



Etudes structurales et biochimiques de la γ -kétol réductase chloroplastique d'Arabidopsis thaliana : caractérisation d'une nouvelle classe de " Medium chain dehydrogenase/reductase " impliquée dans la détoxification.

Sarah Mas y Mas

► **To cite this version:**

Sarah Mas y Mas. Etudes structurales et biochimiques de la γ -kétol réductase chloroplastique d'Arabidopsis thaliana : caractérisation d'une nouvelle classe de " Medium chain dehydrogenase/reductase " impliquée dans la détoxification.. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université Grenoble Alpes, 2015. Français. <NNT : 2015GREAV015>. <tel-01286770>

HAL Id: tel-01286770

<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01286770>

Submitted on 11 Mar 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ GRENOBLE ALPES

Spécialité : **BIOLOGIE STRUCTURALE ET NANOBIOLOGIE**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par **Sarah MAS Y MAS**

Thèse dirigée par le **Dr David COBESSI**

préparée au sein de l'**Institut de Biologie Structurale**

dans l'**École Doctorale Chimie et Sciences du Vivant**

Etudes structurales et biochimiques de la γ -kétol réductase chloroplastique d'*Arabidopsis thaliana* : caractérisation d'une nouvelle classe de « Medium chain dehydrogenase/reductase » impliquée dans la détoxification.

Thèse soutenue publiquement le **30 octobre 2015**,

devant le jury composé de :

Mme Christelle BRETON

Professeur à l'Université de Grenoble, Grenoble, (Président)

Mme Claudine MAYER

Professeur à l'Université Paris Diderot Paris 7, Paris, (Rapporteur)

Mme Frédérique TETE-FAVIER

Maître de conférences à l'Université de Lorraine, Nancy, (Rapporteur)

Mme Nushin AGHAJARI

Directeur de Recherche à l'IBCP, Lyon, (Examineur)

Mr Norbert ROLLAND

Directeur de Recherche CNRS à l'IRTSV/LPCV, Grenoble, (Examineur)

Mr David COBESSI

Chargé de Recherche CNRS à l'IBS, Grenoble, (Directeur de thèse)



A mes grands-parents paternels,

REMERCIEMENTS

La période de l'élaboration de la thèse de doctorat permet de se former par la recherche. Mener une réflexion sur un sujet donné, émettre des hypothèses, pallier les problèmes divers et variés, telles sont les tâches quotidiennes d'un doctorant. Pour que cette formation puisse aboutir, il est important d'avoir le « ciment » permettant de consolider les éléments de base d'une « construction ». Les éléments de base sont représentés par les collègues proches de travail avec qui on passe la majorité de notre temps, puis, le « ciment » correspond aux amis qui sont « la bouffée d'air fraîche » permettant de se ressourcer et à la famille toujours présente et à l'écoute. Dans cette optique, permettez-moi de remercier les personnes suivantes :

- ✓ Dr AGHAJARI Nushin, Prof. BRETON Christelle, Prof. MAYER Claudine, Dr TETE-FAVIER Frédérique, et Dr NORBERT Rolland ; tous les membres du jury qui ont accepté d'évaluer mes travaux et aussi pour leurs conseils avisés. A ces personnes s'ajoute Dr GOUET Patrice, membre de mon comité de suivi de thèse, et qui par ce biais, m'a également apporté de nombreux conseils.
- ✓ le Directeur de l'IBS, Dr Eva PEBAY-PEROULA puis Dr Winfried WEISSENHORN pour m'avoir permis de faire ma thèse au sein de l'IBS.
- ✓ mon directeur de thèse, Dr David COBESSI, pour ce qu'il m'a apporté durant ces trois années de thèse, et pour m'avoir permis de suivre des formations. Entre autres, il a accepté que je participe au label Recherche Entreprise et Innovation (REI) afin de connaître les particularités d'une entreprise. En plus de cela, il m'a autorisée à faire des vacances à l'UFR de pharmacie de Grenoble. L'ensemble de ces formations se sont révélées être essentielles dans mes choix professionnels post-thèse.
- ✓ le chef du groupe, Dr Jean-Luc FERRER, pour sa contribution conséquente dans le cadre de ma thèse.

- ✓ nos collaborateurs : Dr Gilles CURIEN, pour m'avoir permis d'apprendre et de comprendre une partie de l'étude sur l'enzymologie et d'avoir répondu à mes nombreuses questions tout au long de ma thèse, Cécile GIUSTINI, pour les manipulations que nous avons pu réaliser ensemble et Dr Elisa DELL'AGLIO, pour le partage sans hésitation de ses connaissances et de ses propres résultats sur le sujet.

- ✓ le Dr Franck BOREL pour sa gentillesse, sa patience à mon égard, sa présence continue tout au long de ces trois années de thèse (*jusqu'à la fin*), pour avoir partagé avec moi ses connaissances scientifiques, pour son écoute, pour son aide, pour sa disponibilité (*la sollicitation a été assez importante, je dois bien le reconnaître !*), pour son soutien, pour ses réponses honnêtes et tous les échanges et les discussions que nous avons pu avoir. Il a eu un rôle **considérable** dans l'aboutissement de ma thèse.

- ✓ le Dr Yann-Vaï LE BIHAN, pour son regard extérieur souvent indispensable dans l'avancement de mon travail. Sa contribution pendant mes deux premières années m'a permis d'évoluer dans ma réflexion scientifique notamment sur les résultats obtenus sur mon sujet de thèse. Je le remercie également pour son aide sur certaines expériences. En plus de cet aspect scientifique, je le remercie également pour sa convivialité au quotidien pendant ces deux ans.

- ✓ Mrs André PLISSON, Patrick MALAUREILLE, Philippe CHINKIRCH et Pierre OSNI pour tout ce que j'ai pu apprendre grâce à eux au sein du label Recherche Entreprise et Innovation. Je les remercie de m'avoir donné cette chance de découvrir le « monde de l'entreprise ». Je les remercie également pour tous les conseils qu'ils ont pu me prodiguer au cours de cette formation.

- ✓ Dr Monika SPANO, Dr Nicolas TABOURIECH et Dr Wim BURMEISTER de m'avoir permis de faire des vacances à l'UFR de pharmacie de Grenoble malgré quelques problèmes administratifs. Cela m'a permis de me rendre compte de ce que peut être l'enseignement. *Vous m'avez donné cette opportunité et je vous en suis énormément reconnaissante.*

- ✓ tous les membres de l'équipe du groupe synchrotron et du groupe des métalloprotéines pour leur accueil au sein du laboratoire, pour les échanges de qualité, pour leur gentillesse et leur soutien. Ce fut un plaisir de travailler dans le même laboratoire que vous !!! Tout particulièrement, mes différentes collègues de bureau Christine, Chloé, Fanny, Anthi. C'était un réel plaisir de venir au laboratoire sachant que vous étiez là !! Mille merci Fanny pour ta présence, tu me manqueras je vais avoir du mal à trouver une aussi bonne collègue de bureau à l'avenir, c'est certains !!! Je tiens à remercier Laura Zieperi dont la présence à de nombreuses reprises au laboratoire m'a bien sauvé la vie. *Merci beaucoup pour tes précieux conseils Laura et pour les classeurs des colonnes, ne t'inquiètes pas, à moi, ils m'auront bien servi.* Merci à Lydie, Claudine, Patricia, Juan, Yvain, Antoine, Jacques, Eve, Anne, Isabelle, Xavier, Oriane. Juan merci pour avoir partagé tes connaissances et ta culture avec ceux qui t'entoure. Yvain merci pour le temps que tu m'as consacré pour m'avoir aidé à prendre du recul sur ma thèse lors de la rédaction et pour tes explications sur la cristallographie. Patricia, pour le temps que tu as passé à m'expliquer certains aspects du docking et également merci pour ton dynamisme au laboratoire. Merci à Adrien et Romane, une paire de doctorants pas comme les autres, merci pour tous les échanges que nous avons pu réaliser sur le domaine scientifique. A Niels, pour les nombreuses fois où nous avons parlé longuement de cristallogénèse ou de purifications ou tout autre sujet. Je remercie également Widade pour tous ses conseils et ses encouragements ainsi que Christophe pour nos échanges.

- ✓ le groupe synchrotron de la ligne FIP, merci à Michel d'avoir pris le temps de me présenter la ligne et de m'avoir expliqué les différents processus de la ligne FIP ainsi que pour le fait d'être venu à mon aide à plus d'une reprise. Merci à Yoann également pour son aide concernant mes problèmes d'ordinateurs ou encore ceux sur la ligne.

- ✓ Chantal ROBESSON, une secrétaire efficace, patiente, souriante, gentille, quoi attendre de plus ?! Interlocutrice d'une aide précieuse, *milles merci Chantal pour ton implication et les réponses à mes nombreuses questions.*

- ✓ les scientifiques de l'IBS avec qui j'ai eu l'occasion d'échanger ou de travailler : le Dr Christine EBEL, le Dr Nicole THIELENS, le Dr Jean-Baptiste REISER et le Dr Eric GIRARD.

- ✓ toutes les personnes présentes pendant les pauses du midi bien qu'elles n'ont duré qu'un certain temps, ça a été un bon regain d'énergie, Dr Michel THEPAUT pour ses précieux conseils et ces moments de détente, Florine, Louise, Yann, Pascal, Yann et tous les autres.
- ✓ la bande des simples MAS : Guillaume MAS et Dr Caroline MAS, un doctorant et une post-doctorante très sympathiques avec un humour hors du commun.
- ✓ Dr Albane LEMAIRE qui a pu et su me transmettre toutes les bases expérimentales pour faire de la recherche et les bases pour mener une réflexion scientifique pertinente. Je lui en suis **énormément reconnaissante**. Cela m'a permis de commencer ma thèse sur de bonnes bases. Au Dr Déborah HARRUS, également pour sa présence, ses conseils, ça a toujours été un plaisir de te revoir, même si c'était souvent sur les lignes de lumière. A ceux du Centre de Biologie Structurale de Montpellier et ceux de l'Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale de Toulouse que j'ai pu revoir et qui m'ont rappelé à quel point je pouvais aimer les sciences (Dr Vanessa DELPHOSSE, Dr Jean-François GUICHOU, Dr Stefano TRAPANI, Dr Catherine ROYER...).
- ✓ Nat-X Ray d'avoir accepté que je sois présente au sein de l'entreprise et Pierrick ROGUES pour les échanges sur les différents aspects de son travail et pour ses conseils pour la suite de la thèse.
- ✓ mes vieilles amies de lycée : Roschanack, Margaret, Pauline, mes visites à Nantes ont été plus que revigorantes et ce grâce à vous !! Présentes quoiqu'il arrive et pour cela merci beaucoup ! Merci à ma petite réunionnaise, Sandrine, pour son amitié, et tous ces supers moments La Rochelle, Rennes, Faro, Montpellier, il nous manque plus que Grenoble ! Merci à ma petite Laura, également pour son amitié et pour sa présence à tous moments. Merci à Olivier, malgré la distance et notre phrase fétiche (faudra qu'on s'appelle), toujours présent à n'importe quelle période. Merci à Shirley pour ces petits moments de fou rire. Merci à Nadia qui a toujours une petite pensée pour moi dès qu'elle vient sur le synchrotron, bon courage pour la suite de ta thèse. Merci à Céline également des petits moments au laboratoire et hors laboratoire bien sympathiques. Et merci à Ratiba, Cécile (DFA), Christelle, Mélanie, Sam, Magalie, Sandra,

Mathilde pour le partage d'une même passion, pour ces moments d'expression par la danse et surtout pour tous les fous rires !!! Idem pour les volleyeurs, merci Xavier, Alex and co...!!!

- ✓ Rodrigue pour sa présence, son écoute, ses conseils, son aide et à sa famille au Gabon pour m'avoir rappelé au cours de ma thèse les choses essentielles de la vie.

- ✓ mon père et ma mère pour leur présence constante tout au long de ma thèse; à mes grands-parents paternels pour leur soutien inestimable et leur confiance indéfectible envers moi. Un remerciement profond pour mon beau-père, la personne la plus courageuse que je connaisse et qui est un exemple de ténacité dans la vie. A ma belle-mère pour sa générosité vis-à-vis de moi et à mes sœurs Valérie, Ophélie, Marion et Romane pour leur proximité et le grand amour qu'elles ont fait preuve dans les moments difficiles. Merci à mon frère, pour ses sages conseils et pour m'avoir aidé à relativiser de nombreuses choses. Enfin, merci à ma tante et marraine, Natacha, grâce à qui j'ai pu arriver ici.

- ✓ aux scientifiques de l'IBS avec qui j'ai échangé quotidiennement un bonjour. *Rien de tel pour commencer une bonne journée notamment avec nos voisins RMNistes du premier étage.*

Je termine cette page à cœur ouvert en remerciant tous ceux qui ont pu participer de près ou de loin à l'aboutissement de ma thèse et que j'ai certainement oubliés.

« Une page se ferme et une autre s'ouvre... »

RESUME EN FRANCAIS

Sous l'effet du stress oxydant, la production des espèces réactives de l'oxygène (ERO) est accrue. Les ERO peuvent réagir avec différentes molécules biologiques dont les acides gras polyinsaturés libres ou provenant des lipides membranaires engendrant la formation d'hydroperoxydes d'acides gras. Dans le chloroplaste, ces molécules sont sujettes à de nombreuses modifications enzymatiques ou chimiques aboutissant à la formation d'oxylipines. Les oxylipines participent à la signalisation cellulaire (précurseurs de la voie du jasmonate par exemple), à la défense de la plante (activité antimicrobienne par exemple). Certaines de ces molécules très réactives et toxiques doivent être métabolisées en des produits moins réactifs par des réactions d'oxydoréduction par exemple.

La ceQORH (chloroplast envelope **Q**uinine **O**xydo**R**eductase **H**omolog) et IEP32 (**I**nnner **E**nvelope **P**rotein **32**) d'*Arabidopsis thaliana* sont des oxydoréductases chloroplastiques impliquées dans la détoxification de la plante. Elles sont transportées au travers de l'enveloppe du chloroplaste sans clivage de leur peptide de transit par une voie d'import alternative à la voie TOC/TIC (**T**ranslocon of the **O**uter **C**hloroplast membrane et **T**ranslocon of the **I**nnner **C**hloroplast membrane). Ces particularités ont fait de la ceQORH et d'IEP32 des enzymes intéressantes à étudier.

IEP32 a été purifiée et cristallisée. Les structures de la ceQORH sous forme apo, liée au NADPH et liée au NADP⁺ et à des inhibiteurs ont été déterminées en utilisant la cristallographie aux rayons X. Leur analyse a permis de mettre en évidence que la ceQORH existe sous différents états oligomériques dans les conditions expérimentales utilisées. Ces observations ont été confirmées par des expériences d'ultracentrifugation analytique. La ceQORH est une enzyme monomérique qui lie le NADPH par l'intermédiaire du repliement de Rossmann. Le site catalytique, large et hydrophobe, permet à la ceQORH d'accommoder et de réduire un grand nombre de substrats dont le motif commun est la présence d'une fonction alcène en α , β d'un groupement carbonyle. Les constantes d'efficacité et d'affinité étant meilleures pour les γ -kétols que pour les quinones, nous proposons que la ceQORH soit renommée « γ -kétol réductase ».

Mots clefs : chloroplaste – Déshydrogénase/réductase à chaîne moyenne – γ -kétol réductase – oxylipines – oligomérisation – inhibition – cristallographie aux rayons X – ultracentrifugation analytique

RESUME EN ANGLAIS

Under the influence of the oxidative stress, the production of the Reactive Oxygen Species (ROS) is increased. These compounds can react with various biological molecules like free polyunsaturated fatty acids or lipids producing hydroperoxides of fatty acids. In chloroplast, these molecules are subject to numerous enzymatic or chemical modifications resulting in oxylipins. Oxylipins participate in cell signaling (precursors of the way of the jasmonate for example), or in the defense of the plant (antimicrobial activity). However some of them are very reactive and toxic so they are metabolized in less reactive molecules by oxidoreduction reactions.

The ceQORH (chloroplast envelope Quinone OxydoReductase Homolog) and IEP32 (Inner Envelope Protein 32) of *Arabidopsis thaliana* are chloroplast oxidoreductases involved in the plant detoxification. They are transported through the envelope of the chloroplast without cleavage of their transit peptide by an alternative import pathway of TOC/TIC (Translocon of the Outer Chloroplast membrane and Translocon of the Inner Chloroplast membrane). In order to better understand their roles, we studied their enzymatic properties and structures.

IEP32 was purified and crystallized. The structures apo-ceQORH and bound to the NADPH/NADP⁺ with inhibitors were determined using X-ray crystallography. The analysis allowed us to show that ceQORH exists under different oligomerization states what was confirmed by results of analytical ultracentrifugation. The NADPH binding to the Rossmann fold induces the monomerization. The catalytic site is large and hydrophobic allowing to ceQORH to reduce many α , β -unsaturated carbonyls of various chain lengths. CeQORH was shown to reduce with high efficiency the reactive double bond of γ -ketols that's why we propose to rename ceQORH by " γ - ketol reductase".

Keywords: chloroplast – Medium chain dehydrogenase/reductase – γ -ketol reductase – oxylipins – oligomerization state – inhibition – X-ray crystallography – analytical ultracentrifugation

SOMMAIRE

Liste des figures	14
Liste des tableaux	18
Liste des abréviations	19
Avant-propos.....	23

INTRODUCTION GENERALE

Partie I. Le chloroplaste	26
1 Origine endosymbiotique du chloroplaste	26
2 Rôle du chloroplaste	27
3 Enveloppe du chloroplaste	28
Partie II. Import des protéines chloroplastiques	30
1 Peptide de transit	31
2 Protéines chloroplastiques synthétisées dans le cytosol	32
3 Import par le complexe TOC	34
4 Import : étape dans l'espace intermembranaire	36
5 Import par le complexe TIC	37
6 Imports alternatifs au système TOC/TIC décrit.....	39
Partie III. Stress oxydant et ERO	42
1 Le stress oxydant.....	42
2 Les espèces réactives de l'oxygène nocives pour la plante	44
3 Les molécules antioxydantes.....	45
Partie IV. Les oxylipines	48
1 Production des oxylipines	48
2 Classification des oxylipines	51
3 Les oxylipines : signalisation et rôles.....	54
4 Défenses contre les oxylipines toxiques.....	54

MATERIEL ET METHODES

Partie I. BIOLOGIE MOLECULAIRE	59
1 Les gènes d'intérêt	59
2 Extraction d'un ADN plasmidique.....	59
3 Mutagenèse dirigée : mutants de la ceQORH	60
4 Insertion d'une étiquette poly-histidine et d'un site de clivage à la TEV sur IEP32.....	62

Partie II. BIOCHIMIE.....	64
1 Production des protéines d'intérêt.....	64
2 Purifications des protéines d'intérêt.....	67
3 Enzymologie : tests d'activité de la ceQORH, d'IEP32 et d'IEP32HT.....	70
4 Western blot d'IEP32 et d'IEP32HT.....	71
5 Séquençage <i>N</i> -terminal d'IEP32.....	72
6 Gel natif pour l'étude du complexe ceQORH-CaM.....	72
7 Chromatographie d'exclusion moléculaire analytique du complexe ceQORH-CaM.....	74
Partie III. ETUDES BIOPHYSIQUES.....	75
1 Etude de l'état oligomérique de la ceQORH par ultracentrifugation analytique (AUC).....	75
2 Etude de l'interaction ceQORH-CaM par résonance plasmonique de surface (SPR).....	77
3 Etude de la stabilité de la ceQORH et de la ceQORHR58A par thermofluorescence (TSA).....	81
4 Etude de l'état d'oxydation du cofacteur dans les cristaux de ceQORH par cryobench.....	84
5 Cristallogénèse des protéines d'intérêt.....	85
6 La cristallographie aux rayons X.....	90
7 Diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS).....	97
Partie IV. ETUDES BIO-INFORMATIQUES.....	103
1 Caractérisation des protéines d'interêt.....	103
2 Caractérisation et analyse d'une structure tridimensionnelle d'une protéine.....	103
3 Docking sur la ceQORH.....	104

RESULTATS ET DISCUSSIONS

ceQORH

Partie I. La ceQORH, une quinone oxydoréductase.....	108
1 La superfamille des déshydrogénases/réductases à chaîne moyenne.....	108
2 La famille des quinones oxydoréductases.....	109
3 Caractéristiques structurales des quinones oxydoréductases.....	110
4 Première structure de la ceQORH.....	114
Partie II. Résultats préliminaires: la ceQORH est une γ-kétol réductase NADPH dépendante. 115	115
1 Identification des substrats biologiques de la ceQORH.....	115
2 Identification des inhibiteurs de la ceQORH.....	121
3 Discussions et conclusions sur les molécules substrats et inhibitrices.....	123
Partie III. Etude de la ceQORH apo et de la ceQORH-NADPH.....	126
1 Etude de la ceQORH apo et de la ceQORH-NADPH en solution.....	126
2 Structures tridimensionnelles de la ceQORH apo et de la ceQORHR58A-NADP ⁺	136
3 Conclusion sur les études menées sur la ceQORH apo et en présence du cofacteur.....	155

Partie IV. Etude de la ceQORH en présence d'inhibiteur.....	156
1 Etude de l'état oligomérique de la ceQORH inhibée en AUC	156
2 Inhibition par l'oligomérisation : changements structuraux ?	160
3 Comparaison avec les structures de la PDB	178
4 Rôles essentiels de l'Arg58 et de la Tyr14	179
5 Conclusion sur l'étude de la ceQORH en présence d'inhibiteur	181
Partie V. Etudes préliminaires du site catalytique de la ceQORH	183
1 Cristallisation de la ceQORH-NADP ⁺ -substrat.....	183
2 Docking des oxylipines de plante sur la ceQORH	185
3 Conclusion sur les études préliminaires du site catalytique de la ceQORH	190

ceQORH-CaM

Partie I. Présentation de la calmoduline.....	193
1 Généralités sur la calmoduline	193
2 Localisation de la calmoduline.....	193
3 Calmoduline : un senseur de calcium	194
4 Activité de la calmoduline	194
5 Description structurale des calmodulines	196
6 Interaction entre la calmoduline et ses partenaires protéiques.....	198
Partie II. Etude de l'interaction entre la ceQORH et la calmoduline.....	201
1 Prédiction des sites de fixation de la CaM sur la ceQORH	201
2 Etude de la stœchiométrie du complexe ceQORH-CaM par SEC.....	203
3 Etude de la stœchiométrie du complexe ceQORH-CaM par SPR.....	205
4 Un ou des complexes ceQORH-CaM : étude par gels non-dénaturants	207
5 Etude du complexe ceQORH-CaM par la technique du SAXS.....	207
6 Cristallogénèse du complexe ceQORH-CaM.....	209
7 Analyses <i>in silico</i> du complexe ceQORH-CaM.....	210
Partie III. Conclusion sur l'interaction ceQORH-calmoduline	214

IEP32

Partie I. Présentation d'IEP32	216
1 Découverte d'IEP32 au sein du chloroplaste.....	216
2 Présentation de la superfamille des déshydrogénases/réductases à chaîne courte	217
3 IEP32 est une SDR.....	219
4 Rôles d'IEP32 au sein du chloroplaste	220

Partie II. Etude d'IEP32	221
1 Production et purification d'IEP32	221
2 Cristallogenèse d'IEP32	222
Partie III. Etude d'IEP32HT	226
1 Insertion d'une étiquette poly-histidine en <i>N</i> -terminal d'IEP32 : IEP32HT	226
2 Expression et purification d'IEP32HT dans différentes souches d' <i>E. coli</i>	226
3 Purification d'IEP32HT	226
4 Caractérisation du contaminant présent lors des purifications d'IEP32 et IEP32HT	228
5 Cristallogenèse d'IEP32HT et IEP32HT-NADPH	230
Partie IV. Conclusions et perspectives sur l'étude d'IEP32	234

CONCLUSION GENERALE

Conclusion générale	236
PUBLICATIONS	238
ANNEXES	267
REFERENCES	275

LISTE DES FIGURES

Figure n° 1. L'endosymbiose : origine du chloroplaste	27
Figure n° 2. Système endomembranaire et organites clos.....	28
Figure n° 3. L'enveloppe du chloroplaste.....	29
Figure n° 4. Peptide de transit et localisation des protéines chloroplastiques	30
Figure n° 5. Caractéristiques physico-chimiques du peptide de transit	32
Figure n° 6. Système d'import des protéines dans le chloroplaste	33
Figure n° 7. Modèle de la structure du récepteur Toc75	36
Figure n° 8. Localisation de la ceQORH.....	40
Figure n° 9. Caractérisation du peptide de transit de la ceQORH.....	41
Figure n° 10. Que deviennent les ERO ?	43
Figure n° 11. Réaction de Fenton et de Haber-Weiss.	44
Figure n° 12. Conséquences du stress oxydant sur l'ADN et sur les sucres	45
Figure n° 13. Voies de production des oxylipines.....	49
Figure n° 14. Oxylipines obtenues par voie non-enzymatique.....	50
Figure n° 15. Les carbonyles réactifs.....	51
Figure n° 16. Réactions des RC avec les molécules biologiques	52
Figure n° 17. Défense par les métabolites de la peroxydation lipidique	53
Figure n° 18. Enzymes de détoxification agissant sur les RC	55
Figure n° 19. Rôles des AKR de plante.....	56
Figure n° 20. Superfamilles d'enzymes réduisant les RC.	57
Figure n° 21. Présentation schématique du fonctionnement d'une ultracentrifugeuse analytique.....	76
Figure n° 22. Principe de la SPR.....	78
Figure n° 23. Les différentes étapes lors d'une expérience de SPR.	80
Figure n° 24. Spectre d'excitation et d'émission du SYPRO orange®	82
Figure n° 25. Principe de la thermofluorescence.....	83
Figure n° 26. Le cryobench.....	84
Figure n° 27. Diagramme de phases.....	86
Figure n° 28. Cristallisation par la diffusion de vapeur.....	89
Figure n° 29. Principe de la diffraction.....	92
Figure n° 30. Principe du SAXS.....	98
Figure n° 31. Superposition des structures de GroES d' <i>E. coli</i> et de la QOR d' <i>E. coli</i>	110
Figure n° 32. Interface entre les deux monomères de la QOR d' <i>E. coli</i>	111
Figure n° 33. Comparaison entre les structures PtoQOR et PtoQOR-NADPH.....	112
Figure n° 34. Comparaison des sillons des QOR après la fixation du NADPH.....	112
Figure n° 35. Mécanisme structural de la PtoQOR.....	113
Figure n° 36. Structure de la ceQORH-13KOT	114
Figure n° 37. Structure chimique de la <i>trans</i> 1,3-bisphényl-2-propénone (chalcone).....	115
Figure n° 38. Détermination de la fonction réduite de la chalcone par la ceQORH.....	116

Figure n° 39. Motif ciblé par la ceQORH.	116
Figure n° 40. Molécules substrats de la ceQORH (les 9,12 γ -kétols).....	121
Figure n° 41. Inhibition de la ceQORH par le C18 :1.	122
Figure n° 42. Substrats et inhibiteurs de la ceQORH dans la voie catabolique des acides gras.	124
Figure n° 43. Gel SDS-PAGE après l'étape de la DEAE-Sepharose®.	126
Figure n° 44. Chromatogramme issu de la S-Sepharose®.	127
Figure n° 45. Chromatogramme et gel SDS-PAGE de la S200 (complexe).	128
Figure n° 46. Chromatogramme de la S200 (apo).....	129
Figure n° 47. Courbe d'AUC de la ceQORH apo	130
Figure n° 48. Courbe d'AUC de la ceQORH-NADPH.	132
Figure n° 49. Courbes obtenues par SAXS	133
Figure n° 50. Traitement automatique des données de SAXS de la ceQORH-NADPH	134
Figure n° 51. Kratky plot des données de la ceQORH-NADPH.....	135
Figure n° 52. Cristaux de la ceQORH apo	136
Figure n° 53. Structure de la ceQORH apo.	138
Figure n° 54. Structures secondaires de la ceQORH apo.	139
Figure n° 55. Interactions entre les deux monomères de la ceQORH.	140
Figure n° 56. Superposition des monomères de la ceQORH et de la FaEO-NADP ⁺	143
Figure n° 57. Superposition des monomères de la ceQORH et de la QOR de <i>Coxiella burnetii</i>	144
Figure n° 58. Interface du dimère de la QOR d' <i>E. coli</i>	145
Figure n° 59. Comparaison de la structure de la ceQORH avec celle de l' <i>AtAER</i>	146
Figure n° 60. Cristaux de la ceQORHR58A-NADPH à 20°C et à 4°C.....	147
Figure n° 61. Densité électronique du NADPH dans la structure de la ceQORHR58A-NADPH.....	149
Figure n° 62. Courbe représentant l'absorbance d'un cristal de la ceQORHR58A cocrystallisée avec le NADPH ..	
150	
Figure n° 63. Structure du complexe ceQORHR58A-NADP ⁺	151
Figure n° 64. Potentiel électrostatique de la structure de la ceQORHR58A-NADP ⁺	152
Figure n° 65. Superposition du dimère de la ceQORH apo (bleu) et de la ceQORHR58A-NADP ⁺ (jaune).....	153
Figure n° 66. Comparaison entre la forme apo et celle liée au NADP ⁺	154
Figure n° 67. Courbe d'AUC de la ceQORH-13KOT	157
Figure n° 68. Courbe d'AUC de la ceQORH-NADP ⁺ -13KOT	158
Figure n° 69. Structures chimiques du 13KOD et du 13KOT.	161
Figure n° 70. Cristaux et cliché de diffraction du complexe QorNKt.	162
Figure n° 71. Cristaux du complexe QorNKd.	163
Figure n° 72. Clichés de diffraction des cristaux de la QorNKd.	163
Figure n° 73. Structures du complexe QorNKt	166
Figure n° 74. Le 13KOT empêche la dimérisation initiale	167
Figure n° 75. Positions des molécules inhibitrices.	168
Figure n° 76. Superposition de l'hélice α 8 de la QorNKt et de la QorNKd.....	169
Figure n° 77. Interactions entre le cofacteur et la ceQORH dans QorNKt(d).	170

Figure n° 78. Interactions du 13KOT avec la ceQORH	171
Figure n° 79. Densité électronique du 13KOD..	172
Figure n° 80. Interaction du 13KOD avec l'ensemble de la protéine	173
Figure n° 81. Superposition des structures QorNKt et ceQORH-13KOT.	174
Figure n° 82. Superposition de la ceQORH apo et de QorNKt	175
Figure n° 83. Site catalytique de la ceQORH apo et de la QorNKt.	176
Figure n° 84. Stabilisation du 13KOD dans un monomère.	177
Figure n° 85. Superposition de l'ensemble des structures de la ceQORH	177
Figure n° 86. Position du 13KOT dans le tétramère	180
Figure n° 87. Cristaux de la ceQORH avec un des substrats (γ kétole en C18:3).....	183
Figure n° 88. Carte de densité électronique pour un cristal composé de NADP ⁺ + γ -kétole dérivé de C18:3 + acide gras C18:1.....	184
Figure n° 89. Docking de la chalcone sur la ceQORH.....	185
Figure n° 90. Résidus localisés dans le site de fixation de la chalcone.....	186
Figure n° 91. Docking du γ -kétole dérivé du C18 :1 sur la ceQORH.....	187
Figure n° 92. Résidus impliqués dans la fixation du γ -kétole dérivé du C18:1	188
Figure n° 93. Conformation du NADPH.....	191
Figure n° 94. Motif de la main-EF.	196
Figure n° 95. Changement de conformation de la CaM.....	197
Figure n° 96. Conformation S ou C de la CaM.	198
Figure n° 97. Affinité CaM1-ceQORH.....	199
Figure n° 98. Identification de la séquence d'IEP32 ciblée par la CaM.....	200
Figure n° 99. Prédiction de la séquence favorisant la fixation de la CaM sur la ceQORH.	202
Figure n° 100. Sites de fixation de la CaM sur la structure de la ceQORH.	203
Figure n° 101. Interaction ceQORH-CaM avec ou sans NADPH étudiée par SPR.	205
Figure n° 102. Interaction entre la CaM et la ceQORHR58A avec ou sans NADPH par SPR	206
Figure n° 103. Gels non-dénaturants du complexe ceQORH-CaM	207
Figure n° 104. Docking de la CaM6 sur la ceQORH.....	211
Figure n° 105. Comparaison entre la CaM6 et la CaM7	212
Figure n° 106. Modèles 1 et 3 du docking de la ceQORH sur la CaM7.	213
Figure n° 107. Micrographes de graines (IEP32 sauvage ou un mutant)	216
Figure n° 108. Localisation d'IEP32 au sein du chloroplaste.	217
Figure n° 109. Chromatogramme et gels SDS-PAGE de la S-Sepharose [®] et de la S200.....	222
Figure n° 110. Cristallisation d'IEP32 apo ou en complexe.....	223
Figure n° 111. Cristaux d'IEP32-NADPH.....	224
Figure n° 112. Cliché de diffraction d'un cristal d'IEP32-NADPH.....	225
Figure n° 113. Tests d'expression et de solubilité d'IEP32HT.	226
Figure n° 114. Chromatogramme de la colonne de nickel d'IEP32HT.....	227
Figure n° 115. Chromatogrammes et gels SDS-PAGE de la purification d'IEP32HT.	228
Figure n° 116. Western blot anti-IEP32.....	229

Figure n° 117. Western blot anti-histidine.....	229
Figure n° 118. Cristaux d'IEP32HT-NADPH.....	232
Figure n° 119. Cliché de diffraction d'IEP32HT-NADPH.....	233
Figure n° 120. Complexe TIC dans les conditions oxydantes.....	268
Figure n° 121. Alignement de séquences de protéines de la famille MDR1	274

LISTE DES TABLEAUX

Tableau n° 1. Molécules antioxydantes luttant contre les ERO	46
Tableau n° 2. Caractéristiques des amorces pour la mutagenèse dirigée de la ceQORH.....	60
Tableau n° 3. Mélange PCR pour les mutants de la ceQORH.....	61
Tableau n° 4. Cycles PCR appliqués afin d’obtenir les mutants de la ceQORH	61
Tableau n° 5. Cycles PCR pour l’amplification du gène d’ IEP32HT.....	63
Tableau n° 6. Concentrations des échantillons des complexes CaM-ceQORH déposés sur un gel natif.....	73
Tableau n° 7. Composition des échantillons d’AUC.....	77
Tableau n° 8. Les différentes sous-familles des QOR chez <i>Arabidopsis thaliana</i>	109
Tableau n° 9. Aldéhydes substrats de la ceQORH.....	117
Tableau n° 10. Cétones substrats de la ceQORH.....	118
Tableau n° 11. Kétols substrats de la ceQORH.....	120
Tableau n° 12. Quelques molécules inhibitrices de la ceQORH	122
Tableau n° 13. Coefficients de sédimentation théoriques en fonction du nombre de molécules de ceQORH..	130
Tableau n° 14. Coefficients de sédimentation maximum en fonction de la concentration de ceQORH.....	131
Tableau n° 15. Coefficients de sédimentation moyens en fonction de la concentration de la ceQORH-NADPH..	132
Tableau n° 16. Jeu de données de la ceQORH apo.....	137
Tableau n° 17. Résidus localisés à l’interface monomère-monomère du dimère de la ceQORH apo.....	141
Tableau n° 18. Protéines dont la structure du monomère est proche de celle de la ceQORH apo.....	142
Tableau n° 19. Jeux de données de la ceQORHR58A-NADPH.....	148
Tableau n° 20. Caractéristiques des interfaces des monomères de la structure ceQORHR58A-NADPH.....	151
Tableau n° 21. Coefficients de sédimentation moyens en fonction de la concentration de ceQORH-13KOT..	156
Tableau n° 22. Coefficients de sédimentation en fonction de la concentration de ceQORH-NADP ⁺ -13KOT..	159
Tableau n° 23. Comparaison des valeurs des coefficients de sédimentation (S) de la ceQORH apo et en complexe	160
Tableau n° 24. Jeux de données de QorNKt et QorNKd.....	165
Tableau n° 25. Protéines dont la structure tridimensionnelle du monomère est proche de celle de la QorNKt.....	178
Tableau n° 26. Les différents types de SDR.....	219
Tableau n° 27. La famille SDR7C chez <i>Arabidopsis thaliana</i>	220

LISTE DES ABREVIATIONS

Les abréviations ci-dessous sont présentées en français et en anglais. Certaines abréviations anglaises ne sont que très rarement traduites en français.

ABA	Acide abscissique
ACR	Acyl-CoA réductases
ADH	Alcool déshydrogénase
ADN	Acide désoxyribonucléique
AER	Alkenal/one réductase
<i>AtAER</i>	Alkenal/one réductase d' <i>Arabidopsis thaliana</i>
AKR	Aldo-keto reductase
ALDH	Aldéhydes déshydrogénases
ALR	Aldéhydes réductases
AOR	Alkenone oxydoréductase
<i>AtAOR</i>	Alkenone oxydoréductase d' <i>Arabidopsis thaliana</i>
<i>ARC6</i>	Accumulation and Replication of Chloroplasts 6
ARN	Acide ribonucléique
ASC	Ascorbate
<i>AtAER</i>	Alkenal/one reductase d' <i>Arabidopsis thaliana</i>
<i>AtAOR</i>	Alkenone oxydoreductase d' <i>Arabidopsis thaliana</i>
ATP	Adénosine-5'-triphosphate
AUC	Ultracentrifugation analytique
CAD	Cinnamyl alcool déshydrogénase
CaM	CalModuline
CBR	Carbonyl binding reductase
ceQORH	chloroplast envelope Quinone OxidoReductase Homolog
CSS	Complex significance score
CV	Volume de colonne
DAB	Diaminobenzidine
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DO	Densité optique
ECL	Enhanced chemiluminescence
ERE	Espèces réactives électrophiles
ERO	Espèces réactives de l'oxygène
FaEO	Enone oxydoréductase de <i>Fragaria x ananassa</i>
FNR	Ferrédoxine NADP réductase
FPLC	Fast protein liquid chromatography
GFP	Green fluorescent protein
GSH	Glutathion
GTP	Guanosine triphosphate
HOD/T	Acide 2-hydroxyoctadécadi(tri)énoïque
HPOD/T	Acide 2-hydroperoxyoctadécadi(tri)énoïque
HTS	High-throughput screening

IEP32	Inner Envelope Protein 32
IPTG	Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
LOX	Lipoxygénase
<i>MtbQOR</i>	Quinone oxydoréductase de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
MDRED	Medium-Chain dehydrogenase/reductase engineering database
MDR	Medium chain dehydrogenase/reductase
MPD	2-methyl-2,4-pentanediol
MRF	Protéines de réponses mitochondriales
NADP/NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (oxydé / réduit)
PCR	Réaction en chaîne par polymérase (polymerase chain reaction)
PDB	Protein data bank
PEG	Polyéthylène glycol
PHD	Polydéshydrogénase
POTRA	Polypeptide transport associated
PRAT	Putative preprotein amino acid transporters
<i>PtoQOR</i>	Quinone oxydoréductase de <i>Pseudomonas syringae pv tomato</i>
QOR	Quinone oxydoréductase
QorNKd	ceQORH-NADPH-13KOD
QorNKt	ceQORH-NADP ⁺ -13KOT
RC	Carbonyles réactifs
RDH	Rétinol déshydrogénase
RES	Reactives electrophiles species
RMN	Résonance magnétique nucléaire
rmsd	Root mean square deviation
ROS	Reactive oxygen species
SAD	Single-wavelength anomalous dispersion
SAXS	Small angle X-ray scattering
SDR	Short chain dehydrogenase/reductase
SEC	Size exclusion chromatography
SIR	Single isomorphous replacement
SIRAS	Single isomorphous replacement with Anomalous Scattering
SOD	Superoxyde dismutase
SPP	Stroma processing peptidase
SPR	Surface plasmon resonance
TEV	Tabaco etch virus protease
TIC	Translocon at the Inner membrane of Chloroplast
T _m	Temperature de fusion
TOC	Translocon at the Outer membrane of Chloroplast
TPR	Tetratricopeptide repeats
TSA	Thermal shift assay
YADH	Alcool déshydrogénase tétramérique de levures
α -kétol	Acide 13-hydroxy-12-oxo-9(E)-octadécénoïque
10-keto-9,13-diol	Acide 9,13-dihydroxy-10-oxo-11(E)-octadécénoïque
12-Oxo-PDA	Acide 12-oxo-10,15(Z)-phytodiénoïque

13KOD	Acide 13-oxo-9,11-octadécadiénoïque
13KOT	Acide 13-oxo-9,11,15-octadécatriénoïque
9,12 γ -kéto1 18:1	Acide 9-hydroxy-12-oxo-10(E)-octadécénoïque
9,12 γ -kéto1 18:2	Acide 9-hydroxy-12-oxo-10(E)-15(E)-octadécénoïque

AVANT-PROPOS

Les travaux présentés dans ce manuscrit portent sur l'étude de deux protéines chloroplastiques : la ceQORH et IEP32. Cette étude globale est axée sur trois aspects du sujet : (i) leurs caractéristiques biologiques, (ii) leurs rôles et (iii) leur interaction avec un partenaire protéique : la calmoduline (CaM) (seulement pour la ceQORH). Chacune de ces parties permet de caractériser ces protéines.

(i) Le génome chloroplastique code pour une partie des protéines chloroplastiques, et le génome nucléaire code pour l'autre partie des protéines chloroplastiques. Cela implique d'instaurer un mécanisme d'import des protéines au travers des membranes du chloroplaste. Le principal système d'import connu se nomme TOC/TIC. Il existe alors un mécanisme de reconnaissance dans le cytosol de la pré-protéine impliquant un peptide de transit clivable. Ces enzymes appartenant aux superfamilles des déshydrogénases/réductases à chaîne moyenne (MDR) et des déshydrogénases/réductases à chaîne courte (SDR) ont des particularités biologiques peu communes. En effet, le transport de ces protéines dans le chloroplaste se fait par l'intermédiaire d'une voie inconnue différente de TOC/TIC, à cela s'ajoute la présence d'un peptide de transit non clivable.

(ii) Au-delà de leurs propres caractéristiques, ces enzymes ont un rôle au sein du chloroplaste. Les cellules végétales subissent continuellement des stress biotiques ou abiotiques. L'ensemble de ces stress agissent sur le métabolisme de la plante. Une des conséquences est la production des espèces réactives de l'oxygène (ERO) et indirectement celle des métabolites secondaires (oxylipines) qui ont un impact sur la signalisation cellulaire et le mécanisme de défense. La défense de l'organisme s'organise par l'intermédiaire d'enzymes réalisant des réactions d'oxydoréduction ou par l'intermédiaire de petites molécules réductrices. Chacune ont un rôle différent, ou pour certaines, redondant, qui est régulé par des mécanismes différents, tels qu'une activation d'une enzyme grâce à une interaction protéine-protéine spécifique, ou un rétrocontrôle sur l'expression d'un gène... Les enzymes appartenant aux superfamilles des MDR, des SDR et des Aldo-Kéto Réductases (AKR) permettent de réduire la toxicité de nombreuses molécules dérivées de la peroxydation lipidique. Ces deux enzymes étudiées, la ceQORH et IEP32, seraient impliquées dans la détoxification de la plante à la suite du stress oxydant entre autres.

(iii) Certaines enzymes de détoxification sont régulées par une interaction avec une autre protéine. La ceQORH et IEP32 interagissent avec la CaM qui est une protéine fixant les ions Ca^{2+} . Cette interaction pourrait avoir un rôle sur l'activité des enzymes en réponse à un stress puisque l'interaction est souvent dépendante de la fixation du Ca^{2+} qui est le premier messager dans la signalisation cellulaire.

Afin de comprendre le fonctionnement complexe de ces deux enzymes, une approche structurale a été menée associée à une étude fonctionnelle réalisée par l'équipe du Dr Norbert ROLLAND au Laboratoire de Physiologie Cellulaire et Végétale au CEA de Grenoble, dont le Dr Gilles CURIEN, Cécile GIUSTINI, et Dr Elisa DELL'AGLIO. Ces études ont pour objectif de caractériser ces enzymes afin de pouvoir expliquer leurs particularités ainsi que leur rôle au sein du chloroplaste.

Dans l'introduction, les aspects généraux seront présentés pour une meilleure compréhension des études réalisées. Le premier point abordé sera une brève présentation de l'origine endosymbiotique du chloroplaste ainsi que son rôle au sein de la cellule. En seconde partie, l'import des protéines au sein du chloroplaste sera décrit. Dans une troisième partie, le stress oxydant sera présenté afin de comprendre son origine, de décrire ses constituants et les conséquences moléculaires sur le métabolisme du chloroplaste. Dans une quatrième partie, les métabolites secondaires issus des acides gras formés à la suite d'un stress oxydant nommés oxylipines seront présentés ainsi que les enzymes permettant de détoxifier la plante en réduisant certaines oxylipines nocives. Après une description du matériel et des méthodes utilisées, les résultats concernant la ceQORH seront présentés dans une première partie suivie des résultats sur le complexe ceQORH-CaM puis les résultats d'IEP32 seront présentés et discutés en troisième partie de ce manuscrit. Et pour finir une conclusion générale sur l'ensemble des résultats obtenus permettra de conclure.

INTRODUCTION

GENERALE

Partie I. Le chloroplaste

Ce travail a pour objet l'étude de protéines chloroplastiques, il est donc nécessaire de connaître l'organite et l'environnement dans lequel il se situe. C'est pourquoi, dans cette première partie, je tâcherai de présenter succinctement son origine, son rôle et sa capacité d'adaptation au cours de l'évolution.

1 Origine endosymbiotique du chloroplaste

En 1885, Schimper Andreas Franz Wilhelm est le premier à émettre l'hypothèse selon laquelle les chloroplastes pourraient être le résultat d'une symbiose opérée entre des micro-organismes et des cellules eucaryotes, il y a environ 1,5 milliards d'années ([commentaire de Palenik, 2002](#)). Puis en 1905, Mereschkowsky Sergueïevitch Constantin relève d'importantes similitudes entre les cyanobactéries et les chloroplastes (figure n°1). L'hypothèse de l'endosymbiose devient plausible lorsqu'en 1960, la présence d'ADN et de ribosomes a été mise en évidence dans les chloroplastes. Selon Dyall, plusieurs types de chloroplaste existeraient et chaque type de chloroplaste correspondrait à des cyanobactéries différentes ([pour revue Dyall et al., 2004](#)). Au cours de l'évolution, une grande partie du génome chloroplastique a été transférée dans le noyau. En effet, actuellement 95 % des protéines chloroplastiques sont codées par le génome nucléaire ([Martin et Herrmann et al., 1998](#) ; [Richly et Leister, 2004](#)). Par conséquent, le chloroplaste code pour seulement 5 % de ses protéines. Les éléments nécessaires à la transcription ou aux modifications post-traductionnelles des protéines sont synthétisés à partir du génome du noyau ([Rochaix et al., 1996](#) ; [Rodermeil et al., 2001](#) ; [Strand et al., 2003](#)). Cependant, le chloroplaste a conservé les fonctions biologiques telles que : le métabolisme de l'ADN, le métabolisme de l'ARN, la synthèse protéique, la photosynthèse... Pourquoi le chloroplaste a-t-il conservé seulement 5 % de son génome initial ? Il existe deux hypothèses pour expliquer ce fait ([Abdallah et al., 2000](#) ; [Allen et al., 2015](#)).

(i) Les protéines codées par ce dernier étant hydrophobes, leur translocation au travers de l'enveloppe du chloroplaste serait compliquée à mettre en place ou encore, pourrait s'avérer être trop énergivore pour la cellule.

(ii) Certains des gènes conservés au sein du chloroplaste seraient nécessaire à la réponse aux différents stress (biotiques, abiotiques...).

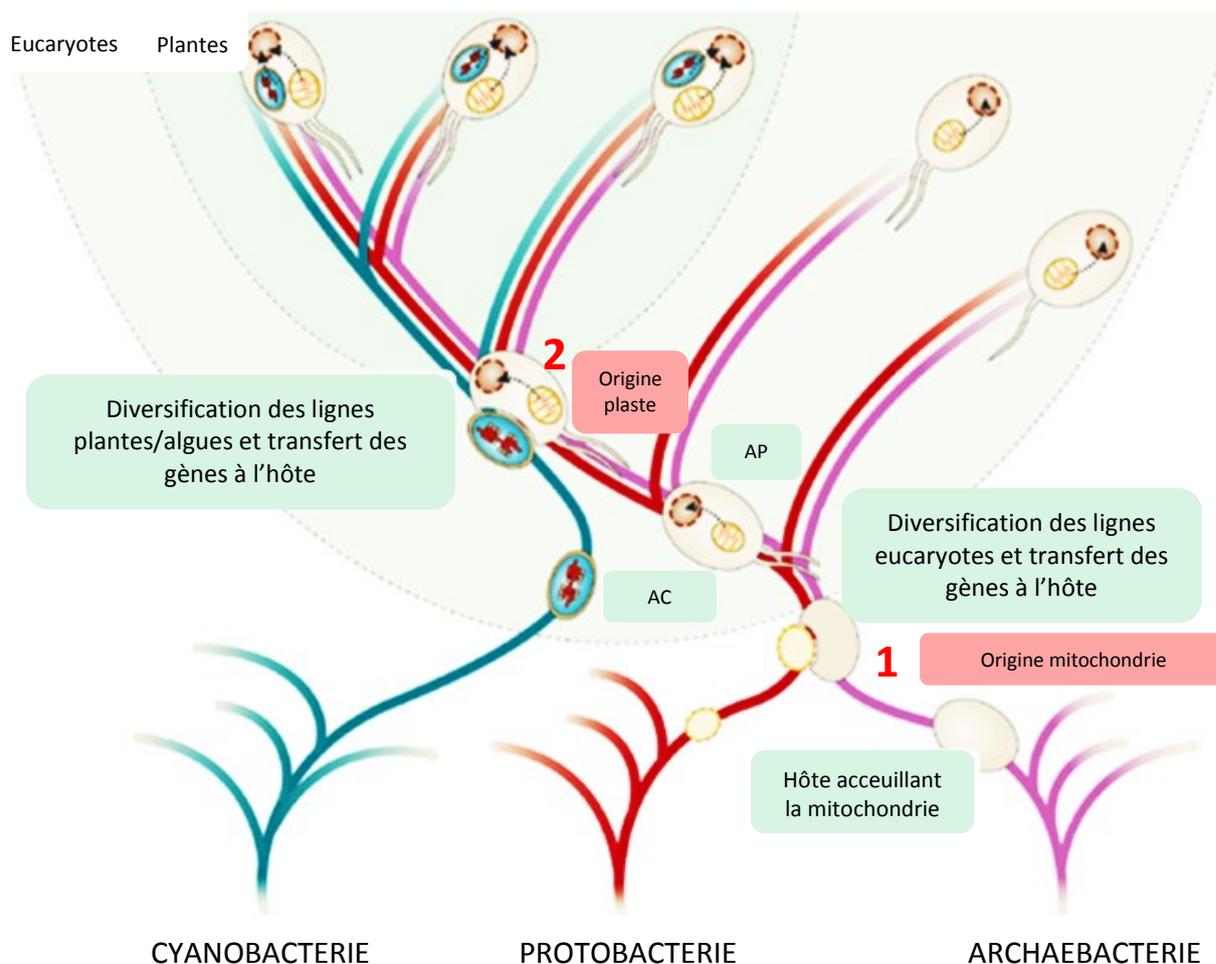


Figure n° 1. L'endosymbiose : origine du chloroplaste.

Une 1^{re} endosymbiose (1) entre les archéobactéries et les protobactéries a abouti à la formation des mitochondries. Une 2^{de} endosymbiose (2) entre les bactéries et les cyanobactéries a abouti à la formation des chloroplastes. AP : ancêtre des protozoaires, AC : ancêtre des cyanobactéries (Timmis *et al.*, 2004).

2 Rôle du chloroplaste

Les végétaux sont photoautotrophes, grâce à l'énergie lumineuse, ils permettent l'entrée du carbone dans la biosphère. Cela est possible grâce à la photosynthèse qui a lieu dans le chloroplaste. De nombreux autres mécanismes vitaux se déroulent dans le chloroplaste. C'est le cas du métabolisme des acides aminés, du métabolisme des lipides, de la synthèse d'amidon, de la synthèse des bases nucléotidiques, de la synthèse des vitamines et des groupements tétrapyrroliques ou de l'incorporation d'azote et de soufre dans la cellule végétale (Leister *et al.*, 2003).

3 Enveloppe du chloroplaste

La spécificité des cellules eucaryotes réside dans la compartimentation de la cellule. Les organites appartiennent soit à un système endomembranaire soit aux organites clos. Leur appartenance à un des systèmes est étroitement liée à leur origine. La différence essentielle concerne la membrane des organites. Le système endomembranaire représente un organite délimité par une simple membrane et de ce fait les organites réalisent des échanges plus facilement avec le reste de la cellule (figure n° 2) (Block *et al.*, 2007 ; Breuers *et al.*, 2011). Parmi eux, se trouvent le réticulum-endoplasmique, l'enveloppe nucléaire, l'appareil de Golgi, les lysosomes et les endosomes. Les organites clos (chloroplastes et mitochondries) possèdent une double membrane (figures n° 2 et 3).

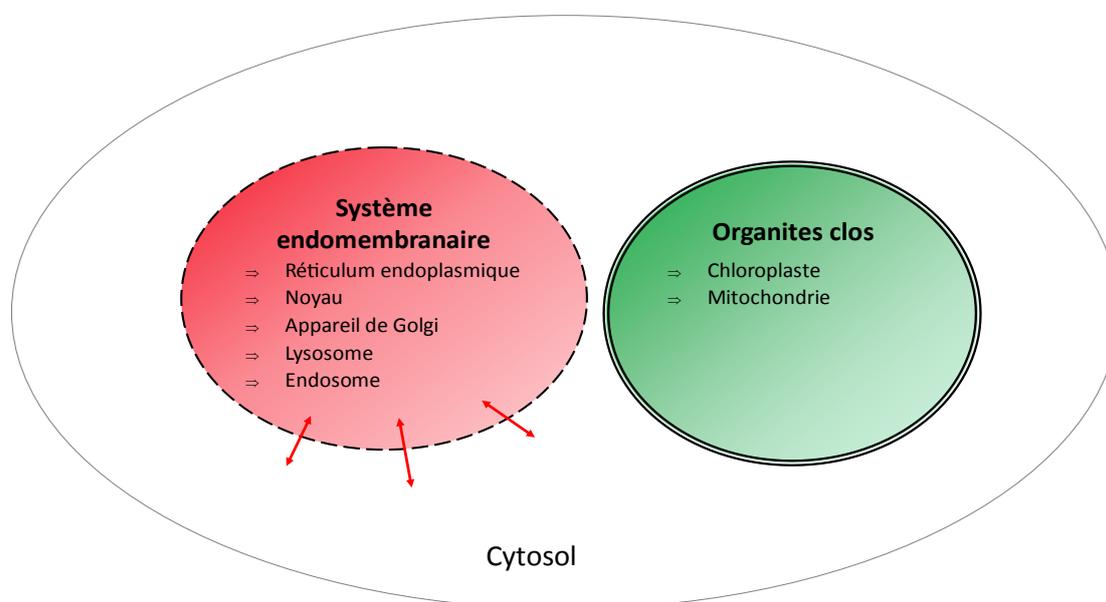


Figure n° 2. Système endomembranaire et organites clos.

Les organites du système endomembranaire à simple membrane sont représentés avec un contour en pointillé. Les organites clos possédant une double membrane sont représentés avec un contour en double trait. Les organites consommateurs d'énergie sont en rouge et les organites producteurs d'énergie sont en vert. Les doubles flèches symbolisent les échanges facilités entre l'organite et le cytosol.

