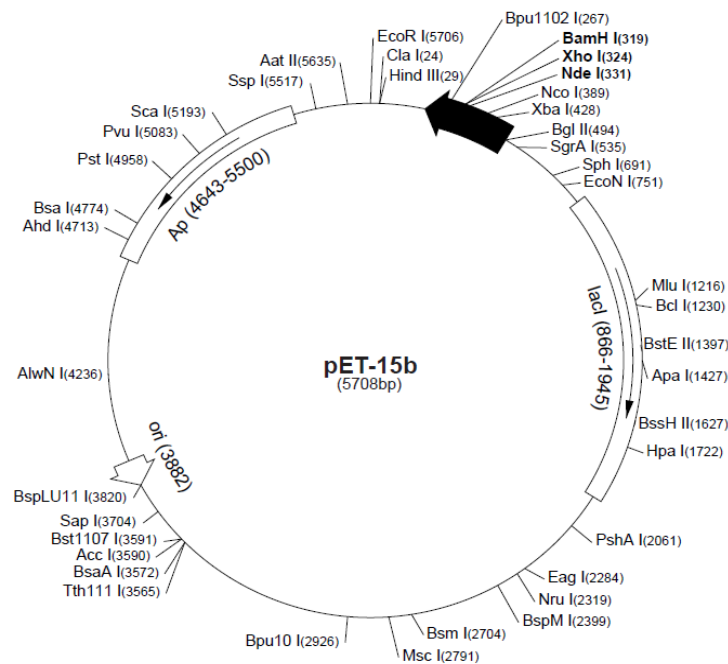
- HUYNEN, M. A., SPRONK, C. A. E. M., GABALDÓN, T. & SNEL, B. 2005. Combining data from genomes, Y2H and 3D structure indicates that BolA is a reductase interacting with a glutaredoxin. *FEBS Lett*, 579, 591-596.
- JOHNSON, D. C., DEAN, D. R., SMITH, A. D. & JOHNSON, M. K. 2005. Structure, function, and formation of biological iron-sulfur clusters. *Annu Rev Biochem*, 74, 247-81.
- KUMANOVICS, A., CHEN, O. S., LI, L., BAGLEY, D., ADKINS, E. M., LIN, H., DINGRA, N. N., OUTTEN, C. E., KELLER, G., WINGE, D., WARD, D. M. & KAPLAN, J. 2008. Identification of FRA1 and FRA2 as genes involved in regulating the yeast iron regulon in response to decreased mitochondrial iron-sulfur cluster synthesis. *J Biol Chem*, 283, 10276-86.
- LI, H., MAPOLELO, D. T., DINGRA, N. N., NAIK, S. G., LEES, N. S., HOFFMAN, B. M., RIGGS-GELASCO, P. J., HUYNH, B. H., JOHNSON, M. K. & OUTTEN, C. E. 2009. The Yeast Iron Regulatory Proteins Grx3/4 and Fra2 Form Heterodimeric Complexes Containing a [2Fe-2S] Cluster with Cysteinyll and Histidyl Ligation. *Biochemistry*, 48, 9569-9581.
- LI, H., MAPOLELO, D. T., RANDENIYA, S., JOHNSON, M. K. & OUTTEN, C. E. 2012. Human glutaredoxin 3 forms [2Fe-2S]-bridged complexes with human BolA2. *Biochemistry*, 51, 1687-96.
- LILL, R. 2009. Function and biogenesis of iron-sulphur proteins. *Nature*, 460, 831-8.
- MALKIN, R. & RABINOWITZ, J. C. 1966. The reconstitution of clostridial ferredoxin. *Biochem Biophys Res Commun*, 23, 822-7.
- MUHLENHOFF, U., GERBER, J., RICHHARDT, N. & LILL, R. 2003. Components involved in assembly and dislocation of iron-sulfur clusters on the scaffold protein Isu1p. *EMBO J*, 22, 4815-25.
- OUTTEN, F. W., WOOD, M. J., MUNOZ, F. M. & STORZ, G. 2003. The SufE protein and the SufBCD complex enhance SufS cysteine desulfurase activity as part of a sulfur transfer pathway for Fe-S cluster assembly in *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, 278, 45713-9.
- PICCIOCCI, A., SAGUEZ, C., BOUSSAC, A., CASSIER-CHAUVAT, C. & CHAUVAT, F. 2007. CGFS-type monothiol glutaredoxins from the cyanobacterium *Synechocystis* PCC6803 and other evolutionary distant model organisms possess a glutathione-ligated [2Fe-2S] cluster. *Biochemistry*, 46, 15018-26.
- RODRIGUEZ-MANZANEQUE, M. T., TAMARIT, J., BELLI, G., ROS, J. & HERRERO, E. 2002. Grx5 is a mitochondrial glutaredoxin required for the activity of iron/sulfur enzymes. *Mol Biol Cell*, 13, 1109-21.
- ROUHIER, N. 2010. Plant glutaredoxins: pivotal players in redox biology and iron-sulphur centre assembly. *New Phytol*, 186, 365-72.
- ROUHIER, N., COUTURIER, J., JOHNSON, M. K. & JACQUOT, J. P. 2010. Glutaredoxins: roles in iron homeostasis. *Trends Biochem Sci*, 35, 43-52.
- ROUHIER, N., GELHAYE, E. & JACQUOT, J. P. 2004. Plant glutaredoxins: still mysterious reducing systems. *Cell Mol Life Sci*, 61, 1266-77.
- TERRY, N. & ABADÍA, J. 1986. Function of iron in chloroplasts. *Journal of Plant Nutrition*, 9, 609-646.
- YE, H., ABDEL-GHANY, S. E., ANDERSON, T. D., PILON-SMITS, E. A. & PILON, M. 2006. CpSufE activates the cysteine desulfurase CpNifS for chloroplastic Fe-S cluster formation. *J Biol Chem*, 281, 8958-69.