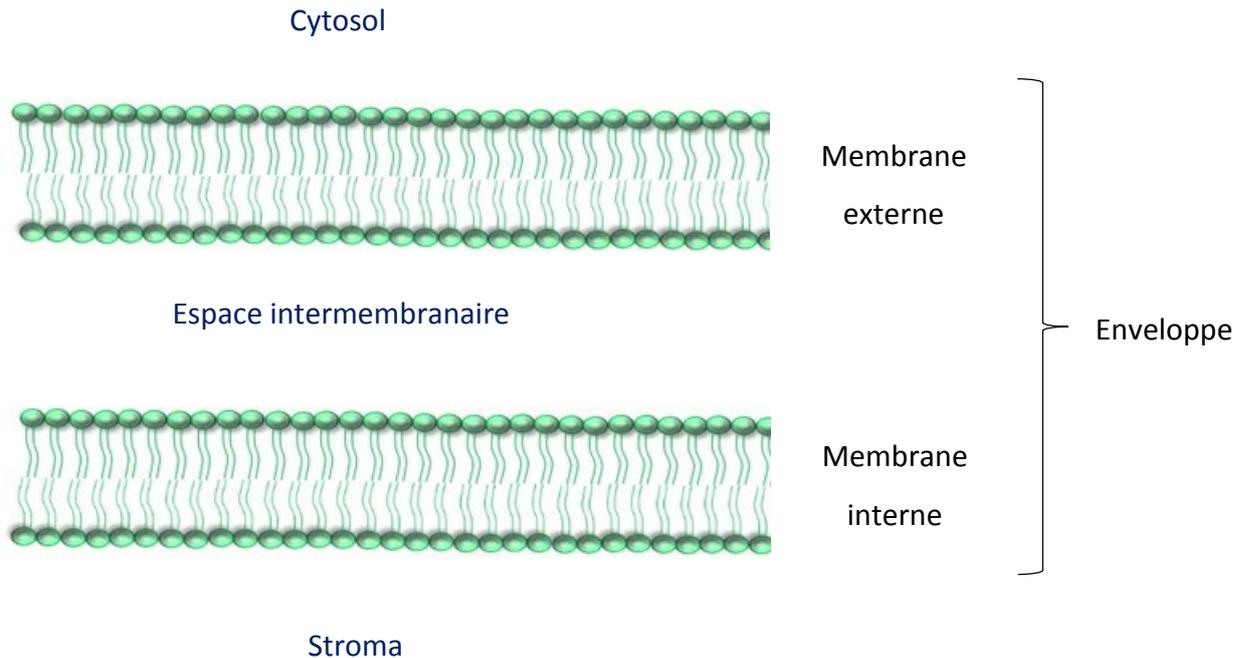


Figure n° 3. L'enveloppe du chloroplaste.

L'enveloppe du chloroplaste est constituée de deux membranes : la membrane externe séparant le cytosol de l'espace intermembranaire et la membrane interne séparant l'espace intermembranaire du stroma (intérieur du chloroplaste).

Les deux membranes du chloroplaste ont une composition différente (Douce *et al.*, 1990). La membrane externe du chloroplaste est constituée principalement de lipides polaires tels que le phosphatidylglycérol et le digalactosyldiacylglycérol alors que la membrane interne est composée majoritairement de monogalactosyldiacylglycérol et de digalactosyldiacylglycérol (Partelli *et al.*, 2011).

Partie II. Import des protéines chloroplastiques

Les protéines chloroplastiques dont le gène est nucléaire sont synthétisées dans le cytosol sous la forme de pré-protéines non-repliées et sont ensuite importées dans le chloroplaste (Keegstra *et al.*, 1989 ; Keegstra et Cline, 1999 ; Keegstra et Froehlich, 1999). En 1977, des études ont montré que l'adressage des pré-protéines à l'organite est possible grâce à une séquence d'adressage au chloroplaste appelée peptide de transit (Dobberstein *et al.*, 1977). Cependant toutes les protéines chloroplastiques ne possèdent pas nécessairement cette séquence. En effet, les protéines localisées dans la membrane externe de l'enveloppe du chloroplaste ne possèdent pas de peptide de transit clivable contrairement aux autres protéines chloroplastiques (Wu *et al.*, 1993 ; pour revue, Soll, 2002 ; Schleiff, 2003a ; Jarvis, 2008) (figure n° 4). Cependant il existe quelques exceptions à cette règle. Par exemple, Toc75, localisée dans la membrane externe de l'enveloppe du chloroplaste, est une exception. Elle est impliquée dans l'import des protéines chloroplastiques, et possède un peptide de transit bipartite (Tranel *et al.*, 1995, 1996 ; Muckel et Soll, 1996). Pour la localisation des protéines de la membrane externe de l'enveloppe du chloroplaste, d'autres éléments sont primordiaux comme le domaine G de Toc159 par exemple (Bauer *et al.*, 2002).

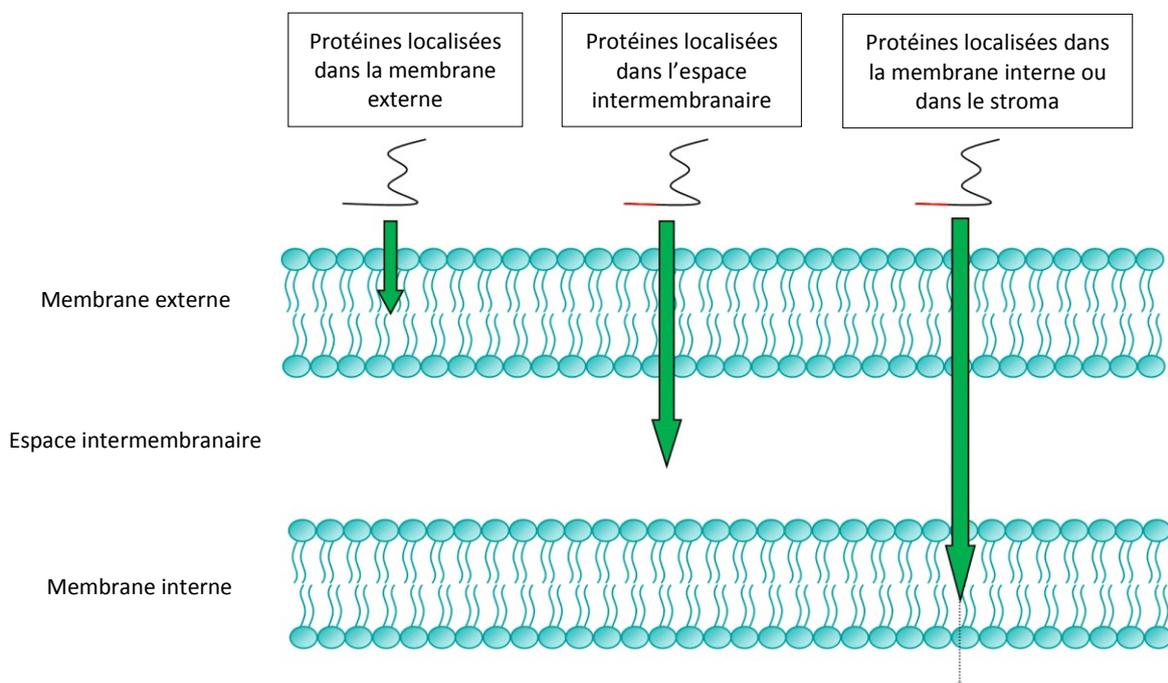


Figure n° 4. Peptide de transit et localisation des protéines chloroplastiques.

La pré-protéine non-repliée est représentée par un filament noir. Le peptide de transit clivable est représenté en rouge. Les flèches indiquent les différentes localisations des protéines chloroplastiques.

Par la suite, nous allons nous intéresser à l'import des protéines chloroplastiques possédant un peptide de transit (Perry *et al.*, 1991 ; Vojta *et al.*, 2004).

1 Peptide de transit

Le peptide de transit localisé sur les précurseurs est une séquence nécessaire et suffisante à la localisation des protéines chloroplastiques dans le chloroplaste (Douwe de Boer *et al.*, 1991 ; Chen et Schnell, 1999 ; Bauer *et al.*, 2001 ; Soll *et al.*, 2002). La séquence correspondant au peptide de transit est généralement localisée à l'extrémité *N*-terminale de la protéine.

1.1 Origine du peptide de transit

L'origine du peptide de transit n'a pas encore été clairement définie. La première hypothèse est que cette séquence correspondrait à des régions 5' non-codantes des gènes issus de l'endosymbiote qui auraient évolué afin d'adapter le mécanisme d'adressage. Les deux parties, codante et non-codante, auraient été transférées au génome du noyau (Rolland *et al.*, 1993). La seconde hypothèse est que cette séquence proviendrait de la recombinaison et de l'évolution de différentes séquences codantes du génome de la cyanobactérie. Ce serait une séquence à plusieurs exons (Quigley *et al.*, 1988 ; Martinez *et al.*, 1989 ; Gregerson *et al.*, 1994).

1.2 Composition du peptide de transit

Les peptides de transit clivables peuvent être composés de 13 à 146 résidus, la moyenne étant une cinquantaine d'acides aminés (Jarvis *et al.*, 2008).

Les séquences primaires des peptides de transit ont en commun la présence d'une alanine à la suite de la méthionine initiatrice (Karlin-Neumann et Tobin, 1986). Excepté cette similitude, les alignements de séquences des peptides de transit n'ont révélé aucun résidu conservé (Bruce *et al.*, 2001 ; Lee *et al.*, 2008). Cependant, les caractéristiques physico-chimiques des différents domaines du peptide de transit sont conservées (Karlin-Neumann *et al.*, 1986 ; Von Heijne *et al.*, 1990). La charge nette de la séquence totale du peptide de transit est positive (Heijne et Nishikawa, 1991). La partie *N*-terminale de la séquence d'adressage au chloroplaste est constituée principalement de résidus hydrophobes (Resink *et al.*, 1998). La partie centrale, quant à elle, est constituée d'acides aminés hydroxylés. Chez *Arabidopsis thaliana*, le résidu le plus abondant est la sérine. La partie *C*-terminale est composée de résidus chargés positivement et est suivie du site de clivage (figure n° 5).

La partie *N*-terminale du peptide de transit sert à initier l'import et la partie *C*-terminale sert au mécanisme d'import (Bhushan *et al.*, 2006 ; Bruch *et al.*, 2012). Ces caractéristiques physico-chimiques des peptides de transit sont utilisées par certains programmes bio-informatiques (ChloroP, TargetP, Predotar, Psort, SignalP) afin de déterminer la localisation subcellulaire d'une protéine (Ferro *et al.*, 2010). Dans certains cas, une protéine peut être localisée dans différents compartiments cellulaires alors le système d'adressage sera différent (Danpure *et al.*, 1995 ; Silva-Filho *et al.*, 2003 ; Chew *et al.*, 2004 ; Pujol *et al.*, 2007 ; Baudisch *et al.*, 2014). Dans d'autres cas, comme pour la cystathionine γ -synthase, le peptide de transit peut être impliqué dans la régulation de l'expression de certains gènes (Hagiwara-Komoda *et al.*, 2014).

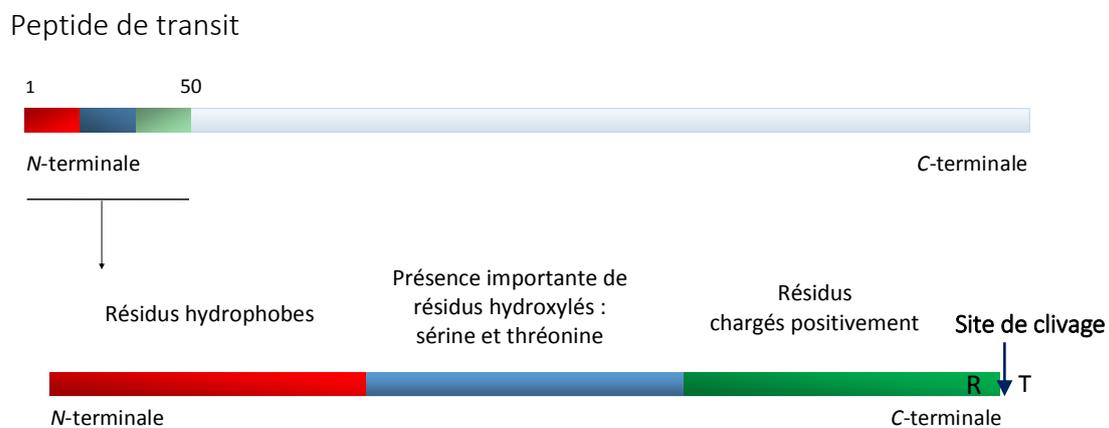


Figure n° 5. Caractéristiques physico-chimiques du peptide de transit.

La séquence de la protéine mature est en bleu clair. Le peptide de transit est divisé en trois parties : *N*-terminale (rouge), centrale (bleu foncé) et *C*-terminale (vert). Chaque partie a sa propre caractéristique physico-chimique dépendant de sa composition en acides aminés. Pour la plupart des protéines, le site de clivage est situé entre une arginine et une thréonine.

2 Protéines chloroplastiques synthétisées dans le cytosol

L'environnement (le pH, la proximité avec les membranes...) dans lequel se situe le précurseur a un impact sur son import (Lee *et al.*, 2002 ; Bionda *et al.*, 2008 ; Li *et al.*, 2013). Le peptide de transit n'adopte pas de structure secondaire spécifique en solution aqueuse (Krimm *et al.*, 1999). Cette particularité permettrait à la pré-protéine d'interagir avec des chaperonnes cytosoliques (Wienk *et al.*, 2000). En effet, l'état non-replié de la pré-protéine dans le cytosol l'expose aux nombreuses protéases présentes ; c'est pourquoi les chaperonnes cytosoliques de type Hsp70 interagissent avec les protéines néo-synthétisées (figure n° 6 : étape 1) (Beckmann *et al.*, 1990 ; Rial *et al.*, 2000 ; Zhang *et al.*, 2002 ; pour revue Schwenkert, 2011).

Dans certains cas, le peptide de transit est phosphorylé afin qu'une autre protéine chaperonne, la protéine 14-3-3, puisse se fixer sur cette séquence sous la forme d'un dimère (Waagemenn et Soll, 1996 ; Yaffe *et al.*, 1997a, 1997b ; May *et al.*, 2000). A ce complexe s'ajoute Hsp70 ce qui forme le complexe ternaire appelé le complexe de guidance. Il permet la reconnaissance du peptide de transit par les récepteurs de la membrane externe du chloroplaste et initie l'import du précurseur dans le chloroplaste (figure n° 6 : étape 1) (Lamberti *et al.*, 2011). Alors lorsque le peptide de transit est en milieu hydrophobe, il forme une hélice. Un système d'import reconnaissant probablement l'hélice du peptide de transit a donc été mis en place au niveau de la membrane externe de l'enveloppe du chloroplaste (complexe TOC) (Demarsy *et al.*, 2014). La reconnaissance du peptide de transit se ferait par l'intermédiaire d'une structure secondaire ou tertiaire particulière.

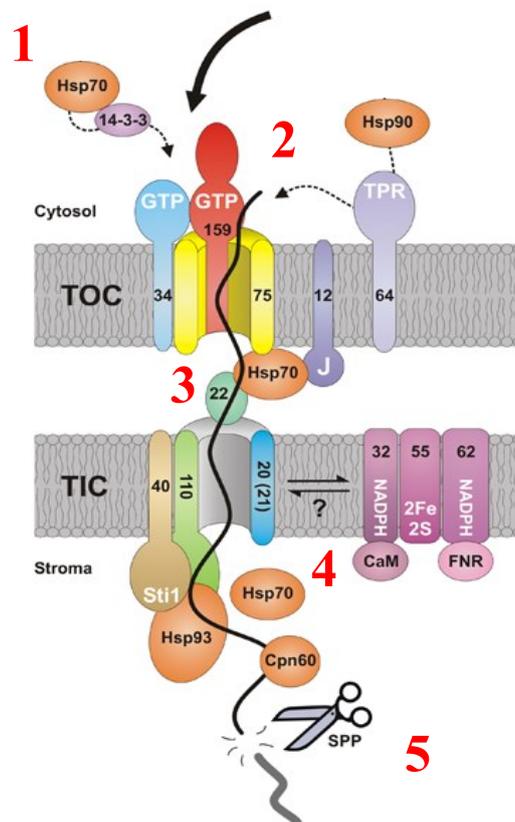


Figure n° 6. Système d'import des protéines dans le chloroplaste.

L'import des protéines chloroplastiques est divisé en cinq étapes (chiffres en rouge). Les protéines chaperonnes sont en orange, les protéines sensibles à l'état redox du complexe TIC sont en violet foncé, la protéine localisée dans l'espace intermembranaire est présentée en vert foncé et les autres protéines sont colorées de manière différente en fonction qu'elles possèdent ou non un domaine cytosolique ou qu'elles soient situées au niveau du complexe TOC ou TIC. TPR : « tetratricopeptide repeats », CaM : calmoduline, FNR : ferrédoxine (Sakamoto *et al.*, 2008).

3 Import par le complexe TOC

Les récepteurs protéiques appartenant au complexe TOC (Translocon at the Outer envelope of Chloroplast) sont impliqués dans le transport des protéines au travers de la membrane externe de l'enveloppe du chloroplaste (Reddick *et al.*, 2008). Le complexe est composé de quatre protéines ayant chacune un rôle différent dans l'import: Toc159, Toc75, Toc34, Toc64 (figure n° 6 : étape 2) (Schnell *et al.*, 1994, 1997 ; Sommer et Schleiff, 2009). Le récepteur impliqué dans la reconnaissance du peptide de transit dépend de la chaperonne qui se fixe au préalable sur la pré-protéine (figure n° 6 : étape 2) (Becker *et al.*, 2004b ; Andrès *et al.*, 2010 ; Chu et Li, 2012 ; Inoue *et al.*, 2013).

3.1 Reconnaissance de la pré-protéine dans le cytosol

3.1.1 Première possibilité : reconnaissance grâce au complexe de guidance

Si la protéine chaperonne se fixant sur le peptide de transit de la pré-protéine est la protéine 14-3-3 suivie de Hsp70 alors l'import se fait de la manière suivante.

❖ Toc34

Toc34 est ancrée dans la membrane externe par son extrémité C-terminale et son domaine cytosolique fixe le GTP (Yan *et al.*, 2014 ; Lumme *et al.*, 2014). La fixation du précurseur sur le récepteur Toc34 est possible lorsque le complexe de guidance s'est formé dans le cytosol. Ce récepteur est un homodimère, qui, à la suite de la reconnaissance et de la fixation du peptide de transit, se monomérise (Sun *et al.*, 2002b ; Weibel *et al.*, 2003 ; Koenig *et al.*, 2008a, 2008b). Le monomère Toc34 interagit ensuite avec Toc159.

❖ Toc159

Les membres de la famille GTPases de Toc159 sont les premiers acteurs de l'import (à proprement dit) des pré-protéines chloroplastiques (Ma *et al.*, 1996 ; Smith *et al.*, 2002, 2004 ; Schleiff *et al.*, 2003 ; Lee *et al.*, 2009a, 2009b). Toc159 possède deux sites de fixation du GTP au niveau de son domaine central qui est capable d'interagir avec Toc34 (Hirsch *et al.*, 1994 ; Kessler *et al.*, 1994). La région C-terminale de la protéine possède une hélice α qui permet son ancrage dans la membrane externe du chloroplaste (Chen *et al.*, 2000a, 2000b). La partie N-terminale de la protéine, riche en acides aminés acides, est cytosolique. Ce domaine prend en charge le précurseur. L'interaction d'une pré-protéine avec Toc159 est covalente (Inoue *et al.*, 2010 ; Aronsson *et al.*, 2011a, 2011b). Puis l'hydrolyse du GTP induit le transfert du précurseur

protéique vers Toc75 (Hirsch *et al.*, 1994 ; Kessler *et al.*, 1994 ; Seedorf *et al.*, 1995 ; Tranel *et al.*, 1995 ; Hinnah *et al.*, 1997 ; Yeh *et al.*, 2007).

3.1.2 Deuxième possibilité : reconnaissance grâce aux protéines chaperonnes type Hsp70

Si la protéine chaperonne se fixant sur le peptide de transit de la pré-protéine est Hsp70 alors l'import se fait de la manière suivante.

❖ Toc64

Toc64 contient un motif nommé TPR (« tetratricopeptide repeats ») (Sohrt et Soll, 2000 ; Panigrahi *et al.*, 2013). Ce motif est retrouvé chez les protéines qui agissent comme cofacteurs auprès des chaperonnes comme Hsp70 et Hsp90. Le motif TPR, organisé en super hélice, permet l'interaction avec la partie C-terminale de Hsp70. Toc64 reconnaît ainsi la pré-protéine à transporter. Cette première étape de transfert est ensuite finalisée par une association GTP dépendante entre Toc64 et Toc34 (Sommer *et al.*, 2013). Puis la suite de l'import a été décrite précédemment.

Une fois la reconnaissance du peptide de transit réalisée par les sous-unités Toc34, Toc159, Toc64 présentées précédemment, la translocation du précurseur est activée au travers de Toc75.

3.2 Translocation des pré-protéines au travers de la membrane externe

❖ Toc75

Le pore central du complexe TOC formé de Toc75 est constitué d'un tonneau β de 16 brins. Toc75 possède également un domaine cytosolique correspondant à un domaine POTRA (POLypeptide TRansport Associated) (Schnell *et al.*, 1994 ; Jarvis *et al.*, 2002 ; Baldwin *et al.*, 2005). Toc75 permet le transfert des précurseurs au travers de la membrane externe de l'enveloppe du chloroplaste (figure n° 7). Il s'avère qu'il est capable d'interagir avec le peptide de transit mais aussi avec l'extrémité N-terminale de la protéine mature qui aurait évolué en même temps que le peptide de transit (Smeekens *et al.*, 1989). Il est alors possible que la séquence de la protéine mature à l'extrémité N-terminale ait subi des modifications, elle-aussi, au cours de l'évolution (Kouranov *et al.*, 1997).

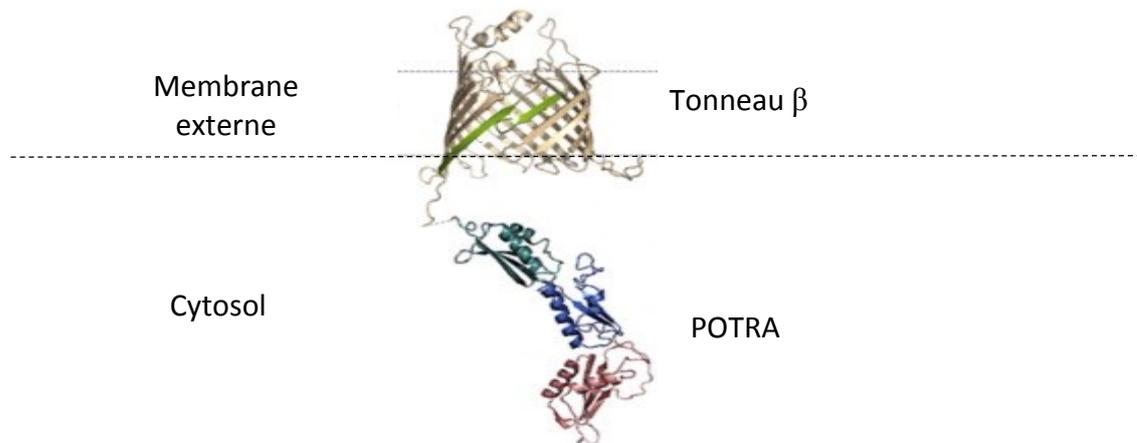


Figure n° 7. Modèle de la structure du récepteur Toc75.

Le tonneau β situé au niveau de la membrane externe de l'enveloppe du chloroplaste constitue le pore. Le domaine POTRA est localisé dans le cytosol (Paila *et al.*, 2015).

4 Import : étape dans l'espace intermembranaire

4.1 Protéines chloroplastiques localisées au niveau de l'espace intermembranaire

Une fois la translocation du précurseur réalisée, ce dernier se retrouve au niveau de l'espace intermembranaire. Si la localisation de la protéine chloroplastique est l'espace intermembranaire alors le peptide de transit est clivé par des peptidases et la protéine devient fonctionnelle (Richardson *et al.*, 2014).

4.2 Protéines chloroplastiques localisées au niveau de la membrane interne ou du stroma

Si la protéine est localisée au niveau de la membrane interne de l'enveloppe du chloroplaste ou dans le stroma, alors le précurseur est pris en charge par Tic22 (figure n° 6 : étape 3) (Becker *et al.*, 2004 ; Benz *et al.*, 2009b). Tic22 est une protéine permettant de faire le lien entre le complexe TOC et le complexe TIC (Tanslocon at the Inner envelope of Chloroplast). Elle reconnaît ainsi le précurseur protéique, et le transfère vers le complexe TIC (Oreb *et al.*, 2008). Elle aurait un rôle similaire à celui des chaperonnes c'est-à-dire protéger la pré-protéine des protéases (Glaser *et al.*, 2012 ; Rudolf *et al.*, 2013).

5 Import par le complexe TIC

Le complexe TIC est composé de sept protéines : Tic20, IEP32, Tic40, Tic55, Tic62 et Tic110 (Ko *et al.*, 1995 ; Kesller et Blobel, 1996 ; Lübeck *et al.*, 1996 ; Caliebe *et al.*, 1997 ; Kouranov et Schnell 1997) (figure n° 6 : étape 4).

❖ Tic110 et Tic40

Un des domaines de la protéine Tic110 est soluble et le second domaine est ancré dans la membrane interne (Inaba *et al.*, 2003, 2005,). Tic110 forme le canal de translocation du complexe TIC et interagit avec le peptide de transit des protéines chloroplastiques à l'aide de son domaine soluble (Tsai *et al.*, 2013 ; Hernandez-Torres *et al.*, 2014). Ce même domaine interagit avec Tic40. Tout comme Toc64, Tic40 possède un motif TPR (Stahl *et al.*, 1999 ; Chou *et al.*, 2003). Les deux protéines, Tic110 et Tic40, recrutent les chaperonnes du stroma comme Cpn60 et ClpC et permettent le transfert des pré-protéines aux chaperonnes du stroma (Kouranov *et al.*, 1998 ; Chou *et al.*, 2006). L'énergie nécessaire à la translocation est fournie par l'hydrolyse de l'ATP. Ces deux protéines sont les principaux acteurs de l'import de la pré-protéine au niveau du complexe TIC.

❖ Tic20 et Tic21

Tic20 et Tic21 sont localisées dans la membrane interne du chloroplaste. Elles fonctionnent de la même manière, c'est pourquoi elles ne sont que rarement dissociées. Elles possèdent quatre hélices transmembranaires (Kouranov *et al.*, 1998) et jouent un rôle dans l'assemblage du complexe TIC car elles interagissent avec Tic110 (Chen, 2002 ; Kessler et Schnell, 2009). Tic20 serait essentielle tôt dans le développement alors que Tic21 serait essentielle à un stade plus tardif dans le développement de la plante (Teng *et al.*, 2006).

❖ IEP32

IEP32 est localisée au niveau de la membrane interne de l'enveloppe du chloroplaste. Elle interagit fortement avec Tic110 et Tic55. Cependant l'interaction avec Tic110 est dépendante de la fixation du NADP⁺ et de l'interaction entre la CaM et IEP32 (*cf.* Annexe n° 1).

❖ Tic55

Tic55 expose un de ses domaines vers le stroma qui possède un centre fer-soufre (Caliebe *et al.*, 1997). Cette particularité de la protéine fait d'elle un senseur de l'état rédox du milieu. En effet, le transport des protéines peut être régulé en réponse aux variations de l'état redox (*cf.* Annexe n° 1). Tic55 interagit avec Tic62 (figure n° 6 : étape 4) (Balsera *et al.*, 2007).

❖ Tic62

Tic62 fixe le NADPH par son extrémité *N*-terminale et la ferrédoxine par son extrémité *C*-terminale (Kuchler *et al.*, 2002). La fixation du NADPH dépend de son état d'oxydation car il doit être sous la forme NADP⁺. La ferrédoxine et le NADPH sont des molécules régulant l'import des protéines chloroplastiques (*cf.* Annexe n° 1) (Noctor *et al.*, 2006).

En conclusion, le complexe TIC est régulé par l'état redox du chloroplaste (Caliebe *et al.*, 1997 ; Kuchler *et al.*, 2002 ; Hörmann *et al.*, 2004). L'état redox de la chaîne photosynthétique du chloroplaste est un signal de régulation de l'import (Benz *et al.*, 2009a). Par exemple, en conditions oxydantes, Tic62 et IEP32 s'associent avec le complexe TIC. Il existe également une régulation résultant de l'état d'oxydation des thiols de Tic110 (Hirohashi *et al.*, 2001). Il apparaît donc que la moindre modification du statut redox peut considérablement modifier l'import des protéines dans le chloroplaste (Kovács-Bogdán *et al.*, 2010b).

5.1 Protéines chloroplastiques localisées au niveau de la membrane interne

Pour les protéines de la membrane interne, deux mécanismes d'insertion existent.

(i) La protéine peut être insérée directement dans la membrane interne après le passage de la membrane externe. L'information sur la localisation est alors contenue dans le domaine *N*-terminal qui est souvent hydrophobe. C'est le cas pour IEP37, ou ARC6 (« Accumulation and Replication of Chloroplasts 6 »).

(ii) La pré-protéine est, dans un premier temps, importée dans le stroma où le peptide de transit est clivé. La protéine est ensuite intégrée à la membrane interne. C'est le cas de Tic110 et de Tic40. Pour Tic40, une fois le premier clivage réalisé, elle forme une hélice riche en sérine et en proline favorisant l'ancrage dans la membrane interne (Tripp *et al.*, 2007).

5.2 Protéines chloroplastiques localisées au niveau du stroma

Une fois la translocation du précurseur au travers du complexe TIC réalisé, le peptide de transit est clivé par une « Stroma Processing Peptidase » (SPP) (figure n° 6 : étape 5) (Richter *et al.*, 2003). Les protéines chloroplastiques se replient alors dans le stroma à l'aide de protéines chaperonnes comme Hsp60 et deviennent fonctionnelles (Oblong et Lamppa, 1992 ; Rowland *et al.*, 2015).

6 Imports alternatifs au système TOC/TIC décrit

6.1 Systèmes d'import alternatif

L'ensemble des protéines des complexes TOC et TIC est codé par le génome nucléaire. D'autres systèmes d'import existent (Reinbothe *et al.*, 2008). Récemment, un autre complexe TIC a été décrit (Cline *et al.*, 2008 ; Kikuchi *et al.*, 2009). La première protéine identifiée est YCF1 qui est appelée par la suite Tic214 en accord avec sa nouvelle fonction. Contrairement au complexe TIC présenté précédemment, le nouveau complexe TIC n'est pas composé de Tic110 ni de Tic40. Il est composé de trois protéines supplémentaires : Tic100, Tic56, et Tic20-I. L'association de ces protéines forme un complexe de 1 mégadalton. Il permettrait l'import des pré-protéines photosynthétiques (Nakai *et al.*, 2015).

Une autre voie d'import a été décrite impliquant principalement trois protéines nommées PRAT (« putative preprotein amino acid transporters ») : HP20, HP30 et HP30-2 (Rossig *et al.*, 2013). Celle-ci ne sera pas davantage détaillée.

6.2 Protéines importées par les voies alternatives

Lors de ma thèse, deux protéines chloroplastiques localisées au niveau de la membrane interne du chloroplaste ou associée à cette dernière, ont été étudiées : IEP32 et la ceQORH. Ces deux protéines sont intéressantes car elles sont toutes deux incorporées au chloroplaste par un système d'import alternatif qui n'est pas connu à ce jour.

6.2.1 IEP32

IEP32 peut être appelée aussi Tic32. Comme cela a été expliqué précédemment, elle est une des protéines du complexe TIC et elle est située dans la membrane interne de l'enveloppe du chloroplaste (*cf.* p.37). Elle interagit spécifiquement avec Tic110, mais également avec d'autres protéines du complexe TIC (Tic22) et TOC (Toc159, Toc34) (Hörmann *et al.*, 2004).

L'import d'IEP32 dans le chloroplaste n'est pas affecté par un traitement préalable aux protéases (qui dégrade le complexe TOC) ou par l'utilisation d'un compétiteur. IEP32 est donc importée par une voie alternative au complexe TOC/TIC. La seule information obtenue est que l'apport énergétique nécessaire à l'import est inférieur à 20 μM d'ATP, ce qui est faible (Nada *et al.*, 2004). La concentration en ATP requise pour l'import est généralement au-dessus de 50 μM (Theg *et al.*, 1989). D'autres part, le peptide de transit d'IEP32 (10 résidus à l'extrémité *N*-terminale) n'est pas clivé après l'import (Nada *et al.*, 2004).

6.2.2 ceQORH

La ceQORH, la seconde protéine, a été localisée, dans un premier temps, dans l'enveloppe du chloroplaste et est caractérisée comme étant une enzyme soluble (figure n° 8). Différents tests ont été réalisés et il s'avère que la ceQORH est associée à la membrane interne de l'enveloppe du chloroplaste (Miras *et al.*, 2002). De plus, elle possède un peptide de transit interne non-clivable constitué d'une quarantaine d'acides aminés (Pro59 à Leu100) (figure n° 9) (Miras *et al.*, 2002 ; Ferro *et al.*, 2003).

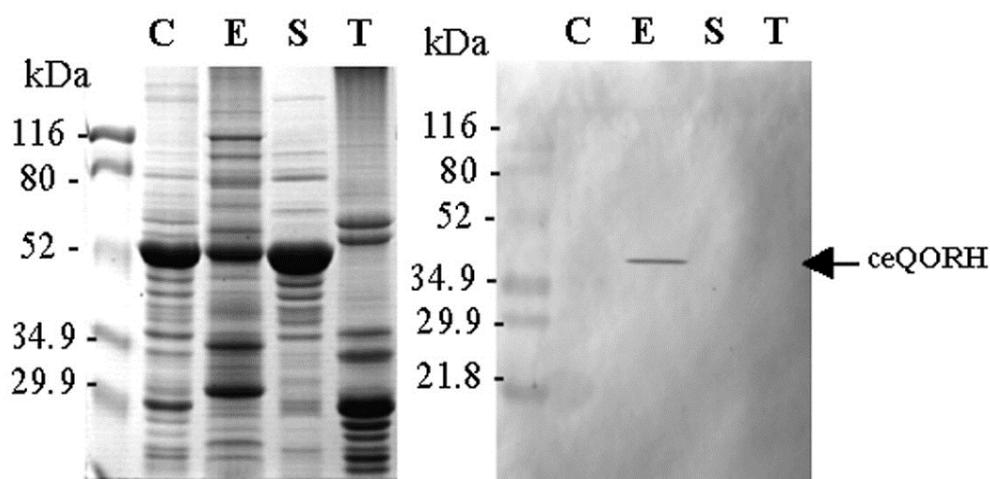


Figure n° 8. Localisation de la ceQORH.

Un gel SDS-PAGE 12 % a été réalisé ainsi qu'un western blot à la suite de différentes manipulations permettant de séparer les protéines des différents compartiments du chloroplaste. « C » : extrait total du chloroplaste, « E » : protéines de l'enveloppe du chloroplaste, « S » : protéines du stroma du chloroplaste, « T » : protéines des thylakoïdes. Pour le western blot, des anti-corps dirigés contre la ceQORH d'*Arabidopsis thaliana* ont été utilisés (Miras *et al.*, 2002).

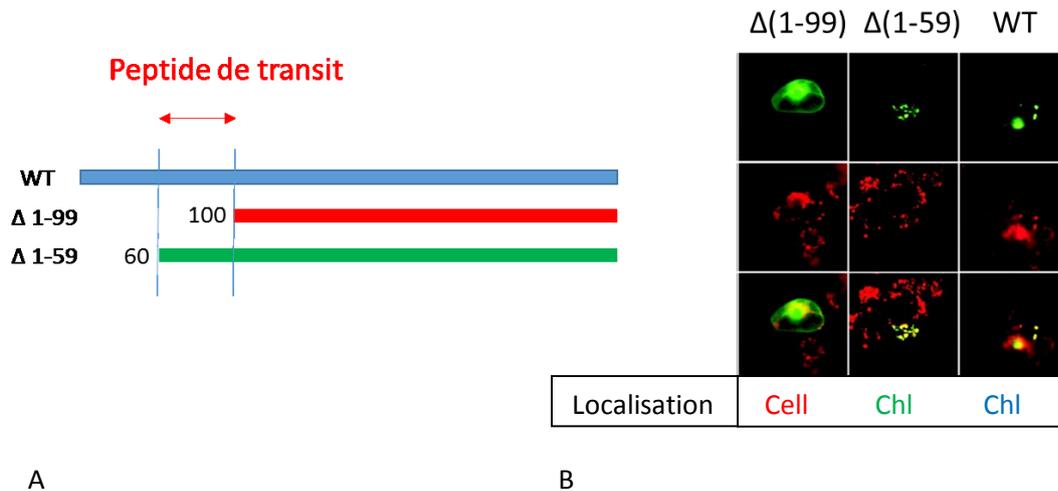


Figure n° 9. Caractérisation du peptide de transit de la ceQORH.

Cette figure présente la localisation chez *Arabidopsis thaliana* de la ceQORH entière ou mutées (A) grâce à la fluorescence de la GFP et des autres contrôles (B). Les résultats suggèrent que la région de 60 à 100 est la séquence suffisante et essentielle pour la localisation de la ceQORH au niveau du plaste. Chl : chloroplaste, Cell : cellule (Miras *et al.*, 2007).

Concernant l'import de la ceQORH dans le chloroplaste, l'inhibition des récepteurs Toc75 ou de Toc159 ont pu mettre en évidence que le transport de la ceQORH n'est pas affecté et donc qu'elle utilise une autre voie d'import que TOC/TIC qui n'a pas encore été définie à ce jour (Miras *et al.*, 2007).

Partie III. Stress oxydant et ERO

Un système de communication et de régulation existe entre le noyau et les organites de la cellule végétale (Hedtke *et al.*, 1999a, 1999b). Ce réseau intracellulaire est d'autant plus complexe que les cellules possèdent plusieurs organites (chloroplaste, mitochondrie). La signalisation entre le noyau et les organites, est appelée « voie antérograde ». La signalisation entre les organites et le noyau est appelée « voie rétrograde » (Chi *et al.*, 2015 ; Gollan *et al.*, 2015) puis la signalisation entre les différents organites, est appelée « voie transversale ». L'ensemble des processus de signalisation est régi essentiellement par la concentration en calcium libre dans les différents compartiments (Xiong *et al.*, 2006). Cependant, d'autres molécules sont impliquées dans la communication intracellulaire. C'est le cas des espèces réactives de l'oxygène (ERO) présentes dans les organelles (pour revue Stefano *et al.*, 2015). Bien que ces ERO puissent être produites par différents stress, la principale source est le stress oxydant, c'est pourquoi, c'est celui qui sera présenté par la suite. Dans cette partie, je présenterai le stress oxydant, la toxicité des ERO et les molécules antioxydantes permettant de diminuer la toxicité des ERO.

1 Le stress oxydant

Il y a environ 2,5 milliards d'années, la quantité d'oxygène moléculaire dans l'atmosphère qui était en quantité infinitésimale, a augmenté : c'est ce qui est appelé la grande oxydation. L'oxygène moléculaire est essentiel dans le métabolisme des organismes vivant en aérobie (Fridovich *et al.*, 1978a, 1978b). Cependant des espèces moléculaires de l'oxygène très réactives nommées ERO aussi appelées ROS (**R**eactive **O**xygen **S**pecies) se forment à partir de l'oxygène moléculaire et peuvent être nocives pour l'organisme (*cf.* Annexe n° 2) (Bailey-Serres *et al.*, 2006). Pour pallier ce problème, il existe des molécules antioxydantes permettant de neutraliser la toxicité des ERO. Le stress oxydant correspond à la rupture de l'équilibre entre les pro-oxydants et les antioxydants. Ce phénomène a été décrit par Sies en 1991 (Sies *et al.*, 1991).

Dans le chloroplaste, l'oxygène transite en permanence et donc la production des ERO est une résultante inévitable. Les mécanismes biologiques induisant la production d'ERO sont localisés essentiellement au niveau de la chaîne de transport des électrons du photosystème I (PSI) et du

photosystème II (PSII). En conditions normales, les effets des ERO sont limités par l'action de molécules antioxydantes ou d'enzymes de détoxification (figure n° 10 : étape 1).

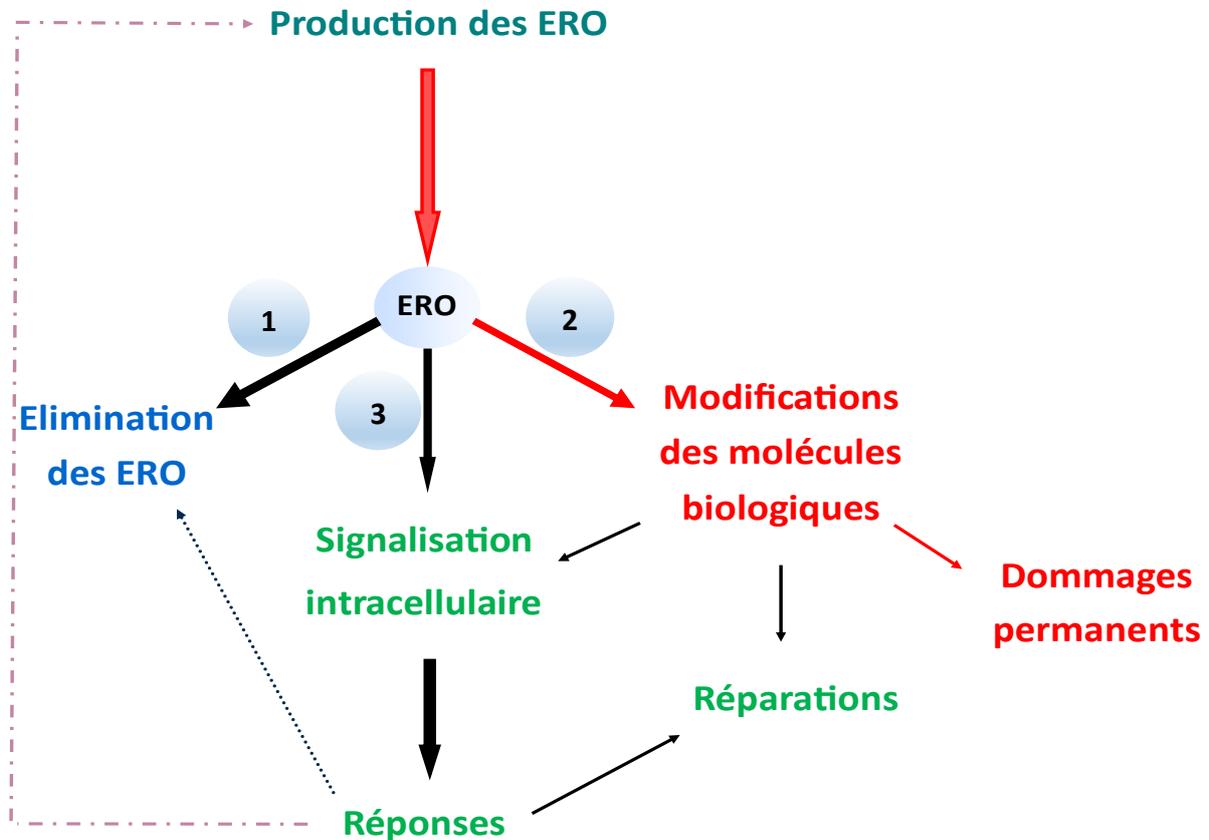


Figure n° 10. Que deviennent les ERO ?

Les différentes conséquences de la présence des ERO au sein de la cellule. **1** : élimination des ERO, **2** : impact des ERO sur les molécules biologiques essentielles, **3** : processus de signalisation permettant la réponse au stress chez la plante.

Les conditions environnementales dans lesquelles se trouvent les plantes peuvent varier et être stressantes. Ces stress de type biotique ou abiotique (blessure, stress hydrique) entraînent une production accrue d'ERO (pour revue Moller *et al.*, 2007 ; Gill *et al.*, 2010). Par exemple, certaines enzymes comme la peroxydase, l'amine oxydase, la NADPH oxydase et la xanthine oxydase produisent des ERO à la suite d'un stress (Gralla *et al.*, 1997 ; Richter et Schweizer, 1997 ; Mittler *et al.*, 2011 ; Suzuki *et al.*, 2012). Cette augmentation des ERO provoque donc un déséquilibre entre les molécules pro-oxydantes et antioxydantes. Cela a pour conséquence la production de molécules secondaires (par exemple les oxylipines) et de molécules dérivées (par exemple les jasmonates) impliquées dans la signalisation rétrograde (Gollan *et al.*, 2015) et la défense de la plante (figure n° 10 : étape 2 et 3) (Grene *et al.*, 2002).

2 Les espèces réactives de l'oxygène nocives pour la plante

2.1 Caractéristiques des ERO toxiques

Chez les plantes, le stress oxydant provoque des dégâts souvent irréversibles sur la cellule. Parmi tous les ERO, le radical hydroxyle est la forme la plus délétère car elle est très réactive. Les radicaux libres possèdent un ou plusieurs électrons non appariés. Ce sont donc des molécules très instables (Halliwell *et al.*, 2006 ; Noctor, 2006). Les radicaux libres, malgré une durée de vie très brève, sont alors toxiques pour les molécules biologiques et sont capables de provoquer des dommages cellulaires importants. Le radical hydroxyle est formé à partir du peroxyde d'hydrogène via la présence de catalyseurs métalliques tels que Fe^{2+} ou Cu^{2+} par la réaction de Fenton ou alors il peut être formé par la réaction de Haber-Weiss entre O_2^- et H_2O_2 (figure n° 11) (Mullineaux et Baker, 2010). Le radical hydroxyle a la capacité d'arracher un électron ou un hydrogène ou alors de venir s'additionner sur une insaturation. Les agents oxydants capables de focaliser les électrons de molécules organiques essentielles perturbent ainsi les fonctions cellulaires (Demidchik *et al.*, 2015).

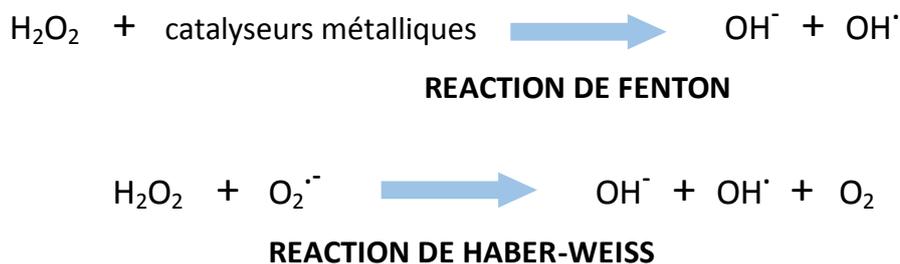


Figure n° 11. Réaction de Fenton et de Haber-Weiss.

La réaction de Fenton est possible en présence de peroxyde d'hydrogène et de catalyseurs métalliques comme le Fe^{2+} ou Cu^{2+} . En l'absence de catalyseurs métalliques, le peroxyde d'hydrogène peut réagir avec l'anion superoxyde pour former un radical hydroxyle par la réaction de Haber-Weiss.

2.2 Conséquences de la présence des ERO sur les molécules organiques essentielles

Les conséquences moléculaires des ERO concernent les lipides, les protéines, l'ADN et les sucres (Halliwell *et al.*, 1996). Les ERO clivent les molécules lipidiques ce qui a pour conséquence une augmentation de la fluidité et de la perméabilité des membranes (Noctor *et al.*, 2015). Les ERO peuvent fragmenter la chaîne polypeptidique et/ou modifier certains sites spécifiques de la protéine (Guptasarma *et al.*, 1992). Ils vont également altérer la charge

électrique des protéines, et entraîner une inactivation de certaines enzymes. Les ERO induisent une oxydation des désoxyriboses ou une cassure des brins ou des mutations de l'ADN, ou forment des adduits (figure n° 12 : A). De plus, les ERO entraînent l'oxydation des pigments et des sucres (figure n° 12 : B).

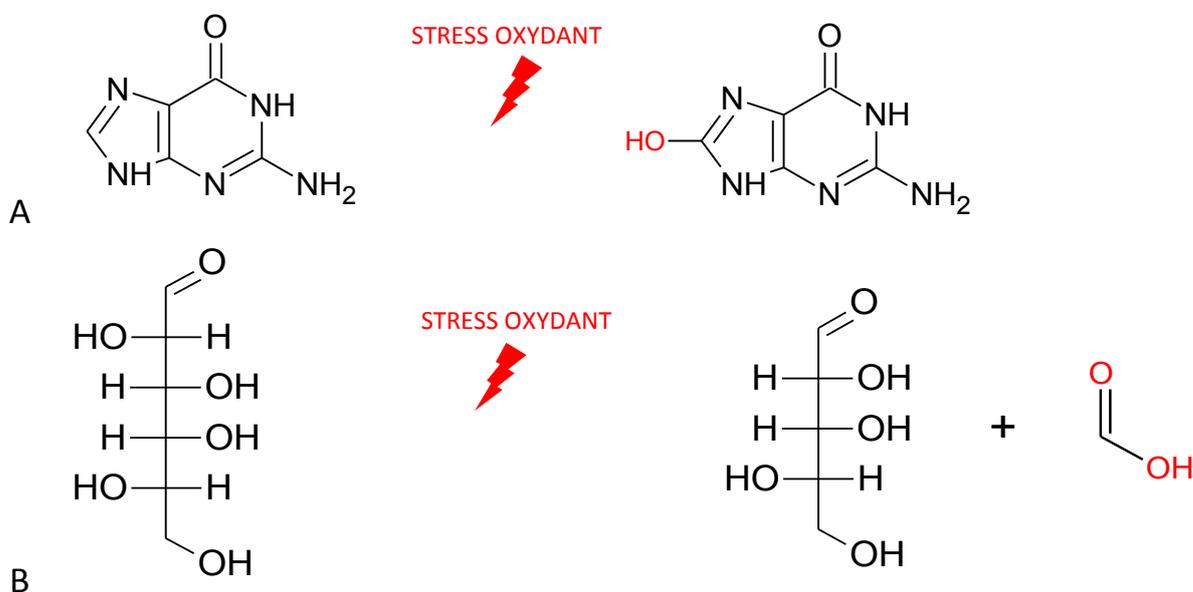


Figure n° 12. Conséquences du stress oxydant sur l'ADN et sur les sucres.

A. Cette figure montre la modification de la guanine en 8-hydroxyguanine par les ERO (radical hydroxyle). B. Cette figure montre la modification d'un hexose en aldose par les ERO (radical hydroxyle).

3 Les molécules antioxydantes

La concentration en ERO est contrôlée par un réseau complexe reliant tous les compartiments cellulaires afin de maintenir l'équilibre redox (Mittler *et al.*, 2004 ; Mittler *et al.*, 2011). Chez *Arabidopsis thaliana*, 152 gènes sont impliqués dans ce réseau. Ainsi la réponse au stress oxydant sera dépendante de la concentration d'ERO, du site de production des ERO, et des interactions avec d'autres molécules issues du stress. Par exemple, en conditions normales dans le chloroplaste, la production d'ERO est dépendante de la concentration en ferrédoxine et en NADPH qui sont également des molécules impliquées dans la régulation de l'import des protéines chloroplastiques, comme on a pu le voir précédemment (*cf.* p.38). Les molécules antioxydantes sont de deux natures différentes : petites molécules organiques ou enzymes.

3.1 Petites molécules organiques antioxydantes

L'ascorbate (ASC) et le glutathion (GSH) sont des molécules antioxydantes les plus importantes dans les cellules de plante. Le glutathion est un tripeptide synthétisé dans le chloroplaste qui est présent dans les différents compartiments cellulaires (cytosol, mitochondrie, réticulum endoplasmique) (Noctor *et al.*, 2012). Cette molécule interagit avec certains radicaux libres pour catalyser la conjugaison de composés électrophiles (Blokхина *et coll.*, 2003 ; Apel *et Hirt*, 2004). Il agit donc sur les produits issus des divers stress. Les caroténoïdes et les flavonoïdes sont également des molécules organiques antioxydantes (tableau n° 1) (Carol *et al.*, 2001 ; Hernández *et al.*, 2009). Il a été démontré que le tocotriénol, par exemple, est un antioxydant chez le tabac (Matringe *et al.*, 2008).

3.2 Enzymes antioxydantes

Les enzymes antioxydantes sont nombreuses et sont spécifiques d'un stress donné. Les ERO sont également spécifiques d'un type d'ERO donné (tableau n° 1) (Triantaphylidès *et al.*, 2009). Les différentes enzymes et leur spécificité sont listées dans le tableau n° 1 : la superoxyde dismutase, la catalase, l'ascorbate peroxydase, la glutathion peroxydase et les peroxyrédoxines (Fridovich *et al.*, 1995 ; Rejeb *et al.*, 2015). Par exemple, en cas de sécheresse, une des enzymes actives chez *Oryza sativa* est la superoxyde dismutase (SOD).

MECANISMES	PRODUITS CIBLES	LOCALISATIONS
SOD	O ₂ ⁻ (H ₂ O ₂)	Chl, Cyt, Mit, Per
Catalase	H ₂ O ₂ (H ₂ O)	Per
Peroxydase	H ₂ O ₂ (H ₂ O)	Plusieurs localisations
Glutathione peroxydase	H ₂ O ₂ (H ₂ O)	Chl, Cyt, ER, Mit
	Hydroperoxyde lipidique	-
	Autres hydroperoxydes	-
Système peroxyrédoxine	H ₂ O ₂ (H ₂ O)	Chl, Cyt, Mit, Nucl
	Alkyl hydroperoxyde	-
	Peroxinitrite	-
Système thiorédoxine	H ₂ O ₂ (H ₂ O)	Chl, Cyt, Mit
Système glutarédoxine	H ₂ O ₂ (H ₂ O)	Chl, Cyt, Mit
	Hydroperoxyde	-
Ascorbate/glutathion	H ₂ O ₂ (H ₂ O)	Chl, Mit, Per
Carotènes et tocophérols	¹ O ₂ (O ₂)	Chl

Tableau n° 1. Molécules antioxydantes luttant contre les ERO (Chl : chloroplaste, Cyt : cytosol, Mit : mitochondrie, Nucl : noyau, Per : peroxysome) (pour revue Milvia Luisa Racchi, 2013).

En conditions stressantes, le nombre d'accepteur d'électrons n'est plus suffisant. Des métabolites secondaires sont alors produits et participent à la signalisation moléculaire. L'activation de la signalisation cellulaire rétrograde par les ERO permet de produire des molécules et des enzymes de défense qui vont réduire la toxicité des molécules produites au cours de ce stress (ou directement diminuer la toxicité des ERO). Certains de ces métabolites secondaires dérivés de la peroxydation lipidique sont appelés les oxylipines. Elles sont présentées dans la partie suivante.

Partie IV. Les oxylipines

Dans le cadre de cette étude, nous nous intéresserons plus particulièrement à l'impact des ERO sur les lipides et les produits cataboliques formés à partir de la peroxydation lipidique participant à la signalisation cellulaire. La signalisation moléculaire résultante implique deux types de molécules principales : les oxylipines et les hormones comme l'acide abscissique (ABA) (Wasilewska *et al.*, 2008 ; Welsch *et al.*, 2008). Ces molécules sont produites dans l'objectif de retrouver l'équilibre entre les molécules pro-oxydantes et les molécules antioxydantes et donc de diminuer les dommages moléculaires et les conséquences phénotypiques (figure n°10). Une des étapes est, par exemple, l'activation de la transcription de certains gènes conservés au sein du chloroplaste afin de produire les enzymes nécessaires pour réduire la toxicité de certains métabolites (Allen *et al.*, 2015).

1 Production des oxylipines

La peroxydation lipidique correspond à l'incorporation d'oxygène moléculaire dans les lipides des membranes. Par l'action de la phospholipase au niveau des lipides, les acides gras polyinsaturés sont libérés dans le stroma du chloroplaste ou dans le cytosol. Les acides gras libérés sont des molécules à 18 carbones (octadécanoides) comme les acides linoléique (C18:2 ω 6, 9) et linoléique (C18:3 ω 3, 6, 9) possédant un motif 1,4 pentadiène. Il existe également des acides gras sous forme libre dans le stroma obtenus sans l'action de la phospholipase.

Les premières étapes sont initiées par deux types d'enzyme, les lipoxygénases (LOX) (Feussner et Wasternack, 2002), et les α -dioxigénases (Hamberg *et al.*, 2005). La réaction catalysée par les LOX (9-LOX et 13-LOX) a pour produit des hydroperoxydes d'acides gras. Ces enzymes convertissent donc les acides gras (C18:2 et C18:3) en acide 2-hydroperoxyoctadecadi(tri)énoïque (HPOD/T) qui peut être converti en acide 2-hydroxyoctadecadi(tri)énoïque (2-HOD/T) (figure n° 13) (Hamberg *et al.*, 2003).

Les hydroperoxydes d'acides gras (HPOD/T) formés par la voie des 9-LOX ou des 13-LOX (9-HPOD/T) ou (13-HPOD/T) peuvent être métabolisés par des réactions enzymatiques différentes divisées en six voies principales (figure n° 14). En effet, les hydroperoxydes d'acides gras sont les substrats de nombreuses enzymes telles que : l'allène oxyde synthétase (AOS), la divinyle éther synthétase (DES), l'hydroperoxyde lyase (HPL), la peroxygénase (PXG) ou l'alcool époxy synthétase (EAS).

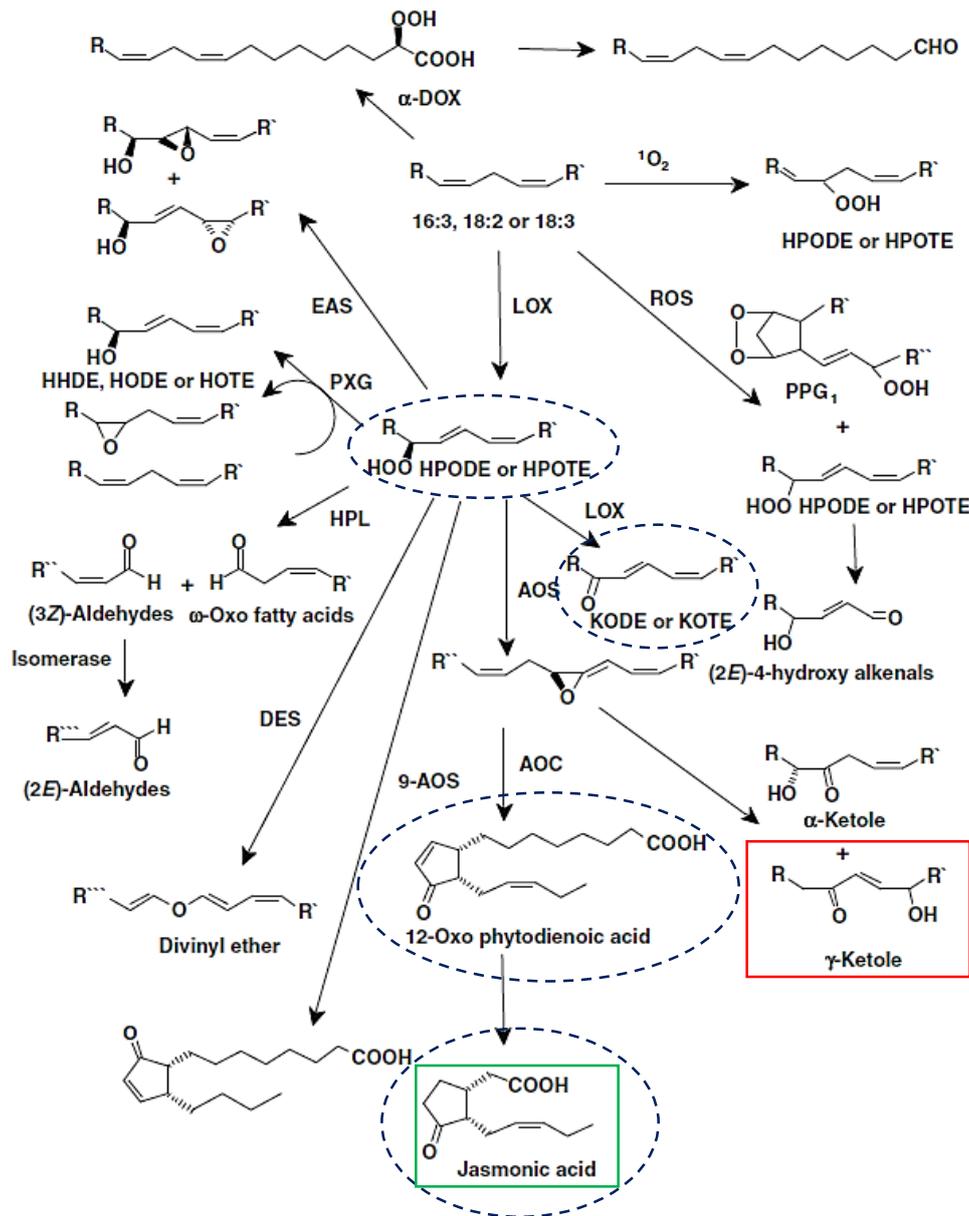


Figure n° 13. Voies de production des oxylipines.

La molécule participant à la défense de la plante est encadrée en vert, alors qu'en rouge est encadré un exemple de molécules toxiques pour l'organisme. Les cercles bleus indiquent les molécules citées dans la partie sur les rôles des oxylipines. Les réactions enzymatiques de cette figure sont décrites ci-dessous :

- (1) L'hydroperoxyde est réduit par une PXG ou par une peroxydase formant alors l'acide 9 ou 13-hydroxyoctadecadi(tri)énoïque (Blée, 2002 ; Weichert *et al.*, 1999 ; Dietz *et al.*, 2002).
- (2) L'hydroperoxyde est converti par une EAS ou par une PXG suivie par une époxyde hydrolase pour former un acide gras trihydroxylate en alcool époxy (Blée, 1998 ; Hamberg, 1999).
- (3) L'hydroperoxyde peut être déshydraté par les LOX ou subir une déshydrogénation formant alors des hydroxydes d'acides gras kétodiène (KOD) ou kétotriène (KOT) (Chechetkin *et al.*, 2004).
- (4) L'hydroperoxyde peut alors être substrat de la HPL formant des aldo-acides à chaîne courte (C9 ou C12) et des aldéhydes (C9 ou C6) (Grechkin et Hamberg, 2004).
- (5) L'hydroperoxyde par l'action de la DES peut devenir un divinyl ester d'acides gras (Grechkin, 2002).
- (6) L'hydroperoxyde peut alors être le substrat de l'AOS formant alors un oxyde d'allène (Tijet et Brash, 2002). Le nom de chaque enzyme est indiqué sur la figure. Cette figure est extraite de la publication d'Andreou *et al.*, 2009.

Certains dérivés sont obtenus par des réactions non-enzymatiques (figure n° 14):

- α-kétol
- γ-kétol

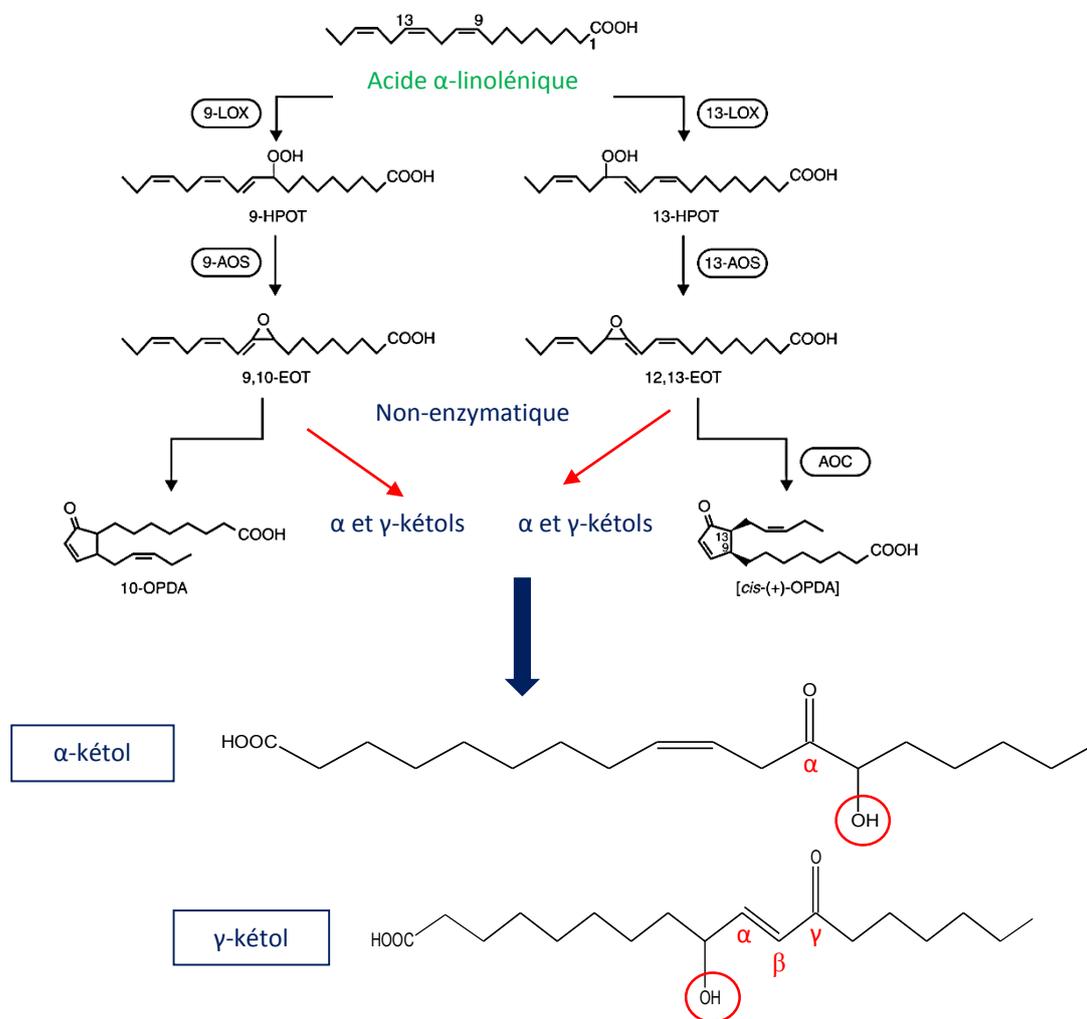


Figure n° 14. Oxylipines obtenues par voie non-enzymatique.

La molécule initiale est la même que celle retrouvée pour les réactions enzymatiques et qui, en fonction de la LOX, va produire des molécules dont le groupement oxygéné sera placé soit sur le carbone 9 ou soit sur le carbone 13. C'est ce qui est appelé respectivement la voie des 9-LOX et la voie des 13-LOX. Dans le chloroplaste, seule la voie des 13-LOX est possible. Les dérivés peroxydiques sont sensibles aux réactions chimiques induisant la production de molécules nommées les α-kétols et les γ-kétols. La différence se situe au niveau de la position du groupement carbonyle par rapport à la fonction hydroxyle. Cette figure est extraite de la publication de [Wasternack et al., 2007](#).

La plante produit des composés dérivés des acides gras oxydés qui sont appelés oxylipines (Blée *et al.*, 2002 ; Howe et Schillmiller, 2002 ; Farmer *et al.*, 2003). La plupart des molécules obtenues par le processus précédent sont des métabolites bioactifs impliqués ou non dans les voies de signalisation (Feussener et Wasternack, 2002) ou se sont révélées être toxiques (Yin *et al.*, 2010). En effet, les oxylipines sont classées en deux types de famille en fonction de leur nature électrophile.

2 Classification des oxylipines

2.1 Oxylipines toxiques pour la plante

Cette classe d'oxylipines est composée de molécules très réactives électrophiles qui peuvent se lier spontanément aux espèces nucléophiles au sein de la cellule. Ces oxylipines sont appelées les espèces réactives électrophiles (ERE) ou **Reactive Electrophilic Species (RES)** (Vollenweider *et al.*, 2000). Les effets sur la cellule et sur les molécules organiques essentielles sont similaires à ceux des ERO. Certaines d'entre elles sont toxiques car elles possèdent un groupement carbonyle suivi d'une insaturation en α , β . Ces molécules sont appelées les carbonyles réactifs (RC) (figure n° 15). Les RC, très électrophiles, sont les cibles des attaques nucléophiles par des molécules ou des groupements nucléophiles (par exemple le groupement –SH d'une protéine) (figure n° 16).

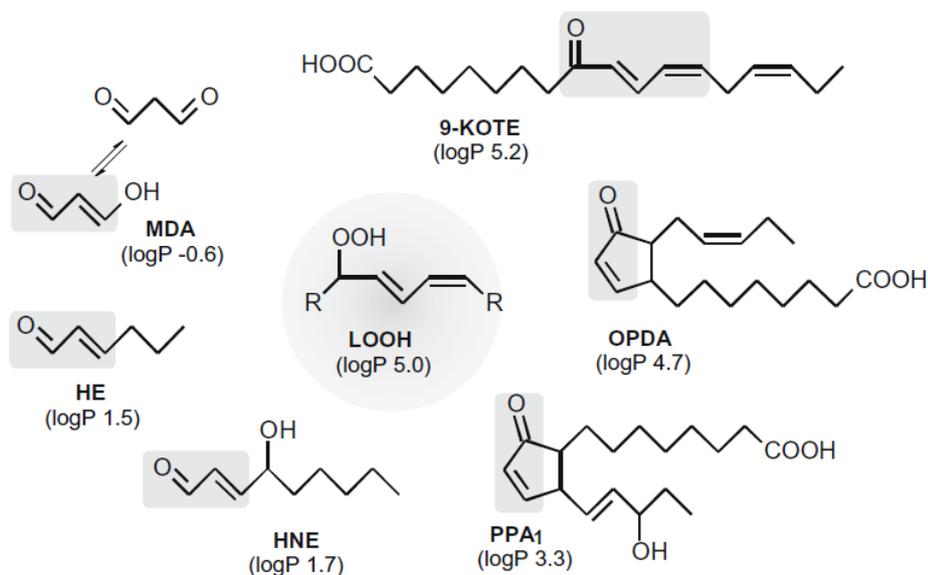


Figure n° 15. Les carbonyles réactifs.

La figure présente l'ensemble des oxylipines appartenant aux ERE. LOOH : les hydroperoxydes d'acides gras, MDA : malondialdéhyde, HE : 2E-hexéanal, HNE : 4-hydroxy-2E-nonéanal, PPA₁ : A₁-phytoprostanes, OPDA : acide 12-oxo-phytodiénoïque, 9-KOTE : acide 9-oxo-octadécatriénoïque. Les oxylipines lipophiles sont indiquées avec la valeur du logP qui permet d'appréhender le caractère hydrophile ou hydrophobe d'une molécule (Mueller *et al.*, 2009).

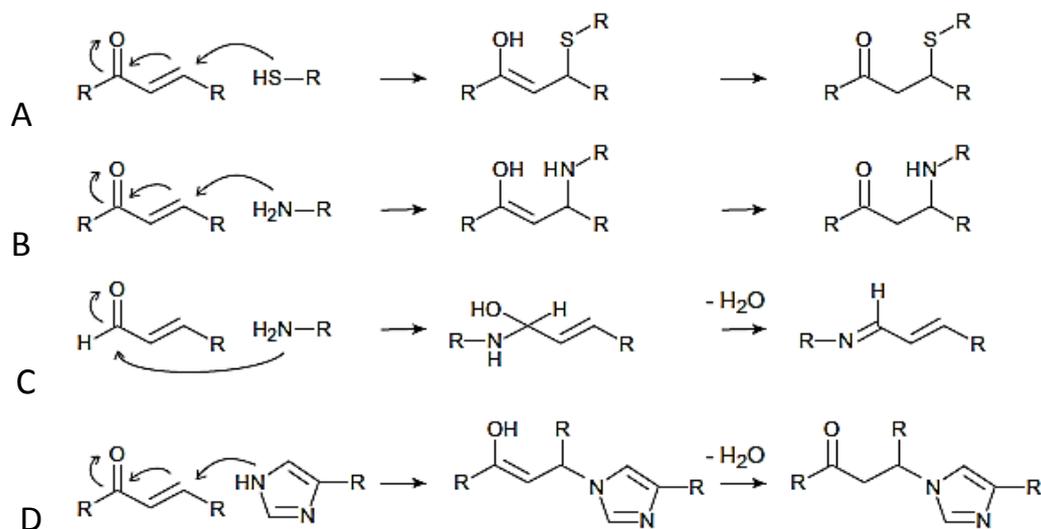


Figure n° 16. Réactions des RC avec les molécules biologiques.

L'attaque nucléophile peut se faire au niveau de l'alcène (**A, B, D**) ou alors au niveau de la cétone (**C**). Les groupements des molécules organiques essentielles qui sont responsables des attaques nucléophiles sont les groupements thiol, amine ou imidazole.

2.2 Oxylipines participant à la défense de la plante

Les oxylipines de cette catégorie participent à la signalisation et sont également impliquées dans la défense de l'organisme lors de la réponse aux différents stress impliquant la production des ERO (Wang *et al.*, 2006). Ces oxylipines, contrairement aux précédentes, sont considérées comme des composés non-réactifs.

Les peroxydes lipidiques libérés au cours de la peroxydation lipidique servent de précurseurs à la synthèse de l'acide jasmonique. L'acide jasmonique et le méthyle jasmonate appartiennent à la famille des jasmonates. Par conséquent, la production de certaines oxylipines favorise la production des phytohormones comme le jasmonate qui est l'hormone essentielle à l'organisme mais aussi à son mécanisme de défense (Rao *et al.*, 2000 ; Bachmann *et al.*, 2002). Cette hormone est impliquée dans la transcription de certains gènes, on appelle cette voie : la voie du jasmonate (Schaller *et al.*, 2009). De plus, la surexpression de la méthyltransférase du jasmonate, par exemple, chez *Arabidopsis thaliana* augmente la résistance à *Botrytis cinerea* (Seo *et al.*, 2001 ; Mène-Saffrané *et al.*, 2003). A savoir que les hormones régulent également l'activité des enzymes de détoxification (Feussener et Wasternack, 2002). Parmi elles, on retrouve l'acide abscissique, l'auxine, l'acide gibbérellique, l'acide jasmonique, l'acide salicylique. Elles sont également produites à la suite d'autres types de stress qui, eux-mêmes, peuvent induire la production des ERO.

- ❖ L'acide abscissique est une hormone impliquée dans la réponse au stress hydrique et au stress lié au froid.
- ❖ L'acide jasmonique agit en réponse au stress mécanique, aux attaques d'insectes, et de pathogènes (Vick et Zimmermann, 1983).
- ❖ L'éthylène est une hormone produite en réponse au stress hypoxique, ou en réponse à des attaques d'insectes ou de pathogènes.
- ❖ L'acide salicylique agit en réponse aux attaques de pathogènes biotrophes.

D'autres rôles ont été définis pour les oxylipines comme ceux antimicrobiens, antifongiques ou anti-oomycètes : 13-HPOT, 13-HOT. Au-delà de leur participation aux défenses de la plante, les oxylipines ont aussi un rôle dans la croissance cellulaire.

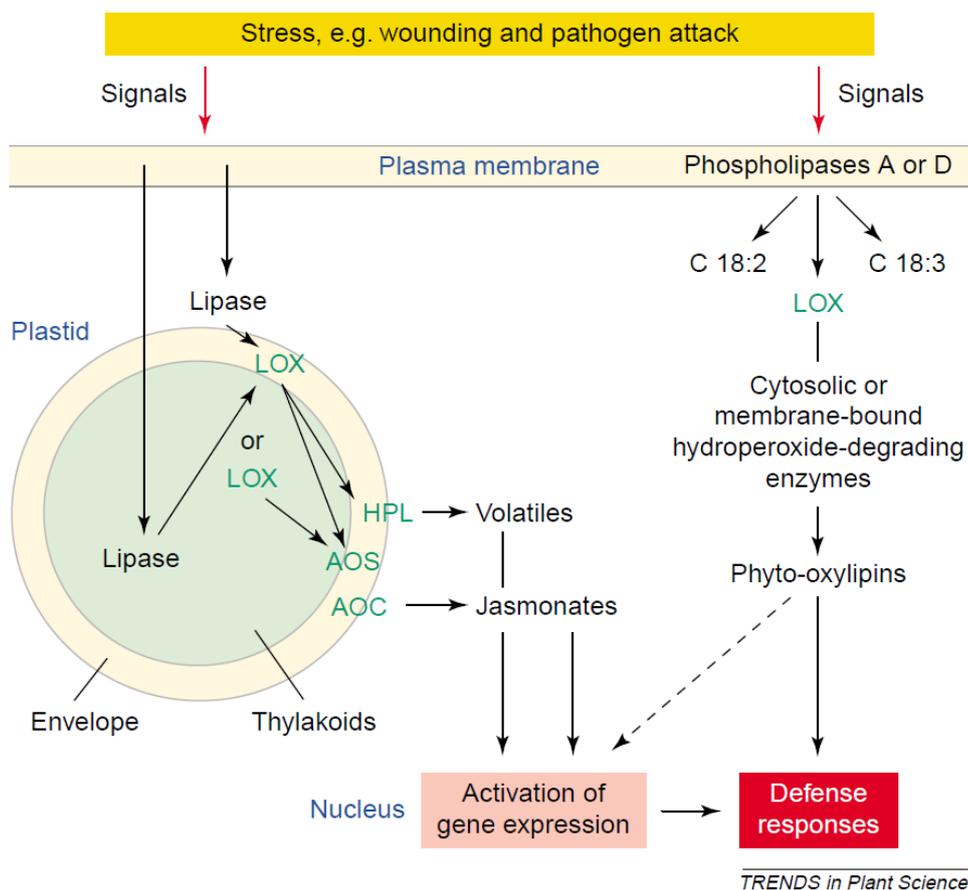


Figure n° 17. Défense par les métabolites de la peroxydation lipidique.

Cette figure met en évidence la signalisation cellulaire impliquée dans la réponse à un stress et impliquant les oxylipines et les hormones (Blée *et al.*, 2002).

3 Les oxylipines : signalisation et rôles

Les activités de signalisation impliquent des oxylipines issues des deux catégories précédentes comme les 9 ou 13 HPOD/T, l'acide jasmonique, le méthyl jasmonate, le 12-Oxo-PDA, le 13-HPL, le dérivé aldéhyde en C₆ et les dérivés d'acides gras électrophiles comme les KOD et KOT (figure n° 17) (Rustérucchi *et al.*, 1999 ; Knight *et al.*, 2001 ; Alméras *et al.*, 2003 ; Farmer *et al.*, 2007). A plus grande échelle, ces molécules participent à la signalisation moléculaire impliquée dans la croissance et le développement de la plante, dans la défense contre les attaques pathogènes, dans la résistance face aux stress, dans la production d'hormones de stress, dans la programmation de la mort cellulaire, dans la fermeture des stomates, dans la biosynthèse de la lignine, dans l'induction d'un stress osmotique (Satoh *et al.*, 2014)...

4 Défenses contre les oxylipines toxiques

Pour se protéger des oxylipines toxiques, certaines enzymes ont pour objectif de réduire la fonction alcène ou le groupement carbonyle des RC appartenant aux oxylipines afin de diminuer leur réactivité. En effet, comme la figure n° 16 a pu le montrer, ces deux fonctions chimiques sont celles réagissant avec les molécules organiques essentielles. Les enzymes permettant la détoxification des RC sont : les aldéhydes déshydrogénases (ALDH), les aldo/kéto réductases (AKR) ou les aldéhydes réductases (ALR) et les alkénones réductases (AER). Ces enzymes peuvent transformer les carbonyles en alcool (ALDH, AKR ou ALR) ou réduire la double liaison (AER) (figure n° 18).

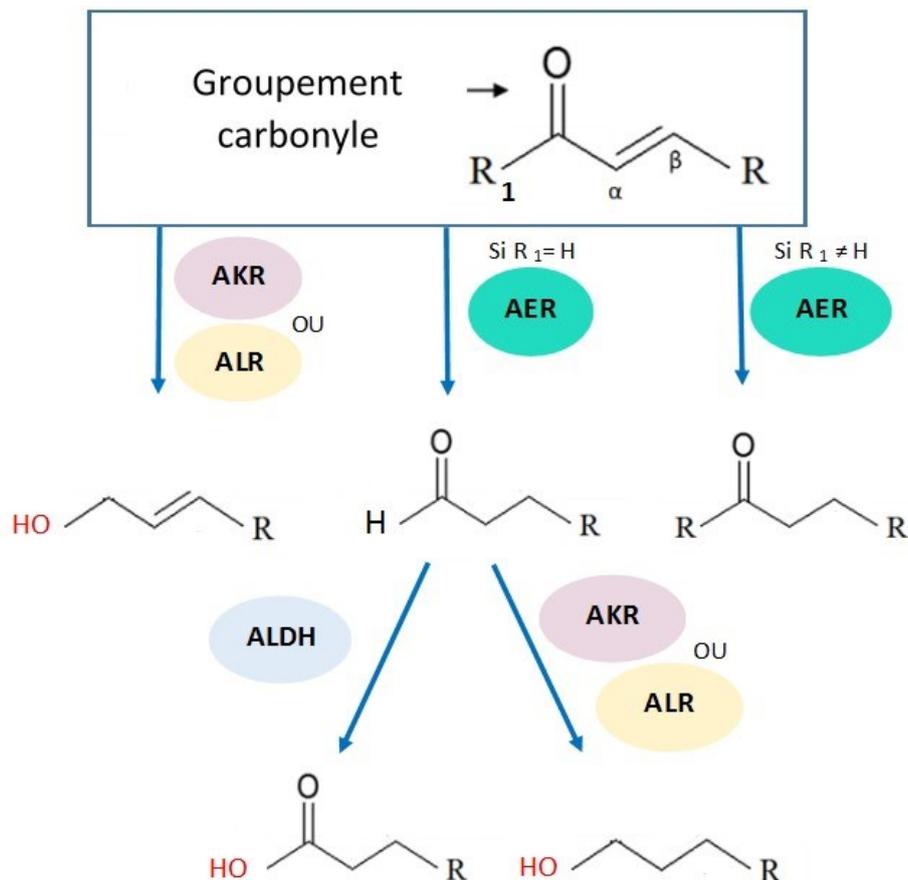


Figure n° 18. Enzymes de détoxification agissant sur les RC.

Les enzymes permettant la réduction des RC sont présentées ci-dessus. Les molécules non-réactives issues des réactions enzymatiques sont également présentées dans cette figure.

Dans le cadre de cette étude, nous nous intéresserons aux enzymes de plante permettant la détoxification.

4.1 Aldéhydes déshydrogénases

Chez *Arabidopsis thaliana*, 14 gènes d'ALDH sont exprimés dans les différents compartiments cellulaires. L'expression de ces gènes est induite lorsque la plante est soumise à un stress (Kotchoni *et al.*, 2006). Deux enzymes permettent, grâce à cette régulation, de lutter contre le stress oxydant et osmotique. Au niveau du cytoplasme, l'ALDH est nommée ALDH7B4, et celle du chloroplaste est nommée l'ALDH3I1 (Stiti *et al.*, 2011, 2014). Elles sont des aldéhydes déshydrogénases détoxifiant l'organisme par la suppression des ERO et des dérivés de la peroxydation lipidique toxiques (Missihoun *et al.*, 2011 ; Sunkar *et al.*, 2003 ; Kotchoni *et al.*, 2006). Cette enzyme fixe le NAD⁺ et le NADP⁺.

4.2 Aldo/kéto réductases

La superfamille des AKR est divisée en quatre groupes (figure n° 19 et n° 20) (Zhang *et al.*, 1994). Le groupe I est celui permettant la réponse au stress. C'est donc celui qui sera décrit. Ce groupe, auquel appartient AKR4C9 (chloroplaste) ainsi que des homologues d'AKR4C9, est retrouvé chez différentes espèces de plantes (Penning *et al.*, 2015).

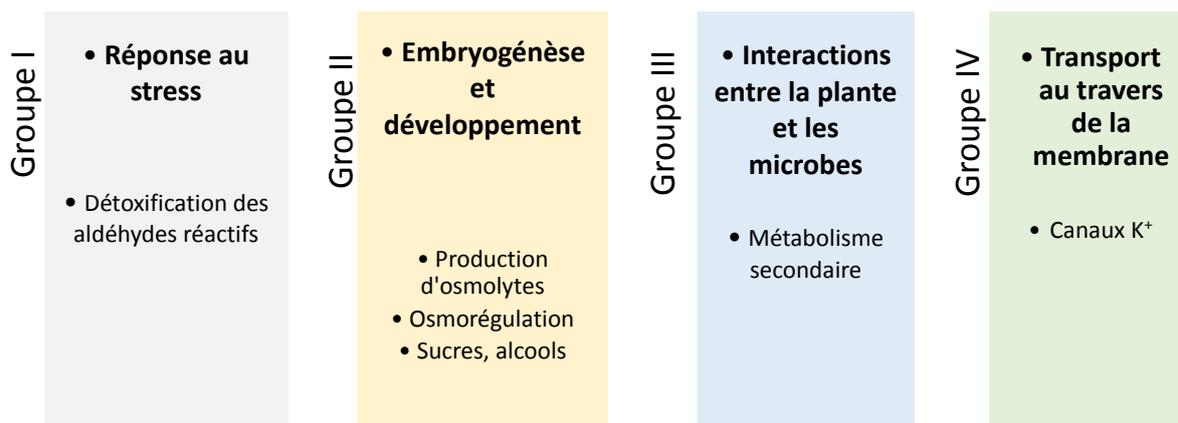


Figure n° 19. Rôles des AKR de plante.

La superfamille des AKR est divisée en quatre groupes. Le groupe I regroupe les enzymes impliquées dans la réponse au stress, le groupe II est impliqué dans l'embryogénèse et la production d'osmolytes, le groupe III est impliqué dans les interactions entre la plante et les microbes, puis le groupe IV est impliqué dans le transport ionique au travers de la membrane.

Les résidus catalytiques sont conservés et sont localisés sur trois boucles flexibles responsables de la grande diversité de substrat pour ces enzymes (pour revue, Segunpta *et al.*, 2015). Cependant les cétones ne sont pas des molécules substrats des AKR4C9, or les RC peuvent être des cétones. Leur inhibition consiste à altérer le site catalytique en modifiant la position des boucles dans l'espace lors de la fixation de l'inhibiteur. La conformation change et nécessite un mouvement du squelette carboné tout comme des chaînes latérales (Simpson *et al.*, 2009).

4.3 Alkénone - Alkénal/one oxydoréductases

Les oxydoréductases comme les alkénones oxydoréductases sont impliquées dans la détoxification : parmi elles, on peut citer l'« Alkénone **Oxido**Reductase d'*Arabidopsis thaliana* » l'*AtAOR* (numéro d'accèsion TAIR : AT1G23740) (Miras *et al.*, 2002 ; Youn *et al.*, 2006). L'*AtAOR* est une Alkénone **Oxydo**Réductase (AOR), appartenant à la superfamille des MDR et à la famille des AOR de plantes (figure n° 20).

Elle est localisée dans le stroma du chloroplaste et a pour substrat des RC dont la chaîne carbonée est composée de moins de six atomes de carbone. L'*AtAOR* est annotée comme étant une quinone oxydoréductase et elle possède le motif de Rossmann lui permettant de fixer le NADPH (GAGGXX).

Il existe également l'« AlkEnal/one Reductase d'*Arabidopsis thaliana* », l'*AtAER* qui est localisée dans le cytosol et le noyau (Mano *et al.*, 2005). C'est une enzyme appartenant à la superfamille des MDR, et plus précisément à la famille des AOR conventionnelles, une famille différente de celle de l'*AtAOR* (figure n° 20). Elle permet de réduire un nombre de substrats important. Cependant à cause de sa localisation, l'*AtAER* ne réduit pas les oxylipines dérivées de la voie des 13-LOX localisées dans le chloroplaste (Wagner *et al.*, 2002 ; Kotchoni *et al.*, 2006 ; Yamauchi *et al.*, 2011, 2012 ; Stiti *et al.*, 2014).

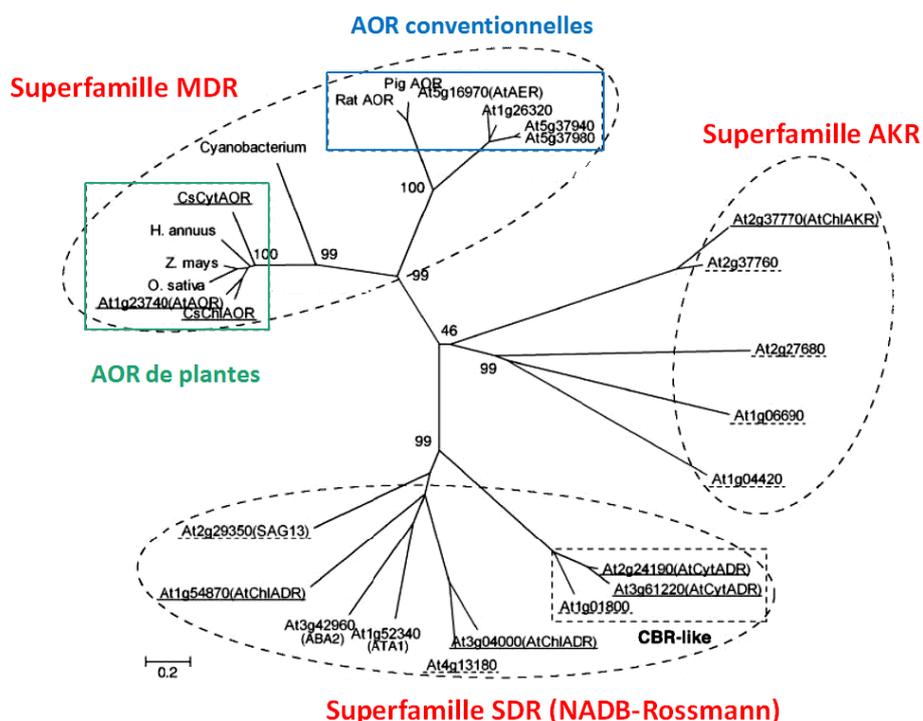


Figure n° 20. Superfamilles d'enzymes réduisant les RC.

Cet arbre met en évidence les superfamilles (entourées) et les familles (encadrées) d'enzymes réduisant les RC. La superfamille des MDR est composée des AOR de plantes et des AOR conventionnelles, la superfamille des SDR est composée, entre autres, des CBR, « Carbonyl Binding Reductase » et la superfamille des AKR est également indiquée. Le chiffre indique le pourcentage d'arbres répliqués (Yamauchi *et al.*, 2011).

Le nombre d'enzymes capables de réduire les RC dans le chloroplaste est toutefois limité.

MATERIEL

ET METHODES

Partie I. BIOLOGIE MOLECULAIRE

1 Les gènes d'intérêt

Les constructions des gènes, excepté IEP32HT, ont été réalisées par le Dr Gilles CURIEN et Cécile GIUSTINI du Laboratoire de Physiologie Cellulaire et Végétale dirigé par le Dr Norbert ROLLAND au CEA, à Grenoble. IEP32 est la protéine sauvage et IEP32HT correspond à la protéine IEP32 sur laquelle a été ajoutée une étiquette poly-histidine et un site de clivage à la « Tobacco Etch Virus » (TEV) en *N*-terminal.

1.1 Gène codant pour la ceQORH

L'ADNc d'*Arabidopsis thaliana* codant pour la protéine ceQORH (numéro d'accension TrEMBL : Q9SV68) a été inséré dans le plasmide pET30a(+).

1.2 Gène codant pour la CaM1

L'ADNc codant pour la CaM1 (numéro d'accension TrEMBL : P0DH95) d'*Arabidopsis thaliana* a été inséré dans le plasmide pET15b.

1.3 Gène codant pour IEP32

L'ADNc d'*Arabidopsis thaliana* codant pour la protéine IEP32 (numéro d'accension TrEMBL : A2RVM0) a été inséré dans le plasmide pET20b. Le gène d'IEP32HT a été inséré dans le plasmide pET28a(+).

2 Extraction d'un ADN plasmidique

L'objectif est d'isoler et de purifier l'ADN plasmidique. Pour cette manipulation appelée « minipréparation », un kit de QIAGEN® (QIAprep®) a été utilisé en suivant le protocole rédigé par QIAGEN® (www.qiagen.com). A la fin de l'expérience, la concentration en plasmide est déterminée par mesure de la densité optique (DO) à 260 nm selon la référence : 1 DO = 50 µg/mL.

3 Mutagenèse dirigée : mutants de la ceQORH

Pour cette étude, l'objectif est de construire quatre mutants de la ceQORH : Y14A, Y14F, R58A, R58Q.

3.1 Protocole expérimentale de la mutagenèse dirigée

Nous avons réalisé la mutagenèse dirigée à l'aide d'un kit QuickChange® (Stratagene – Agilent technologies) (Kunkel *et al.*, 1985 ; Vandeyar *et al.*, 1988 ; Sugimoto *et al.*, 1989).

3.2 Création des amorces pour la mutagenèse dirigée

Les amorces permettant l'insertion d'une mutation dans la séquence de l'ADNc de la ceQORH ont été créées en utilisant le site d'Eurofins MWG Genomics (www.eurofinsgenomics.eu/). L'outil « Primer Design Tools » permet de créer une amorce qui sera la plus favorable à la réussite de la mutagenèse. Les amorces sont conçues de façon à éviter un appariement non-spécifique et/ou un auto-appariement (tableau n° 2). Les oligonucléotides achetés chez Eurofins MWG operons (www.eurofinsgenomics.eu) sont dissous dans 10 mM de tampon Tris-HCl pH 7 à une concentration de 100 picomoles/ μ L.

Nom des amorces	Séquence des amorces (5' à 3')	Longueur (nt.)	T _m (°C)	Energie des mésappariements (%)
Tyrosine 14 en Alanine				
t40g_a41c_anti-sens	5'-cgccaccaccggcagagtgactgaagagcgtg-3'	34	78.68	1.05
t40g_a41c	5'-cacgctcttcagtacaactctgccgggtgtggcg-3'	34	78.68	1.89
Tyrosine 14 en Phénylalanine				
a41t	5'-gctcttcagtacaactcttcgggtgtggcg-3'	31	78,98	4.09
a41t_anti-sens	5'-cgccaccaccgaaagagtgactgaagagc-3'	31	78.98	1.54
Arginine 58 en Alanine				
c172g_g173c_anti-sens	5'-gcggggcagaaatggggcgatcattccttctga-3'	34	78.68	13.35
c172g_g173c	5'-tcagaaaggaatgatcgccccatttctgccccgc-3'	34	78.68	13.17
Arginine 58 en Glutamine				
g173a_c174g_anti-sens	5'-cttgcggggcagaaatggctggatcattccttctgaa-3'	38	78.97	12.85
g173a_c174g	5'-tcagaaaggaatgatccagccatttctgccccgcaag-3'	38	78.97	12.92

Tableau n° 2. Caractéristiques des amorces pour la mutagenèse dirigée de la ceQORH.

3.3 Protocole de la mutagenèse dirigée de la ceQORH

Les conditions expérimentales sont les suivantes. Les plasmides et les oligonucléotides sont dosés, 40 ng et 125 ng respectivement sont nécessaires en vue des expériences de mutagenèse dirigée. La mutagenèse s'est faite à l'aide du mélange des solutions présentées ci-dessous (le paramètre variant pour R58Q est en vert) :

Type de solution	Concentration finale
Tampon de Phusion 5X	1X soit 10 µL
dNTP (2'-deoxynucleoside 5'-triphosphate)	200 µM
Amorce sens	0,5 µM
Amorce anti-sens	0,5 µM
Phusion	1 unité/50 µL PCR
Plasmide	40 ng
DMSO (diméthylsulfoxyde)	3 %
Eau	Qsp 50 µL

Tableau n° 3. Mélange PCR pour les mutants de la ceQORH.

Le cycle PCR réalisé est présenté dans le tableau ci-dessous, pour l'un des mutants, R58Q, le cycle PCR a été légèrement modifié (en vert).

Etape	Température	Temps
Dénaturation	98°C (95°C)	30 secondes
Hybridation (16 cycles) (32 cycles)	98°C (95°C)	30 secondes
	52°C	30 secondes
	72°C	4 minutes 30 secondes
Extension	72 °C	5 minutes (10 minutes)

Tableau n° 4. Cycles PCR appliqués afin d'obtenir les mutants de la ceQORH.

Une fois la cible amplifiée, le plasmide parent est digéré à l'aide de DpnI (2U/µL) à 37°C pendant une heure. Après digestion, les plasmides sont amplifiés dans les cellules compétentes DH5αTM. L'ADN plasmidique est ensuite dosé et séquencé.

4 Insertion d'une étiquette poly-histidine et d'un site de clivage à la TEV sur IEP32

4.1 Insertion d'une étiquette poly-histidine et d'un site de clivage à la TEV

L'objectif est d'insérer à l'extrémité *N*-terminale de la séquence codante d'IEP32 une étiquette poly-histidine suivie d'un site de clivage à la TEV dans le but de faciliter sa purification et de pouvoir ensuite supprimer l'étiquette. Le site de clivage choisi est celui de la TEV car c'est une protéase très spécifique.

4.2 Création des amorces contenant l'étiquette poly-histidine et le site de clivage

L'oligonucléotide (sens) utilisé pour l'insertion d'une étiquette poly-histidine et d'un site de clivage du côté *N*-terminal est :

GATACCATGGGACATCATCATCATCACGGCACGGGTGAAAATCTGTACTTCAAGGCTGGTTTTTGGATCGAAAGGAG

- ✓ Les nucléotides supplémentaires nécessaires à la digestion par les enzymes de restriction sont en rose.
- ✓ Le site de restriction de NcoI est souligné.
- ✓ Le codon initiateur est présenté en vert.
- ✓ Le tag poly-histidine et le site de clivage à la TEV sont présentés en marron.
- ✓ La séquence permettant l'hybridation à la matrice (T_m : 56,5 °C) est représentée en violet.

L'oligonucléotide anti-sens est construit selon le même principe. Les oligonucléotides sont dilués dans de l'eau stérile pour obtenir une concentration de 115,8 μ M pour l'oligonucléotide sens et 128,4 μ M pour l'oligonucléotide anti-sens.

4.3 Amplification du plasmide parent

La température utilisée pour la PCR est de 52°C au lieu de 55°C utilisé habituellement car la solution comporte du DMSO ainsi que de la bétaine. Ces éléments diminuent la température d'hybridation (tableau n° 5, le paramètre variant est représenté en vert). La bétaine et le DMSO sont utilisés comme additifs pour augmenter la spécificité de l'hybridation car la présence d'une amorce de grande taille pourrait favoriser une amplification non-spécifique.

4.4 Purification du produit PCR

La purification du produit PCR est réalisée sur gel d'agarose à 1 % préparé dans du Tris-Acétate/EDTA (TAE) dont la composition est 40 mM de Tris-Acétate et 1 mM d'EDTA. Les fragments PCR sont extraits du gel grâce au kit nuxleospin extract II® (clontech).

Etape	Température	Temps
Dénaturation	98°C (95°C)	30 secondes
Polymérisation (34 cycles)	95°C	30 secondes
	52°C	30 secondes
	72°C	1 minute 25 secondes
Extension	72°C	5 minutes

Tableau n° 5. Cycles PCR pour l'amplification du gène d'IEP32HT.

4.5 Clonage du gène d'IEP32HT

4.5.1 Préparation du plasmide

Le gène d'IEP32 est introduit dans le plasmide pET28a(+). Pour cela, le plasmide est digéré par deux enzymes de restrictions : NcoI (1U) et BamHI (2U). Puis, le plasmide est déphosphorylé à l'aide de la phosphatase alcaline pendant une heure à 37°C. L'ADN linéaire et déphosphorylé est purifié sur gel d'agarose à 0,8 %.

4.5.2 « Ligation »

Une fois le plasmide obtenu et les produits PCR également, il faut réaliser la « ligation ». Pour cela, 50 ng de plasmide et 39 ng d'insert sont utilisés en présence de ligase à température ambiante. Il est important que les inserts soient largement en excès pour une « ligation » optimale. Une transformation des bactéries DH5 α TM est ensuite réalisée. Chaque colonie obtenue est repiquée et une extraction de l'ADN plasmidique est ensuite réalisée. Un dosage des plasmides est réalisé avant de les séquencer (par MWG operons).

Partie II. BIOCHIMIE

1 Production des protéines d'intérêt

1.1 Transformation des bactéries compétentes

1.1.1 Principe et objectif d'une transformation

L'objectif est de pouvoir insérer le plasmide possédant la séquence codante de la protéine d'intérêt dans une souche d'*Escherichia coli* afin d'utiliser la machinerie protéique de la bactérie pour sur-exprimer la protéine d'intérêt.

1.1.2 Protocole de transformation

Les concentrations des antibiotiques utilisés sont de 30 µg/mL pour le chloramphénicol, de 100 µg/mL pour l'ampicilline et de 50 ou 100 µg/mL de kanamycine.

➤ L'expression de la ceQORH

Les bactéries compétentes Rosetta 2 sont transformées par le vecteur pET30a(+) possédant la séquence codante de la ceQORH. Rosetta 2 est une souche d'*E. coli* modifiée dans le but qu'elle soit capable de synthétiser efficacement les protéines contenant des codons rares, grâce à un plasmide contenant le gène de résistance au chloramphénicol, et codant pour des ARNt supplémentaires. Pour réaliser la transformation, 50 µL de bactéries compétentes sont mises sur la glace pendant 10 min. 1 µL de plasmide à 155 ng/µL est ajouté. Le mélange est conservé pendant 30 min sur la glace. Puis un choc thermique à 42°C est réalisé pendant 1 min 30 s. 950 µL de milieu LB est ajouté et l'ensemble est incubé à 37°C pendant une heure sous agitation. Puis les bactéries sont culotées en centrifugeant à 4000 g pendant 2 min à 4°C. Plusieurs volumes, 10 µL, 50 µL puis 100 µL sont étalés sur des boîtes LB agar (+ antibiotiques : chloramphénicol - kanamycine) au début des projets. De manière routinière, 100 µL sont étalés. Les boîtes sont placées à 37°C pendant une nuit.

➤ L'expression d'IEP32

Les bactéries compétentes Rosetta 2 sont transformées avec le vecteur pET20b(+) dans lequel la séquence codante pour IEP32 a été insérée. Pour réaliser la transformation, le protocole est identique à celui de la ceQORH. Mais dans ce cas, 1 µL de plasmide à 5 ng/µL est ajouté aux 50 µL de bactéries compétentes et les antibiotiques sont le chloramphénicol et l'ampicilline.

➤ L'expression d'IEP32HT

Le protocole est identique à celui de la ceQORH excepté que le vecteur est le pET28a(+) comportant la partie codante pour IEP32HT. 0,5 µL de plasmide à 75 ng/µL a été utilisé pour 50 µL de bactéries compétentes.

➤ L'expression de la TEV

La TEV sera utilisée ici dans le cadre du clivage de l'étiquette polyhistidine d'IEP32HT. Le protocole est identique à celui de la ceQORH excepté que les bactéries compétentes utilisées sont les BL21 résistantes à l'ampicilline.

➤ L'expression de la CaM1

Le protocole est identique à celui de la ceQORH. 1 µL de plasmide à 58 ng/µL a été ajouté à 100 µL de bactéries compétentes. Les antibiotiques sont l'ampicilline et le chloramphénicol.

1.2 Tests d'expression et de solubilité d'IEP32HT

1.2.1 Principe et objectif d'un test d'expression et de solubilité

Les tests d'expression permettent de déterminer dans quelle souche d'*E. coli* transformée avec le plasmide d'intérêt, la protéine sera le plus exprimée et de manière plus importante dans la fraction soluble afin d'obtenir un meilleur rendement. Cela peut nécessiter d'utiliser une souche synthétisant des ARNt qui correspondent à des codons rares chez *E. coli*. Ces tests visent aussi à déterminer la température adéquate de production de la protéine d'intérêt.

1.2.2 Protocole du test d'expression et de solubilité

Après l'insert de l'étiquette poly-histidine et du site de clivage à la TEV en *N*-terminal d'IEP32, deux souches différentes (Rosetta 2 et BL21) ont été transformées avec le plasmide dans lequel a été inséré le gène codant pour IEP32HT. Chacune de ces souches a été cultivée dans trois milieux différents (LB, TB, milieu auto-inductible) et a été placée à deux ou trois températures différentes pour l'induction à l'IPTG (3h à 37°C, sur la nuit à 20°C, sur deux jours à 20°C). Des gels SDS-PAGE à 12 % d'acrylamide sont réalisés pour déterminer la condition la plus intéressante.

1.3 Production des protéines d'intérêt

1.3.1 Principe et objectif de la production des protéines

Le plasmide portant le gène d'intérêt étant inséré dans une souche bactérienne, la surexpression du gène codant pour la protéine d'intérêt peut alors se faire. Les bactéries sont placées dans les conditions optimales à leur prolifération (milieu LB ou TB autoclavés...). Lorsque ces dernières atteignent la phase exponentielle de croissance, la transcription du gène d'intérêt est activée en levant la répression par l'ajout d'IPTG.

1.3.2 Protocole de la production des protéines

Chaque milieu utilisé est supplémenté par les antibiotiques nécessaires.

➤ Production de la ceQORH

Quelques colonies d'*E. coli* de souche Rosetta 2 possédant le vecteur codant pour la ceQORH sont ajoutées à 10 mL de milieu LB. La préculture est placée à 37°C, sous agitation à 220 rpm toute la nuit. Le lendemain, un litre de LB est inoculé de façon à ce que la densité optique initiale soit de 0,1. Lorsque la densité optique à 600 nm de la culture atteint 0,6 alors la température d'incubation est diminuée à 20°C. Quand la culture atteint la température souhaitée, 0,4 mM d'IPTG sont ajoutés pour induire l'expression de la protéine pendant une nuit. Puis, la culture est centrifugée à 5500 g pendant 30 min à 4°C. Le culot cellulaire est alors resuspendu dans le tampon de sonication puis est centrifugé à 4400 g pendant 15 min à 4°C. Le culot cellulaire est stocké à -20°C ou -80°C en fonction de la date de son utilisation.

➤ Production d'IEP32

La préculture est composée de 10 mL de LB et quelques colonies d'*E. coli* de souche Rosetta 2 possédant le vecteur codant pour IEP32. Elle est placée à 37°C, et sous agitation à 220 rpm pendant environ trois heures. La préculture est alors transférée dans 50 mL de LB, placée également à 37°C, à 220 rpm jusqu'à ce que la densité optique à 600 nm soit de 0,6. Alors 13 mL de préculture sont ajoutés à un litre de LB (+ 30 µg/mL de chloramphénicol et 100 µg/mL d'ampicilline). La culture est placée à 37°C, à 220 rpm. Une fois que la densité optique à 600 nm a atteint 0,8, la température est abaissée à 15°C et l'expression est induite sur la nuit en ajoutant 0,5 mM d'IPTG. La suite du protocole est identique à celui de la ceQORH.

➤ Production de la TEV

Une préculture de 10 mL de LB est préparée avec 100 µg/mL d'ampicilline et quelques microlitres d'un stock glycérol d'*E. coli* de souche BL21 possédant le vecteur codant pour la TEV. La préculture est placée à 37°C, sous agitation à 220 rpm toute la nuit. Puis 12 mL sont alors utilisés pour inoculer un litre de LB (+ ampicilline 100 µg/mL), la densité optique à 600 nm doit alors être de 0,1. Dès que la densité optique à 600 nm atteint 0,6, alors la température est abaissée à 27°C et l'expression est induite par l'ajout de 1 mM d'IPTG (concentration finale) puis la culture est placée sous agitation à 220 rpm pendant trois heures. La suite du protocole est identique à celui de la ceQORH.

➤ Production de la CaM

Le protocole est identique à celui de la ceQORH. La température pour l'induction est de 30°C et l'induction se fait avec 0,5 mM d'IPTG.

2 Purification des protéines d'intérêt

2.1 Principe et objectif d'une purification

La protéine d'intérêt est produite par des bactéries et donc, initialement en présence d'un grand nombre d'autres molécules contenues dans les bactéries (autres protéines, acides nucléiques, lipides...). La purification d'une protéine consiste à isoler la protéine d'intérêt des autres constituants cellulaires par un enchaînement d'étapes de purification. La première étape correspond à la centrifugation après la lyse cellulaire qui permet d'éliminer des composants insolubles et autres petites molécules s'y fixant. Chaque étape est réalisée en utilisant un système FPLC à température ambiante ou à 4°C. Pour chaque étape, l'absorbance à 280 nm est mesurée permettant de suivre l'évolution de la purification. A la fin de chaque étape, une analyse des échantillons est effectuée sur un gel SDS-PAGE (12 % ou 15 % d'acrylamide) afin de choisir les fractions les plus pures contenant la protéine d'intérêt. L'objectif est d'obtenir une protéine pure avec le meilleur rendement possible.

2.2 Protocoles de purification des protéines d'intérêt

La liste des solutions utilisées est donnée en Annexe n° 3. Chaque étape de purification se termine par un contrôle des échantillons sur gels SDS-PAGE de 12 % ou 15 % d'acrylamide.

2.2.1 Purification de la ceQORH

Le culot cellulaire (provenant de deux litres de culture) est resuspendu dans le tampon de sonication, auquel une pastille anti-protéase (Sigma Aldrich®) a été ajoutée ainsi que 0,2 % final de streptomycine. Pour lyser les cellules, la solution cellulaire placée dans la glace est soniquée pendant 12 minutes avec une durée de 2 secondes par pulse et de 8 secondes de pause et ceci à 40 % d'amplitude de l'intensité maximale. Les débris cellulaire sont séparés des protéines et molécules solubles par centrifugation à 15000 rpm pendant 45 min à 4°C. Le surnageant est filtré au travers d'un filtre avec un seuil de rétention de 0,2 µm. Le filtrat est injecté sur une colonne DEAE-Sepharose® qui est une échangeuse d'anions faible. Les protéines passant au travers de la DEAE-Sepharose® sont fractionnées. Les protéines obtenues à la suite de l'élution de la colonne ne sont pas conservées. Les fractions intéressantes sont rassemblées puis sont congelées à -80°C ou dialysées pendant la nuit à 4°C contre le tampon dialyse 1. Le pool de l'étape précédente est décongelé rapidement à 37°C. Sans concentrer, 150 mL de l'étape précédente sont injectés sur la colonne S (ou SP) Sepharose® qui est une échangeuse de cations forte. Le pool peut cependant être concentré avant injection, à l'aide d'un concentrateur de 10 kDa (MILLIPORE®-Fisher Scientific). L'élution se fait par un gradient de tampon B S Sepharose® jusqu'à 50 % de B sur 10 volumes de colonne (CV) à un débit de 1 mL/min. Le pool contenant la ceQORH est ensuite dialysé contre le tampon dialyse 2 et est concentré à l'aide d'un concentrateur de 10 kDa. Une chromatographie d'exclusion moléculaire (HiLoad Superdex® 200 16/60 de 120 mL de résine) équilibrée dans le tampon GF est ensuite réalisée. Cette colonne permet de séparer les molécules en fonction de leur rayon hydrodynamique (taille, forme, degré d'hydratation...). La protéine est éluée, concentrée, puis aliquotée (avec ou sans ajout de 20 % de glycérol en fonction des tests effectués après) puis congelée rapidement dans l'azote liquide avant d'être stockée à -80°C.

2.2.2 Purification du mutant de la ceQORHR58A

Le culot cellulaire de deux litres de culture est décongelé. Le protocole est pratiquement identique à la ceQORH. Une des différences est la sonication où la solution cellulaire a été placée dans la glace et est soniquée pendant 12 minutes avec une durée de 2 secondes par pulse et de 10 secondes de pause et ceci à 40 % d'amplitude puis quelques secondes à 60 %. Ensuite la seconde différence est l'élution sur la S Sepharose® qui se fait avec un gradient de B jusqu'à 40 % sur 20 CV à un débit de 1 mL/min.

2.2.3 Purification d'IEP32

Le culot cellulaire utilisé correspond à quatre litres de culture. Le reste est identique au protocole de la ceQORH concernant la lyse cellulaire. Le filtrat est injecté sur une Q Sepharose[®] ou sur une DEAE. La protéine ne se fixe pas à la colonne, elle va donc être éluée et fractionnée en même temps. Les fractions sont rassemblées en fonction des résultats des analyses sur gel SDS-PAGE puis placées à 4°C. Le pool contenant IEP32 est concentré à l'aide d'un concentrateur de 3 kDa (MILLIPORE[®]-Fisher Scientific) puis est injecté sur une S Sepharose[®]. L'éluion se fait par un gradient de B jusqu'à 50 % sur 2 CV mais en réalisant des arrêts de gradient dès l'apparition de pics d'absorbance à 280 nm. Les fractions d'intérêt sont rassemblées, puis dialysées. La même étape est réalisée à nouveau sur une SP-Sepharose[®]. La protéine est ensuite aliquotée (ajout de 10 % de glycérol pour certains) puis est congelée rapidement dans l'azote avant d'être stockée à -80°C.

2.2.4 Purification d'IEP32HT

Le culot cellulaire correspondant à un litre de culture placé à -80°C est décongelé, puis resuspendu dans le tampon de sonication auquel une pastille anti-protéase a été ajoutée. Les cellules sont lysées de la même manière que lors de la purification de la ceQORH. La protéine est purifiée en utilisant une chromatographie d'affinité sur résine Ni-NTA. En effet, les protéines ayant beaucoup d'histidine ont une forte affinité pour le nickel, dont évidemment, celles auxquelles on a ajouté une étiquette poly-histidine. Puis un gradient linéaire d'imidazole est réalisé. Une séparation en deux lots de la protéine est réalisée (*cf.* p.227). Une dialyse est réalisée contre le tampon A pour éliminer l'imidazole. Ensuite une tentative de clivage de l'étiquette poly-histidine par la TEV est réalisée sur un des lots de protéine (sur la nuit à 4°C sous agitation). Pour vérifier si le clivage s'est bien produit une seconde étape de purification sur colonne d'affinité est réalisée pour séparer la TEV d'IEP32. Les fractions intéressantes sont rassemblées et concentrées. Une chromatographie d'exclusion moléculaire est réalisée à l'aide d'une colonne Superdex[®] 75 de 120 mL de résine qui est équilibrée dans le tampon GF. La protéine est finalement concentrée, aliquotée (ajout de 20 % de glycérol pour certains lots de protéines) puis est stockée à -80°C.