6. Annexes

Annexe 1 : Représentation schématique du vecteur pET28a. La flèche noire représente le site multiple de clonage.



Annexe 2 : Représentation schématique du vecteur pET15b. La flèche noire représente le site multiple de clonage.



Annexe 5 : Tableau récapitulatif des gènes amplifiés par PCR, des plasmides dans lesquels ils ont été clonés et des amorces utilisées pour l'amplification par PCR et pour les PCR sur colonie bactérienne. En bleu sont représentés le site et l'enzyme de restriction de chaque amorce et en rouge les sites mutés.

Gène amplifié	Plasmide utilisé pour le clonage	Amorce	Séquence de l'amorce 5' 3'	Enzymes de restriction
AtGrxS14	pET 15b et pET 12a	AtGrxS14 for3	CCCCCCCCCATATGGCTTCGGCTCTTACGCCGCAA	NdeI
		AtGrxS14 rev	CCCCGGATCCTCAAGAGCACATAGCTTTCTC	BamHI
AtNfs2	pET 15b et pET 12a	AtNfs2 for	CCCCCCCCCATATGGCCGCCGCCGCTTCTCCGCCACC	NdeI
		AtNfs2 rev2	CCCCGGATCCTTATTTGAAAGAGTTGAAGAAGCTCACAGTGTC	BamHI
AtNfs2C384S	pET 15b et pET 12a	AtNfs2C384Sfor	AGGTCAGGACACCACAGCGCACAGCCACTCCAC	cystéine en sérine
		AtNfs2C384Srev	GTGGAGTGGCTGTGCCTGTGGTGTCTGACCT	cystéine en sérine
AtSufE1	pEt 28a	AtSufE1 for	CCCCCATGGCTGGAGACCTTCAACCAATC	NcoI
		AtSufE1 for2	CCCCCCCCCATATGGCTTCATCATCTCCGTCTG	NdeI
		AtSufE1 for3	CCCCCATGGCTCTTCCACCGAAGTACAAGAGATC	NcoI
		AtSufE1 for4	CCCCCCCCCATATGGCTTTAGGGAGTAGA	NdeI
		AtSufE1 rev	CCCGGATCCTCAAACCTCAGCAGGAGT	BamHI
		AtSufE1 rev2	CCCGGATCCTCACTCTCCAGAACTTGAATC	BamHI
		AtSufE1 rev3	CCCCCTCGAGTTATTCCAAATGAAGAGCTTTTCTG	XhoI
His-AtSufE1 / AtNfs2	pCDFDuet	AtSufE1 for	CCCCCATGGCTGGAGACCTTCAACCAATC	NcoI
		AtSufE1 rev	CCCGGATCCTCAAACCTCAGCAGGAGT	BamHI
		AtNfs2 for	CCCCCCCCCATATGGCCGCCGCCGCTTCTCCGCCACC	NdeI
		AtNfs2 rev3	CCCCCATGGCTTATTTGAAAGAGTTGAAGAAGCTCACAGTGTC	XhoI
His-AtNfs2 / AtSufE1	pCDFDuet	AtNfs2 for	CCCCCCCCCATATGGCCGCCGCCGCTTCTCCGCCACC	NcoI
		AtNfs2 rev3	CCCCGGATCCTTATTTGAAAGAGTTGAAGAAGCTC	BamHI
		AtSufE1for2	CCCCCCCCCATATGGCTTCATCATCTCCGTCTG	NdeI
		AtSufE1 rev3	CCCCCTCGAGTCAAACCTCAGCAGGAGT	XhoI
His-AtGrxS14 / AtSufE1	pCDFDuet	AtGrxS14 for	CCCCCATGGCTTTGACTCCTGCGCTGAAG	NcoI
		AtGrxS14 rev 2	CCCCGGATCCTCAAGAGCACATTGCCTT	BamHI
		AtSufE1for2	CCCCCCCCCATATGGCTTCATCATCTCCGTCTG	NdeI
		AtSufE1 rev3	CCCCCTCGAGTCAAACCTCAGCAGGAGT	XhoI
His-AtGrxS14 / AtNfs2	pCDFDuet	AtGrxS14 for	CCCCCATGGCTTTGACTCCTGCGCTGAAG	NcoI
		AtGrxS14 rev 2	CCCCGGATCCTCAAGAGCACATTGCCTT	BamHI
		AtNfs2 for	CCCCCCCCCATATGGCCGCCGCCGCTTCTCCGCCACC	NdeI
		AtNfs2 rev3	CCCCCTCGAGTTATTTGAAAGAGTTGAAGAAGCTCACAGTGTC	XhoI
His-AtGrxS14 / AtBolA2	pCDFDuet	AtGrxS14 for	CCCCCATGGCTTTGACTCCTGCGCTGAAG	NcoI
		AtGrxS14 rev 2	CCCCGGATCCTCAAGAGCACATTGCCTT	BamHI
		AtBolA2for2	CCCCCCCCCATATGAGCAGCGTTGAGAAAACC	NdeI
		AtBolA2rev3	CCCCCTCGAGCTAGTCTTTAGAAGG	XhoI