2.2.5 Purification de la TEV

Le culot cellulaire de deux litres de culture placé à -80°C est décongelé sur la glace (culot de BL21 TEV). La lyse se fait de la même manière que celle d'IEP32HT. La fraction cellulaire soluble est alors chargée sur une résine Ni-NTA à 4°C . L'éluat est collecté, un lavage avec 10 % de tampon B Ni-NTA puis un gradient de 10 % à 100 % de tampon B Ni-NTA sur 10 CV sont réalisés. Les fractions contenant la TEV sont collectées et sont réunies. La concentration de la TEV ne doit pas être trop élevée car la TEV précipite à forte concentration. Puis elle est dialysée à 4°C et elle est concentrée à l'aide d'un concentrateur de 10 kDa, puis aliquotée et congelée à -80°C .

2.2.6 Purification de la CaM1

Le culot cellulaire de quatre litres de culture, placé à -80°C , est décongelé. Le culot est resuspendu dans 100 mL de tampon de sonication, auquel une pastille anti-protéase a été ajoutée ainsi que 0,2 % final de streptomycine. La suite de la lyse est identique à celle de la ceQORH excepté l'amplitude de la sonication qui est de 50 % de l'intensité maximale. La DEAE-Sepharose[®] est équilibrée puis le filtrat est injecté sur la colonne. L'élution se fait par un gradient atteignant 100 % de tampon B DEAE sur 5 CV à un débit de 1 mL/min. Les fractions intéressantes sont identifiées, dialysées puis concentrées à l'aide d'un concentrateur de 3 kDa (MILLIPORE[®]-Fisher Scientific). Une MonoQ[®], une échangeuse d'anions, est réalisée. L'élution se fait par un gradient atteignant 50 % de tampon B MonoQ[®] sur 20 CV à un débit de 1 mL/min. Les fractions intéressantes sont identifiées, dialysées puis concentrées. Une chromatographie d'exclusion moléculaire dans le tampon GF sur une colonne HiLoad 16/60 Superdex[®] 75 est ensuite réalisée. La protéine pure est ensuite concentrée à l'aide d'un concentrateur de 3 kDa puis est congelée rapidement dans l'azote liquide avant d'être stockée à -80°C .

3 Enzymologie : tests d'activité de la ceQORH, d'IEP32 et d'IEP32HT

3.1 Principe, objectif et protocole des tests d'activité de la ceQORH

L'utilisation du NADPH, pour réduire certains substrats par la ceQORH, a pour conséquence une diminution de l'absorbance à 340 nm, longueur d'onde à laquelle absorbe le NADPH. Le test d'activité de la ceQORH est réalisé dans une solution constituée de 10 mM d'HEPES pH 8, 200 mM KCl et de 200 μM de NADPH. La réaction est déclenchée par l'ajout de substrat tel que la chalcone (100 μM).

3.2 Principe, objectif et protocole des tests d'activité d'IEP32 et IEP32HT

Le principe est le même que pour la ceQORH. Le test d'activité est réalisé dans une solution constituée de 10 mM d'HEPES pH 7,5 ou 8, de 1 à 160 μ M de NADPH, (et pour certains, en présence de liposomes ou de glycérol). La réaction est déclenchée par l'ajout de substrats :

- ✓ 9,10 phénanthrène quinone dans du diméthylformamide à une concentration finale de 50 μ M.
- ✓ dodecanal à une concentration finale de 100 mM ou 20 mM en fonction du test.

4 Western blot d'IEP32 et d'IEP32HT

4.1 Principe et objectif du western blot

Le western blot permet de mettre en évidence de manière spécifique si la protéine étudiée d'un échantillon est bien celle que l'on souhaite étudier. Pour cela, on utilise les anticorps spécifiques à la protéine ou spécifiques à l'étiquette poly-histidine.

4.2 Protocole du western blot anti-histidine pour identifier IEP32HT

Le transfert du gel SDS-PAGE sur une membrane de nitrocellulose est réalisé en suivant un protocole classique. Pour faire la révélation, la membrane baignant dans le PBSt est mis sur une table à agitation pendant 15 min, puis dans le PBSt/lait (PBStl) permettant de saturer la membrane et ensuite pendant 30 min dans le PBSt/anticorps. L'anticorps, l'anti-histidine, doit être dilué au 1/10000^{ième}. Afin de supprimer l'excédent d'anticorps, trois lavages de 10 min dans le PSBt sont réalisés. Un lavage de 5 min est réalisé dans l'eau puis des pastilles de Sigma[®] fast 3,3' diaminobenzidine (DAB) sont diluées dans 1 mL d'eau. Le DAB a la capacité de localiser l'activité peroxydase. L'observation des bandes d'intérêt se fait directement à l'œil nu.

4.3 Protocole du western blot anti-IEP32

La première étape est identique pour tous les westerns blot. Pour faire la révélation, le processus est le même que précédemment. L'anticorps anti-IEP32 provenant de lapin doit être à un ratio de 1/10000^{ième}. Afin de supprimer l'excédent d'anticorps, trois lavages de 10 min dans le PSBtl sont effectués. L'anticorps secondaire anti-anticorps primaire est alors dilué au 1/10000^{ième} dans le PBStl (Amersham et Jackson Labs). La membrane est placée sous agitation pendant trois heures, et un nouveau rinçage sur une nuit est réalisé dans le PBStl. La membrane, placée dans une pièce avec une lumière rouge, est photographiée. Pour cela, le matériel nécessaire est une cassette, un film auto-radiographique, un révélateur ECL (Enhance

ChemiLuminescence) Pico Western system (Pierce), de l'eau et pour finir d'un fixateur. En effet, c'est le principe de la chimioluminescence. L'anticorps secondaire est couplé à la HRP qui métabolise l'ECL, réactions permettant de générer de la lumière afin de la photographier. Les résultats des « photographies de cette membrane » peuvent alors être visibles à l'œil nu. Le temps nécessaire de mise en contact entre le film et la membrane dans la cassette est d'environ de 4 secondes mais plusieurs tests doivent être réalisés avant d'obtenir des bandes bien définies.

5 Séquençage *N*-terminal d'IEP32

5.1 Principe et objectif du séquençage *N*-terminal

L'objectif de cette méthode est de déterminer les premiers résidus d'une chaîne polypeptidique localisés à l'extrémité *N*-terminale.

5.2 Protocole du séquençage *N*-terminal

Le séquençage *N*-terminal a été réalisé par la plateforme de séquençage protéique de l'IBS dirigée par le Dr Jean-Pierre ANDRIEU et est réalisé à l'aide d'un séquenceur Applied Biosystems®. La concentration de l'échantillon d'IEP32 est de 1,16 mg/mL soit 33,40 picomoles/μL. La protéine doit être pure à plus de 90 % et la concentration doit être supérieure à 30 picomoles/μL. Les acides aminés sont identifiés par HPLC, sur Applied Biosystems Model 140C®. L'analyse des données est réalisée avec le logiciel Applied Biosystems Model 610A (version 2.1).

6 Gel natif pour l'étude du complexe ceQORH-CaM

6.1 Principe et objectif d'un gel natif

L'objectif est de conserver la protéine sous forme native afin de séparer les molécules en fonction de leur poids moléculaire, de leur charge nette globale ainsi que de leur structure tridimensionnelle. La protéine étant dans son état natif, cela permet de conserver les interactions entre les monomères lorsque les protéines sont multimériques et/ou lorsqu'il existe une interaction entre différents partenaires protéiques d'un complexe. Le principe d'un gel natif également appelé gel non-dénaturant est de faire migrer des protéines chargées sur un gel d'acrylamide sans composants dénaturants tels que le sodium dodécyl sulfates (SDS) ou le dithiothréitol (DTT).

6.2 Protocole des gels natifs

Le système utilisé est le système BIO-RAD®. Un gel d'acrylamide natif à 10 % est préparé dans les conditions suivantes :

- 10 % d'acrylamide: bis-acrylamide (37,5 : 1)
- 0,1 % ammonium persulfate (APS)
- 0,02 % de tétraméthyléthylènediamine (TEMED)
- 0,5X Tris Borate (TB)

La migration est réalisée à 100 V pendant une heure ou trois heures à 4°C. Le tampon de migration est du TB à 0,5X. Les échantillons sont préparés avec du glycérol. Un échantillon de bleu de Bromophénol est également déposé comme témoin de migration.

Les proportions des échantillons sont de 10,2 µg de ceQORH pour 4,8 µg de CaM (15 µg de complexe) puis de 3,4 µg de ceQORH pour 1,6 µg de CaM (5 µg de complexe) pour un premier gel. Puis des contrôles sont déposés à une concentration molaire de 58 µM, 20 µM pour la ceQORH seule et de 71 µM, 26 µM pour la CaM seule (tableau n° 6). Pour le gel suivant, le NADPH à une concentration de 1,5 mM et le calcium (Ca²⁺) à 1 mM pour chaque complexe ont été ajoutés.

	Piste 1	Piste 2	Piste 3	Piste 4	Piste 5	Piste 6	Piste 7
CaM							
µM	20	20	20	20	20	20	20
Concentration (mg/mL)	0,336	0,336	0,336	0,336	0,336	0,336	0,336
Masse (µg)	3,36	3,36	3,36	3,36	3,36	3,36	3,36
ceQORH							
µM	80	60	40	20	10	5	0
Concentration (mg/mL)	2,744	2,058	1,372	0,686	0,343	0,1715	0
Masse (µg)	27,44	20,58	13,72	6,86	3,43	1,715	0
Ratio CaM : ceQORH	4 : 1	3 : 1	2 : 1	1 : 1	1 : 2	1 : 4	0 : 1

Tableau n° 6. Concentrations des échantillons des complexes CaM-ceQORH déposés sur un gel natif.

7 Chromatographie d'exclusion moléculaire analytique du complexe ceQORH-CaM

7.1 Principe et objectif d'une chromatographie d'exclusion moléculaire analytique

Le principe de cette expérience est d'éluer une protéine, ou un complexe sur une colonne de chromatographie d'exclusion moléculaire résolutive (SEC). Ce type de chromatographie permet de séparer des macromolécules de masse différente. La forme de la macromolécule a également une influence sur son élution mais sa contribution est minime comparée à celle de la masse. L'objectif d'une chromatographie d'exclusion moléculaire analytique est de comparer des chromatogrammes entre deux protéines, une sauvage et une autre mutante par exemple, et de déterminer l'état oligomérique d'une protéine, ou de déterminer la formation d'un complexe protéine-protéine et tout cela à partir d'un faible volume d'échantillon (inférieur à 0,5 mL).

7.2 Protocole de la chromatographie d'exclusion moléculaire

Une colonne Superdex[®] 200 10/300 de 24 mL est utilisée pour cette expérience. Les échantillons sont tous préparés au préalable dans le même tampon pour une expérience donnée et ont un volume final de 100 µL. La calibration de la colonne est réalisée à l'aide du bleu Dextran, de la ribonucléase A, de l'ovalbumine, de la conalbumine à une même concentration.

Partie III. ETUDES BIOPHYSIQUES

1 Etude de l'état oligomérique de la ceQORH par ultracentrifugation analytique (AUC)

1.1 Principe et objectif de l'ultracentrifugation analytique

L'ultracentrifugation analytique (AUC) permet d'étudier le comportement hydrodynamique d'une macromolécule en solution, l'homogénéité d'un échantillon et la stoechiométrie de différents complexes. Selon son comportement, différentes caractéristiques de la molécule sont déterminées : le coefficient de sédimentation, la masse moléculaire approximative, la forme globale de la macromolécule, les constantes d'association lors d'interactions inter-macromoléculaires. L'AUC prend en considération la densité des particules. Par conséquent, plusieurs associations de molécules peuvent être étudiées : protéine-détergent, protéine-sucre, protéine-ARN, protéine polymère, solvatation (Ebel *et al.*, 2004). L'AUC peut répondre ainsi aux exigences de certaines expériences plus complexes notamment pour étudier les interactions des protéines membranaires et/ou glycolysées qui sont dans une solution dont la viscosité est élevée (Boyer *et al.*, 1993 ; Le roy *et al.*, 2013). Afin de pouvoir étudier ce comportement tout au long de l'expérimentation, un système optique constitué d'une source lumineuse (lampe xénon) et d'un monochromateur va permettre de mesurer la densité optique des échantillons entre 230 nm et 600 nm en fonction de la distance radiale à différents temps. Les paramètres tels que la température, la vitesse et l'acquisition des données sont contrôlés par un ordinateur. Deux approches différentes sont alors possibles en fonction de l'objectif de l'expérience : soit on réalise des mesures de la vitesse de sédimentation soit on réalise celles de l'équilibre de sédimentation. La technique utilisée ici est celle des mesures de la vitesse de sédimentation. Ce premier type de mesures permet d'obtenir un certain nombre de paramètres hydrodynamiques : coefficients de sédimentation (s), de diffusion (D) et de friction (f). Les vitesses de sédimentation à haute vitesse donnent, en plus, des informations sur la dynamique de l'association et sur la forme des macromolécules.

Le principe de cette technique est de soumettre les macromolécules étudiées à une force centrifuge pouvant atteindre deux millions de g au maximum. Chaque macromolécule en fonction de ses caractéristiques hydrodynamiques va se comporter différemment. En effet, trois forces au total sont impliquées (figure n° 21).

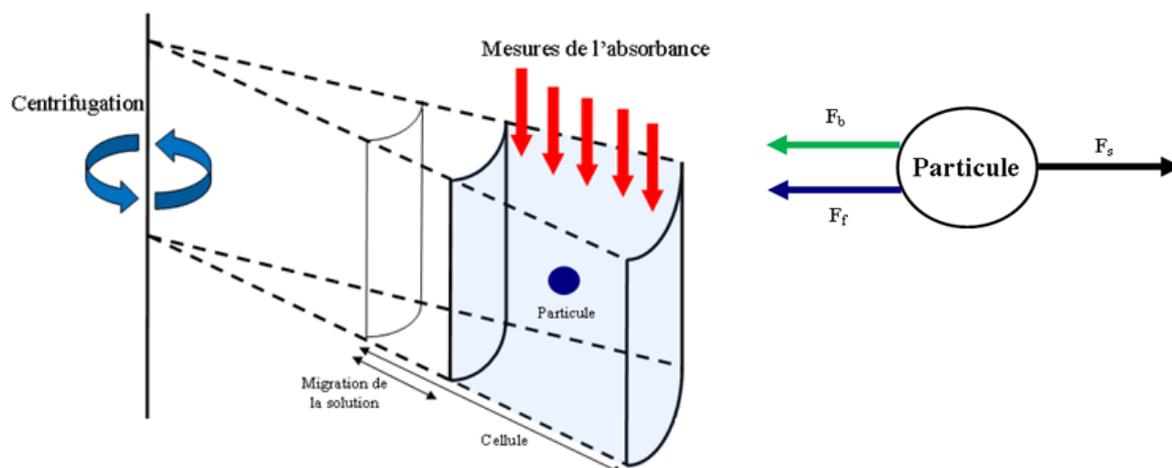


Figure n° 21. Présentation schématique du fonctionnement d'une ultracentrifugeuse analytique.

Différentes forces s'appliquent sur la cellule. F_b correspond à la poussée d'Archimède, F_f correspond à la force de friction et F_s correspond à la force centrifuge.

1.2 Description de l'appareil utilisé

La longueur d'onde et la vitesse de centrifugation sont déterminées au préalable selon la macromolécule à analyser. La durée d'une expérience de vitesse de sédimentation est de sept h. L'évolution de la densité optique de l'échantillon est mesurée en fonction du temps lors de la centrifugation. Un volume de 450 μL pour une vitesse de sédimentation est requis. Chaque échantillon doit avoir une densité optique à 280 nm comprise entre 0,5 et 1 pour une expérience de vitesse de sédimentation. La pureté des préparations et la stabilité des macromolécules sont donc des paramètres déterminants. Dans cette étude, l'appareil utilisé est une ultracentrifugeuse analytique XLI (Beckman Coulter, Palo Alto, USA). Le rotor est un Anti-60 (Beckman) permettant de mesurer simultanément le signal de trois échantillons et les cellules utilisées sont des cellules à double secteur (Nanolytics[®]) avec des trajets optiques de 12 mm, de 3 mm ou de 1,5 mm et constituées d'une fenêtre en saphir et adaptées pour le type de rotor utilisé. L'ultracentrifugeuse analytique utilisée est dotée d'un double système de détection en absorbance et en interférence. L'acquisition des données a donc été réalisée en absorbance et en interférence optique en utilisant le programme Proteomelab XLI V 6.0. Les analyses des résultats se réalisent à l'aide du programme Sedfit V14.c (Schuck, US) et Sednterp (D. Hayes, T. Laue, J. Philo, USA).

1.3 Protocole pour l'AUC : composition des échantillons testés

La présence de glycérol est un facteur ayant de l'influence sur les résultats d'une analyse, c'est pourquoi une colonne type PD10 a été réalisée avant dans le but d'éliminer le glycérol avant l'expérience. Puis l'échantillon est concentré à l'aide d'un concentrateur de 10 kDa. Pour l'AUC, il est également conseillé d'avoir du sel dans le tampon afin d'éviter toutes interactions parasites éventuelles. Les expériences d'AUC sont réalisées en présence de 20 mM de Tris pH 7,5 et 150 mM de NaCl. Excepté le sel, les conditions (concentration en inhibiteur et en cofacteur) sont similaires à celles utilisées en cristallogénèse. Les échantillons ont été préparés comme ci-dessous (tableau n° 7).

Nom cellule	Volume (µL)	Cuve (mm)	Complexe	Concentration ceQORH (µM)	Concentration 13KOT (mM)	Concentration NADP ⁺ /NADPH (mM)
A1	450	12	ceQORH 13KOT NADP ⁺	17	1,45	145
A2	450	12	ceQORH NADPH	17	-	145
A3	450	12	ceQORH	17	-	-
B1	80	1,5	ceQORH	176	-	-
B2	80	1,5	ceQORH 13KOT NADP ⁺	176	1,45	145
B3	80	1,5	ceQORH 13KOT	176	1,45	-
C1	450	12	ceQORH 13KOT	17	1,45	-
C2	80	1,5	ceQORH NADPH	17	-	145
C3	130	3	ceQORH 13KOT NADP ⁺	132	1,45	145

Tableau n° 7. Composition des échantillons d'AUC.

2 Etude de l'interaction ceQORH-CaM par résonance plasmonique de surface (SPR)

2.1 Description de la résonance plasmonique de surface

Ce système se compose d'une interface séparant deux milieux dont les indices de réfraction sont différents. En dirigeant une lumière polarisée monochromatique contre cette interface, une partie de la lumière incidente est réfléchié alors que la seconde partie est réfractée. Lors de ce phénomène, la propagation de l'onde évanescente se fait perpendiculairement à l'interface. La distance de propagation est équivalente à sa longueur d'onde. Cette distance correspond au champ évanescent.

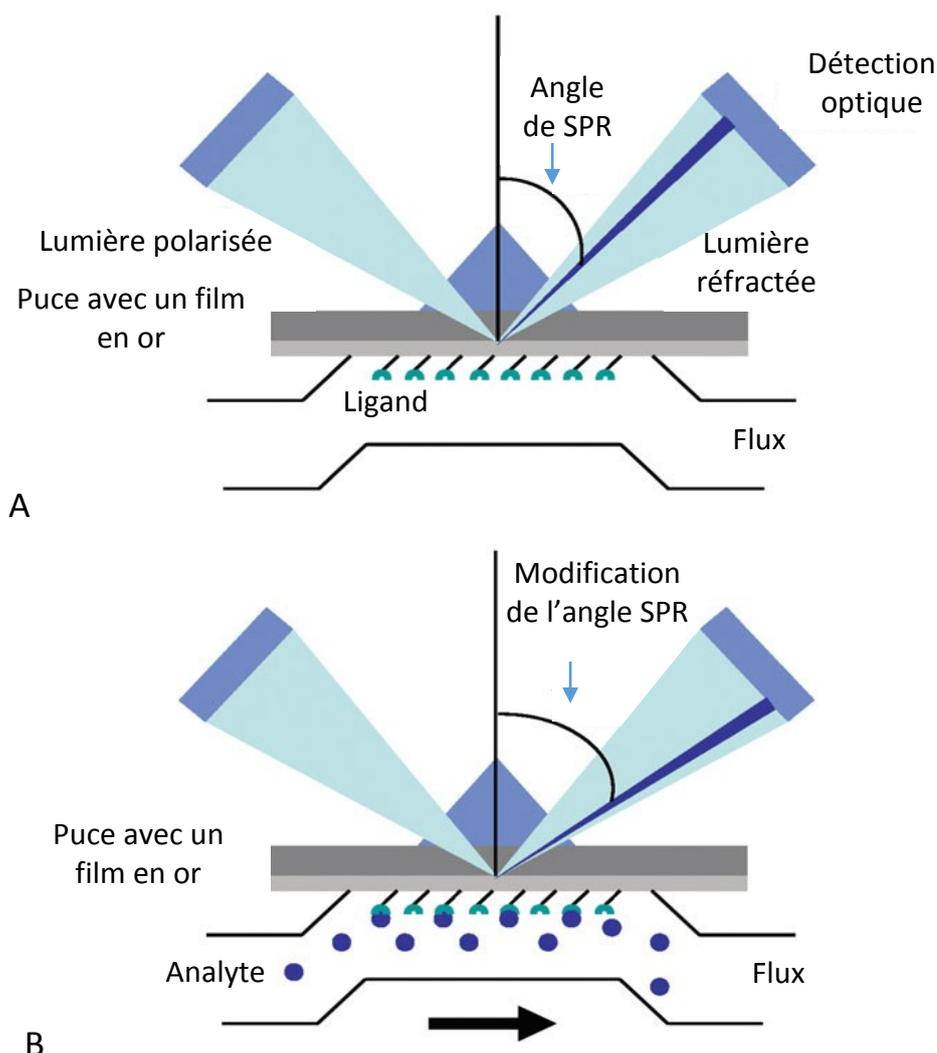


Figure n° 22. Principe de la SPR.

Cette figure présente le principe de la SPR. Le support utilisé est une puce sur laquelle se trouve un film d'or. L'immobilisation du ligand sur cette puce est dans un premier temps réalisée (A) pour ensuite ajouter l'analyte dans le flux afin d'observer si l'angle de SPR est modifié (B) (Madeira *et al.*, 2009).

Dans le cas de la SPR, l'interface utilisée est constituée d'une couche de métal (or) qui a la particularité d'être riche en électrons libres. La rencontre de la lumière et de l'interface sur laquelle se situent les électrons libres crée une résonance plasmonique de surface. Lorsque le faisceau est réfléchi sur ce type de surface, l'intensité diminue à un angle donné. Cet angle est appelé angle de résonance. Cette technique est un outil pour l'étude des interactions protéine-protéine (figure n° 22).

2.2 Principe et objectif de la résonance plasmonique de surface (SPR)

Le principe consiste à immobiliser une première molécule sur cette surface (figure n° 22. A). Cette molécule est alors appelée ligand (concentration en ligand en M : [L]). Ensuite une seconde molécule en solution, appelée analyte (concentration en analyte en M : [A]), circule à la surface (figure n° 22. B et phase 1 de la figure n° 23). Si les deux molécules interagissent, alors l'analyte va s'immobiliser et l'indice de réfraction du milieu sera modifié, ce qui fera alors varier la position de l'angle de résonance (brevet Magnus Malmqvist, Gregory Paul Winter, 1993). L'équation d'association est définie telle que (constante d'affinité en $M^{-1} s^{-1}$: k_a) :

$$\frac{d [AL]}{dt} = [L] [A] k_a$$

Ensuite la phase stationnaire est atteinte lorsque tous les ligands sont liés (phase 2 de la figure n° 23). Puis la phase 3 consiste à dissocier le ligand et l'analyte en injectant le tampon initial. L'équation de dissociation est définie telle que (constante de dissociation en s^{-1} : k_d):

$$-\frac{d [AL]}{dt} = [AL] k_d$$

L'équation de la cinétique résultante est donc :

$$\frac{d[AL]}{dt} = k_a[A][L] - k_d[AL]$$

Dans un système biologique, pour une cinétique dont le rapport est de 1:1, le k_a se situe entre 10^3 et $10^7 M^{-1} s^{-1}$ et le k_d se situe entre 10^{-1} et $10^{-6} s^{-1}$. Quelques fois le système adopte un modèle un peu plus complexe (état d'oligomérisation de l'analyte, plusieurs sites de fixation sur le ligand ...) qui ne répond pas à cette simple équation. Ces modèles sont proposés dans le traitement des résultats par le logiciel BiaEval. A l'équilibre, K_A la constante d'équilibre d'association en M^{-1} (k_a/k_d) est égale à K_D la constante d'équilibre de dissociation en M (k_d/k_a).

Par la suite, en cas d'interaction entre le ligand et l'analyte, la puce doit être régénérée à l'aide de différentes solutions (dépendant du type d'interaction : force ionique élevé, détergent...) qui auront les propriétés chimiques nécessaires pour dissocier les deux éléments.

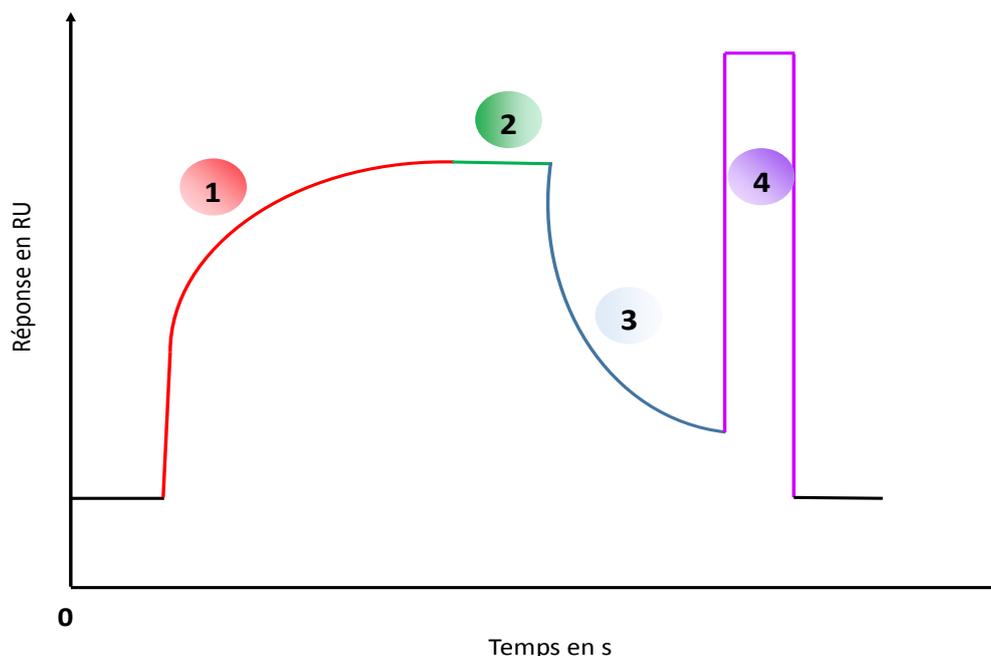


Figure n° 23. Les différentes étapes lors d'une expérience de SPR.

Cette figure a été réalisée à partir d'une figure existante sur le site <http://www.sprpages.nl/>. Elle présente les quatre phases de la SPR, la phase 1 correspond à la phase d'association, la phase 2 correspond à la phase stationnaire, la phase 3 correspond à la phase de dissociation et la phase 4 correspond à la phase de régénération de la puce.

2.3 Protocole pour une expérience de résonance plasmonique de surface

L'appareil utilisé est le BIACORE 3000[®] (GE Healthcare) de la plateforme de l'IBS avec l'aide des Dr Nicole THIELENS et Jean-Baptiste REISER. La puce utilisée est une puce CM5[™] (GE Healthcare) fixant les groupements suivants : NH₂, SH, CHO, OH, COOH, et la matrice est composée de carboxyméthyle dextran attaché à une surface en or. Plus la chaîne de dextran est longue, plus la fixation est meilleure. Il est nécessaire de bloquer le dextran avec de l'éthanolamine pour éviter toutes interactions non-spécifiques. Il est aussi nécessaire de vérifier la présence de lysines au préalable dans la molécule que l'on souhaite immobiliser afin de favoriser sa fixation. En cas de problèmes lors de l'immobilisation, l'utilisation d'une puce dont la chaîne de la matrice est plus courte serait une des solutions envisageables.

Pour activer la puce, deux types de solution sont utilisés : le -N-hydroxysuccinimide (NHS) (GE Healthcare) à 0,4 M, et le N-(3-diméthylaminopropyl)-N'-éthylcarbodiimide hydrochloride (EDC) (GE Healthcare) à 0,1 M. Ces solutions sont toutes deux très réactives, et ont un temps de demi-vie de 30 min. Pour bloquer le dextran, l'éthanolamine à pH 8,5 est utilisé. La grandeur observée lors de l'expérimentation est le RU, correspondant à l'unité de résonance (1 pg/mm²). Lors de l'immobilisation du ligand, le R_{max} doit approximativement être entre 100 et 1000 RU. Le R_{max} correspond à :

$$R_{max} = \frac{MW_{analyte}}{MW_{ligand}} R_{ligand} V_{Ligand}$$

R_{ligand} correspond à la quantité de protéine immobilisée en RU.

MW correspond à la masse moléculaire.

V_{Ligand} correspond à la valence du ligand (en fonction de la stoechiométrie de l'interaction)

Le ligand, ici la CaM, doit être pur. Pour immobiliser cette molécule, le débit est de 5 $\mu\text{L}/\text{min}$. En raison de son point isoélectrique de 4,14, la CaM a été diluée dans le tampon formate à 10 mM pH 3 ou acétate de sodium à 10 mM pH 3,5. Le tampon d'immobilisation de la CaM est le HBS-P composé de 0,01 M HEPES pH 7,4, 0,15 M NaCl, 0,005 % P20. Les quantités utilisées de CaM immobilisée ont été de 13 $\mu\text{g}/\text{mL}$, de 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ et de 26 $\mu\text{g}/\text{mL}$. L'ensemble des expériences est réalisé à une température de 25°C. Le tampon de l'analyte est composé de 50 mM Tris pH 7,5, 150 mM NaCl, 1 mM DTT (un avec 5 mM de CaCl_2 , et 1,5 mM NADPH) auquel on ajoute du Tween 20 (0,005 % final). L'analyte est injecté à différentes concentrations : 200 nM, 10 nM, 4 nM, 1 nM à un débit de 20 $\mu\text{L}/\text{min}$ dans une solution de 140 μL à 180 μL . La dissociation se fait sur 300 s puis on régénère la puce avec 250 mM (jusqu'à 1 M) de NaCl et 5 mM (jusqu'à 10 mM) d'EDTA. Concernant les cinétiques, les concentrations de la ceQORH ou de la ceQORHR58A utilisées sont : 40 nM, 20 nM, 10 nM, 5 nM, 2,5 nM, 1,25 nM. Le traitement des données se fait à l'aide du logiciel Biaevaluation.

3 Etude de la stabilité de la ceQORH et de la ceQORHR58A par thermofluorescence (TSA)

3.1 Principe et objectif de la thermofluorescence

Cette méthode permet d'obtenir de nombreuses informations sur la stabilité de la protéine en fonction de son environnement. Ainsi la comparaison des T_m (« Temperature melting ») met en évidence les conditions optimales pour obtenir la meilleure stabilité et solubilité de la protéine étudiée. Généralement, ces conditions sont également les conditions favorables à la cristallisation de la protéine (Philips *et al.*, 2011) et les résultats concernant le T_m permettent également de déterminer la température adéquate pour la cristallisation (Dupeux *et al.*, 2011). Cette technique peut également être utilisée pour déterminer la stabilité d'un complexe protéine-protéine, protéine-ligand (Koshland *et al.*, 1958 ; Linderström-Lang *et al.*, 1959) et pour déterminer l'affinité d'un ligand (Grøftehaug *et al.*, 2015). Cette technique permet de comparer la stabilité d'une protéine par rapport à celle d'un mutant comme la ceQORH et de la ceQORHR58A.

La thermofluorescence (TSA) aussi nommée Thermofluor[®] ou « Differential Scanning Fluorimetry », mesure le signal de la fluorescence d'un fluorochrome, excité à sa longueur d'onde maximale d'excitation, en présence de la protéine à étudier. Le fluorochrome utilisé est le Sypro orange[®] (figure n° 24) (Niesen *et al.*, 2007).

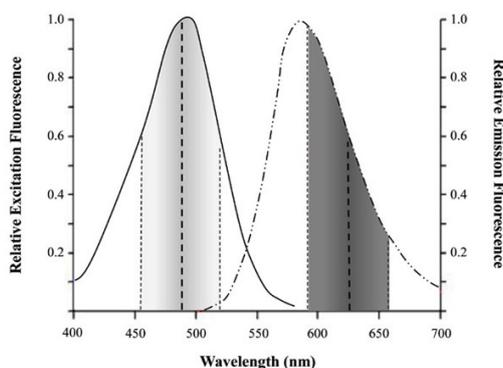


Figure n° 24. Spectre d'excitation et d'émission du SYPRO orange[®].

Cette figure représente le spectre d'excitation (en gris) et le spectre d'émission (en noir) du SYPRO orange[®] (Bio-Rad[®]). La longueur d'onde d'excitation est à $485 \text{ nm} \pm 30 \text{ nm}$ et la longueur d'onde maximale d'émission est à $625 \text{ nm} \pm 30 \text{ nm}$ (Biggar *et al.*, 2012).

Le SYPRO[®] orange a la capacité de se fixer sur les zones hydrophobes. Lorsqu'il est en présence d'une protéine, il se fixe soit au niveau des « patchs » hydrophobes lorsque la protéine est repliée ou alors sur les zones constituant le coeur hydrophobe de la protéine lorsque celle-ci se dénature (figure n° 25). Au cours de l'expérience, la protéine est dénaturée grâce à l'augmentation de la température, exposant ainsi des zones hydrophobes du coeur de la protéine sur lesquelles le fluorophore se fixe. La température initiale est de 4°C ou 25°C en fonction de l'appareil utilisé et la température maximale atteinte est de 95°C .

Le principe consiste à préparer différentes conditions (tampon, pH, sel, et variation de la concentration de chaque élément) dans lesquelles la protéine et le fluorochrome sont mélangés. La plaque PCR de 96 puits utilisée à l'EMBL (Grenoble) et contenant ces conditions est ensuite placée dans un thermocycleur équipé d'un système permettant la mesure de la fluorescence. Le signal de la fluorescence est mesuré en fonction de la variation de la température. Le point d'inflexion de la transition de la courbe (T_m) est calculé à partir d'une équation de Boltzmann.

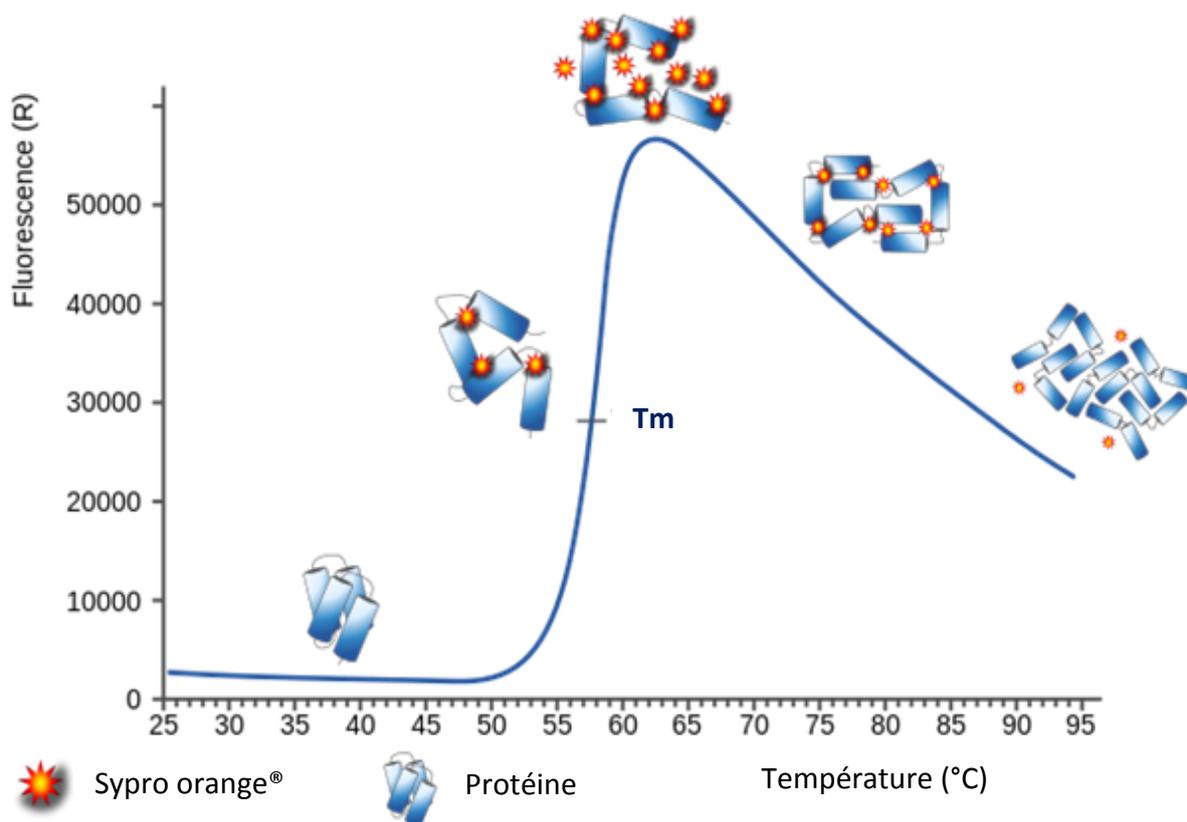


Figure n° 25. Principe de la thermofluorescence.

La protéine est repliée jusqu'à 50°C. A cette température, elle commence à se dénaturer. Le fluorophore se fixe sur les parties hydrophobes de la protéine qui sont accessibles au fur et à mesure que la température croît. Le maximum de fluorescence est atteint une fois que la protéine est totalement dénaturée. Puis la protéine finit par s'agréger diminuant ainsi le nombre de fluorochromes fixés et diminuant ainsi la fluorescence mesurée. La figure est réalisée par Goran tek-en.

3.2 Protocole pour une expérience de thermofluorescence

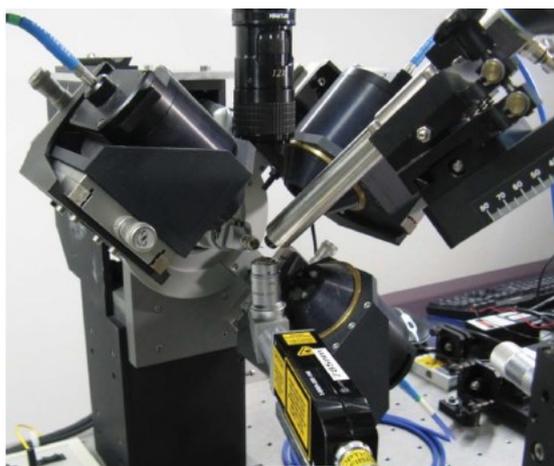
Ces expériences ont été réalisées sur la plateforme d'HTXlab (High throuput crystallography) de l'EMBL-Grenoble avec l'aide de Vincent MARIAULE. Les matrices d'échantillonnage sont fournies par la plateforme, et sont préparées dans des plaques PCR de 96 puits. La matrice d'échantillonnage SPC1 est utilisée. Chaque puits a été rempli avec 21 μL de la condition à tester. Le SYPRO orange® 5000x provient d'Invitrogen (#S6651). Plus la protéine est concentrée et moins le signal est bruité. La concentration finale de la protéine dans un puits est comprise entre 1,6 et 8 μM et est de 3x pour le SYPRO® orange. Le protocole consiste à dispenser 2 μL de protéine et 2 μL de SYPRO® orange dans chaque puits de la plaque placée sur la glace en veillant à ce que les deux ne soient pas en contact. La plaque est centrifugée à 2250 g pendant 20 s. La plaque est ensuite placée dans un instrument appelé RT-PCR MylQ (ABGENE). Dans l'enceinte de l'appareil, la température varie de 25°C à 95°C avec un plateau d'une minute par degré Celsius et la mesure de la fluorescence est réalisée trois

fois (par degré Celsius). La longueur d'onde d'excitation est de 492 nm car il s'avère que celle-ci est la longueur d'onde maximale d'excitation pour ce fluorochrome. Les données sont traitées à l'aide de Graph-Pad et Prism.

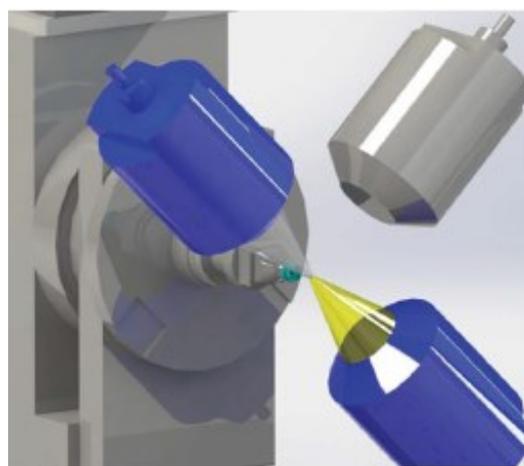
4 Etude de l'état d'oxydation du cofacteur dans les cristaux de ceQORH par cryobench

4.1 Principe et objectif du cryobench

L'utilisation du cryobench permet de déterminer : si le cristal est un cristal de protéine, si la protéine est complexée avec une autre molécule absorbant à une longueur d'onde différente de 280 nm (Prasad *et al.*, 2002 ; Royant *et al.*, 2007) et d'estimer la stœchiométrie protéine-ligand. Dans certains cas, il est possible d'étudier l'impact que peuvent avoir les rayons X après un enregistrement de données sur certaines molécules. Le cryobench est un appareil mesurant l'absorbance à différentes longueurs d'onde des cristaux de protéine à température ambiante ou sous flux d'azote (Von Stetten *et al.*, 2015).



A



B

Figure n° 26. Le cryobench.

La figure **A** présente une photographie du cryobench de la ligne ID29 et la figure **B** présente le fonctionnement du cryobench pour des mesures dans l'UV-vis (Von Stetten *et al.*, 2015).

4.2 Protocole pour le cryobench

Cette manipulation a été réalisée sur la ligne de lumière ID29S à l'ESRF avec l'aide des Dr Antoine ROYANT et Dr Guillaume GOTTHARD. Les cristaux ont été d'abord testés sur le cryobench avant de les exposer aux rayons X. Ainsi ils n'ont subi aucun dommage radiatif au préalable.

5 Cristallogénèse des protéines d'intérêt

Le premier pas vers la détermination d'une structure par cristallographie aux rayons X, souvent le plus difficile, est l'obtention de cristaux de bonne qualité.

5.1 Définition d'un cristal

Un cristal est une structure tridimensionnelle formée par une disposition régulière d'un certain nombre d'éléments de base. En effet, le cristal est le produit de convolution d'une fonction motif par une fonction réseau. Il est constitué d'une maille définie par un trièdre irréductible répété dans les trois dimensions de l'espace. Il existe les cristaux de protéine et des cristaux de sel. Cependant, il existe quelques différences fondamentales au niveau de leurs propriétés mécaniques et optiques et de leur composition. Les cristaux de protéine sont plus fragiles et contiennent, en général, entre 30 % et 70 % d'eau. L'intégrité des cristaux de protéine est maintenue principalement par des interactions existantes entre les molécules de protéine. L'espace entre les protéines est occupé par des molécules d'eau ou de tampon. Par conséquent, les molécules de protéine dans les cristaux existent dans un environnement aqueux quasi naturel. La structure native (le repliement approprié de la protéine qui lui confère sa fonction et son activité) est conservée. Cela peut être démontré par la réalisation de tests enzymatiques sur la forme cristalline de la protéine. Dans certains cas, la forme cristalline correspond à une forme naturelle de stockage, comme c'est le cas pour l'insuline. Comment peut-on obtenir des cristaux à partir de molécules aussi complexes que les protéines ?

5.2 Principe et objectif de la cristallogénèse

Pour arriver à une structure cristalline à partir d'une solution de protéine, il faut réduire la solubilité de la protéine. En règle générale, la réduction de la solubilité entraîne la formation d'un précipité amorphe. Cependant, en sélectionnant des conditions spécifiques, des interactions attractives peuvent avoir lieu. Si ces interactions sont favorables, elles peuvent donner lieu à la cristallisation de la protéine. La cristallisation est une transition de phase ; la molécule passe d'une phase liquide à une phase solide, le cristal. Le comportement d'une molécule en fonction des variations de son environnement peut être décrit sous la forme d'un diagramme de phases (figure n° 27).

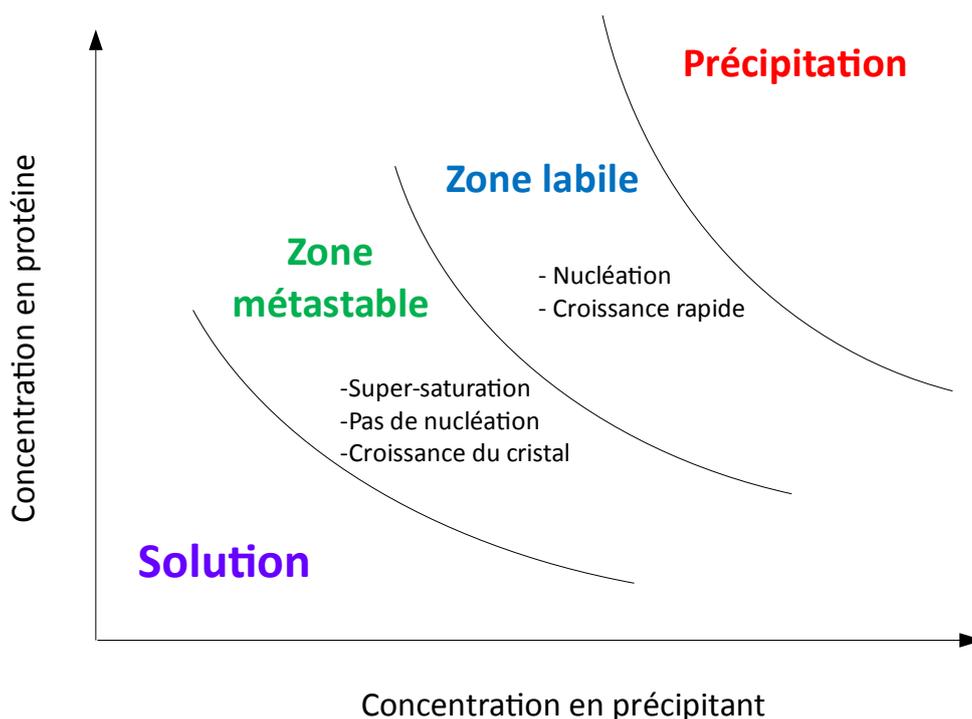


Figure n° 27. Diagramme de phases.

La figure présente les différentes phases utiles pour la cristallogénèse des protéines. Le diagramme représente la concentration en protéine en fonction de la concentration en précipitant. Les zones présentées sont : la phase où la protéine est soluble (en solution), puis la phase métastable qui permet la croissance d'un cristal déjà existant, puis la zone labile qui permet la nucléation et la croissance rapide d'un cristal puis la zone de précipitation de la protéine.

La courbe de solubilité définit la limite entre la sursaturation et la sous-saturation. Au niveau de cette courbe, les états soluble et solide sont en équilibre dynamique. Pour qu'une macromolécule cristallise, elle doit entrer dans une zone hors équilibre thermodynamique. Elle se trouve alors dans un état de sursaturation qui lui permet d'initier sa cristallisation. Cette initiation ou nucléation, ne s'opère que si la sursaturation est suffisante. Il existe, de ce fait, une seconde courbe, dite courbe de super-solubilité, qui sépare deux zones sursaturées du diagramme : la zone de nucléation ou zone labile, où la sursaturation élevée conduit à la nucléation du cristal et la zone métastable où la sursaturation plus faible est juste suffisante pour qu'un cristal existe et croisse. Pour atteindre une solution super-saturée, on fait varier les concentrations en protéine et/ou en précipitant dans le schéma du diagramme de phases (figure n° 27).

5.3 Méthodes de cristallisation

Les mécanismes physiques responsables du changement de concentration peuvent être la diffusion liquide-liquide dans le cas de la méthode « en batch » ou la diffusion de vapeur dans le cas de la méthode de la « goutte suspendue » (figure n° 28). La méthode de diffusion de vapeur est actuellement la plus utilisée pour la cristallisation des protéines.

La cristallogenèse est l'étude du phénomène de cristallisation des molécules. La cristallogenèse des macromolécules biologiques est régie par certaines règles généralisées à ce jour, telles que : salting in, salting out, effet de température, effet de pH. En principe, toutes les substances qui peuvent influencer la solubilité de la protéine sont susceptibles d'être utilisés comme précipitants, pour autant qu'une concentration élevée de précipitant n'entraîne pas la dénaturation de la protéine.

5.4 Solubilité des protéines : les paramètres

5.4.1 Précipitants

Généralement on classe les différents précipitants utilisés pour la cristallisation des protéines selon leur effet en solution. Les précipitants les plus utilisés incluent les sels, les polymères organiques, les alcools, et parfois l'eau pure. Des sels comme le $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, le NaCl, le LiCl, le KH_2PO_4 modifient la force ionique de la solution. La variation de la solubilité d'une protéine en fonction de la force ionique est représentée dans la figure n° 27.

5.4.2 Salting in et salting out

Dans la région de « salting-in », la solubilité augmente due à l'augmentation de la constante diélectrique du solvant. Ceci entraîne une meilleure interaction entre les charges à la surface de la protéine et l'environnement. Dans la région de « salting-out », la solubilité se réduit car les charges du précipitant entrent en compétition avec les charges superficielles des protéines pour les molécules d'eau, menant à un abaissement de l'état d'hydratation de la protéine.

5.4.3 Précipitants organiques

Les précipitants organiques comme l'éthanol, le méthanol, le propanol, le méthyl-2,4-pentanediol (MPD) ou l'acétonitrile réduisent la solubilité de la protéine en abaissant la constante diélectrique du solvant. Les polymères organiques fonctionnent de la même façon. C'est par exemple le cas du polyéthylène glycol (PEG).

5.4.4 pH

Un autre paramètre important affectant la solubilité des protéines est le pH de la solution. En règle générale, la solubilité de la protéine est minimale vers le point isoélectrique car à ce point, la charge globale de la protéine est nulle.

5.4.5 Température

On peut évoquer aussi l'effet de la température. La solubilité d'une protéine augmente en général avec la température (cas de solubilité directe), mais le cas contraire peut également être rencontré (cas de solubilité inverse).

Compte tenu du nombre très important de paramètres pouvant influencer la cristallisation et de la quantité réduite de protéine dont les chercheurs disposent habituellement, il existe des moyens robotisés pour tester un grand nombre de conditions en utilisant très peu de protéine (de l'ordre de 0,1 μL par goutte).

5.5 Protocole expérimental pour la cristallogénèse

Le procédé expérimental de la méthode de la « goutte suspendue » est illustré dans la figure n° 29. Une goutte (0,5 à 5 μL) composée d'un mélange de la protéine et d'agents précipitants est placée sur la face inférieure d'une lamelle au-dessus d'un réservoir (volume : entre 500 μL et 1 mL) contenant une solution dont la concentration en précipitant est supérieure mais ne contenant pas de protéine. La concentration en protéine varie en fonction des protéines (la plupart des tests ont été réalisés avec des échantillons de protéine dont la concentration est supérieure à 5 mg/mL). L'enceinte est hermétiquement scellée. L'équilibration se fait par évaporation des composés volatils (l'eau, par exemple) de la goutte vers le réservoir, jusqu'à ce que les tensions de vapeur à la surface des deux compartiments soient identiques. Cela va entraîner une augmentation de la concentration en protéine et du précipitant dans la goutte. Si des conditions appropriées ont été choisies, cela va amener la protéine à cristalliser.

La technique de cristallisation, en elle-même, peut être un paramètre supplémentaire à prendre en considération. La méthode de la diffusion de vapeur ([Wlodawer et Hodgson, 1975](#) ; [McPherson *et al.*, 1995](#)) est la méthode couramment utilisée.

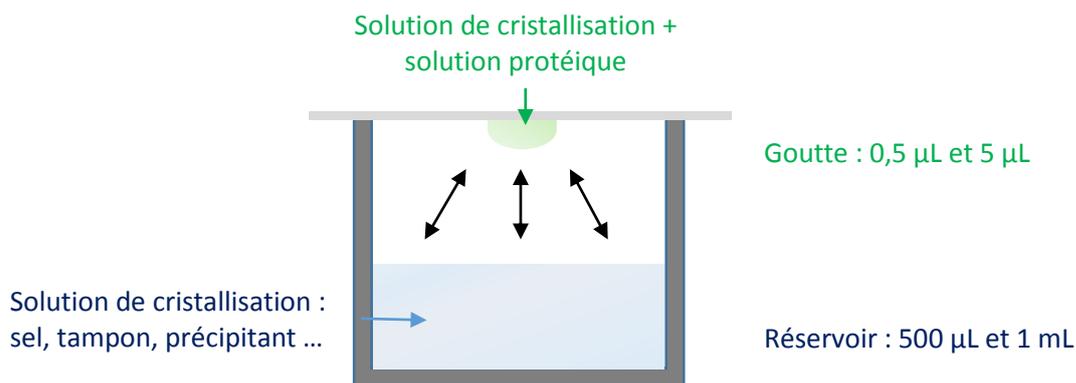


Figure n° 28. Cristallisation par la diffusion de vapeur.

Le système présenté est celui de la goutte suspendue. Cette dernière est constituée de la solution protéique mélangée à la solution de cristallisation.

Cette méthode s'applique à la technique de la goutte suspendue et à la technique de la goutte assise. La technique utilisée peut être un paramètre favorisant ou non la cristallisation de la protéine. Par défaut, durant la thèse, la technique de la goutte assise a été utilisée pour les tests sur la plateforme de HTXlab à l'EMBL. Les deux techniques ont été utilisées pour l'optimisation manuelle des conditions de cristallisation.

5.6 Optimisation de la taille des cristaux par ensemencement (seeding)

Lorsque des cristaux sont formés mais ont cessé de croître et que leur taille est insuffisante, des tests d'ensemencement peuvent être réalisés. Pour cela, un cristal est broyé et ensuite des dilutions de la solution mère contenant les débris des cristaux sont réalisées afin de diminuer le nombre de cristaux dans les solutions diluées. La taille de ces débris cristallin est si petite que les débris sont invisibles au microscope optique. Ou bien un cristal entier (visible par un microscope optique) peut être récupéré et placé dans une solution mère ayant la même composition que celle initiale (mais une concentration différente en précipitant). Dans les deux cas d'ensemencement présentés, la concentration en précipitant est plus faible afin d'obtenir une condition de cristallisation correspondant à la zone métastable du diagramme de phase. La première technique se nomme micro-ensemencement et la seconde se nomme macro-ensemencement.

5.7 Congélation des cristaux

Lors de leur exposition aux rayons X, les cristaux subissent des dégâts d'irradiation qui les dégradent au cours du temps. A l'origine, les dégâts d'irradiation sont dus à l'absorption des rayons X par la matière, arrachant des électrons aux atomes : c'est l'ionisation primaire. De ce

fait, certaines liaisons chimiques, comme les ponts disulfures, se retrouvent brisées. Aussi, des radicaux libres peuvent se former et diffuser dans le cristal. A température ambiante, les radicaux ainsi formés sont à l'origine de réactions radicalaires en chaîne qui dégradent certains acides aminés (Garman, 2010). Le fait de travailler à température cryogénique réduit la diffusion des radicaux libres et limite ainsi les dégâts associés.

Pour congeler les cristaux, il convient de choisir un cryoprotectant qui ne dégrade pas les cristaux et qui assure une vitrification. Le cryoprotectant a la capacité de réduire la formation de glace autour d'un cristal. Il se prépare à partir de la liqueur mère dans laquelle sont apparus les cristaux. La congélation a lieu dans l'azote liquide ou sous flux d'azote plaçant ainsi les cristaux à une température entre -210°C et -195°C. Cette température est conservée tout au long de l'exposition du cristal aux rayons X. Bien que les bienfaits des cryoprotants ne soient plus à démontrer, il n'en demeure pas moins que l'enregistrement de données peut se faire à partir d'un cristal sans cryoprotection et que cela n'affecte pas la qualité des données acquises (Pellegrini *et al.*, 2011).

6 La cristallographie aux rayons X

6.1 Principe et objectif de la cristallographie aux rayons X

La cristallographie aux rayons X est une technique physique permettant d'obtenir la structure tridimensionnelle de macromolécules biologiques ou d'autres constituants à partir d'un cristal. Cette technique n'est pas exclusive dans l'obtention d'une structure tridimensionnelle. Si le poids moléculaire de la macromolécule d'étude est inférieur à 30 kDa alors la structure tridimensionnelle peut être obtenue en utilisant la résonance magnétique nucléaire (RMN). Il n'est pas rare d'associer la cristallographie aux rayons X (ou le SAXS) à la RMN (Grishaev *et al.*, 2005 ; Tsutakawa *et al.*, 2007). Contrairement à la cristallographie aux rayons X, la RMN n'engendre pas de contraintes physiques sur la structure. La cristallographie aux rayons X nécessite d'obtenir, au préalable, un cristal de protéine dans lequel certaines zones de la protéine telles que des boucles peuvent avoir des orientations forcées par l'empilement cristallin. A basse résolution, l'enveloppe d'une macromolécule peut être déterminée en utilisant la diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS). La structure tridimensionnelle ou l'enveloppe de la protéine peuvent aussi être déterminées grâce à la microscopie électronique également (Walz *et al.*, 2015 ; Cheng *et al.*, 2015).

6.2 Les éléments nécessaires pour la diffraction des rayons X

Dans le cas de l'étude de la structure tridimensionnelle d'une protéine, la précision maximale souhaitée est de l'ordre de l'atome. La seule source pouvant correspondre à cet ordre de grandeur est la source de rayons X. En effet, les rayons X ont une longueur d'onde avoisinant l'Angström (Å soit 10^{-10} m). Les rayons X peuvent provenir d'un générateur de laboratoire tel qu'un tube scellé ou une anode tournante ou peuvent provenir d'un synchrotron ou encore d'un laser à électrons libres. Dans le cas de l'étude cristallographique d'une macromolécule, l'objet observé ne peut pas être une seule macromolécule car le signal ne serait pas suffisant. C'est pourquoi un cristal est utilisé. En effet, un cristal est composé d'une même entité se répétant dans les trois dimensions de l'espace. Ceci amplifie de manière considérable le signal ce qui permet de l'enregistrer et de le traiter.

6.3 La diffraction des rayons X

Les rayons X vont interagir avec le nuage électronique des atomes constituant le cristal. Les rayons X sont alors diffusés par chacun de ces atomes et ils peuvent interférer entre eux. Ces interférences peuvent être constructives ou destructrices. Ce sont ces interférences d'ondes diffusées qui forme le phénomène de la diffraction des rayons X. Les interférences sont constructrices à la condition que la différence de marche entre les rayons X soit égale à un multiple entier de λ et que les rayons X soient déviés aux angles de déviation de 2θ du faisceau incident. Alors les rayons diffusés s'additionnent et des pics du diffractogramme pourront être observés. Pour obtenir ce cas de figure, les atomes doivent être ordonnés et placés à un intervalle régulier. Un cristal est composé de différents plans réticulaires parallèles d'indice h, k, l et de distance interréticulaires d_{hkl} . C'est pourquoi l'objet utilisé pour la diffraction est un cristal (figure n° 29). Ainsi la diffraction est définie par la loi de Bragg (découverte en 1915 par Henri et Lawrence Bragg) :

$$2 d \sin \theta = n\lambda$$

d : distance interréticulaire

θ : angle de Bragg

n : appartient à \mathbb{N} et est appelé ordre de diffraction

λ : longueur d'onde en Å

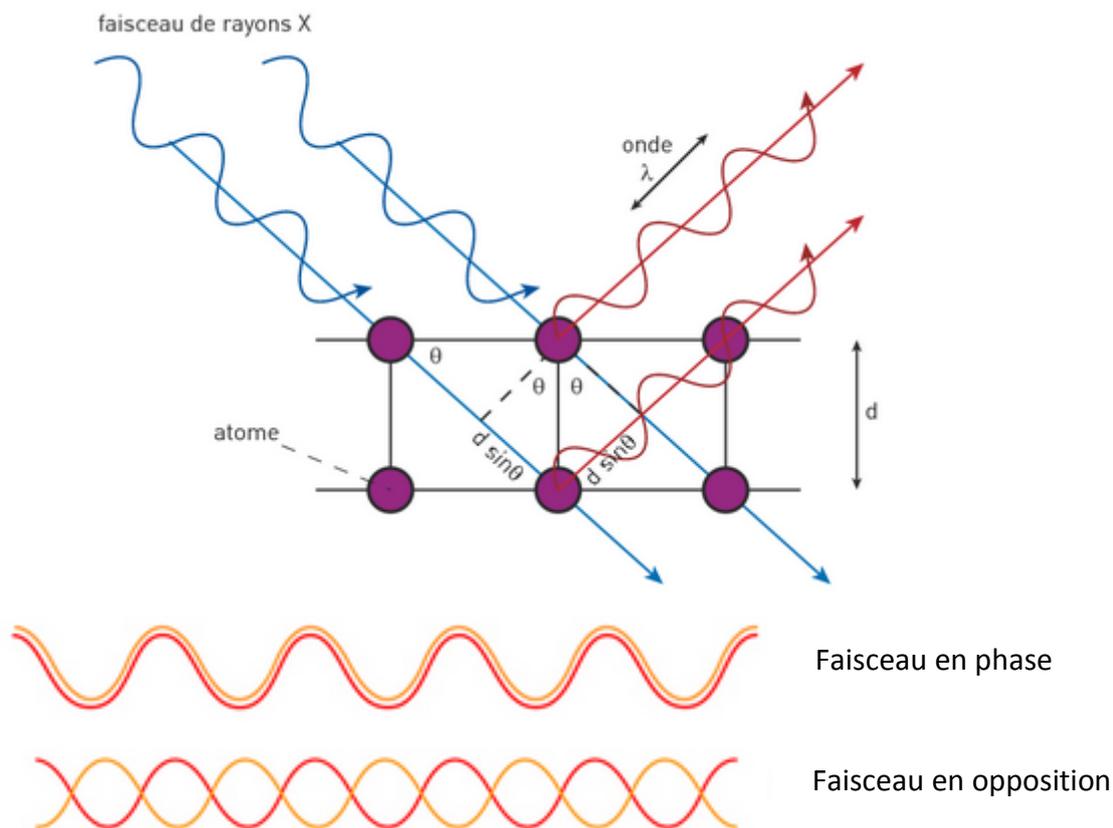


Figure n° 29. Principe de la diffraction.

Un atome est représenté par les sphères violettes. Le plan interréticulaire est représenté par d. Les faisceaux en phase et en opposition sont représentés afin de comprendre la différence entre les interférences constructives ou destructives (image du site web de l'Institut Néel).

6.4 Intensités, facteurs de structure et densité électronique

L'intensité des réflexions est proportionnelle au carré de l'amplitude du facteur de structure. Les facteurs de structure sont déterminés à partir de la racine carrée de l'intensité grâce à la relation suivante :

$$I_{hkl} \propto |F_{hkl}|^2$$

Or une onde diffractée est caractérisée par un facteur de structure étant lui-même défini par une amplitude F_{hkl} et une phase φ_{hkl} tel que :

$$\vec{F}_{hkl} = |F_{hkl}|e^{i\varphi_{hkl}}$$

Il est nécessaire d'avoir ces deux informations pour obtenir la carte de densité électronique correspondante.

6.5 Résolution d'une structure tridimensionnelle

Pour obtenir la phase, différentes méthodes peuvent être utilisées : le remplacement moléculaire (Rossmann, 1972 ; Navaza, 1994) ou les méthodes MAD et MIR (Hendrickson, 1999). Le remplacement moléculaire consiste à utiliser une structure tridimensionnelle supposée homologue à celle de la protéine d'intérêt. L'homologue utilisé est identifié en étudiant les résultats des alignements de séquences. Au-delà de 30 % d'identité de séquences, il est possible que la structure choisie soit suffisamment proche de celle de la protéine étudiée pour calculer les phases puis une carte de densité électronique.

$$F_{cristal} = |F_{observés}|e^{i\varphi_{calculées}}$$

Le signal anomal repose sur la présence d'atomes lourds dans la protéine soit des sélénométhionines ou des sélénocystéines représentant au minimum 1 % (Hendrickson *et al.*, 1990 ; Nagem *et al.*, 2003). A défaut d'avoir ces résidus dans la protéine, il est possible de réaliser un trempage des cristaux dans des solutions d'atomes lourds. Grâce à ce signal, il est alors possible d'obtenir la phase en utilisant les méthodes par SIR, MIR, MIRAS, SIRAS, SAD et MAD. Les méthodes MIR nécessitent de faire diffuser des atomes lourds dans le cristal. L'identification des positions des atomes lourds permettra le calcul d'une carte de densité électronique et de construire un modèle moléculaire.

$$F_{cristal} = |F_{observés}|e^{i\varphi_{expérimentales}}$$

6.5.1 Traitement d'un jeu de données

Les étapes du traitement de données sont réalisées avec XDS (Kabsch *et al.*, 2010a).

➤ L'indexation

En tenant compte des paramètres d'enregistrement des données (angle initial du cristal par rapport à un référent, rotation du cristal, distance du détecteur par rapport au cristal), la position des tâches de diffraction est une source d'informations sur l'orientation du cristal. Trois vecteurs initiaux peuvent être calculés de manière à définir le plus petit trièdre irréductible et ainsi le système cristallin et le réseau. A partir de cette information, une prédiction de l'ensemble des réflexions peut être obtenue si les trois vecteurs initiaux ont été correctement définis. En fonction du rapport entre des réflexions prédites et celles observées, il est possible de savoir si le système cristallin choisi est correct.

➤ Intégration des intensités

Cette étape permet de mesurer l'intensité des tâches de diffraction se situant à l'emplacement défini précédemment (Kabsch *et al.*, 2010b).

➤ Mise à l'échelle des données

Les réflexions équivalentes sont déterminées et leur intensité est moyennée. Les réflexions uniques sont ainsi obtenues et permettront de calculer la densité électronique.

6.5.2 Validité d'un jeu de données

➤ La résolution

La résolution est un critère d'évaluation important. Généralement plus la résolution est basse et plus la densité électronique sera mieux définie. La résolution atteinte lors d'un enregistrement de données dépend du pouvoir diffractant du cristal, de la longueur d'onde, de l'intensité utilisée, de la distance à laquelle est placé le cristal par rapport au détecteur. La résolution dépend aussi de la qualité du cristal. La résolution n'est pas le seul paramètre liée à la précision de la structure. En effet, pour deux jeux de données à des résolutions différentes, il n'est pas évident que celui possédant une résolution plus basse soit celui qui sera le plus précis et de meilleure qualité.

➤ Le rapport signal sur bruit

Le rapport signal sur bruit, $I/\sigma(I)$ rend compte de la qualité des données où I représente l'intensité des réflexions et $\sigma(I)$ représente l'écart type des intensités des réflexions. Plus la valeur de ce rapport sera élevée alors plus les données mesurées seront considérées comme étant de bonne qualité.

➤ La complétude

La complétude correspond au rapport entre le nombre de réflexions uniques mesurées et le nombre de réflexions uniques qui doivent être obtenues théoriquement à la résolution choisie précédemment. Plus cette valeur est élevée et plus le jeu de données est considéré comme complet et donc de meilleure qualité. Pour être acceptable, le jeu de données doit avoir une complétude supérieure à 90 %.

➤ La redondance

La redondance est un paramètre qui permet de donner le nombre de fois où chacune des réflexions et ses équivalentes ont été mesurées. Ce paramètre est important car plus les réflexions auront été mesurées plusieurs fois alors plus l'estimation de l'intensité moyenne sera précise (I) réduisant ainsi l'écart type $\sigma(I)$.

➤ Le R_{sym}

Le facteur R_{sym} (appelé également R_{merge} dans le cas où il y a plusieurs cristaux) représente la qualité de la concordance entre une réflexion et la moyenne des réflexions équivalentes par symétrie divisée par le total des réflexions. Sa formule est :

$$R_{sym} = \frac{\sum_{hkl} |I_{hkl} - \langle I \rangle|}{\sum_{hkl} I_{hkl}}$$

Où I est l'intensité moyenne des réflexions équivalentes par rapport à l'intensité d'une réflexion équivalente I_{hkl} .

6.5.3 Remplacement moléculaire

Le remplacement moléculaire consiste à calculer les phases à partir d'un modèle orienté et à le positionner dans la maille de la structure inconnue. Le modèle est orienté et positionné en calculant les fonctions de rotation et de translation.

➤ Fonction de rotation

Cette fonction définit l'orientation du modèle initial. Elle consiste à déterminer 3 angles d'Euler de manière à ce que la corrélation entre la fonction de Patterson du modèle orienté et celle du jeu de données soit la plus élevée possible.

$$RF(\theta_1, \theta_2, \theta_3) = \int_V P_{obs}(\vec{u}) \cdot U(\vec{u}) \cdot P_{calc}(R \cdot \vec{u}) d\vec{u}$$

Où RF est la fonction de Patterson calculée en (\vec{u}) à laquelle s'applique la matrice de rotation correspondant aux angles $(\theta_1, \theta_2, \theta_3 ; U(\vec{u}))$

$P_{obs}(\vec{u})$ est la fonction de Patterson correspondant aux facteurs de structure observés en (\vec{u})

$P_{calc}(R \cdot (\vec{u}))$ est la fonction de Patterson correspondant au modèle, calculée en $R \cdot (\vec{u})$

Le calcul de la fonction de rotation doit être limité à la distribution des vecteurs intramoléculaires. Le volume d'intégration est choisi de manière à exclure un maximum de vecteurs intermoléculaires et à y inclure un maximum de vecteurs intramoléculaires.

➤ Fonction de translation

Lorsque le modèle est orienté alors il faut le positionner correctement. Pour cela, on utilise la fonction de translation qui le positionnera dans la maille. La méthode est celle de R. Crowther et D. Blow (Crowther et blow, 1967) qui utilise les vecteurs intermoléculaires entre deux molécules symétriques. Il faut veiller à ce que la corrélation entre les distributions des vecteurs et ceux des facteurs de structures observés soit maximale pour un vecteur donné \vec{r} et reliant deux positions symétriques.

$$TF(t) = \int_V P_{\text{obs}}(\vec{u}) \cdot P_{\text{calc}}(\vec{u}, \vec{r}) d\vec{u}$$

$P_{\text{obs}}(\vec{u})$: fonction de Patterson observée en \vec{u}

$P_{\text{calc}}(\vec{u}, \vec{r})$: fonction de Patterson calculée en \vec{u} et pour le vecteur donné de \vec{r}

Les phases sont ainsi obtenues. Le remplacement moléculaire est réalisé à l'aide de PHASER (McCoy *et al.*, 2007) ou de Molrep (Murshudov *et al.*, 1997) de CCP4 (CCP4, 1994). Par la suite, le modèle est affiné.

6.5.4 Affinement du modèle

Une carte de densité électronique est obtenue grâce aux phases, alors un modèle de la structure peut être construit. L'affinement permet de corriger le modèle construit manuellement afin de réduire les erreurs et de rapprocher les facteurs de structure calculés à partir de ceux du modèle de ceux observés et de diminuer l'énergie totale du système. Pour cela, les NCS et les TLS peuvent être utilisés (Urzhumtsev *et al.*, 2013). L'affinement est réalisé soit dans PHENIX (Adams *et al.*, 2010) ou soit dans CCP4 avec REFMAC (Murshudov *et al.*, 1997), le modèle est reconstruit dans Coot (Emsley et Cowtan, 2004). Le programme de visualisation de la structure qui a été utilisé est PyMol (DeLano *et al.*, 2002).

6.5.5 Evaluation du modèle

L'objectif de l'affinement est de corriger les erreurs introduites dans le modèle lors de la reconstruction ce qui se traduit par une baisse du R_{cryst} (ou R) et du R_{free} . Le R_{free} est calculé sur un ensemble de réflexions exclues de l'affinement. Elles représentent 5 % des réflexions totales et sont choisies de manière aléatoire (Brunger *et al.*, 1992). Il donne donc des informations moins biaisées que le R_{cryst} . L'écart entre le facteur R et le R_{free} est déterminant (Tickle *et al.*, 1998). Si le R diminue alors que le R_{free} augmente, on sera dans le cas d'un sur-affinement du

modèle où le nombre d'observations n'est pas suffisant (Kleywegt et Brunger, 1996). Le facteur R est défini tel que :

$$R = \frac{\sum_{hkl} \left| |\vec{F}_{obs}| - |\vec{F}_{calc}| \right|}{\sum_{hkl} |\vec{F}_{obs}|}$$

Le R exprime donc l'adéquation entre les données expérimentales et la structure par l'intermédiaire des facteurs de structure observés et calculés.

De plus, le modèle doit être conforme à certaines règles. Le diagramme de Ramachandran (Ramakrishnan et Ramachandran, 1965) doit présenter l'ensemble de la stéréochimie de la chaîne polypeptidique dans la partie du diagramme estimée comme correcte. Les rotamères des résidus de la structure doivent être compris parmi ceux les plus répandus dans les structures biologiques (bien qu'il existe quelques rares exceptions) et la géométrie du squelette carboné doit être respectée (Laskowski *et al.*, 1993 ; Lovell *et al.*, 2003 ; Tickle *et al.*, 2007).

7 Diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS)

7.1 Principe et objectif de la diffusion des rayons X aux petits angles

L'objectif du SAXS est de déterminer l'enveloppe d'une macromolécule à basse résolution (10 à 15 Å) (Hao *et al.*, 2006). La protéine est en solution, son comportement devrait être similaire à celui qu'elle a en condition physiologique. Ainsi, il est alors possible de réaliser des études sur la cinétique d'une réaction enzymatique, ou sur les régions désordonnées d'une molécule ou encore sur le changement conformationnel d'une molécule ou sur des interactions protéine-protéine (Kim *et al.*, 2008 ; Blobel *et al.*, 2009 ; Yang *et al.*, 2014). Le SAXS est une technique qui fournit des données mais le résultat final ne dépend que du traitement de ces dernières ; c'est pourquoi il est nécessaire d'avoir un esprit critique sur les résultats obtenus.

Cette technique est basée sur la diffusion des rayons X. Un échantillon en solution dans un capillaire est soumis à un faisceau de rayons X (Lipfert *et al.*, 2007). Un détecteur bidimensionnel enregistre le signal et est placé à une distance d de l'échantillon (figure n° 30) (Putnam *et al.*, 2007 ; Svergun *et al.*, 2003).

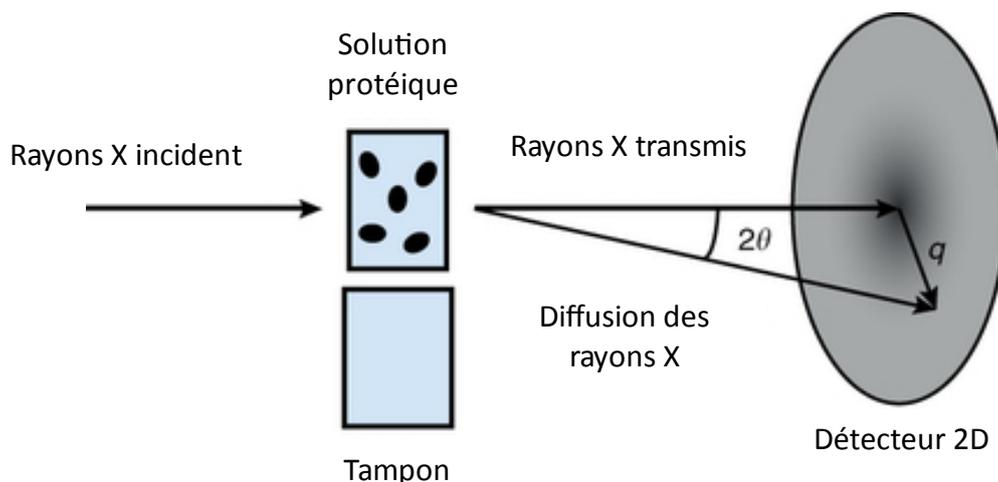


Figure n° 30. Principe du SAXS.

La figure présente le matériel utilisé pour une expérience de SAXS ainsi que les grandeurs utilisées pour le SAXS (Skou *et al.*, 2014).

Le SAXS se base sur la différence de la densité électronique moyenne de la protéine dans le tampon par rapport à celle du tampon seul. La différence donne l'information sur la protéine seule.

$$\rho_{(\text{protéine})} = \rho_{(\text{protéine+tampon})} - \rho_{(\text{tampon})}$$

Aucune image directe n'est obtenue. Seul le signal enregistré à basse résolution est intéressant plus précisément le signal enregistré aux petits angles (petits q de 0 à 5 nm^{-1}). En effet, le phénomène est un phénomène de diffusion isotrope ce qui signifie que le signal atteint un maximum et que par rapport à ce point central on observe une symétrie. L'intensité du signal aux petits angles donne des informations sur la masse moléculaire, le rayon de gyration R_g , la fonction de distribution des distances ainsi que l'enveloppe de l'objet observé.

7.2 Préparation des échantillons pour le SAXS

L'étape de la préparation des échantillons est une étape primordiale. Le tampon préparé pour réaliser la soustraction de son intensité par rapport à l'échantillon protéique doit être identique à la solution dans laquelle est placée la protéine. Dans le cas contraire, les données ne seront pas exploitables. En général, deux méthodes sont possibles pour atteindre ce résultat :

- ✓ à l'aide d'une chromatographie d'exclusion moléculaire en conservant le tampon dans lequel est placée la protéine (BM29 proposent également de faire cette étape directement en amont de l'irradiation de l'échantillon, ceci permet d'avoir de meilleur résultat).
- ✓ en récupérant le tampon issu de la concentration de la protéine à l'aide d'un concentrateur.

Pour une expérience sur la ligne BM29 de l'ESRF, les échantillons préparés doivent avoir un volume final de 50 μ L à trois concentrations différentes au minimum. L'enregistrement se fait tel que 10 images de diffusion de 10 secondes par échantillon soient enregistrées. L'enregistrement se fait dans cet ordre : le tampon, l'échantillon, le tampon. La concentration en protéine doit être supérieure à 1 mg/mL et elle peut aller jusqu'à 20 mg/mL (Zhang *et al.*, 2007). La solution protéique doit être une solution monodisperse sans agrégation, et la protéine doit avoir une seule conformation. Pour éviter ou diminuer les dommages causés par l'irradiation aux rayons X, il est possible d'ajouter un composant supplémentaire tel que le glycérol (> 5 %), le DTT, ou le β -mercaptoéthanol et/ou alors d'utiliser le système en flux et non en statique. Il est recommandé au préalable de réaliser des expériences biochimiques et biophysiques afin de déterminer les conditions dans lesquelles la protéine est stable et est sous un seul état d'oligomérisation. Pour se faire, il est conseillé de faire des gels natifs, des chromatographies d'exclusion stérique (SEC) couplées ou non à la diffusion de lumière à plusieurs angles (SEC-MALLS), de la diffusion dynamique de la lumière (DLS) ou de l'AUC. L'échantillon de ceQORH étant congelé avec du glycérol, une PD10 a été réalisée dans le but de le supprimer. La PD10 a été équilibrée avec 10 mM de Tris pH 7,5. Une fois cette étape réalisée, la protéine est concentrée à l'aide d'un concentrateur de 10 kDa. Les centrifugations se font par cycle de 20 min, à 4°C à 3500 g. La dilution de la protéine pour atteindre la concentration souhaitée se fait avec le tampon passant au travers lors de la concentration. C'est également le tampon utilisé pour l'expérience de SAXS.

Les manipulations de SAXS se sont toutes déroulées à l'ESRF sur la ligne BM29. La première manipulation de SAXS a été réalisée en mode statique puis les autres ont été réalisées en flux continu. Avant chaque manipulation sur la ligne, une calibration était réalisée à l'aide de l'albumine de sérum bovin (BSA).

7.3 Traitement des données obtenues par SAXS

La première étape du traitement des données consiste à soustraire le signal du tampon de celui de la solution protéique. Cette soustraction met en évidence si le tampon utilisé est bien identique à celui de la solution protéique. Elle permet aussi de vérifier si l'échantillon est agrégé. Une courbe chimère peut être créée à partir des courbes obtenues pour les différentes concentrations. Par exemple, l'échantillon le moins concentré est celui qui est le moins biaisé dans les plus petites valeurs de q et le plus concentré est plus bruité dans les plus hautes valeurs de q . L'objectif du traitement est de coupler plusieurs courbes de diffusion et de ne garder que des informations partielles mais précises pour n'en faire qu'une.

7.3.1 Domaine de Guinier

Cette loi décrit la diffusion à des valeurs basses de q . Le domaine de Guinier est limité à $R_g \cdot q < 1$ ou $< 1,3$ (Receveur-Brechot *et al.*, 2012). La protéine de type globulaire a pour limite 1,3. Dans le cas où elle est allongée, la limite est de 1. La représentation de Guinier est une courbe représentant $\log I(q)$ en fonction de q^2 . Cette représentation permet de définir le rayon de gyration R_g ainsi que l'intensité à l'origine $I(0)$ (Guinier *et al.*, 1955). L'intensité à l'origine $I(0)$ est proportionnelle à la masse moléculaire de la macromolécule. Grâce à une calibration (BSA), il est alors possible de définir l'intensité à l'origine et donc la masse moléculaire.

$$I_{prot}(0) = I_{BSA}(0) \frac{C_{prot} M_{prot}}{C_{BSA} M_{BSA}}$$

C : concentration en g/L

M : masse moléculaire en g/mol

Le rayon de gyration est une moyenne quadratique des distances interatomiques du barycentre pondéré par la densité électronique (ρ). Si la courbe est proche d'une droite alors la solution est considérée comme monodisperse, à l'inverse cela signifie que la protéine s'est agrégée. Cependant si on obtient une bonne estimation de la masse moléculaire mais que le rayon de gyration est différent alors il est probable qu'il y ait eu un changement conformationnel. A l'inverse si l'estimation de la masse moléculaire est erronée mais que le rayon de gyration est relativement similaire alors cela signifie que la protéine s'est oligomérisée. Cette partie de traitement de données a été traitée avec PRIMUS (Konarev *et al.*, 2003) et également avec SCATTER (Rambo *et al.*, 2013).

7.3.2 Représentation Kratky plot

La représentation de Kratky plot, $q^2 I(q)$ en fonction de q (KRATKY et POROD, 1949) met en évidence l'état de la protéine. L'allure de la courbe est informative sur l'état de repliement de cette dernière. La loi de Porod indique que pour une protéine globulaire l'intensité de diffusion $I(q)$ diminue en q^{-4} dans les valeurs les plus hautes de q et une protéine dénaturée ou flexible diminue en q^{-2} . Pour faire la différence, l'analyse de la représentation de Kratky plot est souhaitable. La représentation normalisée de Kratky plot y (Durand *et al.*, 2010), permet de prendre en considération le R_g de la protéine, et $I(q)$ est divisé par $I(0)$. En effet, la représentation se fait avec $R_g q^2 I(q) / I(0)$ en fonction de $R_g q$. Ces opérations permettent de s'affranchir de la taille de la protéine et du poids moléculaire. Ainsi il est possible de comparer les protéines entre elles. Ensuite, la courbe de Kratky représentant $q^2 I(q)$ vs q permet de savoir l'état de repliement de la protéine.

7.3.3 Fonction de distribution

$P(r)$ correspond à la transformée de Fourier inverse de l'intensité diffusée $I(q)$. Cette fonction de distribution permet de déterminer le diamètre maximal (d_{\max}) de la particule. Elle représente l'autocorrélation et met en évidence la distance interatomique maximale au sein de la particule définie à partir des électrons. La fonction de distribution des distances est représentée par un histogramme des distances entre paires d'atomes intramoléculaires. Elle donne des informations sur la forme de la molécule et sur le d_{\max} . Chaque courbe correspond à un type de forme de la particule.

7.3.4 Calcul de forme

Si tous ces paramètres sont vérifiés et cohérents, il est possible de reconstruire un modèle de la protéine à partir de la courbe de diffusion de façon *Ab initio*. Une enveloppe constituée de pseudo atomes est calculée par un recuit-simulé ce qui donnera lieu à une modélisation moléculaire. Pour cela, la courbe de diffusion et la $p(R)$ sont utilisées. Le modèle résultant doit être compact et surtout connecté sans vide apparent. Le programme Damaver permet de faire une moyenne de différents modèles obtenus. Il compare, superpose les modèles puis fait une moyenne et filtre.

Dans le cas où la structure tridimensionnelle d'un domaine ou de la protéine est déjà définie alors un des programmes utilisés est BUNCH. Ce programme tente d'accorder la structure 3D avec les informations obtenues de l'enveloppe. Afin de vérifier que les contacts cristallins n'ont pas engendré un changement conformationnel inopiné le programme Crysol permet de calculer une courbe de diffusion théorique à partir d'une structure. La comparaison entre les deux courbes permet de savoir si le modèle est cohérent ou s'il y a eu un changement de conformation ou d'oligomérisation. Si cela est dû à un état d'oligomérisation différent alors le programme SASREF permet de modéliser un dimère par exemple.

Partie IV. ETUDES BIO-INFORMATIQUES

1 Caractérisation des protéines d'intérêt

1.1 Détermination des caractéristiques physico-chimiques

Les caractéristiques physico-chimiques des protéines étudiées (poids moléculaire, point isoélectrique, coefficient d'extinction molaire...) sont déterminées à partir de leur séquence à l'aide du serveur ProtParam disponible sur le site d'ExPASy (<http://web.expasy.org/protparam/>). L'évaluation de ces paramètres est une étape à effectuer avant de réaliser toute expérience de biochimie.

1.2 Alignement multiple de séquences

Le programme Blastp contre différentes banques de données a été utilisé pour réaliser des alignements de séquences. Les paramètres de BlastP sont décrits ci-après. BLOSUM62 est la matrice utilisée lors de ces alignements. BLOSUM signifie **B**LOCKs **S**UBSTITUTION **M**ATRIX et a été développée par Henikoff en 1992. Elle se base sur la recherche des régions hautement conservées. Le seuil est de 10 par défaut et les gaps sont autorisés.

Le programme Clustalw2 (www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/) a été utilisé pour aligner des séquences (Larkin MA *et al.*, 2007 ; Goujon *et al.*, 2010 ; McWilliam H *et al.*, 2013).

2 Caractérisation et analyse d'une structure tridimensionnelle d'une protéine

Les homologues structuraux pour le remplacement moléculaire sont déterminés à l'aide du site du NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Ce programme permet de comparer les structures tridimensionnelles des protéines en utilisant PDBefold (Krissinel *et al.*, 2007). Le nombre de C α des structures qui se sont superposées est indiqué et la qualité de la superposition entre deux structures est estimée par le Q-Score compris entre 0 et 1. Le pourcentage d'acides aminés identiques (% seq) et le pourcentage de structures secondaires identiques (% sse) entre les deux protéines sont également indiqués. A partir de la structure d'une protéine, le programme PISA (<http://www.ebi.ac.uk/pdbe/pisa/>) permet d'estimer la probabilité de l'existence physiologique d'un complexe ou oligomère biologique de structure connue en calculant la surface enfouie aux interfaces. Les interfaces intermoléculaires et intramoléculaires sont analysées et résumées par PISA.

L'association ou l'oligomérisation des molécules doit être confirmée expérimentalement (en utilisant une technique d'analyse telle que la chromatographie d'exclusion moléculaire (SEC, le DLS, l'AUC, le SAXS) car elle pourrait être induite par l'empilement cristallin.

3 Docking sur la ceQORH

3.1 Docking des molécules substrats sur la ceQORH

3.1.1 Principe et objectif du docking

Le docking appelé aussi « *in silico* docking » est une méthode qui permet de prédire par le calcul, l'orientation d'un ligand dans un site de fixation d'une protéine. Le docking peut être utilisé pour étudier la fixation d'un ligand et estimer l'affinité *in silico* de petites molécules ligands pour une protéine. Le docking nécessite de disposer d'un modèle tridimensionnel de la protéine cible. Dans notre cas, ce modèle est obtenu par la cristallographie aux rayons X. Le docking peut être un recours pour définir l'emplacement d'un ligand en fonction de ce qui a été obtenu en cristallographie aux rayons X. A la suite du docking, des scores sont définis. La fonction de score est une méthode mathématique permettant de discriminer la meilleure pose parmi les solutions proposées c'est-à-dire les poses ayant la meilleure affinité.

3.1.2 La préparation du récepteur (ceQORH) *in silico*

Le récepteur, une structure de protéine (RMN ou cristallographie aux rayons X), doit être préparé. Les atomes d'hydrogène sont ajoutés au modèle cristallographique et la géométrie du modèle est ensuite optimisée en utilisant les champs de force (mécanisme moléculaire). L'état de protonation des résidus est déterminé en optimisant le réseau de liaisons hydrogène (protéine et molécules d'eau) en utilisant la suite de programmes de Schrödinger. De la même manière, le ligand est préparé en ajoutant les atomes d'hydrogène et en générant les différents tautomères.

3.1.3 Générer la grille d'action du docking

En cristallographie aux rayons X, il est possible d'obtenir une information partielle concernant la position d'un ligand. Le docking est alors ciblé au niveau de ce site de fixation. Pour se faire, on génère une grille de potentiel électrostatique. Deux possibilités s'offrent à l'utilisateur, soit il a déjà une partie de son ligand dans le modèle expérimental et il lui suffit de le sélectionner pour définir le centre de la grille de potentiel, soit il choisit lui-même la zone de fixation en sélectionnant les résidus environnants.

3.1.4 Docking des molécules substrats sur la ceQORH

Le calcul du docking, proprement dit, est ensuite réalisé avec le programme Glide (la suite de Schrödinger). Différentes options peuvent être choisies en fonction de la précision que l'on souhaite obtenir. A l'issue de ce calcul, une liste de solutions est obtenue, classées par scores décroissants.

3.2 Docking de la protéine CaM sur la protéine ceQORH

3.2.1 Principe et objectif du docking protéine-protéine

L'objectif est d'obtenir des prédictions de la fixation d'une protéine sur une autre protéine. Pour utiliser ce type de programme, il n'est pas nécessaire de définir une grille au préalable car le programme la calcule par lui-même. Pour cela, il définit le type d'atomes nécessaire pour l'interaction protéine-protéine.

3.2.2 Docking protéine-protéine

Autodock (<http://autodock.scripps.edu/>) est un programme utilisé en complément de la cristallographie aux rayons X, ou lors des études de "structure-based drug design" utilisées lors de la recherche de molécules inhibitrices de certaines protéines impliquées dans certaines pathologies, dans des screening virtuels (HTS), dans le docking entre deux protéines, ou encore dans les études de réaction chimique (Goodsell *et al.*, 1996). Autodock est un outil automatisé qui permet de réaliser un docking. Dans le cas de cette étude, il a été utilisé pour le docking de la CaM6 et de la CaM7 sur la ceQORH. Aucun score n'est obtenu à la fin du docking. Le résultat se traduit par une liste de prédiction de poses de la protéine sur la seconde. Les prédictions sont classées de la meilleure prédiction à la moins probable. Sur le même principe d'autres programmes ont été utilisés pour la vérification des résultats obtenus comme Z-DOCK (Chen *et al.*, 2003 ; Pierce *et al.*, 2011) et ClusterPro (Kozakov *et al.*, 2008).

RESULTATS
ET DISCUSSIONS

ceQORH

Partie I. La ceQORH, une quinone oxydoréductase

Les particularités biologiques de la ceQORH ont été présentées dans l'introduction générale. Ici nous allons nous intéresser plus particulièrement à la famille d'enzymes de la ceQORH. La ceQORH est une quinone oxydoréductase qui appartient à la superfamille des déshydrogénases/réductases à chaîne moyenne (MDR).

1 La superfamille des déshydrogénases/réductases à chaîne moyenne

Les enzymes oxydoréductases sont présentes dans les différents règnes. La superfamille des MDR est composée d'enzymes de 350 à 400 résidus environ. Les MDR sont classées en fonction de leur identité de séquences et de leur homologie structurale. Les enzymes appartenant à cette superfamille ont la capacité de fixer le NAD(H) ou le NADP(H). En général, si l'enzyme fixe le NADH, elle possède un site de fixation pour le zinc (Zn^{2+}) et présente une activité déshydrogénase. A l'inverse, si l'enzyme fixe le NADP(H), elle ne fixe pas le zinc et présente une activité réductase. Une base de données des MDR regroupant toutes les MDR a été créée : la « **Medium-Chain Dehydrogenase/Reductase Engineering Database** » (MDRED) ([Knoll et Pleiss, 2008](#)).

Les MDR fixant le zinc sont divisées en quatre familles :

- la cinnamyl alcool déshydrogénase (CAD)
- la polyol déshydrogénase (PDH)
- l'alcool déshydrogénase dimérique (ADH)
- l'alcool déshydrogénase tétramérique de levure (YADH)

Les MDR ne fixant pas le zinc sont également divisées en quatre familles ([Nordling et al., 2002](#) ; [Jornvall et al., 2010](#) ; [Hedlund et al., 2010](#)) :

- les quinones oxydoréductases (QOR)
- les protéines de réponses mitochondriales (MRF)
- les leucotriènes B4 déshydrogénases (LTD)
- les acyl-CoA réductases (ACR)

C'est cette dernière catégorie de MDR qui nous intéresse dans le cadre de cette étude et plus précisément la famille des QOR.

2 La famille des quinones oxydoréductases

La famille des quinones oxydoréductases regroupe l'ensemble des enzymes ayant pour substrat les quinones. Les quinones sont des molécules électrophiles qui peuvent être toxiques à haute concentration (Oppermann *et al.*, 2007 ; Park *et al.*, 2008). Cependant certaines enzymes ont été annotées comme appartenant à la famille des QOR sans que les substrats n'aient été définis. Le classement se fait alors seulement en se basant sur les identités de séquences. Il existe deux types de QOR : celles associées aux membranes et celles qui sont solubles. Les QOR solubles sont elles-mêmes subdivisées en deux groupes : les DT-diaphorases et les QOR comme les ζ -cristallines. Parmi le deuxième groupe, on retrouve les structures des ζ -cristalline like quinone oxydoréductase de *Pseudomonas syringae*, de *Saccharomyces cerevisiae*, de *Thermus thermophilus* HB8, d'*Escherichia coli* et de l'homme. Celles de l'homme et de la levure ont la capacité de réduire une double liaison en α , β d'un groupement carbonyle des molécules alkénals/one.

D'après la base de données MDRED, il existe à ce jour, quatre sous-familles de la famille des QOR chez *Arabidopsis thaliana* (tableau n° 8) (Nordling *et al.*, 2002 ; Persson *et al.*, 2008). La ceQORH appartient à la sous-famille des MDR027. C'est la seule enzyme appartenant à cette sous-famille retrouvée chez *Arabidopsis thaliana*.

Classe	Nom	Nombre membres total	Nombre membres <i>A. thaliana</i>	Zinc	Cofacteur
MDR004	QORX - Putative quinone oxydoréductase	486	3	non	NADP
MDR011	bpQOR - Probable quinone oxydoréductase	575	2	non	NADP
MDR015	QORL2 - Quinone oxydoréductase-like protéine 2	319	2	non	NADP
MDR027	QORH - Putative quinone-oxydoréductase homologue, chloroplastique	34	1	non	NADP

Tableau n° 8. Les différentes sous-familles des QOR chez *Arabidopsis thaliana*.

3 Caractéristiques structurales des quinones oxydoréductases

3.1 Evolution des quinones oxydoréductases

Les QOR possèdent des similitudes structurales avec GroES. La structure de GroES se compose en trois parties : *N*-terminale qui forme des liaisons hydrogène avec la sous-unité adjacente, une épingle à cheveux (hairpin) et une boucle désordonnée. Le domaine catalytique des QOR a donc évolué à partir de celui de GroES (figure n° 31) (Thorn *et al.*, 1995 ; Hunt *et al.*, 1996 ; Mande *et al.*, 1996 ; pour revue Murzin *et al.*, 1996).

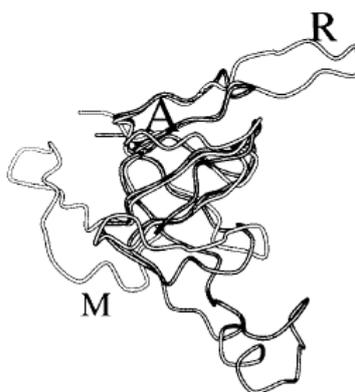


Figure n° 31. Superposition des structures de GroES d'*E. coli* et de la QOR d'*E. coli*.

GroES est représenté en blanc et la QOR (résidus 22-111) en gris. « A » : le domaine *N*-terminal, « R » : hairspin, et « M » : la boucle mobile du site actif, et qui est localisée à proximité du site de fixation du coenzyme (pour revue Murzin, 1996).

3.2 Etat d'oligomérisation des quinones oxydoréductases

La plupart des structures de QOR sont dimériques (Lilley *et al.*, 1993 ; Thorn *et al.*, 1995). Parmi elles, on retrouve :

- la quinone oxydoréductase NADPH dépendante d'*E. coli*
- la quinone oxydoréductase de *Pseudomonas syringae* pv. *Tomato DC3000* (PtoQOR)
- la ζ -cristalline like quinone oxydoréductase de *Saccharomyces cerevisiae* (Zta1)
- la quinone oxydoréductase de *Mycobacterium tuberculosis* (MtbQOR)

La seule exception est la quinone oxydoréductase de *Coxiella burnetii* (code PDB : 3TQH) qui est active sous la forme monomérique (Franklin *et al.*, 2015). L'interface entre les deux monomères des autres QOR se fait par l'intermédiaire de deux brins β anti-parallèles (figure n° 32) (Guo *et al.*, 2011 ; Zheng *et al.*, 2015).

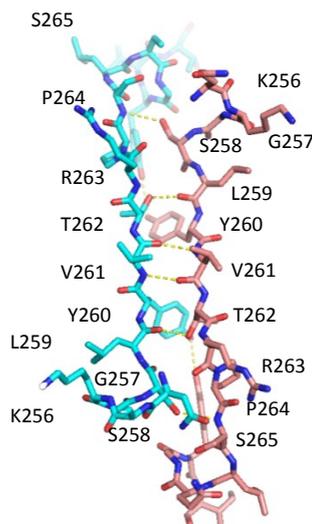


Figure n° 32. Interface entre les deux monomères de la QOR d'*E.coli*.

Chaque chaîne est représentée par une couleur différente. Les atomes sont représentés par une couleur différente : l'oxygène est en rouge, l'azote est en bleu.

3.3 Structures des quinones oxydoréductases

Les QOR sont composées de deux domaines : un domaine liant le cofacteur (contenant le repliement de Rossmann) et un domaine catalytique. Les deux domaines sont connectés par deux hélices α . Le cofacteur (NADPH) est localisé dans un grand sillon entre les deux domaines. La superposition des monomères des QOR liées ou non au NADP(H) donne des valeurs de rmsd compris entre 1,18 Å et 2,78 Å. Le repliement de chaque domaine est similaire cependant pour certaines structures de QOR, la fixation du cofacteur peut occasionner un changement de conformation globale, d'un domaine par rapport au second et/ou local c'est-à-dire d'une structure secondaire.

3.4 Changement conformationnel entre la forme apo et celle liée au cofacteur : exemple de la PtoQOR

Un changement de conformation est observé entre la forme apo et la forme liée au NADPH de la quinone oxydoréductase de *Pseudomonas syringae* pv. *Tomato DC3000* (PtoQOR) (Pan *et al.*, 2009). La distance entre les deux domaines augmente lorsque le cofacteur se fixe. Le rmsd entre les deux formes est de 0,47 Å mais si on s'intéresse uniquement à la position de l'hélice $\alpha 1$ alors le rmsd est de 1,3 Å (figure n° 33). Le changement principal est localisé au niveau de cette hélice. Ce changement doit alors favoriser la reconnaissance ou la fixation du substrat.

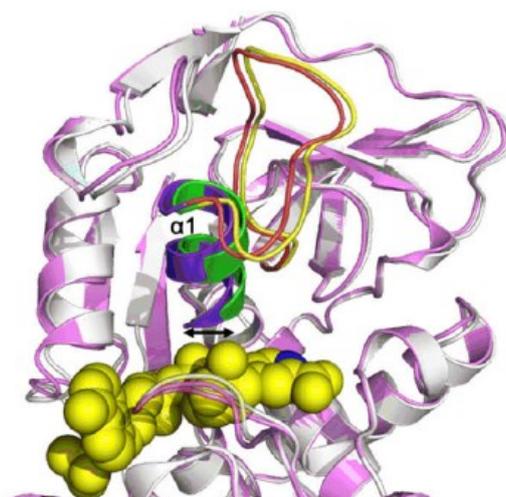


Figure n° 33. Comparaison entre les structures PtoQOR et PtoQOR-NADPH.

La forme apo est représentée en blanc et celle avec le cofacteur est représentée en rose. Le NADPH est représenté par des sphères jaunes. Les parties spécifiques et mobiles de la structure apo sont en vert et en jaune et celles liées au cofacteur sont en violet et en rouge (Pan *et al.*, 2009).

En comparant cette structure avec les structures de la QOR d'*E. coli* et de *T. thermophilus*, il s'avère que pour PtoQOR le sillon dans lequel se situe le NADPH est beaucoup plus large que pour les deux autres (figure n° 34). Cette différence contribue à la spécificité de chaque enzyme.

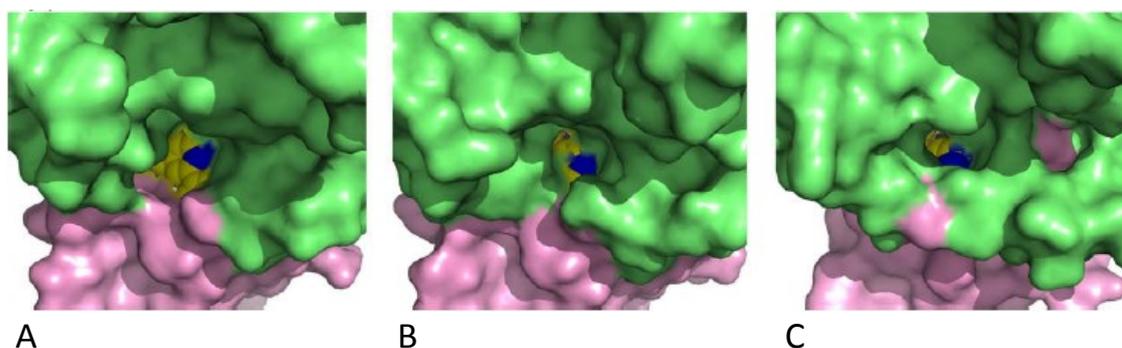


Figure n° 34. Comparaison des sillons des QOR après la fixation du NADPH.

Les deux domaines des différentes QOR sont représentés par une couleur différente. Le NADPH est représenté par des sphères jaunes et le C₄ du nicotinamide du NADPH permettant le transfert d'hydrure est en bleu (Pan *et al.*, 2009). A. PtoQOR-NADPH. B. QOR-NADPH d'*E. coli*. C. QOR-NADPH de *T. thermophilus*.

L'analyse des différentes structures de PtoQOR a permis de formuler une hypothèse sur le mécanisme réactionnel (figure n° 35). Selon l'équipe de Pan, l'enzyme sous forme apo serait

en configuration semi-fermée (I), puis la fixation du NADPH provoquerait le passage en configuration ouverte (II), puis la fixation du substrat entraînerait soit une conformation ouverte ou totalement fermée (III).

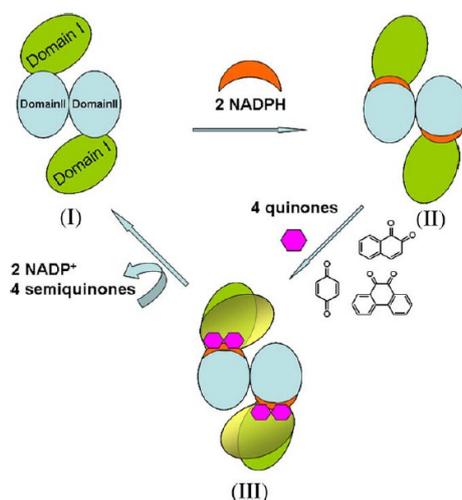


Figure n° 35. Mécanisme structural de la PtoQOR.

Les quinones sont représentées en rose. Les deux domaines de la PtoQOR sont représentés de manière schématique par des formes ovales d'une couleur différente. (I) Configuration semi-ouverte. (II) Configuration ouverte. (III) Configuration fermée ou ouverte (Pan *et al.*, 2009).

Le changement conformationnel induit par la fixation du cofacteur a également été observé pour la Zta1-NADPH avec un rmsd de 1,2 Å entre la forme apo et la forme liée au cofacteur. Dans ce cas, la configuration de l'enzyme passe d'une configuration ouverte à fermée à la suite de la fixation du cofacteur. Concernant la MtbQOR, le rmsd obtenu entre la forme apo et liée au cofacteur est d'environ 2,7 Å mettant en évidence un changement structural (Zheng *et al.*, 2015). Pour la QOR de *T. thermophilus*, aucun changement structural n'est observé lors de la fixation du cofacteur (Shimomura *et al.*, 2003). Il n'existe donc pas de règles sur les conséquences de la fixation du cofacteur sur une enzyme appartenant à la famille des QOR. Toutefois, il est intéressant de connaître le mécanisme de ces enzymes afin de pouvoir les comparer à celui de la ceQORH.

4 Première structure de la ceQORH

Avant mon arrivée au laboratoire, la structure de la ceQORH en présence de 13KOT (un inhibiteur) a été résolue à 2,8 Å de résolution par le Dr David COBESSI. L'unité asymétrique est composée de douze molécules organisées en quatre tétramères équivalents (figure n° 36). L'étude approfondie de la structure de la ceQORH sera faite tout au long de la partie résultats (*cf.* p.173).

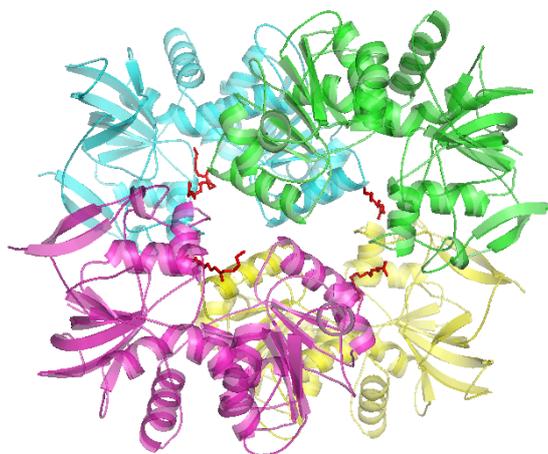


Figure n° 36. Structure de la ceQORH-13KOT.

Un des trois tétramères de la ceQORH en présence de 13KOT (bâtons rouges).

Au cours de ma thèse, une des premières problématiques à laquelle nous souhaitons répondre, est la détermination du mécanisme de reconnaissance des substrats par la ceQORH. C'est pourquoi dans une première partie, une étude menant à l'identification des molécules substrats et inhibitrices sera présentée en résultats préliminaires.

Partie II. Résultats préliminaires : la ceQORH est une γ -kétol réductase NADPH dépendante.

1 Identification des substrats biologiques de la ceQORH

La spécificité de substrat de la ceQORH a été mise en évidence par le Dr Gilles CURIEN du Laboratoire de Physiologie Cellulaire et Végétale au CEA à Grenoble. La ceQORH est définie comme une « chloroplast envelope Quinone OxidoReductase Homolog ». L'une des premières molécules identifiées comme étant un substrat de la ceQORH est la *trans* 1,3-bisphényl-2-propénone (nommée également chalcone). La chalcone appartient à la famille des quinones et est constituée de deux cycles benzéniques reliés par une chaîne carbonée composée de trois atomes de carbone sur lesquels se situe une fonction cétone et en position α de la cétone une fonction alcène (figure n° 37).

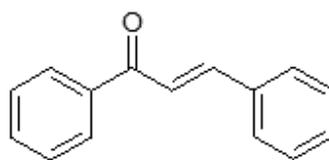


Figure n° 37. Structure chimique de la *trans* 1,3-bisphényl-2-propénone (chalcone).

D'autres quinones telles que : la duroquinone, la décylubiquinone, la coenzyme Q0, la ménadione, la ménaquinone et la phyloquinone ont été testées en cinétique enzymatique. Aucune de ces molécules ne s'est avérée être un substrat de la ceQORH. La question se pose donc de savoir si c'est l'appartenance à la famille des quinones qui fait de la chalcone un substrat de la ceQORH. Pour répondre à cette question, un mélange réactionnel contenant la ceQORH, NADPH et chalcone a été incubé pendant deux heures. L'évolution de l'absorbance à 312 nm a été suivie au cours de l'expérience. La longueur d'onde 312 nm a été choisie car c'est à cette longueur d'onde qu'absorbe la fonction alcène localisée en α de la fonction cétone.

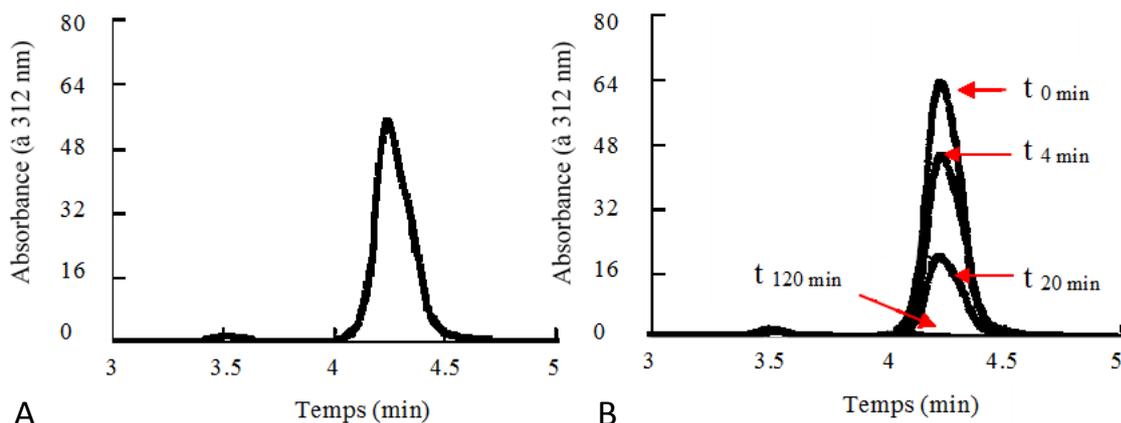


Figure n° 38. Détermination de la fonction réduite de la chalcone par la ceQORH.

A. Absorbance à 312 nm de la fonction alcène en α de la cétone de la chalcone. **B.** Evolution de l'absorbance du mélange réactionnel (ceQORH ; NADPH ; chalcone). Les mesures sont réalisées à $t = 0$ min, $t = 4$ min, $t = 20$ min et $t = 120$ min (Curien *et al.*, 2015).

On constate que l'absorbance à 312 nm diminue d'un facteur quatre après deux heures d'incubation du mélange réactionnel : ceQORH, NADPH, chalcone. La **fonction réduite par la ceQORH est donc la fonction alcène** localisée en α de la fonction cétone (figure n° 39). Il apparaît donc que les molécules substrats de la ceQORH possèdent un motif retrouvé chez les carbonyles réactifs (RC). Ils sont composés d'une fonction alcène en α , β d'un carbonyle (figure n° 39) (*cf.* p.52).

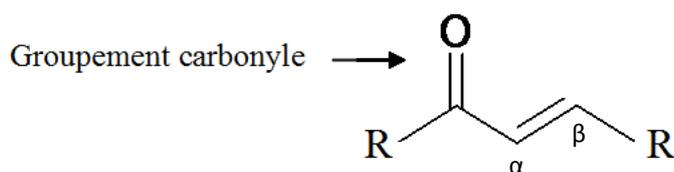


Figure n° 39. Motif ciblé par la ceQORH.

La figure représente le motif retrouvé chez les carbonyles réactifs (RC). R peut représenter un hydrogène ou d'autres atomes. Ces molécules peuvent donc être des aldéhydes (alkénals) ou des cétones (alkénones).