Annexes 6: Gel d'agarose 1% (m/v)

Gel agarose 1 % (m/v) :

Agarose	0,5 g
Tampon TBE 10X	5 ml
Bet 10 mg/ml	0.3 µl
H ₂ O qsp	50 ml

Tampon TBE 10X :

Tris base	108 g/l
Borate	55 g/l
EDTA 0,5M pH8	40 ml/l

La migration s'effectue dans du tampon 1X, à un voltage de 110V, ampérage non limitant.

Annexe 7 : Gels SDS-PAGE

Les échantillons sont repris et déposés dans 10 µl de solution de dissociation. Les extraits bactériens sont chauffés 10 min à 95°C avant le dépôt. La migration s'effectue dans le tampon de migration. Le gel est ensuite coloré puis décoloré.

Gel de séparation (15%) :

1,5 M Tris-HCl pH 8,85	1,875 ml
H ₂ O	2,68 ml
Acrylamide (40%)	2,81 ml
SDS (20%)	37,5 µl
AMPS (10%)	45 µl
TEMED	11 µl

Gel de concentration :

0,5 M Tris-HCl pH 6,8	0,75 ml
H ₂ O	1,77 ml
Acrylamide (40%)	399 µl
SDS (20%)	15 µl
AMPS (10%)	27 µl
TEMED	4,8 µl

Solution de dissociation (bleu de Laemmli) :

Tris 0,5 M pH6,8	250 µl
β-mercaptoéthanol	50 µl
SDS 20 %	100 µl
Glycérol	100µl
BBP 2%	2 µl

Tampon de migration :

Tris base	3 g
Glycine	14,4 g
SDS	1 g
H ₂ O	1 l

	Solution de coloration	Solution de décoloration
Acide acétique	100 ml	75 ml
Ethanol glacial	500 ml	50 ml
H ₂ O	500 ml	850 ml
Bleu de Coomassie R250	2,75 g	

Résumé

Chez les plantes, les protéines à centres fer-soufre (Fe-S) sont essentielles de par leur implication dans des processus variés tels que le transport d'électrons chloroplastique et mitochondrial ou encore l'assimilation du soufre et de l'azote et la synthèse/réplication de l'ADN. Des machineries protéiques d'assemblage des centres Fe-S existent dans la plupart des compartiments sub-cellulaires. Certaines glutarédoxines sont vraisemblablement nécessaires pour la biosynthèse des centres Fe-S dans les chloroplastes mais leur rôle n'est pas exactement défini. Des interactions entre la glutarédoxine GrxS14 et les protéines Nfs2 et SufE1 d'*Arabidopsis thaliana* qui forment le complexe cystéine désulfurase ont été récemment mises en évidence. A l'aide d'approches biochimiques, enzymatiques et structurales, ce travail a permis de résoudre la structure 3D de certaines protéines, de former et d'isoler certains complexes et de comprendre quels domaines protéiques sont nécessaires pour ces interactions. Les analyses enzymatiques révèlent le rôle prépondérant d'AtSufE1 pour l'activité cystéine désulfurase d'AtNfs2 et suggèrent que le glutathion et AtGrxS14 pourraient moduler cette activité.