1.1 Les carbonyles réactifs appartenant aux aldéhydes

Le Dr Gilles CURIEN (LPCV, CEA à Grenoble) a testé plusieurs aldéhydes possédant une fonction alcène en α , β du carbonyle (tableau n° 9).

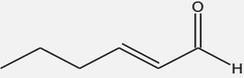
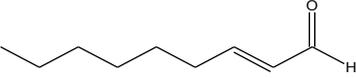
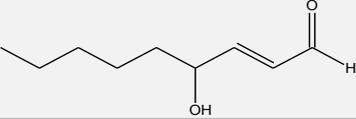
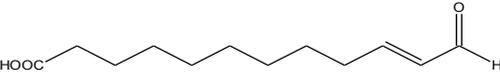
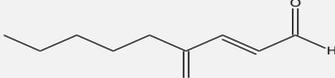
Nom de la molécule	Formule chimique	k_{cat}/K_M ($\mu\text{M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$)
<i>trans</i> -2-hexéнал		-
<i>trans</i> -2-nonéнал		$0,6\cdot 10^{-3}$
4-hydroxynonéнал		$1\cdot 10^{-3}$
Traumatine		$2\cdot 10^{-3}$
4-oxononéнал		$73\cdot 10^{-3}$

Tableau n° 9. Aldéhydes substrats de la ceQORH. Présentation des différentes molécules appartenant à la famille des aldéhydes testées sur la ceQORH. Le rapport k_{cat}/K_M est indiqué pour les molécules substrats (Curien *et al.*, 2015).

Comme le montre le tableau n° 9, les aldéhydes tels que le *trans*-2-nonéнал ou le 4-hydroxynonéнал ont un rapport k_{cat}/K_M du même ordre de grandeur contrairement au *trans*-2-hexéнал qui n'est pas un substrat de la ceQORH. Cette molécule présente une chaîne carbonée constituée de moins de neuf atomes de carbone, contrairement à toutes les autres. Il semblerait que la chaîne carbonée de la molécule substrat doive posséder **au moins neuf atomes de carbone pour être un bon substrat de la ceQORH**.

Lorsque l'on compare l'efficacité enzymatique de la ceQORH réduisant ces différentes molécules, l'une d'elles se différencie par un rapport k_{cat}/K_M de $73\cdot 10^{-3} \mu\text{M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$, soit environ un rapport 120 fois plus élevé que celui des précédentes molécules. La différence majeure est la présence d'un second groupement carbonyle en γ du carbonyle de l'aldéhyde. La question qui s'est donc posée est de savoir si les cétones ayant une fonction alcène en α sont elles aussi des substrats de la ceQORH ?

1.2 Les carbonyles réactifs appartenant aux cétones

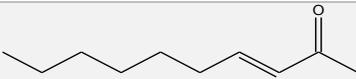
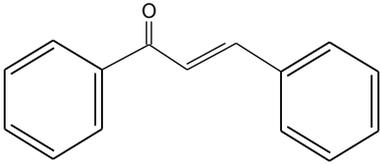
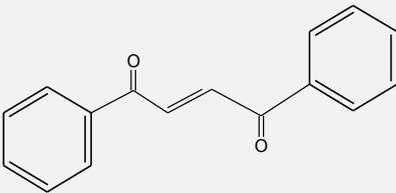
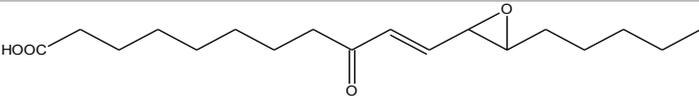
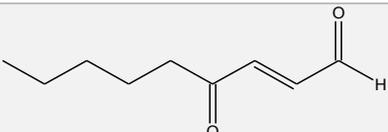
Nom de la molécule	Formule chimique	k_{cat}/K_M ($\mu\text{M}^{-1}.\text{s}^{-1}$)
<i>trans</i> -3-decène-2-one		$0,3.10^{-3}$
<i>trans</i> -1,3 diphényl-2-propénone		250.10^{-3}
<i>trans</i> -1,4-diphényl-2-butène-1,4-dione		400.10^{-3}
<i>trans</i> -EKODE-Ib		170.10^{-3}
4-oxononéal		73.10^{-3}

Tableau n° 10. Cétones substrats de la ceQORH. Présentation des molécules possédant une fonction alcène en α d'une fonction cétone et qui sont substrats de la ceQORH (Curien *et al.*, 2015).

Toutes les molécules présentées dans le tableau n° 10 sont des substrats de la ceQORH. Les rapports k_{cat}/K_M sont compris entre $0,3.10^{-3} \mu\text{M}^{-1}.\text{s}^{-1}$ et $400.10^{-3} \mu\text{M}^{-1}.\text{s}^{-1}$. La valeur maximale du rapport k_{cat}/K_M obtenue pour les cétones est environ 6 fois plus élevée que la valeur maximale du rapport d'efficacité obtenue pour les aldéhydes (à l'exception du 4-oxononéal qui possède les deux fonctions et qui est le composé présentant un rapport d'efficacité de $73.10^{-3} \mu\text{M}^{-1}.\text{s}^{-1}$). L'efficacité enzymatique de la ceQORH est donc **plus élevée pour les cétones que pour les aldéhydes**.

1.3 Un groupement carbonyle, une fonction alcène et un autre groupement oxygéné

L'environnement de la fonction alcène semble être important. En effet, la différence entre la *trans*-1,4-diphényl-2-butène-1,4-dione et la *trans*-1,3 diphényl-2-propénone se situe dans l'ajout d'un carbone sur lequel se situe un second groupement carbonyle en α de la double liaison. Ceci permet d'augmenter le rapport d'efficacité de $250 \cdot 10^{-3} \mu\text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ pour la *trans*-1,3 diphényl-2-propénone à un rapport de $400 \cdot 10^{-3} \mu\text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ pour la *trans*-1,4-diphényl-2-butène-1,4-dione (tableau n° 10). Les constantes de Michaelis pour les deux molécules sont similaires (14 et 9 μM respectivement) mais la constante catalytique est de $3,6 \text{ s}^{-1}$ pour la *trans*-1,3 diphényl-2-propénone alors qu'elle est de $4,5 \text{ s}^{-1}$ pour la *trans*-1,4-diphényl-2-butène-1,4-dione. Bien qu'elles soient du même ordre de grandeur, il semblerait que l'enzyme soit sensiblement plus efficace avec la *trans*-1,4-diphényl-2-butène-1,4-dione. Cette molécule possède une fonction chimique supplémentaire en position γ du premier groupement carbonyle. La présence d'un second groupement oxygéné (carbonyle ou hydroxyle) en γ de la première fonction carbonyle pourrait-elle induire une augmentation de l'affinité de l'enzyme pour ces molécules ?

Pour tenter de répondre à cette question, des tests de cinétique enzymatique ont été réalisés avec des molécules dont la chaîne carbonée contient plus de neuf atomes de carbone, une fonction alcène à réduire à proximité d'un groupement carbonyle et en position γ par rapport au groupement carbonyle, se situe un second groupement oxygéné (carbonyle, ou hydroxyle). Lorsque le second groupement est un hydroxyle, les molécules appartiennent à la famille des γ -kétols.

1.4 Les γ -kétols et les α -kétols

Contrairement aux γ -kétols, l'hydroxyle des α -kétols se situe en α du premier groupement carbonyle (en C₁₀). Les γ -kétols définis comme des substrats de la ceQORH sont présentés dans le tableau n° 11. Les γ -kétols tels que le 9,12 γ -kétol 18:1, le 9,12 γ -kétol 18:2 et le 10-kéto-9,13-diol sont de bons substrats. L'affinité de l'enzyme est meilleure pour le 10-kéto-9,13-diol, mais son efficacité est meilleure pour le 9,12 γ -kétol 18:1. Deux hypothèses peuvent être énoncées pour expliquer ces différences :

- l'ajout d'une troisième fonction sur la molécule augmente la spécificité mais diminue l'efficacité et réduit ainsi fortement la valeur du rapport $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$.
- la position du groupement carbonyle en position 10 au lieu de 12 aurait une influence positive sur la spécificité et donc sur la reconnaissance du substrat.

Si la molécule possède une autre fonction alcène en plus de celle qui est réduite (comme le montre la comparaison entre le 9,12 γ -kétol 18:2 et le 9,12 γ -kétol 18:1), alors l'efficacité de l'enzyme est diminuée (k_{cat}) alors que l'affinité augmente (K_M). Il est possible que cela soit lié à une diminution de la flexibilité de la molécule induite par la présence d'une double liaison supplémentaire.

Nom de la molécule	Formule chimique	k_{cat}/K_M ($\mu\text{M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$)	k_{cat} (s^{-1})	K_M (μM)
9,12 γ -kétol 18:1		$430 \cdot 10^{-3}$	$6 \pm 0,4$	14
9,12 γ -kétol 18:2		$300 \cdot 10^{-3}$	$3 \pm 0,34$	10
10-kéto- 9,13-diol		$70 \cdot 10^{-3}$	$0,2 \pm 0,03$	3
α -kétol		-	-	-

Tableau n° 11. Kétols substrats de la ceQORH. Présentation des molécules appartenant à la famille des kétols. Le rapport k_{cat}/K_M est donné pour les substrats de la ceQORH (Curien *et al.*, 2015).

A l'inverse des γ -kétols, les α -kétols ne sont pas des substrats de la ceQORH. La présence de la fonction alcène en position β du carbonyle ne correspond pas au motif ciblé (RC) par la ceQORH. La ceQORH est une enzyme spécifique des molécules possédant un carbonyle et une insaturation en α , β comme les carbonyles réactifs (RC). Elle est encore plus affine envers les γ -kétols, des molécules possédant un groupement hydroxyle en γ du carbonyle. C'est pourquoi nous avons proposé de renommer la ceQORH en **γ -kétol réductase** (figure n° 40).

La fonction carbonyle en C₁₀ pourrait avoir un rôle important dans la fixation et le positionnement de la molécule dans le site catalytique de l'enzyme permettant ainsi de réaliser la réduction de la double liaison. La stabilisation du substrat serait améliorée par la présence d'un second groupement carbonyle ou hydroxyle localisé en γ du premier carbonyle localisé en C₁₀.

Dans un souci de clarté, la protéine sera nommée ceQORH tout au long de ce manuscrit.

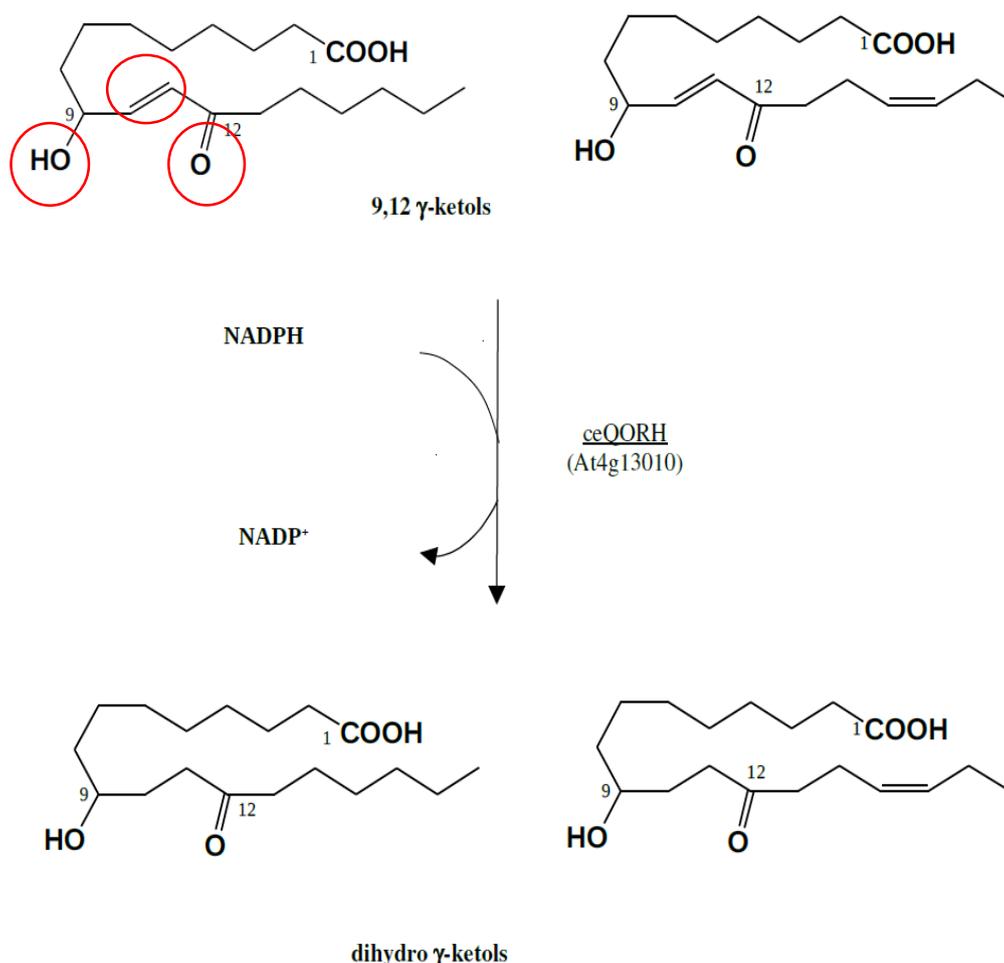


Figure n° 40. Molécules substrats de la ceQORH (les 9,12 γ -kétols).

La réaction enzymatique permet de mettre en évidence les molécules substrats et les produits formés qui sont les dihydro γ -kétols. Les fonctions chimiques importantes pour définir une molécule comme substrat sont entourées en rouge (Curien *et al.*, 2015).

2 Identification des inhibiteurs de la ceQORH

2.1 Les molécules dérivées des acides gras

La plupart des molécules inhibitrices sont constituées de longues chaînes carbonées (C_{18}) (tableau n° 12). Leur structure chimique est similaire à celle des substrats. Cependant la position du carbonyle est différente, en effet, il est localisé sur le C_{13} pour les inhibiteurs alors que pour les substrats, il est localisé en C_{10} ou en C_{12} . La position des liaisons insaturées est également différente. Le type d'inhibition n'est pas encore défini. Les dérivés d'acides gras étant des inhibiteurs de la ceQORH, on peut se demander ce qu'il en est des acides gras libres ?

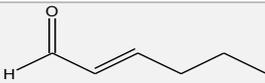
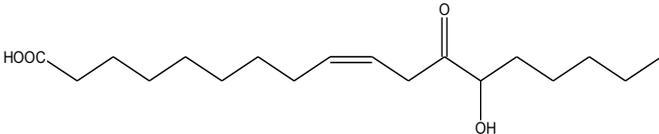
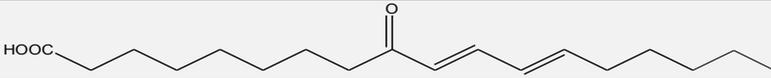
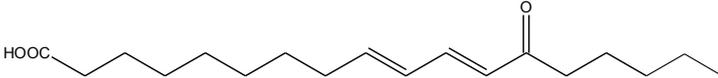
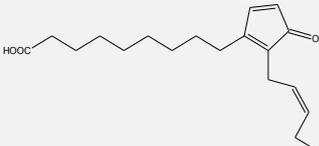
Nom de la molécule	Formule chimique
<i>trans</i> -2-hexéнал	
α -kétol	
9-KODE	
13-KODE	
12-OPDA	

Tableau n° 12. Quelques molécules inhibitrices de la ceQORH (Curien *et al.*, 2015).

2.2 Les acides gras libres

Les acides gras les plus abondants dans les membranes sont l'acide oléique, l'acide linoléique et l'acide linolénique (le C18:1, le C18:2 et le C18:3). Des études de cinétiques enzymatiques ont permis de mettre en évidence que les acides gras peuvent être des inhibiteurs de la ceQORH (figure n° 41).

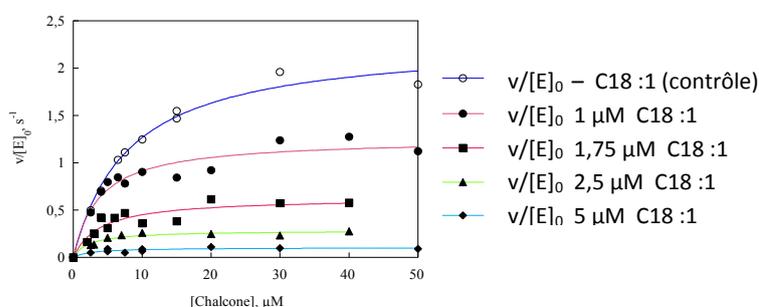


Figure n° 41. Inhibition de la ceQORH par le C18:1.

Activité enzymatique de la ceQORH sur la chalcone en présence de concentration croissante d'acide oléique (Gilles Curien, non publié).

Des expériences similaires avec d'autres acides gras ont montré que l'acide oléique (C18:1) est un meilleur inhibiteur que l'acide linoléique (C18:2) et ce dernier est un meilleur inhibiteur que l'acide linolénique (C18:3). On constate que plus les liaisons insaturées sont nombreuses alors moins la molécule est efficace comme inhibiteur. La diminution de la flexibilité défavoriserait sa fixation, en limitant le nombre de conformations possibles. Le type d'inhibition n'est pas

défini mais les résultats préliminaires semblent indiquer que l'inhibition par les acides gras serait de type non-compétitif.

3 Discussions et conclusions sur les molécules substrats et inhibitrices

Le motif minimum reconnu par la ceQORH est identique à celui définissant les carbonyles réactifs appartenant aux oxylipines, présentés dans l'introduction générale (*cf.* p.52). *In vitro*, la ceQORH est active sur les carbonyles réactifs ayant plus de neuf atomes de carbone. En raison de sa localisation subcellulaire, elle ne peut agir que sur les molécules issues de la voie 13-LOX qui a lieu dans le chloroplaste. Les molécules issues de la voie 9-LOX sont cytosoliques et donc inaccessibles à la ceQORH.

La formation des γ -kétols se déroule en deux étapes. Tout d'abord, les hydroperoxydes d'acides gras sont transformés en des époxys par une allène oxyde synthétase. Ensuite en présence de H_2O_2 , l'hydroperoxyde d'acides gras va s'hydrolyser en α -kétols et en γ -kétols (*cf.* p.50). Le ratio est de quatre pour un (α -kétols : γ -kétols) *in vivo*. L'affinité de la ceQORH pour les γ -kétols nous laisse penser que ces molécules seraient les substrats biologiques de la ceQORH. Les produits réactionnels sont des dihydro γ -kétols (figure n° 40) (Grechkin *et al.*, 2000). Les concentrations en γ -kétols trouvées dans les plastes sont en accord avec cette hypothèse. Les γ -kétols sont des molécules très toxiques pour lesquelles aucun rôle n'a été identifié. Aucune autre enzyme n'a été répertoriée comme étant spécifique des γ -kétols dans le chloroplaste. A l'heure actuelle, il n'y a aucune étude décrivant les effets sur la cellule des produits réactionnels de la ceQORH.

L'*AtAOR*, une autre enzyme chloroplastique impliquée dans la détoxification (*cf.* p.56), a pour substrat des RC dont la chaîne carbonée est composée de moins de six carbones. La ceQORH ne peut réduire que les molécules dont la chaîne carbonée contient au moins neuf atomes de carbone. Ces deux enzymes seraient donc complémentaires et se chargeraient de l'ensemble des RC contenant de 3 à 18 atomes de carbone. Pourtant l'*AtAOR*, tout comme la ceQORH, est annotée comme étant une quinone oxydoréductase.

Il existe une enzyme cytosolique ayant la même fonction que la ceQORH : l'*AtAER*. Cependant, à cause de sa localisation, l'*AtAER* ne peut pas réduire les oxylipines dérivés de la voie 13-LOX localisées dans le chloroplaste. C'est cette enzyme qui agira sur les oxylipines dérivées de la voie 9-LOX.

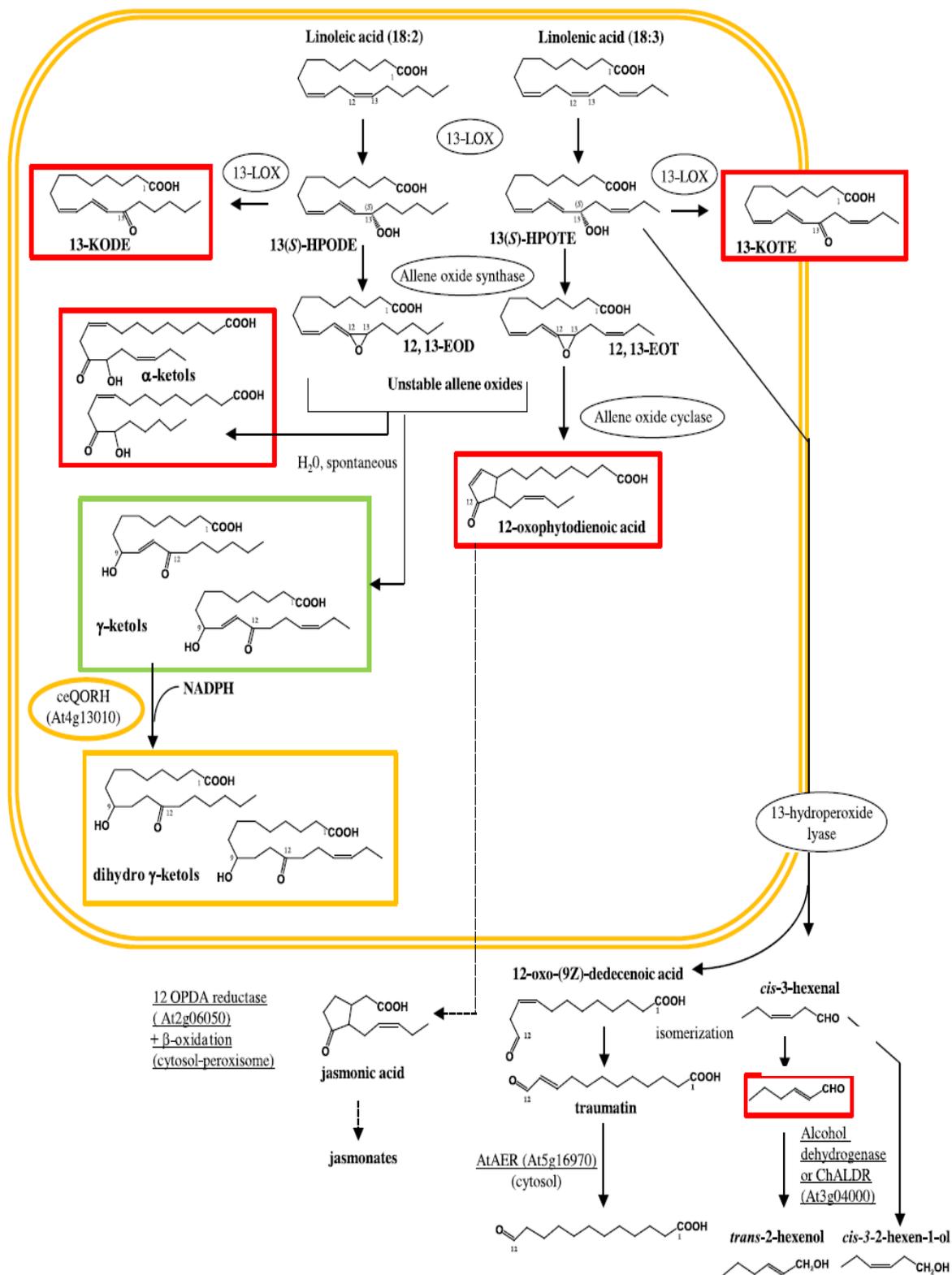


Figure n° 42. Substrats et inhibiteurs de la ceQORH dans la voie catabolique des acides gras.

Les molécules encadrées en rouge sont les molécules inhibitrices de la ceQORH. Les molécules substrats de la ceQORH sont encadrées en vert et celles produites à la suite de la réaction enzymatique entre le substrat, le NADPH et la ceQORH sont encadrées en jaune (Curien *et al.*, 2015).

Les kétodiènes (13-KOD) ou kétotriènes (13-KOT) sont des molécules produites par réactions enzymatiques de la voie 13-LOX. De part leur nature électrophile, elles sont également nocives pour la plante. A ce jour, aucune enzyme n'a été définie comme étant capable de les réduire dans le chloroplaste. Lors de cette étude, un des effets observés des kétodiènes ou kétotriènes est l'inhibition de la ceQORH qui a pour fonction la réduction d'autres oxylipines toxiques apparaissant plus tardivement dans la voie catabolique des acides gras. Les inhibiteurs de la ceQORH sont présents au sein de différentes voies cataboliques des hydroperoxydes d'acides gras. L'un d'eux, le 12-OPDA est un précurseur de la voie du jasmonate. Comme cela a été présenté en introduction, la voie du jasmonate est une voie importante chez la plante dans les réponses aux différents stress et dans le mécanisme de signalisation cellulaire. Il existe probablement une régulation complexe de l'enzyme induite en fonction d'un stress occasionné et en fonction des molécules de signalisation résultantes.

Le rôle physiologique de la ceQORH ne peut être clairement défini. L'invalidation du gène de la ceQORH n'entraîne aucun changement du phénotype de la plante. La ceQORH ne semble donc pas importante pour le développement et la croissance de la plante. Cependant cette même expérience n'a pas été menée dans le cas où la plante aurait été soumise à des conditions stressantes.

A la suite de ces résultats, l'objectif est de déterminer le mécanisme de reconnaissance et de fixation des substrats de la ceQORH. Les réactions de réduction des composés carbonyles insaturés en γ , β emploient généralement le NADPH au lieu du NADH. La concentration du NADPH étant dix fois plus élevée que celle du NADH *in vivo*, le NADPH est donc plus disponible pour réaliser les réactions de détoxification (Yamauchi *et al.*, 2011). Intéressons-nous donc maintenant à la structure de l'enzyme apo et liée au NADPH afin d'étudier la fixation du NADPH sur la ceQORH ainsi que son site catalytique.

Partie III. Etude de la ceQORH apo et de la ceQORH-NADPH

1 Etude de la ceQORH apo et de la ceQORH-NADPH en solution

1.1 Purification de la ceQORH

La purification de la ceQORH a été réalisée en utilisant le protocole mis au point par nos collaborateurs au laboratoire de Physiologie Cellulaire et Végétale au CEA à Grenoble (*cf.* p.68).

1.1.1 Chromatographie sur colonne échangeuse d'anions

La première étape de purification consiste à utiliser une chromatographie échangeuse d'anions, la DEAE-Sepharose[®]. Le point isoélectrique de la ceQORH est situé à un pH basique (pI = 9,05), la protéine est donc chargée positivement à un pH de 7,5. La ceQORH n'est pas retenue par la résine. Cette étape permet d'éliminer de nombreux contaminants présents initialement dans le lysat cellulaire (figure n° 43). Il est à noter qu'une fraction de la ceQORH est éluée à 1 M de KCl (piste n° 8 de la figure n° 43).

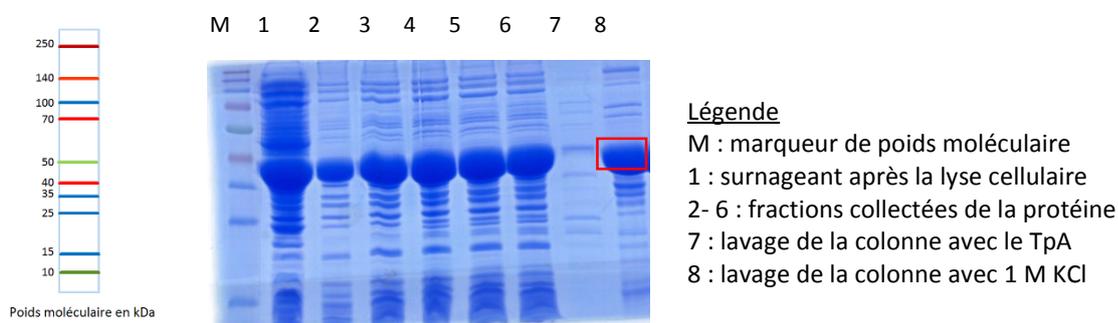


Figure n° 43. Gel SDS-PAGE après l'étape de la DEAE-Sepharose[®].

Le gel SDS-PAGE (15 % d'acrylamide) permet de déterminer la composition en protéine des échantillons prélevés avant (1), pendant (2-6) et après (7-8) l'étape n° 1 de la purification de la ceQORH. La première étape consiste à ce que la ceQORH passe au travers d'une colonne échangeuse d'anions, la DEAE-Sepharose[®]. Les poids moléculaires en kDa indiqués par le marqueur sont indiqués à gauche du gel SDS-PAGE. Pour connaître la composition des tampons *cf.* Annexe n° 3.

1.1.2 Chromatographie sur colonne échangeuse de cations

La seconde étape de purification consiste à utiliser une résine échangeuse de cations (S-Sepharose[®]). Le chromatogramme de cette étape de purification met en évidence la présence de deux pics d'absorbance à 280 nm (figure n° 44). L'analyse électrophorétique sur gel SDS-PAGE des échantillons issus des différents pics d'absorbance à 280 nm révèle la présence d'une

protéine dont le poids moléculaire est proche de celui de la ceQORH. Après vérification de l'activité enzymatique, on est en mesure de confirmer que la protéine majoritaire est la ceQORH dans chacun des deux pics. La différence entre ces derniers se situe dans la valeur du ratio de l'absorbance à 260 nm sur la valeur de l'absorbance à 280 nm. Il existe également une différence au niveau de l'activité enzymatique spécifique. Le lot de protéine possédant la meilleure activité spécifique est celui issu du pic dont le ratio de la valeur de l'absorbance à 260 nm sur la valeur de l'absorbance à 280 nm est inférieur à 1, soit le pic 2 (figure n° 44).

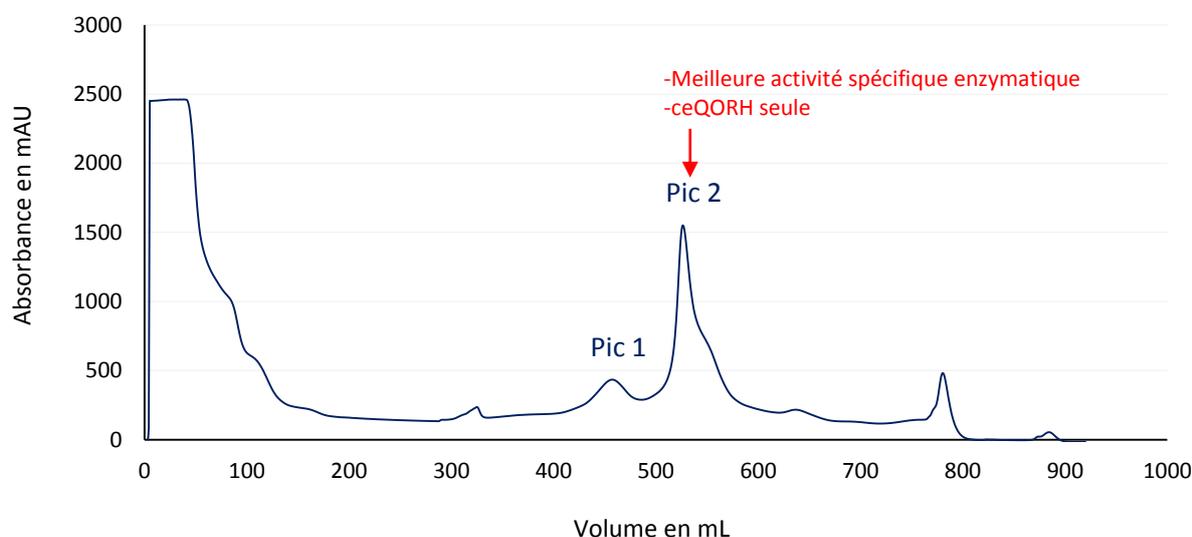


Figure n° 44. Chromatogramme issu de la S-Sepharose®.

L'échantillon obtenu à la suite de la DEAE-Sepharose® est injecté sur la colonne échangeuse de cations de 0 mL à 50 mL. Puis, le tampon A est injecté afin de retrouver la ligne de base de l'absorbance. Ensuite l'élution des protéines chargées positivement est réalisée à l'aide d'un gradient de sel à partir de 250 mL. La ceQORH élue à 150 mM de KCl (pic 1) et à 200 mM de KCl (pic 2).

Le ratio de la valeur de l'absorbance à 260 nm sur la valeur de l'absorbance à 280 nm permet d'obtenir des informations sur l'état libre ou non de la protéine. Si le ratio est inférieur à 1, la ceQORH serait sous la forme apo. Dans le cas contraire, elle serait sous la forme d'un complexe fixant une molécule absorbant à 260 nm. L'entité se complexant à la ceQORH pourrait être un acide nucléique par exemple. Le volume d'élution est différent, cela signifie que la force ionique nécessaire pour l'élution des deux formes de la ceQORH est différente. On peut supposer que la molécule absorbant à 260 nm soit chargée négativement (concentration en sel plus faible pour l'élution du complexe). Cette partie-là n'a pas été davantage étudiée.

1.1.3 Chromatographie d'exclusion moléculaire

La dernière étape de purification est une chromatographie d'exclusion moléculaire (S-Superdex[®] S200 HiLoad 16/60). Cette étape permet d'éliminer les contaminants restants. Les profils obtenus sur cette colonne dépendent de la concentration en protéine mais aussi de la provenance de l'échantillon (pic 1 ou pic 2 de l'étape précédente).

1.1.3.1 ceQORH sous forme de complexe : pic 1 de la S-Sepharose[®]

L'échantillon issu du pic 1 de la S-Sepharose[®] ne présente qu'un seul pic d'absorbance à 280 nm à un volume d'élution de 82 mL (figure n° 45). Grâce à la migration de l'échantillon sur gel SDS-PAGE, on est en mesure de confirmer qu'il s'agit bien de la ceQORH pure. La ceQORH serait alors dans un seul état oligomérique qui serait la forme dimérique.

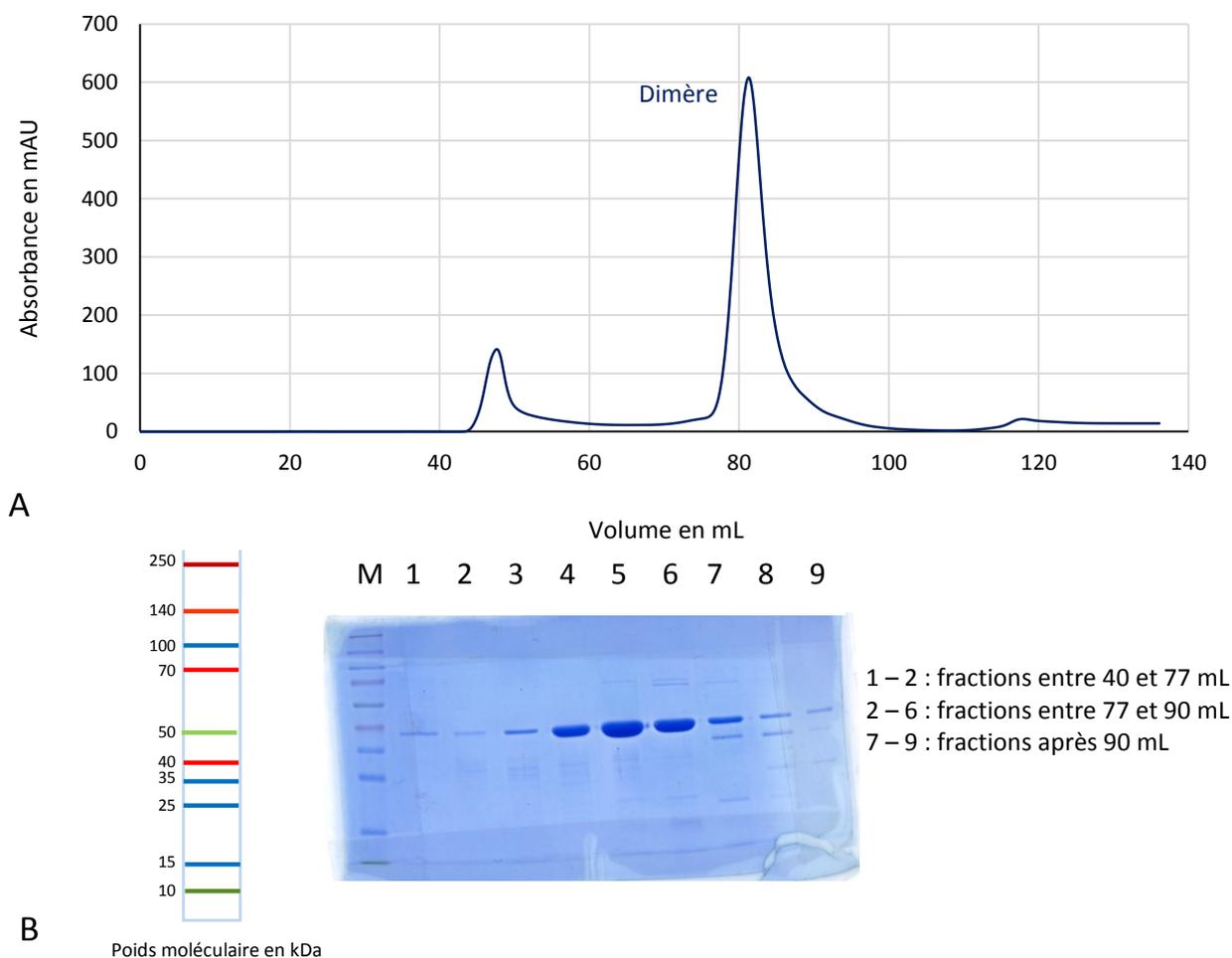


Figure n° 45. Chromatogramme et gel SDS-PAGE de la S200 (complexe).

A. Ce chromatogramme correspond à l'élution de l'échantillon issu du pic 1 de la S-Sepharose[®]. Le volume de la résine est de 120 mL. Le volume mort est de 40 mL. Le 0 correspond à l'injection de l'échantillon. **B.** Le gel SDS-PAGE présente la migration des échantillons collectés à la fin de la chromatographie d'exclusion moléculaire. Les poids moléculaires du marqueur sont indiqués en kDa à la gauche du gel SDS-PAGE (15 %).

1.1.3.2 ceQORH apo : pic 2 de la S-Sepharose®

Pour l'échantillon issu du pic 2 de la S-Sepharose®, trois pics d'absorbance à 280 nm sont observés à : 74 mL, 82 mL et 94 mL (figure n° 46). L'analyse sur gel SDS-PAGE confirme qu'il s'agit bien de la ceQORH pure. Le pic majoritaire est celui éluant à un volume d'éluion de 94 mL, c'est donc la forme monomérique qui est majoritaire. La seconde forme la plus représentée est la forme tétramérique. Les tests réalisés avec et sans glycérol, ou avec ou sans DTT n'ont pas affecté le profil du chromatogramme obtenu pour le pic 2 de la S-Sepharose®. Le rendement de la purification pour la ceQORH apo est de 14 mg par litre de culture.

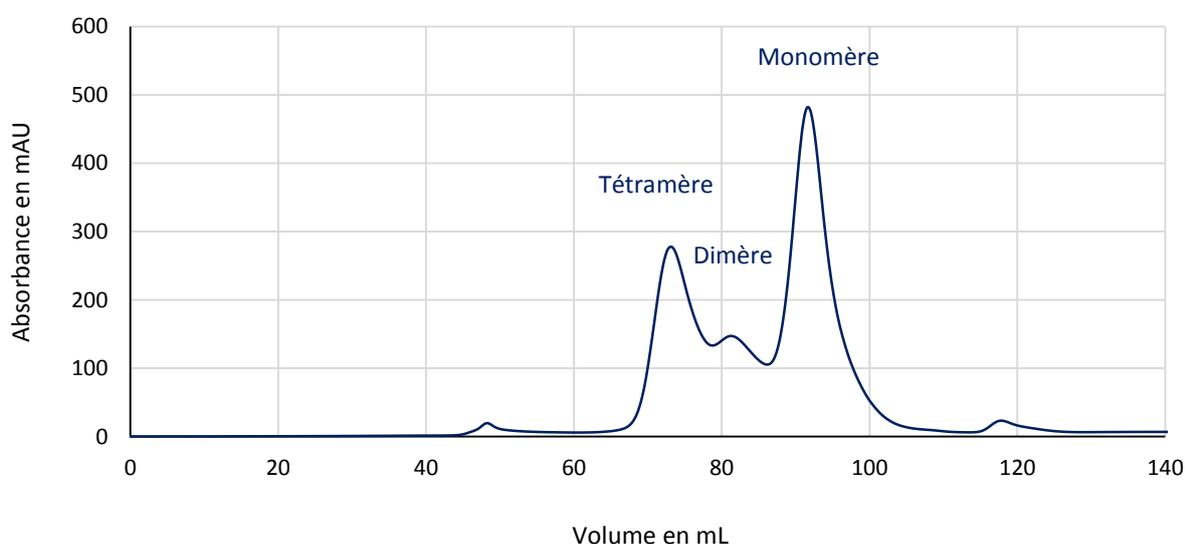


Figure n° 46. Chromatogramme de la S200 (apo).

L'échantillon est injecté sur la colonne de chromatographie d'exclusion moléculaire dont le volume de la résine est de 120 mL et le volume mort est de 40 mL. Le « 0 mL » correspond à l'injection de l'échantillon. Les trois pics d'absorbance à 280 nm correspondent au monomère, dimère, tétramère de la ceQORH.

Ces résultats montrent que la ceQORH existe sous différentes **formes oligomériques en solution**. Afin de caractériser plus finement le comportement de la protéine en solution, des expériences d'ultracentrifugation analytique (AUC) ont été réalisées.

1.2 Etude de l'état oligomérique de la ceQORH et ceQORH-NADPH par AUC

Les coefficients de sédimentation théoriques de la ceQORH en fonction de ses états oligomériques sont présentés dans le tableau n° 13 (pour le calcul des coefficients de sédimentation, la ceQORH est considérée comme étant globulaire et compacte).

Nombre de molécules de ceQORH	1	2	4	6	8
Coefficient de sédimentation théorique (S)	2,8	4,4	6,9	9,1	11,0

Tableau n° 13. Coefficients de sédimentation théoriques en fonction du nombre de molécules de ceQORH.

1.2.1 Résultats de l'AUC pour la ceQORH apo

La mesure de l'absorbance à 280 nm de la ceQORH à 0,6 mg/mL ne révèle qu'un seul pic à 3,2 S. Cependant le retour à la ligne de base n'est effectué qu'à 11 S. La résolution du pic n'est pas suffisante. Il pourrait recouvrir d'autres signaux plus faibles entre 3,3 S et 11 S. La mesure en interférence met en évidence un premier pic à 2,5 S qui était absent lors de la mesure de l'absorbance à 280 nm puis un second pic à 3,3 S. Le mode en interférence n'apporte donc aucune information supplémentaire après 3,3 S qui serait exploitable. Le pic dont le signal est le plus intense correspond à celui du pic à 3,3 S correspondant au monomère. Celui à 2,5 S pourrait être une forme dégradée de la ceQORH.

Pour l'échantillon concentré à 6 mg/mL, trois pics d'absorbance à 280 nm sont enregistrés (3,3 S ; 6,5 S ; 8 S). Les mesures en interférence permettent de confirmer la présence de plusieurs états oligomériques de la ceQORH (2,8 S ; 3,8 S ; 6 S et 9 S) (figure n° 47).

L'analyse de la figure n° 47 montre donc que **l'échantillon est hétérogène**. Le pic d'absorbance à 280 nm n'étant pas résolu pour l'échantillon à 0,6 mg/mL, on ne peut pas affirmer qu'il existe un effet de la concentration sur l'état oligomérique dans le cas présent.

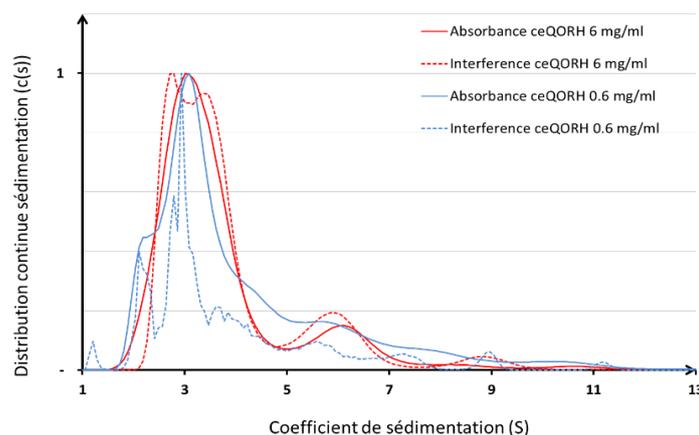


Figure n° 47. Courbe d'AUC de la ceQORH apo.

Cette courbe représente la distribution continue de sédimentation ($c(s)$) en fonction du coefficient de sédimentation (S) obtenue par la mesure de l'absorbance à 280 nm (en trait plein) ou par la mesure de l'interférence (en pointillé) de la ceQORH à deux concentrations différentes (6 mg/mL : rouge et 0,6 mg/mL : bleu).

D'après le calcul théorique, un monomère de la ceQORH aurait un coefficient de sédimentation de 2,8 S. Dans cette étude, le monomère a un coefficient de sédimentation de 3,3 S. La valeur du coefficient de sédimentation devrait être de 4,4 S pour un dimère, or celle-ci est de 3,8 S. La valeur de 6 S pourrait correspondre à un tétramère or la valeur théorique est de 7 S. A savoir que plus la concentration de l'échantillon est élevée et plus le coefficient de sédimentation mesuré sera précis car le rapport signal/bruit est meilleur. Les pics détectés sont ainsi plus résolus donnant une meilleure précision de la valeur du coefficient de sédimentation. Dans le cas de cette expérience, la valeur estimée est inférieure à la valeur théorique. Les hypothèses plausibles seraient qu'il existe un changement de conformation de la protéine lors de l'oligomérisation. Ainsi la protéine ne serait plus compacte et globulaire ce qui modifierait les valeurs théoriques du coefficient de friction et donc du coefficient de sédimentation. Ou tout simplement la protéine n'est pas globulaire ce qui fausse le calcul de la valeur théorique des coefficients de sédimentation.

Concentration massique de la ceQORH (mg/mL)	Optique	Coefficient de sédimentation maximum (S)
0,6	Absorbance à 280 nm	3,3
0,6	Interférence	2,9
6	Absorbance à 280 nm	2,6
6	Interférence	2,8

Tableau n° 14. Coefficients de sédimentation maximum en fonction de la concentration de ceQORH.

Le comportement de la protéine lors de cette expérience met en évidence **l'apparition de trois états oligomériques** différents de la ceQORH apo : un monomère, un dimère et un tétramère. La forme majoritaire serait le monomère (tableau n° 14). Ceci confirme les résultats obtenus lors de la purification de la ceQORH.

1.2.2 Résultats de l'AUC pour le complexe ceQORH-NADPH

Pour l'échantillon de ceQORH à 0,6 mg/mL (17,4 μ M) liée au NADPH (1,45 mM NADPH), sa mesure par interférence révèle un seul pic situé à 2,76 S et représente 91 % du signal relevé. La mesure en absorbance n'a pas été réalisée.

Pour l'échantillon de ceQORH à 6 mg/mL (174 μ M) liée au NADPH (1,45 mM NADPH), sa mesure par interférence révèle un seul pic situé à 2,82 S et représente 92 % du signal relevé et

sa mesure d'absorbance révèle un seul pic à 2,64 S et représente 87 % du signal relevé (figure n° 48 et tableau n° 15).

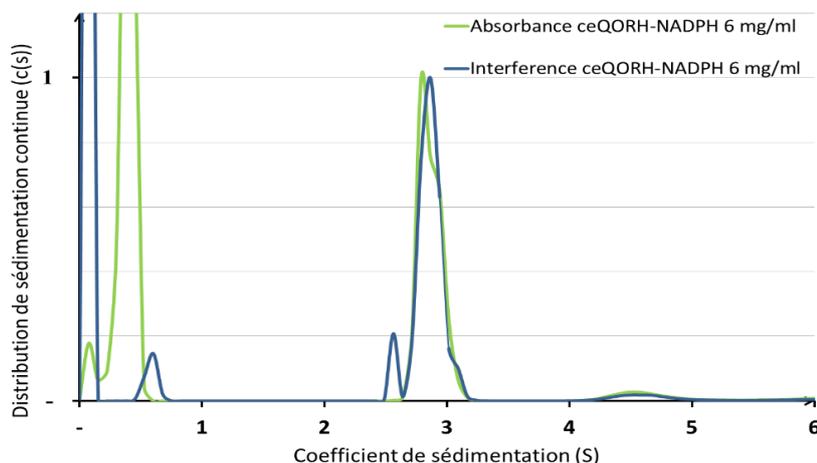


Figure n° 48. Courbe d'AUC de la ceQORH-NADPH.

Cette courbe représente le coefficient de distribution ($c(s)$) en fonction du coefficient de sédimentation (S) obtenue par la mesure de l'absorbance à 280 nm ou par la mesure de l'interférence de la ceQORH-NADPH (ceQORH : 174 μ M et NADPH : 1,45 mM).

Concentration massique de la ceQORH (mg/mL)	Concentration molaire de la ceQORH (μ mol/L)	Concentration molaire du NADPH (mmol/L)	Optique	Coefficient de sédimentation moyen (S)	Pourcentage du signal du pic majoritaire sur la totalité des signaux enregistrés (%)
0,6	17,4	1,45	Interférence	2,76	91
6	174	1,45	Absorbance à 280nm	2,64	87
6	174	1,45	Interférence	2,82	92

Tableau n° 15. Coefficients de sédimentation moyens en fonction de la concentration de la ceQORH-NADPH. Le pourcentage du signal du pic majoritaire sur la totalité des signaux enregistrés est également indiqué.

Pour l'ensemble des échantillons, le coefficient de sédimentation pour lequel a été enregistré le signal maximum pour la ceQORH-NADPH est à $2,7 \pm 0,1$ S (tableau n° 15). La concentration initiale de l'enzyme n'a aucune influence sur l'état d'oligomérisation. Le coefficient de friction est de 1,27 alors qu'il est de 1,25 pour une protéine globulaire et compacte. La ceQORH liée au NADPH est une enzyme monomérique, globulaire. **La fixation du cofacteur permet donc la monomérisation de l'enzyme.**

1.3 Etude de l'enveloppe structurale de la ceQORH et ceQORH-NADPH par SAXS

1.3.1 Résultats sur l'enveloppe structurale de la ceQORH apo par SAXS

Les expériences de SAXS ont été réalisées sur des échantillons de différentes concentrations : 0,3 mg/mL, 0,6 mg/mL et 1 mg/mL. La courbe présentée dans la figure n° 49.A. représente le $\log(I)$ en fonction de q en \AA^{-1} de l'échantillon de ceQORH à 1 mg/mL à laquelle a été soustrait le signal du tampon. Le profil de la courbe où la valeur de q est inférieure à $0,2 \text{\AA}^{-1}$ indique qu'il y a un problème lors de la soustraction du signal du tampon (position **1**) (Skou *et al.*, 2014). Cette première observation se confirme par l'aspect de la courbe en position **2** où la soustraction du signal du tampon entraîne une courbe dont les valeurs sont négatives (figure n° 49. B.), ce qui signifie que le signal de l'échantillon est plus faible que celui du tampon.

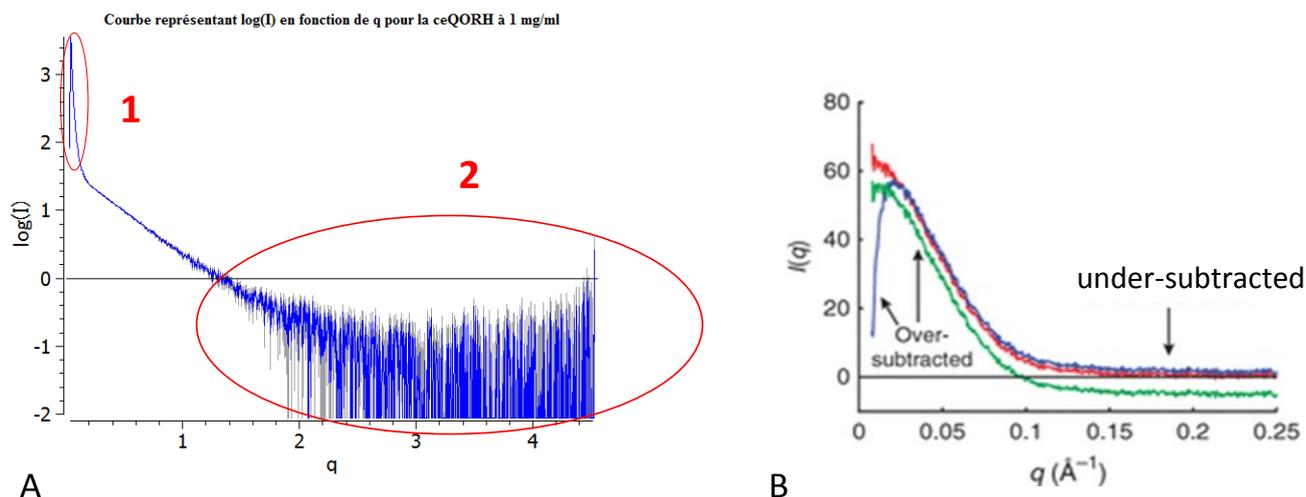


Figure n° 49. Courbes obtenues par SAXS.

A. Cette courbe représente le $\log(I)$ en fonction de q (\AA^{-1}) de l'échantillon de la ceQORH à 1 mg/mL à laquelle a été soustrait le signal du tampon. **1** et **2** sont les parties de la courbe mettant en évidence un problème dans la composition du tampon ou dans la concentration de l'échantillon (trop faible).
B. Cette figure représente des courbes de $I(q)$ en fonction de q (\AA^{-1}) de cas particuliers où les résultats ne sont pas exploitables (Skou *et al.*, 2014).

Ces résultats indiquent que la concentration de l'échantillon n'est pas suffisante et/ou que le tampon de référence est sensiblement différent de celui dans lequel est la protéine. De plus, nous avons constaté au cours de la purification de la ceQORH et lors des expériences d'AUC que la solution de ceQORH apo est hétérogène. Utiliser le SAXS pour obtenir des informations structurales n'est donc pas appropriée, c'est pourquoi l'expérience de SAXS n'a été tentée qu'une seule fois, et ce, avant les expériences d'AUC.

1.3.2 Résultats sur l'enveloppe structurale de la ceQORH-NADPH par SAXS

D'après les résultats d'AUC, la ceQORH liée au NADPH est une solution monodisperse répondant aux critères nécessaires pour obtenir des résultats en SAXS. Nous avons utilisé des échantillons à des concentrations de 1 mg/mL, 3 mg/mL, 6 mg/mL, et de 10 mg/mL contenant chacune 1,45 mM de NADPH.

➤ Traitement automatique des données de SAXS

Le traitement automatique des données du complexe ceQORH-NADPH à 1 mg/mL donne une valeur de la distance maximale (correspondant au diamètre de la molécule) inférieure (2,79) au rayon de gyration, ce qui est incohérent car elle est toujours supérieure. De plus, l'analyse de la courbe représentant le $\log I(q)$ en fonction de q montre que la protéine serait soit sous la forme « long rod » ou soit sous la forme « flat disk » (figure n° 50). L'analyse de la $p(r)$ en fonction de r en Å permet de supposer que la forme de la protéine serait en « dumbell ». Il n'y a donc pas de correspondance ni de logique dans les différents résultats. Le traitement automatique n'a donc pas donné de résultats exploitables.

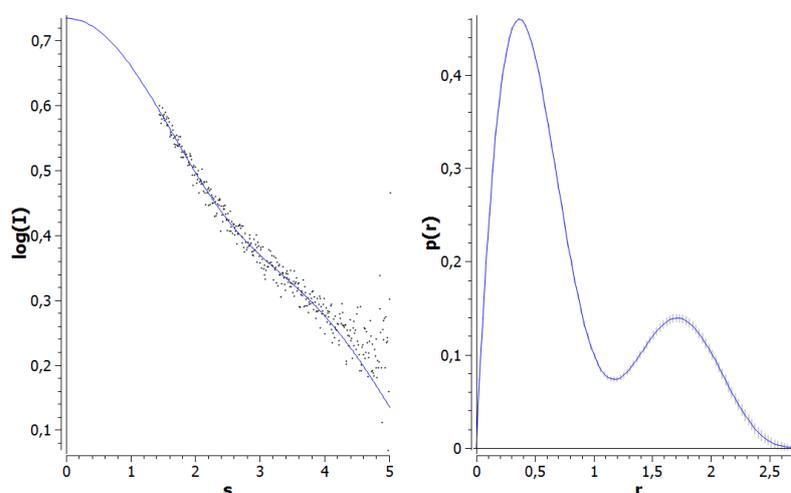


Figure n° 50. Traitement automatique des données de SAXS de la ceQORH-NADPH.

La première courbe représente le $\log(I)$ en fonction de s (Å^{-1}) et la seconde représente la $p(r)$ en fonction de r en Å.

➤ Traitement manuel des données de SAXS

En choisissant des valeurs plus restreintes manuellement pour définir le domaine de guinier, l'allure des deux courbes utilisées précédemment donne un même résultat qui irait dans le sens

d'une forme de la protéine type « flat disk ». Cependant le volume de Porod qui est de 1,25 n'est pas correct. Cela est le cas si l'objet observé est une protéine non-repliée ou flexible. L'utilisation d'une seule concentration en protéine ne peut que rarement permettre d'obtenir les informations souhaitées. Dans de nombreux cas, une courbe chimère peut être créée en utilisant une partie du signal de la courbe obtenue pour l'échantillon dont la concentration est la plus faible avec une autre partie du signal de la courbe obtenue pour l'échantillon dont la concentration est la plus élevée. En effet, à faible concentration, les interactions intermoléculaires non-physiologiques (ou agrégation) sont normalement inexistantes ou plus faibles. La seconde courbe, d'un échantillon à concentration élevée, permet d'obtenir des informations de meilleure qualité avec une plus faible contribution du bruit pour les données enregistrées dans les valeurs des q les plus élevés. Les informations intéressantes sont donc retenues puis assemblées afin d'obtenir qu'une seule courbe.

Le domaine de guinier donne la masse moléculaire de la protéine ainsi que le rayon de gyration. En effet, $I(0)$, qui est l'intensité à l'origine, est proportionnelle à la masse moléculaire. Cette information ainsi que la valeur du rayon de gyration permettent de déduire l'état de l'échantillon (agrégé ou non) et le degré d'oligomérisation. L'analyse des courbes ainsi obtenues pour le complexe ceQORH-NADPH montre que **la protéine est dépliée et agrégée**. Des résultats similaires ont été obtenus pour les différentes concentrations d'échantillon et ce, même en réalisant une courbe chimère. Le temps d'exposition aux rayons X était certainement trop élevé, entraînant ainsi une dégradation des échantillons.

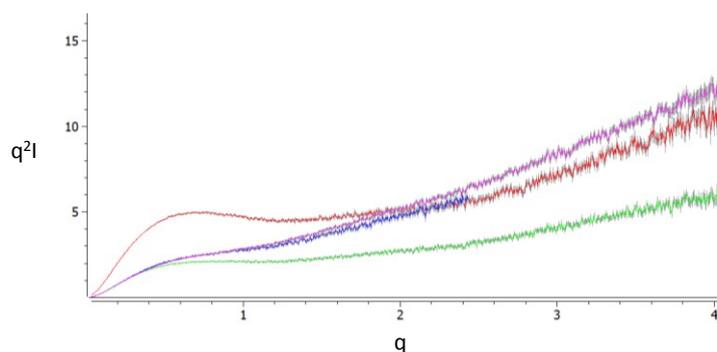


Figure n° 51. Kratky plot des données de la ceQORH-NADPH.

Chaque courbe correspond à une concentration de la ceQORH-NADPH (1 mg/mL : vert, 6 mg/mL : bleu et de 10 mg/mL : rouge, le résultat de la courbe chimère est en rose).

La technique du SAXS n'a **donc pas été fructueuse**. C'est pourquoi la résolution de la structure cristallographique de la ceQORH apo et de la ceQORH-NADPH par la technique de la cristallographie aux rayons X est primordiale pour expliquer la différence d'oligomérisation entre la ceQORH apo et la ceQORH-NADPH.

2 Structures tridimensionnelles de la ceQORH apo et de la ceQORHR58A-NADP⁺

2.1 Structure tridimensionnelle de la ceQORH apo

2.1.1 Cristallisation de la ceQORH apo

Les cristaux de la ceQORH sous la forme apo ont été obtenus de manière inattendue. En effet, la protéine a été cristallisée en présence du NADP⁺ et d'un de ses substrats nommé l'acide 9-hydroxy-12-oxo-10(E)-octadécénoïque (9,12 γ -kétol C18:2) mais il s'est avéré que les cristaux obtenus sont des cristaux de la ceQORH sous la forme apo. En fonction de la concentration en précipitant, deux types de cristaux ont été obtenus : des plaquettes très fragiles (non-montrées) et des aiguilles (figure n° 52). Les cristaux de type plaquette ne diffractaient pas les rayons X et ce, malgré l'utilisation de différentes molécules cryoprotectantes (glycérol, éthylène glycol, huile de parafilm, paratone et les deux dernières combinées). A l'inverse, les aiguilles ont diffracté les rayons X à 2,34 Å de résolution (figure n° 52). Ces aiguilles ont été obtenues dans la condition de cristallisation suivante : 0,2 M d'acétate de sodium, 0,1 M Tris-HCl à un pH de 8,5, et 32 % de PEG 4000.

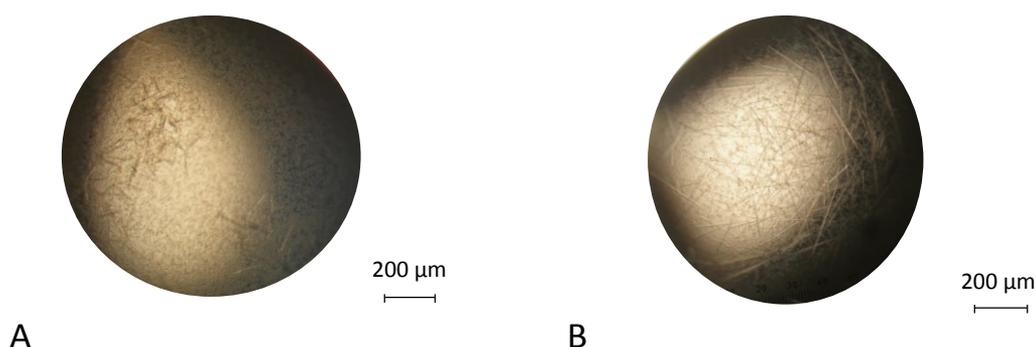


Figure n° 52. Cristaux de la ceQORH apo.

La condition de cristallisation pour les deux gouttes est : 0,2 M d'acétate de sodium, 0,1 M Tris-HCl pH 8,5 et 32 % de PEG 4000. **A.** Cristaux obtenus en présence du NADP⁺ et du 9,12 γ -kétol C18:2.

B. Cristaux obtenus sans la présence du cofacteur et du 9,12 γ -kétol C18:2.

2.1.2 Statistiques des données de diffraction et de l'affinement de la ceQORH

Le groupe d'espace est C222₁. Le jeu de données est complet à une résolution de 2,34 Å. En effet, la complétude est de 97,9 %, elle est donc supérieure à 90 %, les données sont donc

suffisantes pour les exploiter. De plus, la multiplicité est de 6,12 ce qui est correct car elle doit être au minimum de deux pour diminuer l'écart des intensités. La valeur du R_{meas} mesuré est de 14,5 ce qui est acceptable pour le traitement des données. Cette valeur est un peu élevée ce qui est probablement dû à une détérioration du cristal sous l'effet du rayonnement X au cours de l'enregistrement des données (tableau n° 16).

ceQORH	
Enregistrement	
Groupe d'espace	C222 ₁
a, b, c (Å)	44,72 142,65 209,89
Intervalle de résolution (Å)	41,82 - 2,34 (2,49 - 2,34)
R_{meas} (%)	14,5 (54,1)
$\langle I/\sigma(I) \rangle$	13,03 (2,62)
Nombre total de réflexions	172 766 (13 536)
Nombre de réflexions uniques	28 220 (4 078)
Complétude (%)	97,9 (88,9)
$CC^{1/2}$	99,3 (79,6)
Multiplicité	6,12 (3,31)
Mosaïcité (°)	0,13
Affinement	
Résolution (Å)	42,26 - 2,34 (2,42 - 2,34)
R (%)	18,23 (22,40)
R_{free} (%)	25,13 (33,21)
Nombre d'atomes	5 276
Nombre de molécules d'eau	388
Moyenne des facteurs B (Å ²)	25,64
Rmsd liaisons (Å)	0,011
Rmsd angles (°)	1,350
Ramachandran autorisé (%)	97,74

Tableau n° 16. Jeu de données de la ceQORH apo. Statistiques du jeu de données de diffraction d'un des cristaux de la ceQORH apo et de l'affinement de ce jeu de données. La dernière coquille de résolution est indiquée entre parenthèses.

Le remplacement moléculaire a été réalisé en utilisant Phaser (Mc Coy *et al.*, 2007) et un monomère du complexe ceQORH-NADP⁺-13KOT (ne contenant pas les ligands) comme modèle (cette structure a été résolue avant celle de la ceQORH apo). L'affinement a été réalisé avec Phenix (Adams *et al.*, 2012) et la reconstruction du modèle a été réalisée en utilisant COOT (Emsley *et al.*, 2004). La structure a été validée avec MolPROBITY (Lovell *et al.*, 2003) et PROCHECK (Laskowski *et al.*, 1993).

2.1.3 Analyse de la structure de la ceQORH apo

L'unité asymétrique est composée de deux molécules de ceQORH reliées par un axe de symétrie non cristallographique d'ordre 2 (figure n° 53). Lr rmsd est de 0,24 Å.

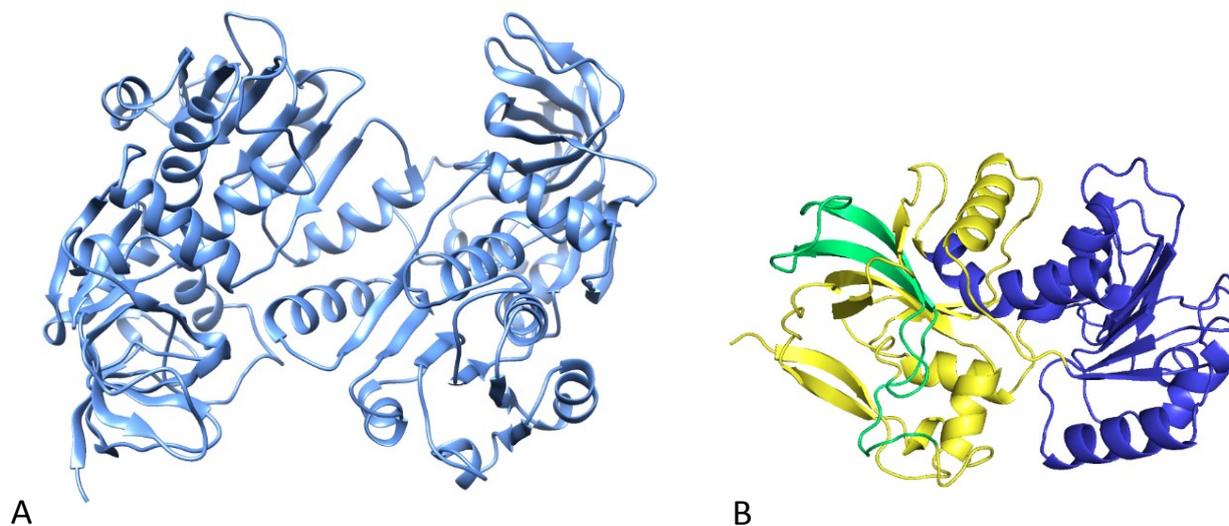


Figure n° 53. Structure de la ceQORH apo.

A. Dimère de la ceQORH représenté en ruban. La figure a été réalisée avec Chimera. **B.** Présentation des domaines de la ceQORH : le domaine de Rossmann (Ala125-Pro279) est en bleu, le domaine catalytique (Gly3-Gly124 et Lys280-Pro329) est en jaune et le peptide de transit (Pro59-Leu100) est en vert. La figure a été réalisée avec Pymol.

2.1.3.1 Le monomère de la ceQORH apo

Le monomère de la ceQORH apo est composé de deux domaines : le domaine de fixation du cofacteur contenant le repliement de Rossmann (Rossmann *et al.*, 1974) et le domaine catalytique. Le monomère a une surface accessible de 14670 Å² et une surface enfouie au niveau de l'interface entre les deux monomères de 1205 Å². Chaque monomère est constitué de 15 brins β et de dix hélices α. L'enchaînement des topologies est présenté ci-dessous :

β₁ α₁ β₂ β₃ α₂ β₄ β₅ β₆ β₇ α₃ β₈ α₄ β₉ α₅ β₁₀ α₆ β₁₁ α₇ β₁₂ α₈ β₁₃ α₉ β₁₄ α₁₀ β₁₅

➤ Le domaine de fixation du cofacteur

Le domaine de fixation du cofacteur adopte le repliement de Rossmann et s'étend de l'Ala125 à la Pro279. Il est composé de six brins β (β₈ à β₁₃) connectés par six hélices α (α₃ à α₈) (figure n° 53).

α₃ β₈ α₄ β₉ α₅ β₁₀ α₆ β₁₁ α₇ β₁₂ α₈ β₁₃

➤ Le domaine catalytique

Le domaine catalytique s'étend des résidus Gly3 à Gly124 et des résidus Lys280 à Pro329. Le domaine catalytique contient également le peptide de transit (Pro59 - Leu100) (figure n° 53).

Le peptide de transit est composé de deux brins β anti-parallèles : $\beta 4$ et $\beta 5$. Le domaine catalytique est constitué de neuf brins β et de quatre hélices α (figure n° 53).

Les deux domaines, celui permettant la fixation du cofacteur et le domaine catalytique, sont reliés par l'hélice $\alpha 3$ (Ala125 à Ala146).

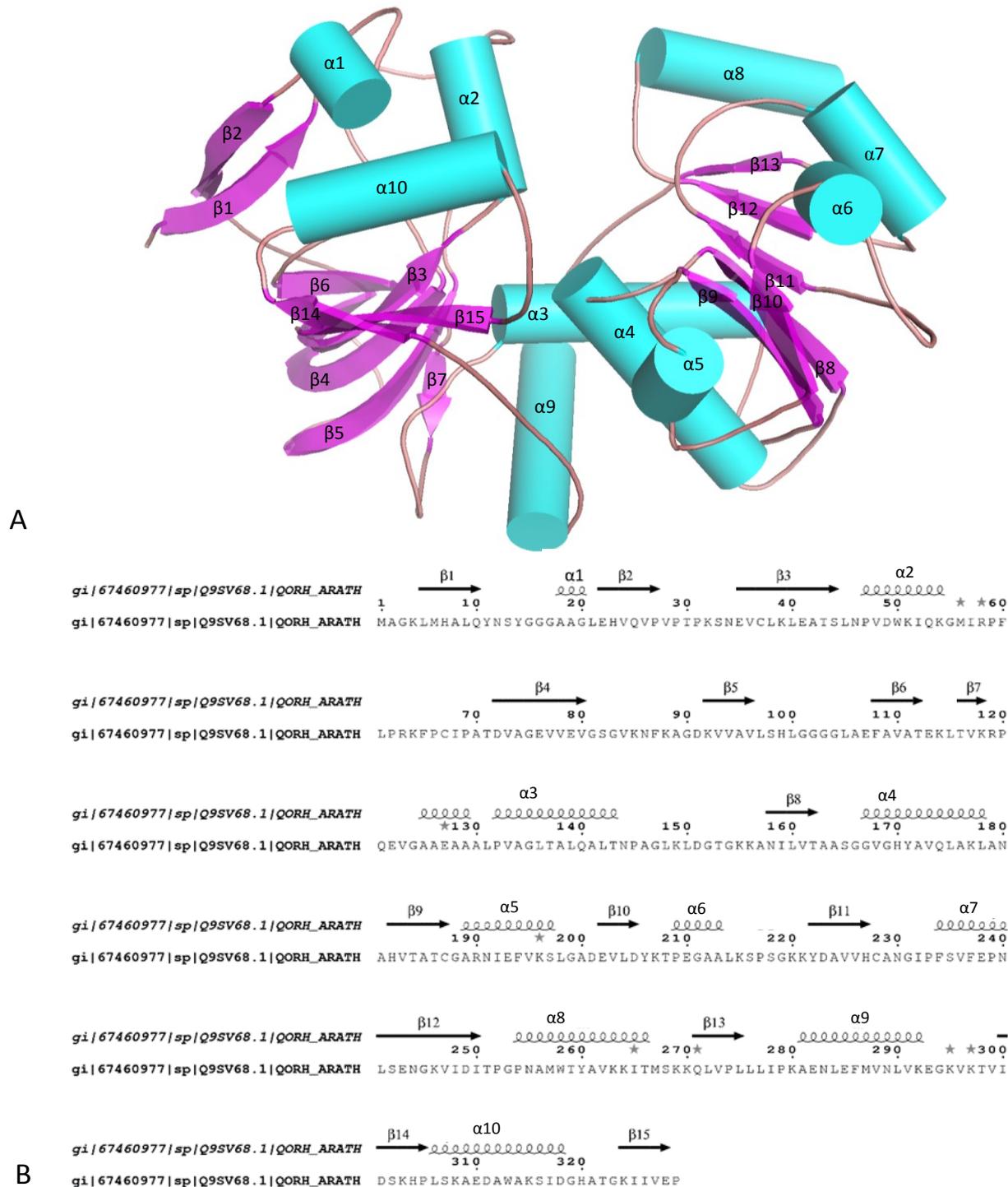


Figure n° 54. Structures secondaires de la ceQORH apo.

A. Les hélices α sont représentées en bleu et les brins β en magenta. Les structures secondaires sont numérotées à partir de l'extrémité *N*-terminale jusqu'à l'extrémité *C*-terminale. **B.** Les structures secondaires sont présentées en fonction de la séquence de la ceQORH. La figure a été réalisée à l'aide d'EsPrict 3.0 (Robert et Gouet, 2014).

2.1.3.2 Le dimère de la ceQORH apo

La surface totale accessible du dimère est de 27030 Å² et la surface enfouie totale à l'interface des monomères est de 2410 Å². L'interface entre les deux monomères est de 1205 Å² pour un monomère d'après PISA soit 8 % de sa surface totale. Chaque monomère contribue pour 50 % de la surface enfouie. Trente résidus en moyenne d'un monomère sont impliqués dans l'interface ce qui correspond à 9,5 % des résidus constituant la protéine. Trois liaisons hydrogène sont formées entre : l'His99 et la Thr266, la Lys264 (monomère A) et la Leu276 puis la Lys264 (monomère B) et la Leu276. Un π stacking est réalisé entre le Trp258 et la Pro254 (figure n° 55). La valeur de CSS (Complex formation Significance Score) étant de 1 et la surface enfouie à l'interface des deux monomères étant de 2410 Å², ces données suggèrent que **ce dimère est stable en solution**. Ce dimère est également observé en AUC ; pourtant il est à noter que les formes monomérique et tétramérique le sont aussi.

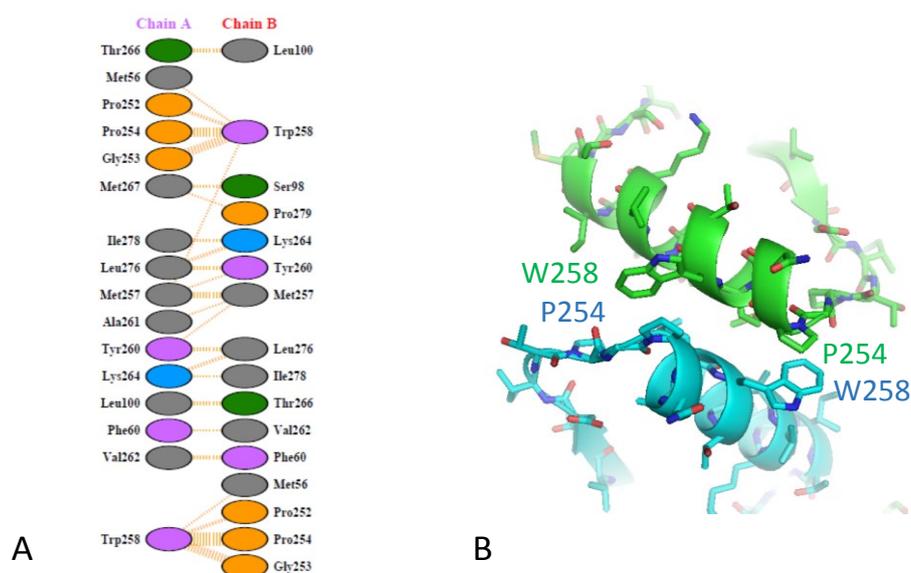


Figure n° 55. Interactions entre les deux monomères de la ceQORH.

A. Les résidus sont représentés par une couleur différente en fonction de leurs propriétés physico-chimiques. Les résidus aromatiques sont en violet, les résidus permettant un changement d'orientation du squelette carboné comme la Pro et la Gly sont en orange, les résidus hydrophobes sont en gris et les résidus polaires sont en vert. **B.** Interface entre les deux monomères de la ceQORH.

La moitié des résidus impliqués dans la dimérisation de l'enzyme sont localisés sur les boucles non-structurées de la protéine (17 résidus) (tableau n° 17). La plupart des autres résidus sont localisés au niveau de l'hélice $\alpha 8$ (Pro254 à Thr266) appartenant au domaine de Rossmann (figure n° 54 et 55). Cette hélice est excentrée du cœur de la structure ce qui fait d'elle une cible accessible pour induire la dimérisation de la ceQORH.

Nom du résidu	Pourcentage de la surface enfouie du résidu (%)	Structures secondaires
VAL 48	40	Hélice $\alpha 2$
MET 56	20	Entre hélice $\alpha 2$ et brin $\beta 4$
ILE 57	100	Entre hélice $\alpha 2$ et brin $\beta 4$
ARG 58	10	Entre hélice $\alpha 2$ et brin $\beta 4$
PHE 60	60	Entre hélice $\alpha 2$ et brin $\beta 4$
LEU 61	100	Entre hélice $\alpha 2$ et brin $\beta 4$
ARG 63	20	Entre hélice $\alpha 2$ et brin $\beta 4$
VAL 96	10	Brin $\beta 5$
LEU 97	10	Brin $\beta 5$
SER 98	40	Entre brin $\beta 5$ et brin $\beta 6$
HIS 99	60	Entre brin $\beta 5$ et brin $\beta 6$
LEU 100	30	Entre brin $\beta 5$ et brin $\beta 6$
LEU 115	50	Entre brin $\beta 6$ et brin $\beta 7$
PRO 252	50	Entre brin $\beta 12$ et hélice $\alpha 8$
GLY 253	20	Hélice $\alpha 8$
PRO 254	50	Hélice $\alpha 8$
MET 257	100	Hélice $\alpha 8$
TRP 258	100	Hélice $\alpha 8$
THR 259	40	Hélice $\alpha 8$
TYR 260	50	Hélice $\alpha 8$
ALA 261	100	Hélice $\alpha 8$
VAL 262	100	Hélice $\alpha 8$
LYS 263	20	Hélice $\alpha 8$
LYS 264	60	Hélice $\alpha 8$
ILE 265	70	Hélice $\alpha 8$
THR 266	90	Hélice $\alpha 8$
MET 267	60	Entre brin $\beta 13$ et hélice $\alpha 9$
LEU 276	90	Entre brin $\beta 13$ et hélice $\alpha 9$
LEU 277	50	Entre brin $\beta 13$ et hélice $\alpha 9$
ILE 278	40	Entre brin $\beta 13$ et hélice $\alpha 9$
PRO 279	70	Entre brin $\beta 13$ et hélice $\alpha 9$

Tableau n° 17. Résidus localisés à l'interface monomère-monomère du dimère de la ceQORH apo. Le pourcentage de la surface enfouie du résidu et la localisation du résidu sont indiquées. Les résidus impliqués dans les liaisons hydrogène à l'interface entre les deux monomères sont surlignés en vert et ceux impliqués dans un π stacking sont surlignés en violet.

2.1.4 Discussions sur la structure de la ceQORH apo

2.1.4.1 Comparaisons du monomère de la ceQORH apo avec ceux de la PDB

La structure tridimensionnelle du monomère de la ceQORH apo a été comparée à l'ensemble des structures de la PDB. Les huit structures ayant les plus faibles rmsd avec la ceQORH apo sont présentées dans le tableau n° 17. Parmi elles, se trouvent des quinones oxydoréductases (QOR) comme celle de *Coxiella burnetii* (code PDB : 3TQH) (Franklin *et al.*, 2015) mais également une énone oxydoréductase comme la FaEO (code PDB : 4IDB) (Schiefner *et al.*, 2013), permettant de réduire une double liaison localisée en position α d'une cétone localisée sur un cycle aromatique (motif RC). Les rmsd des monomères sont de 1,40 Å (code PDB : 3TQH) et 1,64 Å (code PDB : 4IDB), et les Q-scores sont de 0,68 et 0,61 respectivement. Les Q-scores étant élevés et les rmsd faibles, on peut conclure que les structures sont similaires.

Nom	Organisme	Code PDB	Q-score	RMSD
Quinone oxydoréductase (Franklin <i>et al.</i> , 2015)	<i>Coxiella burnetii</i>	3TQH	0,68	1,40
Quinone oxydoréductase (Zheng <i>et al.</i> , 2015)	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	4RVU	0,5	1,55
« human synaptic vesicle membrane protein VAT-1 homolog-like protein »	<i>Homo sapiens</i>	4A27	0,59	1,58
Enone oxydoréductase (NADPH et HDMF) (Schiefner <i>et al.</i> , 2013)	<i>Fragaria x ananassa</i>	4IDC	0,61	1,60
Enone oxydoréductase (NADPH et HMF) (Schiefner <i>et al.</i> , 2013)	<i>Fragaria x ananassa</i>	4IDF	0,61	1,60
Enone oxydoréductase (NADPH et EHMF) (Schiefner <i>et al.</i> , 2013)	<i>Fragaria x ananassa</i>	4IDD	0,61	1,62
Enone oxydoréductase (NADP ⁺ et EDHMF) (Schiefner <i>et al.</i> , 2013)	<i>Fragaria x ananassa</i>	4IDE	0,61	1,63
Enone oxydoréductase (NADP ⁺) (Schiefner <i>et al.</i> , 2013)	<i>Fragaria x ananassa</i>	4IDB	0,61	1,64

Tableau n° 18. Protéines dont la structure du monomère est proche de celle de la ceQORH apo.

➤ Comparaison des monomères de la ceQORH apo et de la FaEO-NADP⁺

Cette enzyme est active sous forme monomérique. Tout comme la ceQORH, elle avait été désignée initialement comme étant une enzyme appartenant aux quinones oxydoréductases (FaQR). La superposition des monomères de la ceQORH apo et de la FaEO met en évidence une différence majeure. L'hélice $\alpha 8$ présente dans la structure de la ceQORH apo n'existe pas chez la FaEO (figure n° 56). Cette hélice se situe au niveau du domaine de Rossmann chez la ceQORH mais n'est pas essentielle à la fixation du cofacteur puisque la FaEO fixe également le NADP⁺ (4IDB). Bien que l'hélice centrale ($\alpha 3$) réalisant la connexion entre les deux

domaines de la ceQORH se superposent avec celle de la FaEO, on observe un décalage du domaine de Rossmann de l'une par rapport à l'autre. Cette différence pourrait s'expliquer par le fait que la structure de la FaEO (4IDB) soit celle de l'enzyme liée au NADP⁺. En effet, la fixation du cofacteur engendre une rotation de 5° du domaine de Rossmann par rapport au domaine catalytique chez la FaEO (Schiefner *et al.*, 2013). Cependant, la comparaison de la forme apo de la FaEO avec la ceQORH présente un rmsd encore plus élevé. L'hypothèse selon laquelle la fixation du cofacteur sur la FaEO serait responsable de la différence de superposition d'un domaine par rapport au second (par rapport à la ceQORH apo) est donc erronée.

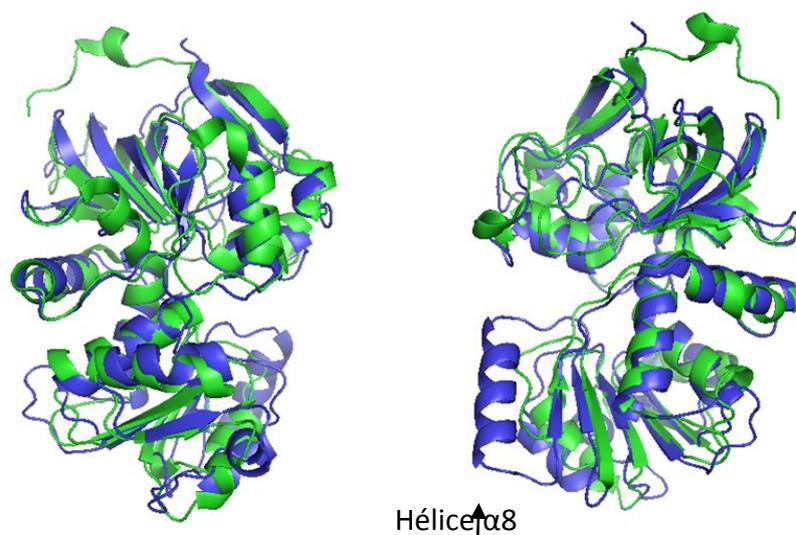


Figure n° 56. Superposition des monomères de la ceQORH et de la FaEO-NADP⁺.

Superposition d'un monomère de la ceQORH apo (en bleu) sur un monomère de la FaEO (en vert) vue sous deux angles différents.

Dans la structure du complexe FaEO-NADP⁺, deux liaisons hydrogène formées entre le résidu Thr113 et les résidus Phe115 et Asn105 restreignent la flexibilité de la boucle définie de la Leu104 à l'Arg114 et qui participe au site de fixation du substrat. Cela met en évidence que les parties non structurées de l'enzyme sont importantes dans la reconnaissance et la fixation du substrat. Cette enzyme étant structurellement proche de la ceQORH, nous pourrions alors supposer que le mécanisme de reconnaissance des substrats par la ceQORH pourrait être similaire.

➤ Comparaison entre les structures de la ceQORH apo et de la QOR de *Coxiella burnetii*

Contrairement à la ceQORH qui a été cristallisée sous la forme dimérique, la structure de la QOR de la *Coxiella burnetii* résolue avec le NADPH, est monomérique. Aucune information n'est disponible sur la forme apo. L'hélice α8 est présente dans la structure de la QOR de *Coxiella burnetii* (code PDB : 3TQH, Franklin *et al.*, 2015).

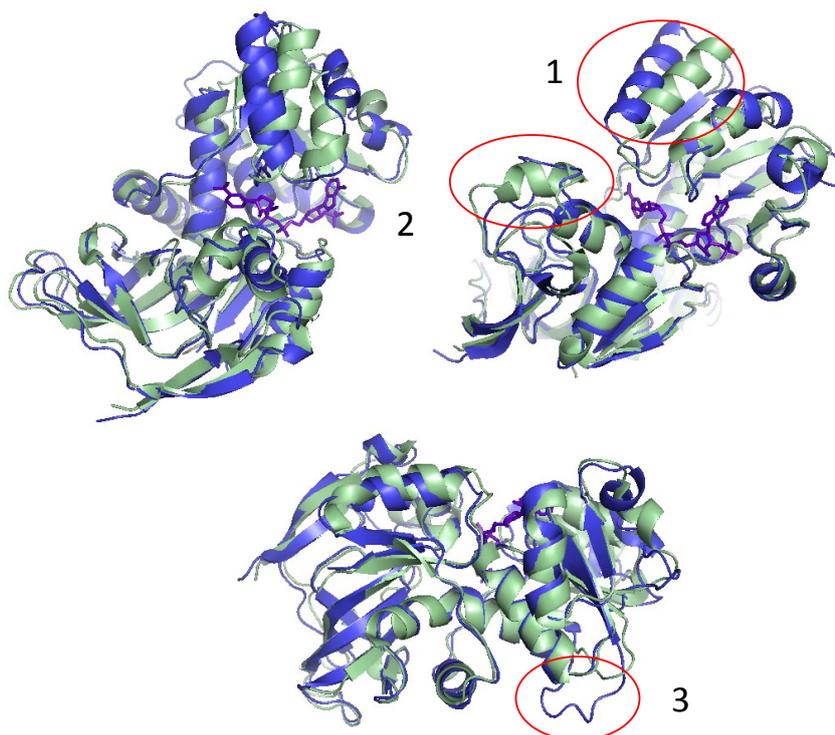


Figure n° 57. Superposition des monomères de la ceQORH et de la QOR de *Coxiella burnetii*.

Superposition d'un monomère de la ceQORH apo en ruban bleu et d'un monomère de la QOR de *Coxiella burnetii* en ruban vert. Le NADPH est présenté par des bâtons violets. Les différences majeures entre les deux structures sont mises en évidence par trois cercles rouges (1, 2, 3).

De plus, la structure de la QOR de *Coxiella burnetii* possède une hélice supplémentaire au niveau du domaine catalytique. Cette hélice comprend les résidus Gly54 à Lys61 (figure n° 57 : 2). La boucle flexible présente au niveau du domaine de Rossmann est plus longue chez la ceQORH (Leu214 à Tyr222) que chez la QOR de *Coxiella burnetii* (Ile209 à Val213) (figure n° 57 : 3). Par conséquent, les trois hélices du domaine de Rossmann ne sont pas orientées de la même manière probablement à cause de la longueur et de la flexibilité de la boucle présentée ci-dessus.

2.1.4.2 Comparaisons du dimère de la ceQORH apo avec les structures de la PDB

Lorsque l'on compare le dimère à l'ensemble des structures de la PDB, seules deux structures possèdent plus de 70 % de similarité des structures secondaires. Le meilleur Q-score (0,19) et rmsd (4,26 Å) est obtenu pour la comparaison entre la ceQORH et la structure de la QOR d'*E. coli* liée au NADPH dont la structure a été résolue à 2,2 Å de résolution (code PDB :

1QOR) (Thorn *et al.*, 1995). La QOR présente 71 % de similitude au niveau des structures secondaires avec la ceQORH. La seconde structure est celle d'une alcool déshydrogénase putative de *Sinorhizobium meliloti* pour laquelle le rmsd est de 4,27 Å et le Q-score est de 0,14. Elle a 76 % de similitude de structures secondaires avec la ceQORH. Sa structure a été résolue à 2,2 Å de résolution (code PDB : 3UOG) (Malashkevich *et al.*, 2011). Cette enzyme fixe le zinc et permet de transformer des alcools en aldéhydes ou en cétones, elle fixe donc le cofacteur oxydé et catalyse une réaction différente de celle de la ceQORH. Les rmsd observés entre les dimères sont élevés car les modes de dimérisation sont différents. La ceQORH dimérise par l'intermédiaire de l'hélice $\alpha 8$ alors que les autres QOR dimérisent par l'intermédiaire d'un brin β (*cf.* p.111).

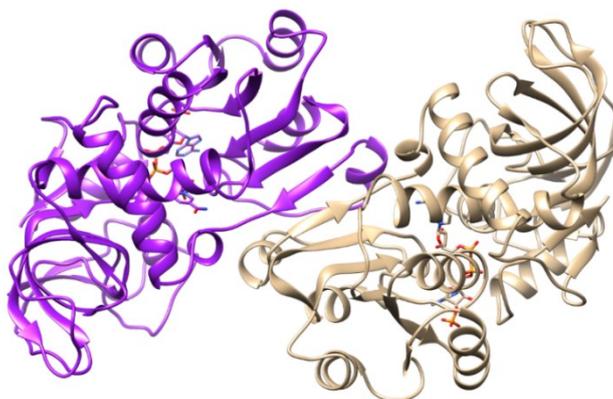


Figure n° 58. Interface du dimère de la QOR d'*E. coli*.

Le dimère de la QOR d'*E. coli* dimérise grâce à un brin β (code PDB : 1QOR).

➤ Comparaison avec l'*AtAER*, une enzyme de détoxification

L'Alkénal réductase d'*Arabidopsis thaliana* est une des enzymes de détoxification chez *Arabidopsis thaliana* (*cf.* p.57). Elle réalise le même type de réaction que la ceQORH mais sur des molécules issues de la voie des 9-LOX. On constate que le mode de dimérisation est également différent et le repliement des monomères sont différents également (rmsd : 2,50 Å, Q-score : 0,40, 20 % d'identité de séquences) (figure n° 59). Malgré cette différence, on constate que le motif de repliement du peptide de transit de la ceQORH est retrouvé chez l'*AtAER* alors qu'elle est cytosolique. Cela nous laisse supposer que la reconnaissance du peptide de transit par le système d'import reconnaît la séquence de la protéine et non la structure secondaire. Cela est possible car la protéine avant l'import est normalement non-repliée (*cf.* p.32).

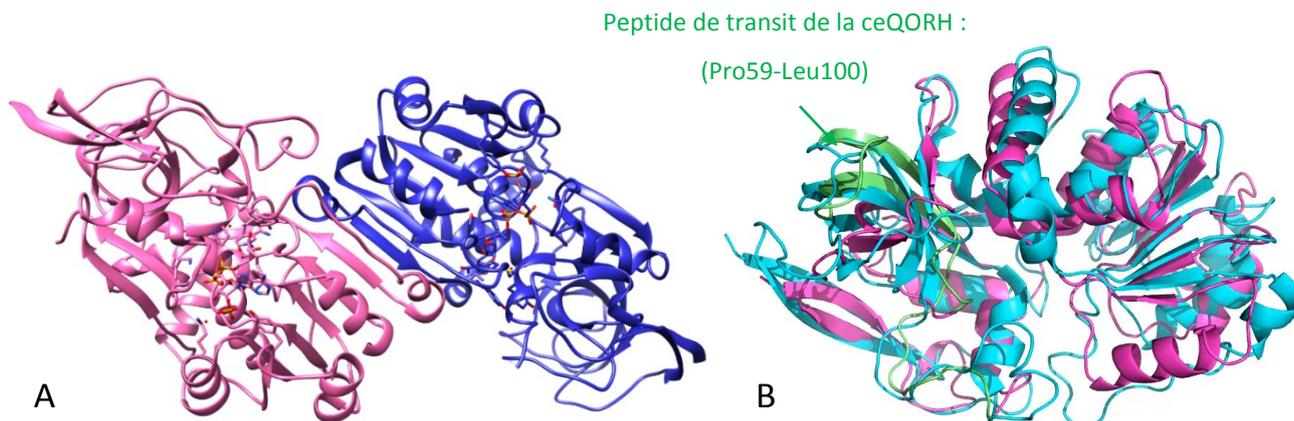


Figure n° 59. Comparaison de la structure de la ceQORH avec celle de l'AtAER.

A. Le dimère de l'AtAER dimérise grâce à un brin β (code PDB : 2J3H). Le NADPH est représenté en bâton. **B.** Superposition du monomère de l'AtAER (bleu) avec celui de la ceQORH (magenta) (Youn *et al.*, 2006).

2.1.5 Conclusion sur la structure de la ceQORH apo

Toutes les structures de QOR excepté celle de *C. burnetii* sont dimériques. La dimérisation de la ceQORH implique une hélice α alors que toutes les autres enzymes interagissent par un brin β . **L'hélice $\alpha 8$ n'est pas retrouvée chez les autres enzymes** proches structuralement de la ceQORH ou les autres QOR excepté chez celle de *C. burnetii*. Cela soulève donc des questions sur l'état d'oligomérisation de la ceQORH qui lui permettrait d'être active car la seule QOR possédant cette même hélice $\alpha 8$ est active sous la forme monomérique.

Les comparaisons entre les différentes structures (ceQORH, FaEO ...) mettent en évidence une rotation entre les domaines qui ne permet pas une bonne superposition du monomère dans sa globalité (pour la QOR d'*E. coli* (code PDB : 1QOR) entre 1,3 à 4 Å de différence). Pourtant chaque domaine pris individuellement se superpose avec ceux de la ceQORH. Cela pourrait être **une conséquence de la dimérisation ou de la fixation du cofacteur** car la ceQORH est sous la forme apo et que les autres sont sous la forme complexée au cofacteur. Il est également possible que la différence d'orientation des deux domaines génère des cavités plus ou moins étroites **adaptées à la reconnaissance des substrats** de chaque enzyme faisant ainsi leur spécificité (*cf.* p.112). Cette dernière hypothèse semble plus plausible.

Afin de déterminer si la ceQORH opère un changement de conformation lorsqu'elle fixe son cofacteur nous avons décidé de résoudre la structure du complexe ceQORH-NADPH.

2.2 Structure tridimensionnelle de la ceQORHR58A-NADPH

2.2.1 Cristallisation de la ceQORHR58A-NADPH

Les résultats d'AUC ont montré que la ceQORH-NADPH est monomérique et que la solution est monodisperse. Ce complexe remplit alors toutes les conditions favorables à la cristallisation. Pourtant aucun cristal du complexe n'a été obtenu et de nombreuses gouttes ont précipité (6 mg/mL). Dans le cadre de l'étude sur l'inhibition, un mutant de la ceQORH a été purifié. L'Arg58 a été mutée en Ala58. L'Arg58 est un résidu appartenant au domaine catalytique et est exposé au solvant. Il ne devrait pas affecter la fixation du cofacteur. La protéine sera nommée ceQORHR58A. Les mêmes conditions de cristallisation testées pour la ceQORH sauvage ont été également testées pour la ceQORHR58A-NADPH aux mêmes concentrations. Les cristaux du complexe ceQORHR58A-NADPH ont été obtenus à 4°C et à 20°C. Les conditions de cristallisation sont : 0,1 M de fluorure de potassium, 26 % de PEG 3350 (figure n° 60). La solution cryoprotectante est composée de la solution mère dans laquelle a été ajoutée 20 % de glycérol. Comment peut-on expliquer l'obtention de cristaux de la ceQORHR58A-NADPH alors qu'aucun cristal n'a été obtenu avec la ceQORH-NADPH ?

(1) La ceQORH et la ceQORHR58A n'ont pas été purifiées dans le même tampon. Ce paramètre peut favoriser la cristallisation.

(2) La mutation en un acide aminé dont l'encombrement stérique est moins important (arginine en alanine) présent à la surface de la protéine pourrait favoriser la formation de cristaux.

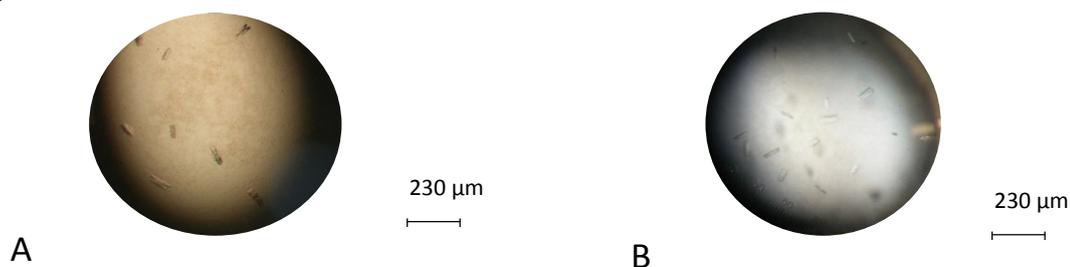


Figure n° 60. Cristaux de la ceQORHR58A-NADPH à 20°C et à 4°C.
Ces cristaux ont été obtenus en présence du NADPH et de la ceQORHR58A à 20 °C (A) et à 4°C (B) dans la condition de cristallisation : 0,1 M de fluorure de potassium, 26 % de PEG 3350. Les gouttes sont des composées de 0,5 µL de la solution mère et de 0,5 µL de la ceQORHR58A-NADPH.

2.2.2 Statistiques des données de diffraction et de l'affinement du mutant ceQORHR58A-NADPH

Le premier jeu de données enregistré est complet à une résolution de 3,3 Å. En effet, la complétude est de 99,7 % donc supérieure à 90 % ce qui permet d'avoir des données suffisantes pour les exploiter. De plus, la multiplicité est de 6,44 ce qui est correct pour obtenir un écart

des intensités relativement faible. Le R_{meas} est de 20,5 ce qui est relativement élevé. Cette valeur est probablement due à une détérioration du cristal sous l'effet du rayonnement X au cours de l'enregistrement des données. Le second jeu de données a été enregistré sur la ligne ID29 de l'ESRF à une meilleure résolution que le premier jeu de données grâce probablement à une intensité incidente plus élevée que celle de FIP-BM30A. Les mêmes commentaires sont valables pour le second jeu de données bien que la résolution soit meilleure (2,48 Å) et que les valeurs des R (R_{work} et R_{free}) soient plus élevées.

	1 - ceQORHR58A-NADPH	2 - ceQORHR58A-NADPH
Enregistrement		
Lignes	BM30A	ID29
Groupe d'espace	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
a, b, c (Å)	78,56 111,07 158,78	78,56 111,79 154,27
Intervalle de résolution (Å)	47,77 - 3,30 (3,50 - 3,30)	46,72 - 2,48 (2,63 - 2,48)
R_{meas} (%)	20,5 (72,8)	19,6 (80,6)
$I/\sigma(I)$	11,34 (3,3)	8,48 (2,21)
Nombre total de réflexions	138 316 (22 224)	260 689 (39 168)
Nombre de réflexions uniques	21 477 (3 391)	48 392 (7 517)
Complétude (%)	99,7 (99,2)	99,4 (97,4)
$CC^{1/2}$	99,2 (85,3)	99,1 (64,7)
Multiplicité	6,4 (6,5)	5,38 (5,21)
Mosaïcité	0,124	0,134
Affinement		
Résolution (Å)	47,77 - 3,30 (3,52 - 3,30)	46,72 - 2,48 (2,53 - 2,48)
R (%)	0,17 (0,24)	0,24 (0,32)
R_{free} (%)	0,22 (0,26)	0,28 (0,39)
Nombre d'atomes	9 659	9 600
Nombre de molécules d'eau	-	-
Moyenne des facteurs B (Å ²)	66,88	32,77
Rmsd liaisons (Å)	0,005	0,009
Rmsd angle (°)	1,06	1,27
Ramachandran (%)	96,22	97,15
Clashscore	4,71	5,84
Rotamères moins fréquents (%)	4,42	3,27

Tableau n° 19. Jeux de données de la ceQORHR58A-NADPH. Statistiques des jeux de données d'un enregistrement de deux des cristaux de la ceQORHR58A liée au NADPH et de l'affinement de ces mêmes jeux de données. Les statistiques de la dernière coquille de résolution sont indiquées entre parenthèses.

Le remplacement moléculaire a été réalisé en utilisant Phaser (Mc Coy *et al.*, 2007) de CCP4 (CCP4, 1994) et un monomère de ceQORH-NADP⁺-13KOT comme modèle. L'affinement a été réalisé avec Phenix (Adams *et al.*, 2012) et la reconstruction du modèle a été réalisée en utilisant COOT (Emsley *et al.*, 2004). La structure a été validée avec MolPROBITY (Lovell *et al.*, 2003) et PROCHECK (Laskowski *et al.*, 1993).

La densité électronique du NADPH est mal définie à partir des pyrophosphates jusqu'au nicotinamide. Cela suggère que le cofacteur soit flexible ou bien que le taux d'occupation du NADPH soit inférieur à 1 ou encore que le NADPH soit dégradé. Le taux d'occupation du NADPH a donc été diminué à 0,7 (figure n° 61). Les mêmes observations ont été faites pour le second à 2,48 Å de résolution (figure n° 61).

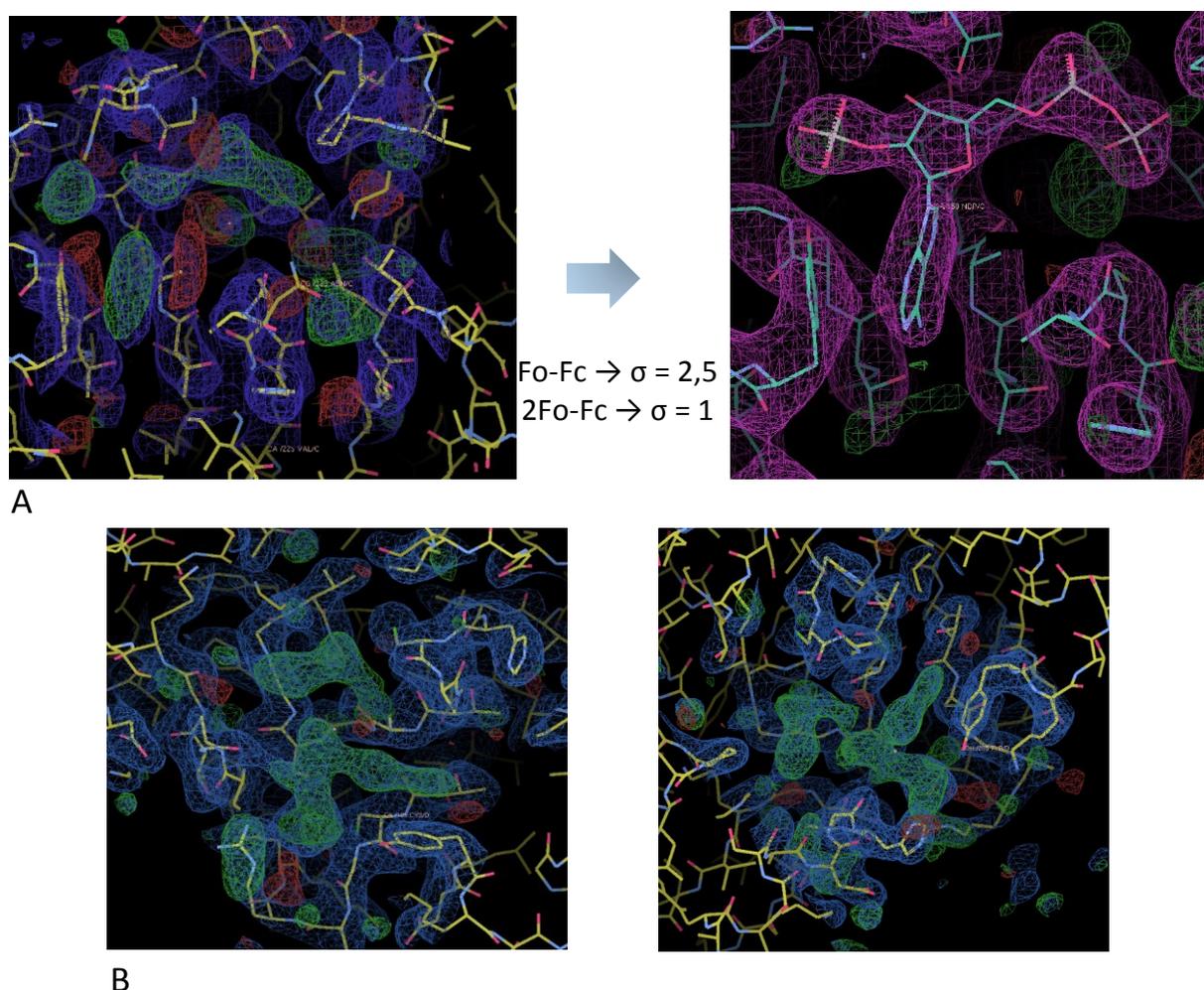


Figure n° 61. Densité électronique du NADPH dans la structure de la ceQORHR58A-NADPH.

A. Ces images montrent la densité électronique du cofacteur NADPH avec un taux d'occupation de 1 puis avec un taux d'occupation de 0,7 à 2,48 Å de résolution dans la structure ceQORHR58A-NADPH. **B.** et **C.** Densité électronique du NADPH au sein de la structure de la ceQORHR58A-NADPH à 3,3 Å de résolution. La densité électronique positive est en vert et celle négative en rouge, elle correspond à la Fo-Fc ($\sigma = 2,5$).

Comme la densité électronique du nicotinamide est mal définie, comment peut-on être sûr que la forme présente soit le cofacteur réduit ? Afin de vérifier, la présence du cofacteur réduit dans les cristaux obtenus, une expérience sur le cryobench a été réalisée.

2.2.3 Détermination de l'état d'oxydation du cofacteur dans les cristaux de ceQORHR58A-NADPH

Les cristaux de la ceQORHR58A-NADPH ont été reproduits dans le but de les pêcher rapidement après leur formation afin d'éviter la dégradation du NADPH au cours du temps (Bose *et al.*, 1975 ; Wu *et al.*, 1986). L'analyse de ces cristaux est ensuite réalisée en utilisant un cryobench. Pour faire la différence entre le NADPH et le NADP⁺, on mesure l'absorbance des cristaux à 340 nm car le premier absorbe à cette longueur d'onde contrairement au second. L'allure de la courbe d'absorbance en fonction de la longueur d'onde est identique pour les six cristaux testés. Aucun pic d'absorbance n'est enregistré à 340 nm ce qui signifie que **ces cristaux sont des cristaux de ceQORHR58A-NADP⁺** (figure n° 62). L'absorbance de la solution du NADPH utilisée pour les cristaux a été vérifiée avant et après son utilisation pour la cristallisation. Ceci confirme que le cofacteur est réduit dans cette solution. Cela révèle l'instabilité du NADPH. On considère alors que le complexe obtenu est ceQORHR58A-NADP⁺.

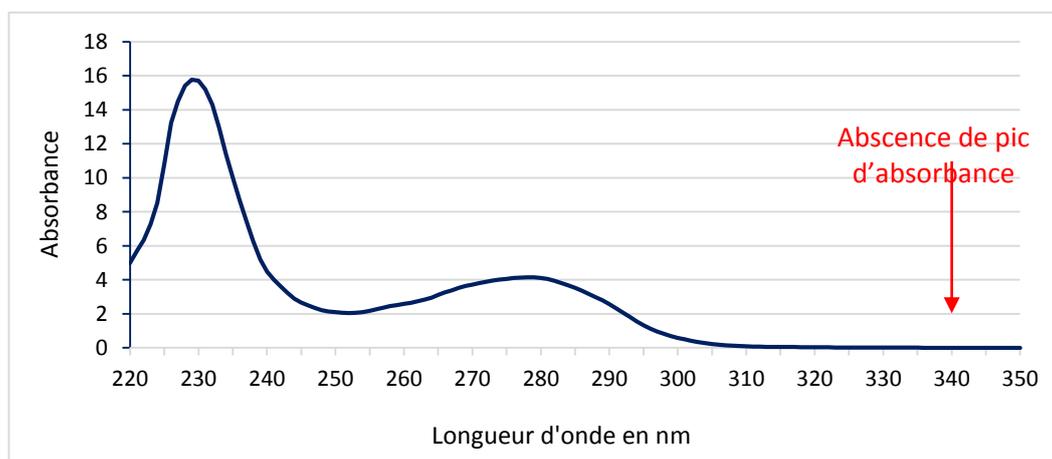


Figure n° 62. Courbe représentant l'absorbance d'un cristal de la ceQORHR58A-NADPH.

2.2.4 Analyse de la structure de la ceQORHR58A-NADP⁺

L'unité asymétrique est composée de quatre molécules (figure n° 63). Les rmsd entre les différents monomères sont compris entre 0,38 Å et 0,53 Å. Les résultats obtenus à l'aide de

PISA mettent en évidence que le tétramère est non physiologique. La formation de ce tétramère serait alors une conséquence de l'empilement cristallin.

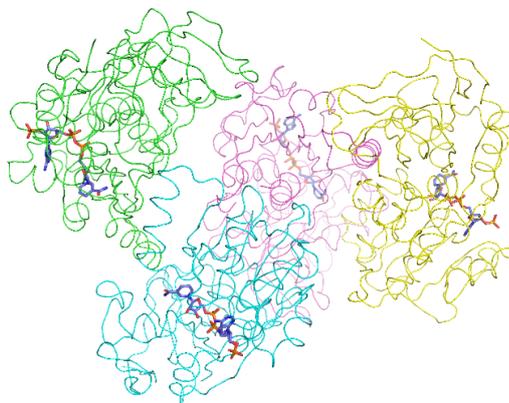


Figure n° 63. Structure du complexe ceQORHR58A–NADP⁺.

Chaque chaîne de la ceQORHR58A est représentée par une couleur différente. Le cofacteur est en bâton.

A l'inverse, les deux dimères constituant le tétramère peuvent être considérés comme stables en solution comme le montre le tableau n° 19, car les CSS s'élèvent à 0,781. L'interface entre deux monomères se forme grâce à une liaison hydrogène entre la Met267 et la Ser98 entre autres. Ces deux derniers résidus étaient impliqués dans l'interface de dimérisation de la forme apo (*cf.* p.141).

	Nombre d'atomes	Nombre de résidus	Surface (Å ²)	Surface à l'interface (Å ²)	CSS	Liaisons
Monomère A (AB)	112 (4,7 %)	28 (8,6 %)	14298	1102,1 (7,7 %)	0,781	Liaison hydrogène Met 267 A – Ser 98 B
Monomère B (AB)	108 (4,5 %)	30 (9,2 %)	14411	1097 (7,6 %)		
Monomère C (CD)	108 (4,5 %)	28 (8,5 %)	14505	1061,2 (7,3 %)	0,781	-
Monomère D (CD)	105 (4,5 %)	28 (8,6 %)	14518	1061,5 (7,3 %)		

Tableau n° 20. Caractéristiques des interfaces des monomères de la structure ceQORHR58A-NADPH.

La molécule NADP⁺ n'a pas été reconstruite entièrement mais grâce à la structure de la ceQORH avec un inhibiteur (QorNkt) et en considérant le fait que le nicotinamide doit être accessible pour que le transfert d'hydrure puisse avoir lieu, une seule conformation du NADP⁺ est possible.

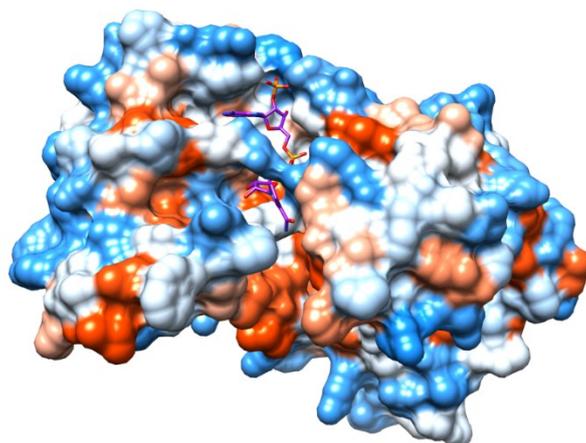


Figure n° 64. Potentiel électrostatique de la structure de la ceQORHR58A-NADP⁺.

Le NADP⁺ est représenté par des bâtons violets. La protéine est représentée en surface (rouge : charge négative, bleu : charge positive, blanc : neutre).

2.2.5 Discussions et conclusion sur la structure de la ceQORHR58A-NADP⁺

2.2.5.1 Motif de fixation du NADPH

La ceQORH appartient à la superfamille des MDR qui a été aussi divisée en fonction du motif de fixation du NADPH. Selon cette classification, la ceQORH appartient à la famille MDR1, il est ainsi possible de prédire les résidus impliqués dans la fixation du cofacteur : Asn46, Pro47, Val48, Lys51, Val133, Tyr137, Ala163, Ala164, Ser165, Gly166, Val168, Gly169, Cys187, Gly188, Asn191, Tyr206, Cys228, Ala229, Ile250, Thr251, Leu275, Leu276, Leu277. Le motif de fixation du cofacteur sur la ceQORH est «AASGGVG» du résidu 163 à 169 concordant avec le motif « (A/G)XXGXXG » de la famille des MDR1. Les résidus impliqués dans l'interaction avec le NADPH sont conservés comme le montre l'alignement de séquences (*cf.* Annexe n° 4). Deux des résidus impliqués dans la fixation du NADPH retrouvés chez la ζ -cristalline sont : His200 et His317, chez la FaeO : Tyr216 et Arg312, chez la QOR d'*E. coli* : Tyr192 et Arg317. Les résidus équivalents chez la ceQORH sont ici Arg190 et His320.

2.2.5.2 Comparaison de la ceQORHR58A-NADP⁺ avec ceux de la PDB

En comparant le dimère de la ceQORHR58A-NADP⁺ à l'ensemble des structures de la PDB, une seule structure est comparable. Cette dernière a déjà été énoncée précédemment : l'alcool déshydrogénase putative (code PDB : 3UOG) avec un rmsd de 4,27 Å, un Q-score de 0,14 et 76 % de similitude au niveau des structures secondaires. Cette enzyme ne catalyse pas le même type de réactions que la ceQORH et le Q-score est trop faible pour considérer ces

résultats comme intéressants. De plus, les résultats d'AUC ont montré que la ceQORH liée au NADPH est sous la forme monomérique en solution.

2.3 Comparaison entre la structure de la ceQORH apo et ceQORHR58A-NADP⁺

2.3.1 Dimère de la ceQORH apo et de la ceQORHR58A-NADP⁺

La superposition du dimère la ceQORH apo avec le dimère de la ceQORHR58A-NADP⁺ donne un rmsd de 0,66 Å (A, B) et de 0,65 Å pour le second (C, D). Les rmsd sont faibles, les structures sont donc similaires.

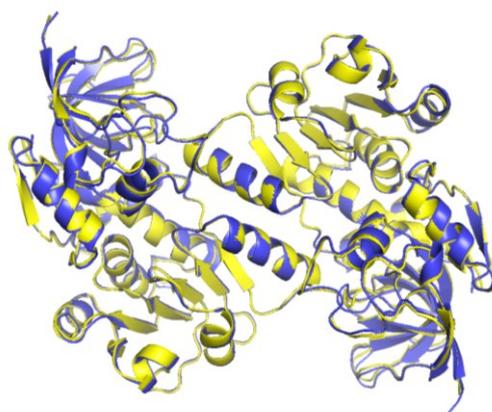


Figure n° 65. Superposition du dimère de la ceQORH apo (bleu) et la ceQORHR58A-NADP⁺ (jaune).

2.3.2 Monomère de la ceQORH apo et de la ceQORHR58A-NADP⁺

La comparaison entre chaque monomère entre la ceQORH apo et la ceQORHR58A liée au NADP⁺ donne des rmsd de 0,45 Å (entre A et A respectivement) à 0,56 Å (B et D respectivement). Les rmsd sont encore plus faibles que ceux obtenus pour les dimères (figure n° 66). Les structures sont similaires malgré quelques légères différences. Les parties structurales révélant une différence lors de la superposition des structures sont :

- Pro62 à Pro66 (boucle)
- Ser82 à Gly90 (boucle)
- Ser98 à Gly102 (boucle)
- Ala146 à Lys156 (boucle)
- Gly188 à Arg190 (boucle)
- Cys228 à Ile232 (boucle)
- Ile250 à Asn255 (boucle)

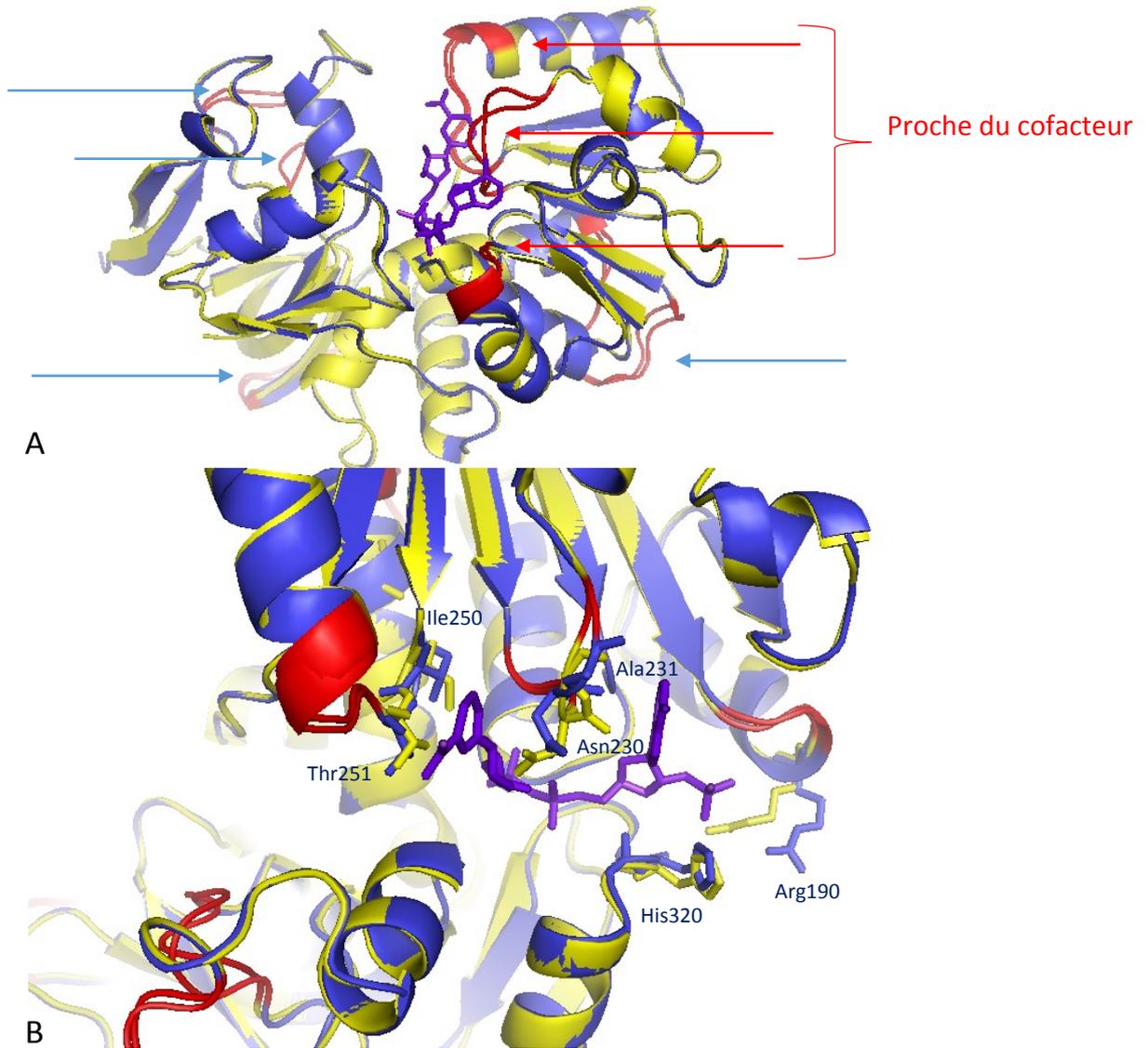


Figure n° 66. Comparaison entre la forme apo et celle liée au NADP⁺.

La structure de la forme apo de la ceQORH est représentée en ruban bleu, celle avec le cofacteur est en ruban jaune. Le cofacteur est représenté en bâton violet. Les rubans en rouge sont les zones présentant une différence entre les deux structures. **A.** Les flèches rouges mettent en évidence les sites localisés à proximité du cofacteur, les zones les plus éloignées sont présentées par une flèche bleue. **B.** Mise en évidence des résidus orientés différemment à la suite de la fixation du NADP⁺. Les résidus dont la position a été modifiée lors de la fixation du NADP⁺ sont représentés en bâton.

Les résidus sont localisés sur les parties non-structurées de la structure (boucles). Ces dernières sont flexibles et il n'est pas rare d'observer un rôle prépondérant des résidus localisés sur les boucles dans les reconnaissances des substrats (figure n° 66). Les zones de la structure impliquées directement dans la fixation du cofacteur sont :

- Gly188 à Arg190 (boucle)
- Cys228 à Ile232 (boucle)
- Ile250 à Asn255 (boucle)

Certains résidus proches du NADP⁺ sont orientés différemment par rapport à la structure de la ceQORH apo. Parmi eux, se trouve : l'Arg190, l'Asn230, l'Ile250 et la Thr251 (figure n° 66). Seul un résidu a changé d'orientation sans que le squelette carboné ne soit affecté : l'His320.

3 Conclusion sur les études menées sur la ceQORH apo et en présence du cofacteur

La ceQORH apo et la ceQORHR58A-NADP⁺ ont cristallisé sous la forme d'un dimère et d'un tétramère respectivement. Les deux structures forment un dimère identique stable en solution. Dans le cas de la ceQORH, la dimérisation est possible par l'intermédiaire d'une hélice $\alpha 8$ et non d'un brin β retrouvé habituellement chez les QOR. Cette même hélice est retrouvée chez la QOR de *Coxiella burnetii* qui est active sous la forme de monomère. A la suite de cette observation et des résultats d'AUC, il est probable que la ceQORH soit active sous forme monomérique. La monomérisation serait induite par la fixation du NADPH.

La fixation du cofacteur est possible grâce aux résidus hautement conservés de la famille MDR1. Contrairement à de nombreuses enzymes oxydoréductases fixant le NADPH, la ceQORH n'opère pas de changement de conformation à la suite de la fixation du NADP⁺. Néanmoins certains résidus changent d'orientation afin d'interagir avec le cofacteur, comme l'Arg190, l'His320, l'Asn230 et la Thr251. La Thr251 en modifiant son orientation se rapproche de la Lys51 formant alors une cavité au niveau de la structure. Bien qu'il n'y ait pas de changements structuraux à la suite de la fixation du NADP⁺, les changements locaux induisent donc une cavité plus étroite pour la reconnaissance des substrats. Cependant à cause de l'absence de densité électronique du NADP⁺ après les pyrophosphates, il n'est pas impossible que toutes les informations ne soient pas obtenues concernant la structure ceQORHR58A-NADP⁺.

Partie IV. Etude de la ceQORH en présence d'inhibiteur

Les molécules substrats et inhibitrices de la ceQORH ont été identifiées préalablement (*cf.* p.116). L'acide 13-oxo-9,11,15-octadécatriénoïque (13KOT) est une molécule inhibitrice de la ceQORH tout comme l'acide 13-oxo-9,11,15-octadécadiénoïque (13KOD). Afin de comprendre le mécanisme d'inhibition de la ceQORH, des études sur la ceQORH en présence du 13KOT ou du 13KOD avec ou sans le cofacteur ont été réalisées.

1 Etude de l'état oligomérique de la ceQORH inhibée en AUC

1.1 Résultats de l'AUC pour le complexe ceQORH-13KOT

La mesure de l'absorbance à 280 nm de la ceQORH à 0,6 mg/mL en complexe avec le NADP⁺ et le 13KOT révèle la présence de trois pics. Les deux premiers pics (2,5 S et 3,5 S ; monomère et dimère) ont un signal deux fois plus intense que le troisième (6,6 S ; un tétramère). Le mode de mesure par interférence n'a pas été utilisé pour cette concentration. Les valeurs des coefficients de sédimentation sont inférieures à celles attendues théoriquement (excepté pour le troisième pic à 6,6 S).

Pour l'échantillon concentré à 6 mg/mL, quatre pics (à 3,3 S, à 4,2 S, à 6,5 S et à 10,5 S) sont enregistrés (tableau n° 21). Quatre états de la protéine sont présents et ont été observés lors de l'enregistrement des données par les deux modes de mesure (absorbance et interférence). Parmi ces quatre pics, deux d'entre eux (3,3 S et 4,2 S ; monomère et dimère) ont un signal plus intense que les deux autres (4 fois plus et 16 fois plus) (tableau n° 21).

Concentration (mg/mL)	Optique	Coefficient de sédimentation moyen (S)	Coefficients de sédimentation maximum (S)
0,6	Absorbance à 280 nm	4,8	2,5 / 3,5 / 6,6 / 10,2
6	Interférence	4,7	3 / 4,2 / 6,2 / 10,5
6	Absorbance à 280 nm	4,7	3,3 / 4,2 / 6,5 / 10,5

Tableau n° 21. Coefficients de sédimentation maximum et moyens en fonction de la concentration de ceQORH-13KOT. Valeurs calculées des coefficients de sédimentation moyens (en S) et les valeurs calculées des coefficients de sédimentation (en S) pour chacun des maxima locaux, à deux concentrations différentes.

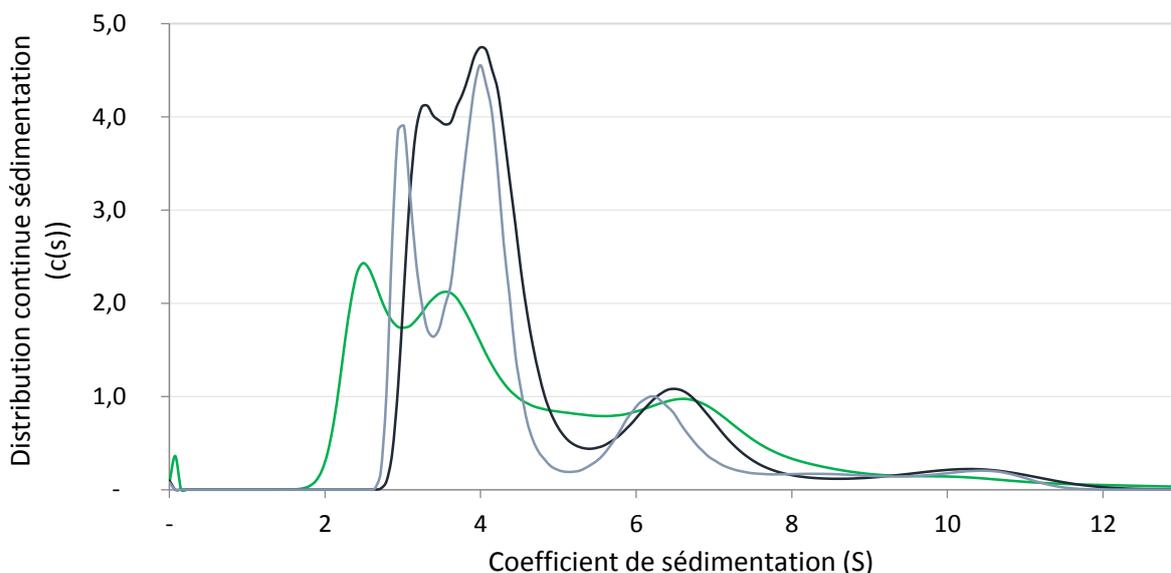


Figure n° 67. Courbe d'AUC de la ceQORH-13KOT.

Cette courbe représente la distribution en fonction du coefficient de sédimentation. Le complexe ceQORH-13KOT à 0,6 mg/mL correspond à la courbe verte. Le complexe ceQORH-13KOT à 6 mg/mL correspond aux courbes bleues, (bleu foncé : absorbance et bleu claire : interférence).

Le coefficient de sédimentation moyen est le même pour les deux échantillons : 0,6 mg/mL et 6 mg/mL ($\pm 0,1$ S). La concentration de l'échantillon (complexe ceQORH-13KOT) n'a aucun impact sur le coefficient de sédimentation moyen. La distribution des différentes formes oligomériques est donc la même. En présence du 13KOT, les formes majoritaires de la ceQORH sont : le monomère et le dimère pour lesquelles le signal est équivalent.

1.2 Résultats de l'AUC pour le complexe ceQORH-NADP⁺-13KOT

Aux concentrations de 0,6 mg/mL et de 4 mg/mL de ceQORH, un signal à 1,5 S et un à 1,9 S sont observés respectivement. Le signal de ce pic représente environ moins de 20 % de la totalité des signaux enregistrés. Ce pic a un coefficient de sédimentation correspondant à des agrégats formés par l'inhibiteur.

Pour toutes les concentrations du complexe, le signal majoritaire est celui correspondant au pic ayant un coefficient de sédimentation de 4,2 S qui contribue entre 49 % et 60 % du signal en fonction de l'échantillon. Ce coefficient de sédimentation correspond à un dimère (figure n° 68).

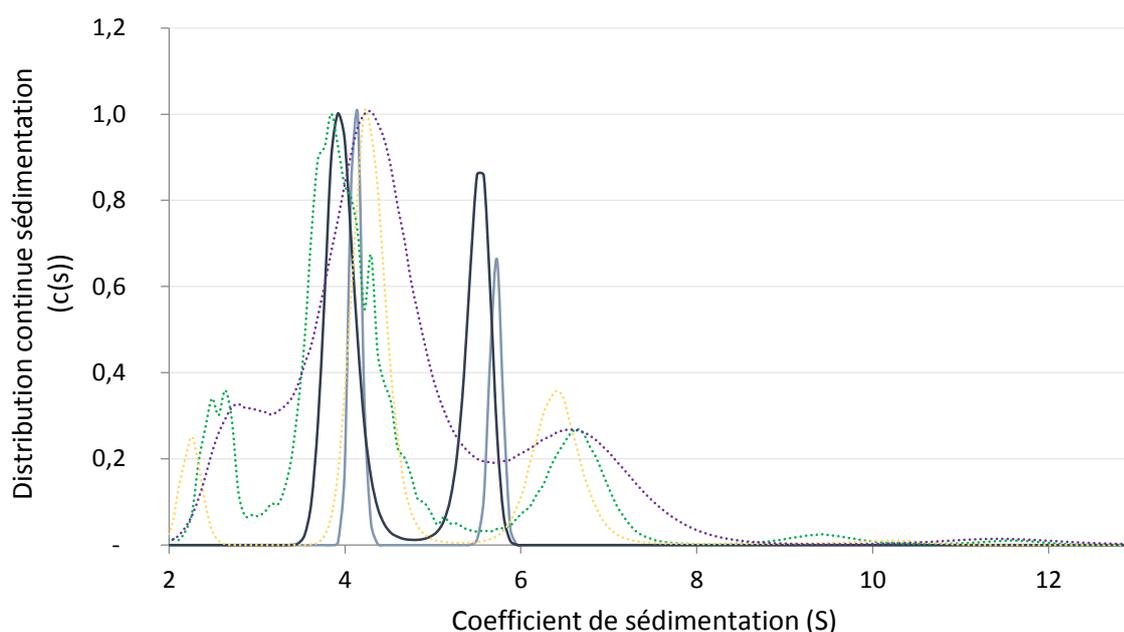


Figure n° 68. Courbe d'AUC de la ceQORH-NADP⁺-13KOT.

Cette courbe représente la distribution en fonction du coefficient de sédimentation. Le complexe ceQORH-NADP⁺-13KOT à 0,6 mg/mL mesuré par interférence correspond à la courbe verte. Les mesures du complexe ceQORH-NADP⁺-13KOT à 6 mg/mL correspondent à la courbe bleue foncée (par absorbance) et à la courbe bleue claire (en interférence) et pour celle à 4 mg/mL, elle correspond à la courbe violette (en interférence).

A faible concentration (0,6 mg/mL), le signal du pic correspondant au monomère est équivalent à celui du tétramère (14 % et 16 % respectivement). Puis à 4 mg/mL, contrairement à l'échantillon précédent, le signal mesuré pour le pic du monomère diminue au profit du signal du pic du tétramère. Par exemple, en absorbance à 280 nm, le signal du pic du monomère est de 8 % contre 31 % pour le tétramère. Puis à 6 mg/mL, le pic du monomère est inexistant et le signal du pic du tétramère représente 40 % du signal.

De plus, pour ce complexe, le coefficient de friction est de $1,35 \pm 0,03$, correspondant à une forme un peu anisotrope pour le tétramère et le dimère. Il est de $1,45 \pm 0,25$ pour le monomère. Le monomère adopte une forme différente d'une forme globulaire. Ce fait s'expliquerait par un changement de conformation lorsque l'enzyme se monomériser. Cependant grâce aux résultats d'AUC et aux résultats structuraux obtenus précédemment sur la ceQORHR58A liée au NADP⁺, aucun changement conformationnel n'est observé.

		Coefficient de sédimentation caractéristique (S)							
		Pic 1 : Espèces inconnues		Pic 2 : Monomère		Pic 3 : Dimère		Pic 4 : Tétramère	
Concentration (mg/mL)	Optique	Valeur (S)	Signal (%)	Valeur (S)	Signal (%)	Valeur (S)	Signal (%)	Valeur (S)	Signal (%)
0,6	Interférence	1,5	17	2,8	14	4	54	6,6	16
4	Absorbance à 280 nm			2,2	8	4,3	62	6,4	31
4	Interférence	1,9	8	2,9	11	4,1	49	6,1	32
6	Absorbance à 280 nm					4,1	60	5,7	40
6	Interférence					4	58	5,5	42

Tableau n° 22. Coefficients de sédimentation en fonction de la concentration de ceQORH-NADP⁺-13KOT. Les valeurs des coefficients de sédimentation à trois concentrations de protéines différentes (0,6 mg/mL, 4 mg/mL et 6 mg/mL) mesurés par différents modes. Il présente également le pourcentage du signal du pic correspondant en fonction du coefficient de sédimentation.

La forme oligomérique **majoritaire en présence de l'inhibiteur et du cofacteur est le dimère**. Cette analyse montre que plus la concentration en protéine augmente et plus la forme tétramérique est favorisée et la forme monomérique diminue jusqu'à ne plus être présente. De plus, la différence entre les coefficients de sédimentation suggère qu'il existe un équilibre lent d'association dépendant de la concentration.

1.3 Comparaisons des résultats d'AUC obtenus entre la ceQORH apo, ceQORH-NADPH et la ceQORH inhibée

La ceQORH-13KOT semble se comporter de la même manière que la forme apo en solution. Les formes monomérique, dimérique, tétramérique et même octamérique (agrégation) sont présentes aux mêmes valeurs des coefficients de sédimentation (tableau n° 23). En présence du cofacteur, la ceQORH se monomériser et si, en plus, elle est en présence du 13KOT alors les formes dimérique et tétramérique sont favorisées.

Nombre de molécules	1	2	4
Coefficient de sédimentation théorique (S)	2,8	4,4	6,9
Coefficient de sédimentation relevé ceQORH apo (S)	3,2	3,9	6,5
Coefficient de sédimentation relevé ceQORH NADPH (S)	2,8	-	-
Coefficient de sédimentation relevé ceQORH 13KOT (S)	2,9	3,9	6,4
Coefficient de sédimentation relevé ceQORH-NADP ⁺ -13KOT (S)	2,8	4	6

Tableau n° 23. Comparaison des valeurs des coefficients de sédimentation (S) de la ceQORH apo et en complexe. Les coefficients de sédimentation sont des moyennes des valeurs obtenus pour des échantillons à différentes concentrations mesurées par absorbance à 280 nm. Ce tableau ne tient pas compte des effets de concentration.

L'inhibition semble donc être liée à l'état d'oligomérisation de la ceQORH. Pourtant des manipulations réalisées par nos collaborateurs ont démontré que la ceQORH serait inhibée sous la forme monomérique. Il existerait alors deux phases dans l'inhibition de la ceQORH. Afin de comprendre le mécanisme d'inhibition, les structures de la ceQORH inhibée en complexe binaire ou ternaire ont été étudiées.

2 Inhibition par l'oligomérisation : changements structuraux ?

2.1 Structure du complexe ceQORH-NADP⁺-13KOT et ceQORH-NADPH-13KOD

Les deux molécules inhibitrices utilisées sont le 13KOT et le 13KOD. La différence entre les deux molécules se situe dans la présence d'une insaturation supplémentaire sur le carbone 15 de la molécule du 13KOT (figure n° 69).

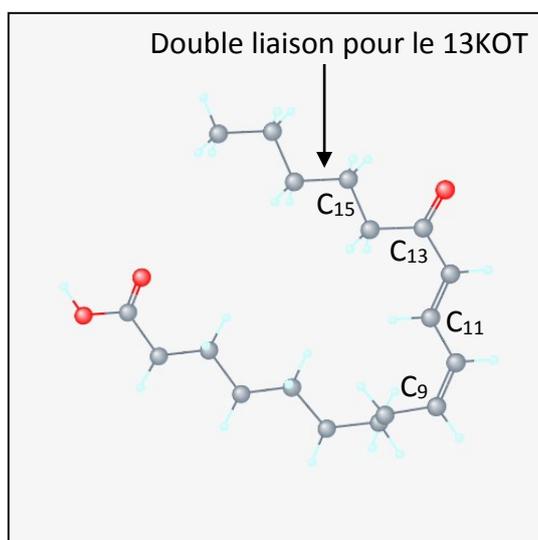


Figure n° 69. Structures chimiques du 13KOD et du 13KOT.

La molécule de 13KOD est présentée à l'aide de bâtons et de sphères correspondant respectivement à une liaison covalente et à un atome. Les atomes d'oxygène sont présentés en rouge, les atomes de carbone sont en gris, les atomes d'hydrogène sont en bleu clair. La molécule de 13KOT diffère du 13KOD par une insaturation supplémentaire localisée par la flèche bleue entre le carbone 15 et le carbone 16.

2.1.1 La cristallisation des complexes ternaires

➤ CeQORH-13KOT et QorNKt

Le complexe ceQORH-NADP⁺-13KOT sera appelé par la suite QorNKt. Bien que la structure de la ceQORH ait été obtenue avec le 13KOT, il est intéressant de tester d'autres conditions de cristallisation dans le but d'améliorer la résolution de la structure (2,8 Å). Les tests de cristallisation ont été réalisés en utilisant la plateforme HTXlab à l'EMBL à 20°C pour les complexes ceQORH-13KOT et QorNKt. La concentration de la protéine est de 5 mg/mL. De nombreuses pistes de cristallisation intéressantes ont été obtenues pour QorNKt. Ce ne fut pas le cas pour le complexe ceQORH-13KOT. La mise à l'échelle de ces premières conditions de cristallisation a abouti. La condition la plus intéressante était : 0,2 M de chlorure de sodium, 0,1 M de Tris, et 15,5 % de PEG 4000. Cela a permis d'obtenir des cristaux de petite taille relativement (20 µm de long sous forme de prisme, figure n° 70). Ces cristaux ont été congelés dans la solution mère de cristallisation contenant 20 % de glycérol et les essais de diffraction ont été réalisés sur la ligne FIP-BM30A à l'ESRF. Les cristaux observés ci-dessous ont diffracté les rayons X. D'autres conditions de cristallisation proche de la précédente ont permis d'obtenir des cristaux diffractant les rayons X.

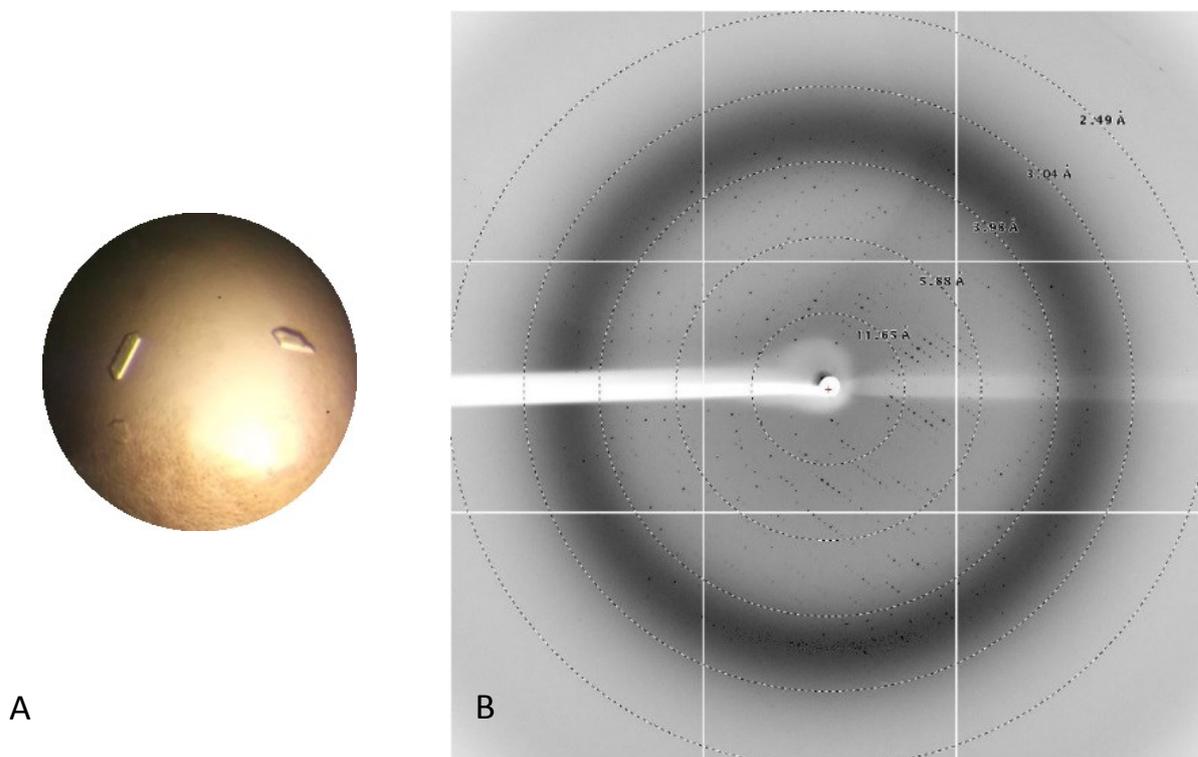


Figure n° 70. Cristaux et cliché de diffraction du complexe QorNKt.

A. Les cristaux du complexe QorNKt ont été obtenus dans une condition de cristallisation composée de : 0,2 M de chlorure de sodium, 0,1 M de Tris, et 15,5 % de PEG 4000. **B.** Ce cliché de diffraction correspond à la diffraction d'un cristal de QorNKt dont la condition de cristallisation est 0,2 M de chlorure de sodium, 0,1 M Tris pH 8,5, 24% PEG 3350. Les limites de résolution sont indiquées.

➤ QorNKd

La ceQORH a été cristallisée avec le NADPH et l'acide 13-oxo-9,11-octadécadiénoïque (13KOD) cette forme sera appelée QorNKd. Ce complexe a été cristallisé dans la condition suivante : 0,2 M de chlorure de sodium, 0,1 M de Tris pH 8,5, 28 % de PEG 3350 (figure n° 71). La condition de cristallisation est proche de celle permettant la cristallisation du complexe QorNKt. La cryoprotection utilisée est la solution mère de cristallisation contenant 20 % de glycérol.

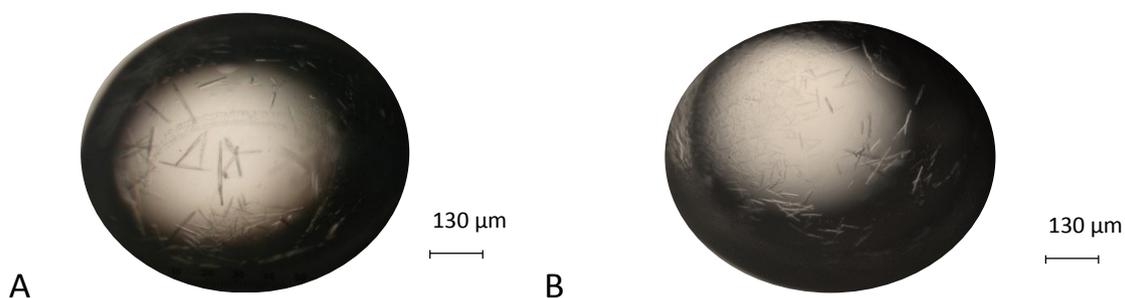


Figure n° 71. Cristaux du complexe QorNKd.

Les cristaux du complexe QorNKd ont été obtenus dans une condition de cristallisation composée de : 0,2 M de chlorure de sodium, 0,1 M de Tris pH 8,5, 28 % (A) ou 30 % (B) de PEG 3350.

D'autres tests de diffraction sur des cristaux (sans cryoprotection ou avec des cristaux obtenus dans une solution possédant un pourcentage plus faible de PEG 3350) ont permis d'obtenir des clichés de diffraction sur lesquels les tâches de diffraction sont peu nombreuses et très mal définies. Les essais de diffraction ont été réalisés sur la ligne FIP-BM30A à l'ESRF.

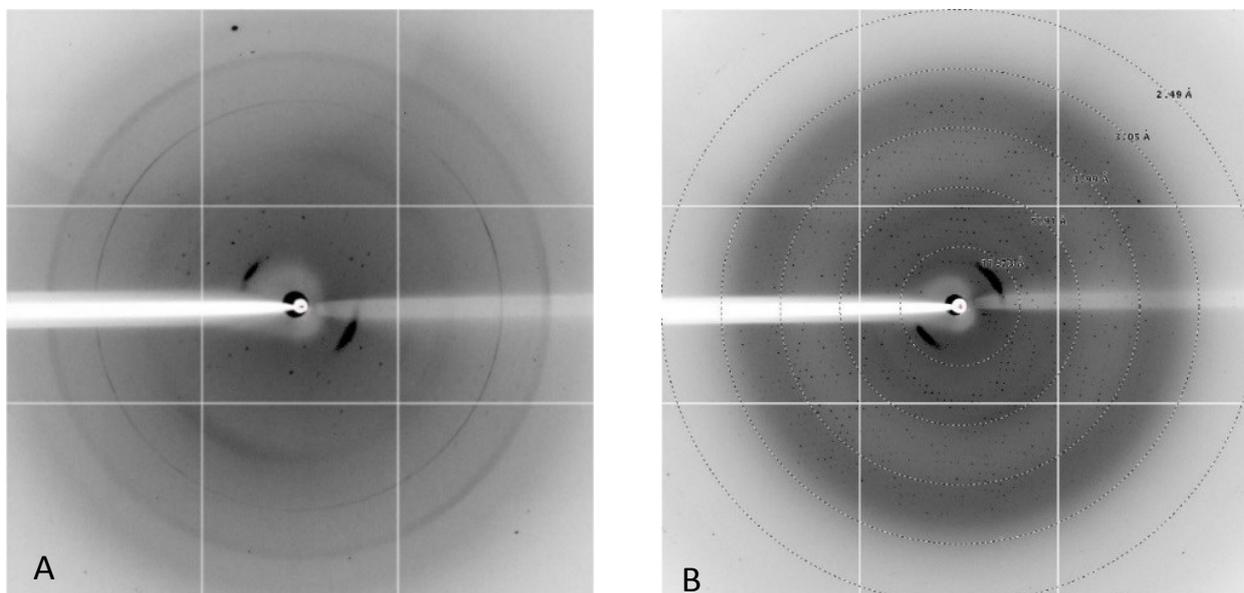


Figure n° 72. Clichés de diffraction des cristaux de la QorNKd.

Ces clichés de diffraction correspondent à la diffraction de cristaux de QorNKd dont les conditions de cristallisation sont (A) 0,2 M de chlorure de sodium, 0,1 M Tris pH 8,5, 22 % PEG 3350 sans cryoprotectant et (B) 0,2 M de chlorure de sodium, 0,1 M de Tris pH 8,5, 28 % de PEG 3350 avec cryoprotectant.

2.1.2 Statistiques des données de diffraction des complexes QorNKt et QorNKd

➤ QorNKt

Le jeu de données de QorNKt est complet avec 99,4 % de complétude à une résolution de 2,81 Å. L'ensemble des statistiques sont correctes pour résoudre et affiner la structure. Le remplacement moléculaire a été réalisé à partir de la première structure obtenue du complexe ceQORH-13KOT.

➤ QorNKd

Le jeu de données de QorNKd est complet avec 98,4 % de complétude à une résolution de 3,58 Å. La résolution des données peut être un frein à la détermination de la structure tridimensionnelle. Un autre jeu de données a été obtenu pour le complexe QorNKd à une meilleure résolution (2,8 Å) mais ces données ne seront pas utilisées car après la réalisation du remplacement moléculaire, il s'est avéré que la carte de densité électronique était moins bien définie par rapport à la précédente.

➤ Complexes QorNKt et QorNKd

Les deux complexes ont été cristallisés dans le même groupe d'espace. Le réseau cristallin est donc primitif et le système cristallin est monoclinique. Un des monomères du complexe QorNKt a été difficile à reconstruire. Les facteurs B des résidus étaient élevés (entre 70 et 100 Å²). Les chaînes latérales, et parfois même le squelette carboné, ont été difficile à reconstruire (chaîne E) et ce malgré l'utilisation des NCS et des TLS lors des affinements. La carte de densité électronique n'a pas permis de définir clairement l'emplacement de nombreux résidus, certaines chaînes latérales ont donc été supprimées. Une des boucles dont la densité électronique a été souvent mal définie dans les différentes structures obtenues est celle correspondant à la boucle du résidu Val96 au résidu Ala106. Les facteurs B avoisinent 100 Å². Il est alors probable que cette partie soit très agitée.

Théoriquement dans le complexe QorNKt, le cofacteur correspond à la forme oxydée alors que dans le complexe QorNKd le cofacteur correspond à la forme réduite. Aucune vérification n'a pu être réalisée sur le cryobench afin d'en vérifier la nature. Cependant on supposera que la forme cristallisée est bien celle initialement ajoutée.

	QorNKt	QorNKd
Enregistrement		
Groupe d'espace	P2 ₁	P2 ₁
a, b, c (Å)	82,16 128,60 150,12	80,98 128,25 152,21
α, β, γ (°)	90 97,76 90	90 98,47 90
Intervalle de résolution (Å)	49,58 – 2,81 (2,98 – 2,81)	48,74 - 3,48 (3,80 – 3,48)
R _{meas} (%)	10,1 (72,9)	45,7 (83,5)
I/ σ (I)	13,67 (2,19)	3,90 (1,95)
Nombre total de réflexions acceptées	283 879 (45 069)	140 438 (18 980)
Nombre de réflexions uniques	75 277 (11 943)	35 715 (5 341)
Complétude (%)	99,4 (98,2)	98,4 (91,4)
CC ^{1/2} (%)	99,7 (77)	95,3 (96,5)
Multiplicité	3,8 (3,8)	3,93 (26,29)
Mosaïcité	0,152	0,233
Solvant (%)	53,68	53,08
Coefficient de Matthews	2,65	2,62
Affinement		
Résolution (Å)	49,58-2,81 (2,98-2,81)	48,76 – 3,48 (3,57 – 3,48)
R (%)	18,82 (32,46)	23,16 (50,39)
R _{free} (%)	22,47 (38,87)	29,21 (35,53)
Nombre d'atomes	19 584	19 625
Moyenne des facteurs B (Å ²)	57,86	37,62
Rmsd bonds (Å)	0,008	0,010
Rmsd angles (°)	1,214	1,267
Ramachandran (%)	97,72	95,80
Clashscore	3,26	8,05
Rotamères moins fréquents (%)	0,25	1,70

Tableau n° 24. Jeux de données de QorNKt et QorNKd. Statistiques des jeux de données enregistrées sur la ligne FIP-BM30A à l'ESRF et celles de l'affinement pour les complexes QorNKt et QorNKd. Les statistiques de la dernière coquille de résolution sont indiquées entre parenthèses.

2.2 Analyse et discussions sur les structures QorNKt et QorNKd

Les structures des complexes QorNKt et QorNKd ont été déterminées à 2,8 Å (code PDB : 5A4D) et 3,3 Å de résolution respectivement. L'unité asymétrique de ces deux structures est composée de huit molécules, formant deux tétramères équivalents (figure n° 73).

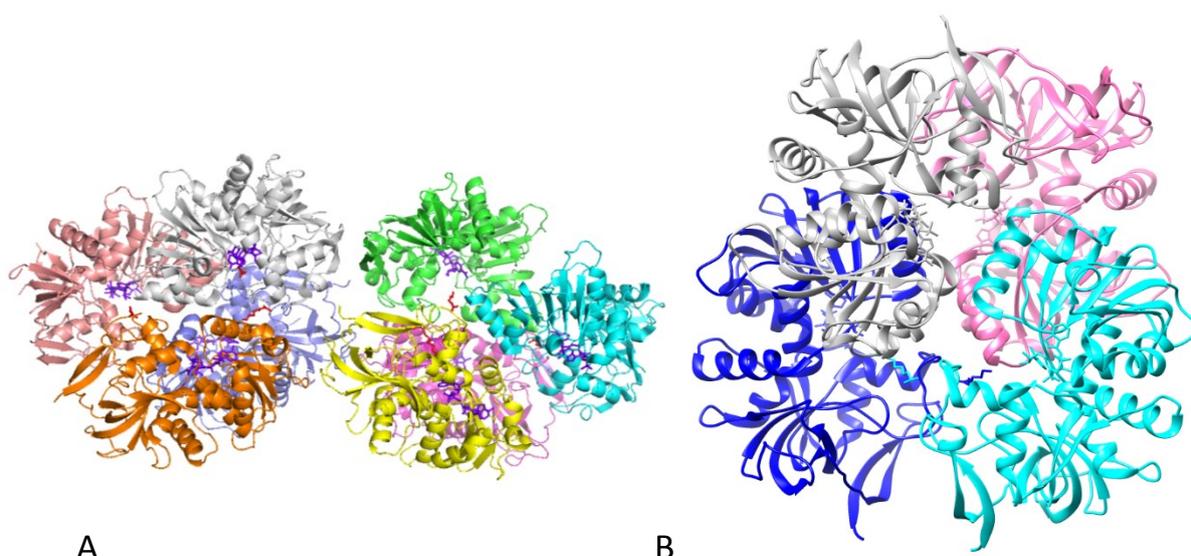


Figure n° 73. Structures du complexe QorNKt.

Les chaînes de la ceQORH sont représentées par une couleur différente. **A.** Le 13KOT est représenté en bâton rouge et le cofacteur est représenté par des bâtons violets. **B.** La figure présente un des tétramères du complexe QorNKt.

2.2.1 L'assemblage du tétramère des complexes QorNKt et QorNKd

La surface d'interaction la plus élevée entre deux monomères dans ce double tétramère est $494,4 \text{ \AA}^2$ entre le monomère E et A (QorNKt) et de $495,9 \text{ \AA}^2$ entre le monomère E et G (QorNKd). Les CSS sont de 0 pour les deux complexes. Le dimère est donc considéré comme instable en solution sans la présence de la molécule inhibitrice, tout comme le tétramère. Le dimère de la ceQORH apo et de la ceQORHR58A-NADP⁺ est différent de celui de QorNKt et QorNKd. En effet, la position de la molécule inhibitrice est telle qu'elle provoquerait de nombreux conflits structuraux. Dans QorNKt, par exemple, le 13KOT se heurterait à une boucle de la structure si le dimère était identique à celui de la ceQORH apo. La proximité du 13KOT avec l'hélice $\alpha 8$ engendre également une modification du dimère (figure n° 74). Le second monomère réalise une rotation de $29,1^\circ$ par rapport au second afin de pallier les conflits précédents. La dimérisation est donc différente à cause de la molécule inhibitrice. Cependant le 13KOT a été défini que partiellement dans la structure QorNKt.

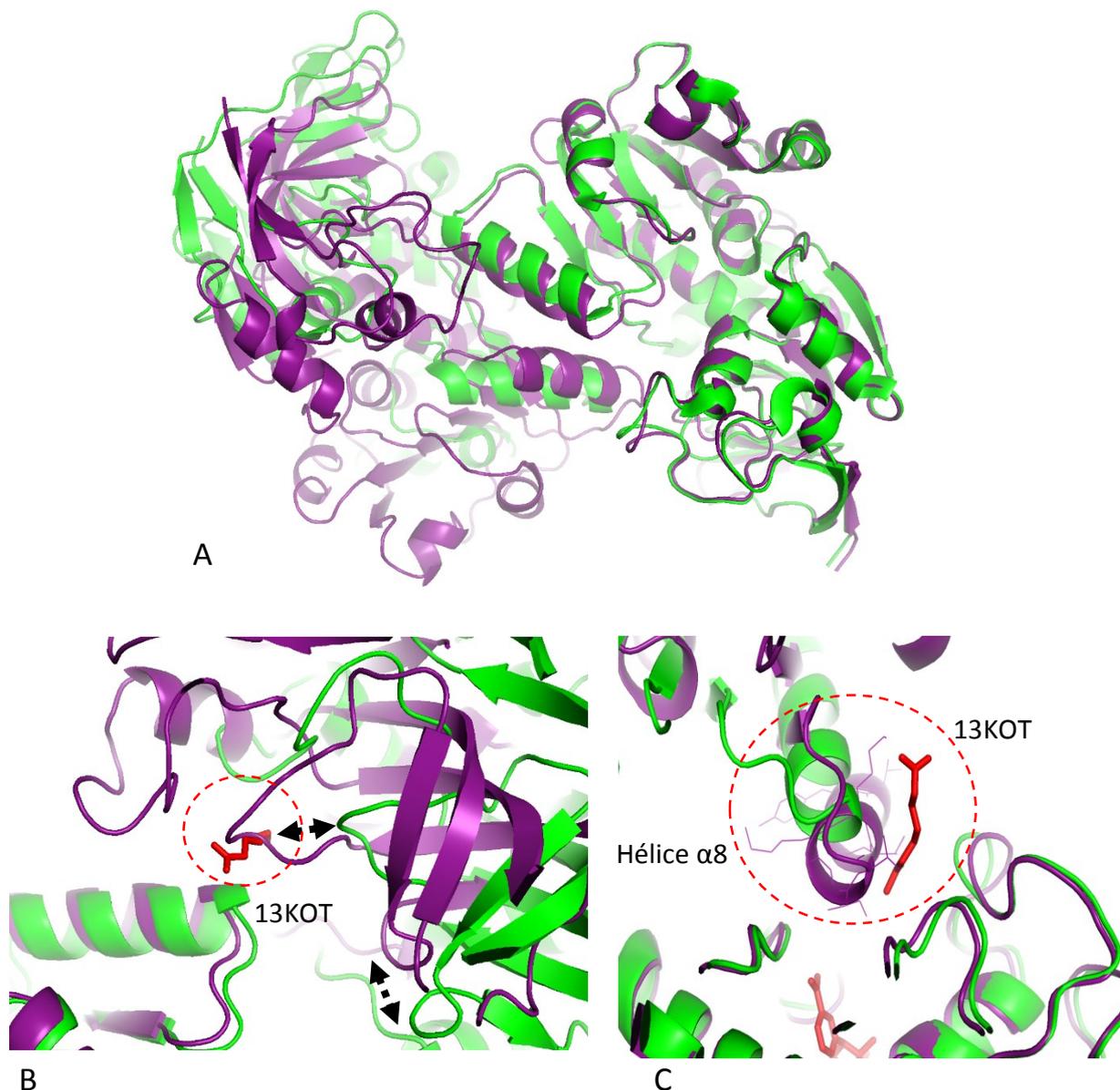


Figure n° 74. Le 13KOT empêche la dimérisation initiale.

A. Cette figure présente la superposition du dimère de la structure de la ceQORH apo (en violet) sur la structure du complexe QorNKt (en vert). Les protéines sont représentées en ruban. Le 13KOT est représenté par des bâtons rouges. Les gênes structurales occasionnées par le 13KOT au niveau d'une boucle (B) ou au niveau de l'hélice $\alpha 8$ (C) sont entourées par un cercle rouge en trait discontinu.

Les molécules inhibitrices dans les autres structures sont mieux définies. La position de l'inhibiteur est identique dans chacune des structures résolues de la ceQORH inhibée (QorNKt, QorNKd et ceQORH-13KOT) (figure n° 75). La position de l'extrémité de la molécule inhibitrice comprenant le carboxylate semble être identique alors que la position de la seconde extrémité semble plus flexible. Cependant la dimérisation est identique. L'inhibiteur est localisé à l'interface de trois monomères. La modification du mode de dimérisation par l'inhibiteur serait-elle à l'origine de l'inhibition ?

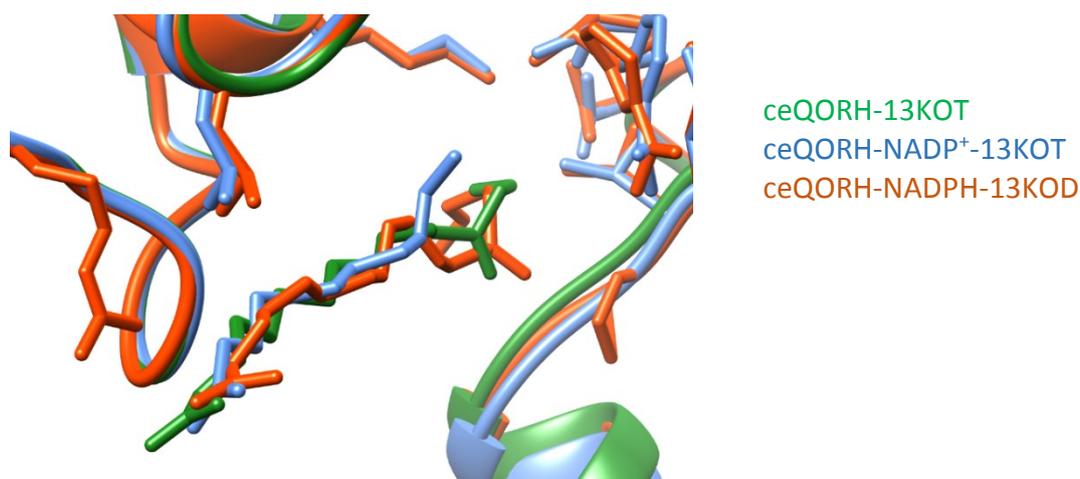


Figure n° 75. Positions des molécules inhibitrices.

La fixation du cofacteur sur la ceQORH entraîne sa monomérisation. De ce fait, le changement du mode de dimérisation ne devrait pas être la cause de l'inhibition de la ceQORH. Quelles sont les conséquences de la fixation de l'inhibiteur au niveau du monomère ? Empêche-t-il les substrats d'accéder au site catalytique ? Certaines enzymes de détoxification comme les AKR9C4 remanient dans l'espace certaines boucles à la suite de la fixation de l'inhibiteur ce qui modifie le site catalytique induisant alors l'inhibition de l'enzyme (*cf.* p. 56). C'est un mécanisme d'inhibition intéressant qui pourrait être également celui de la ceQORH.

2.2.2 Comparaison des complexes QorNKt et QorNKd

Les surfaces totales moyennes des monomères de QorNKt et QorNKd sont de 14585 Å² et de 14754 Å² respectivement. Entre les différents monomères de QorNKt et QorNKd, les rmsd sont compris entre 0,22 Å et 0,28 Å. Les rmsd sont faibles. Les structures sont donc similaires. Cependant les résidus de la Pro254 à Ile265 sont translatés d'environ 0,80 Å entre les deux structures (en considérant les C_α). Ils appartiennent à l'hélice α8 responsable de la dimérisation (figure n° 76). Une autre partie de la protéine est impactée dans une moindre mesure, celle correspondant au résidu Val48 jusqu'au résidu Lys53 (entre 0,30 et 0,56 Å).

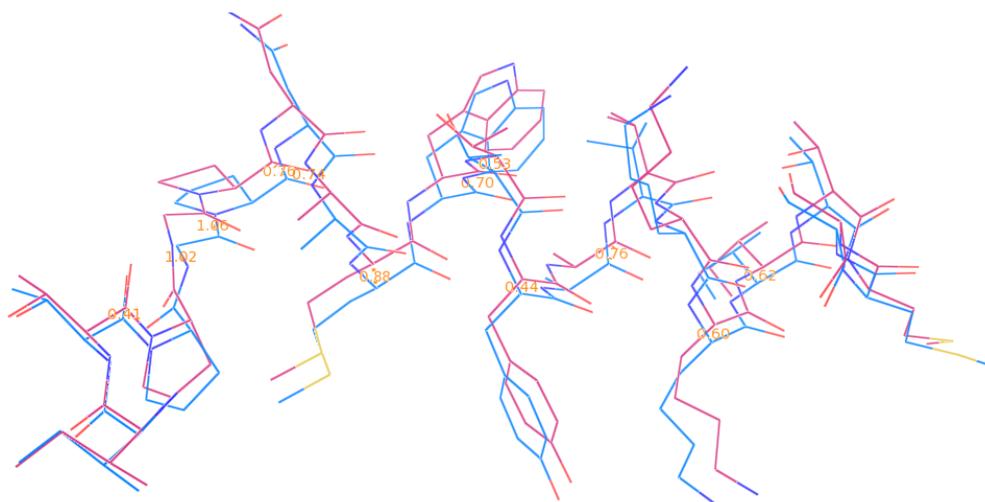


Figure n° 76. Superposition de l'hélice $\alpha 8$ de la QorNKt et de la QorNKd.

La figure présente deux parties équivalentes des chaînes de QorNKt (en bleu) et de QorNKd (en rose). La partie correspondante est : ITPGNAMWTYAVKKITMS (du résidu Ile249 au résidu Ser267). La distance en Å est indiquée en orange entre les deux chaînes.

Le déplacement de l'hélice $\alpha 8$ entre les deux structures de la ceQORH inhibée pourrait s'expliquer de la manière suivante :

- la nature de l'inhibiteur (13KOT ou 13KOD) a une influence.
- la construction partielle du 13KOT signifierait que la molécule s'est dégradée et cela n'affecte pas la structure de la ceQORH de la même manière.
- l'état d'oxydation du cofacteur (théoriquement NADP^+ pour la structure avec le 13KOT et NADPH pour la structure avec le 13KOD) a une influence.

Afin de vérifier laquelle de ces hypothèses pourrait être correcte, l'analyse de la fixation du cofacteur et des inhibiteurs dans les deux structures est réalisée.

2.2.3 Interactions des ligands dans les complexes QorNKt et QorNKd

➤ Le cofacteur

Le cofacteur est placé dans une cavité, entouré par une quarantaine de résidus. Il se lie à la protéine par l'intermédiaire de 14 à 17 liaisons hydrogène. Les résidus impliqués dans la fixation du cofacteur dans les deux complexes sont : Lys51, Ser165, Val168, Gly167, Arg190, Tyr206, Ala231, Ile250, Thr251, Leu275, Leu277, His320. Seule l'Ile250 n'est pas impliquée dans la fixation du cofacteur dans le complexe QorNKd. Les deux formes oxydée et réduite du cofacteur sont équivalentes et ne semblent donc pas avoir une influence particulière sur la position de l'hélice $\alpha 8$.

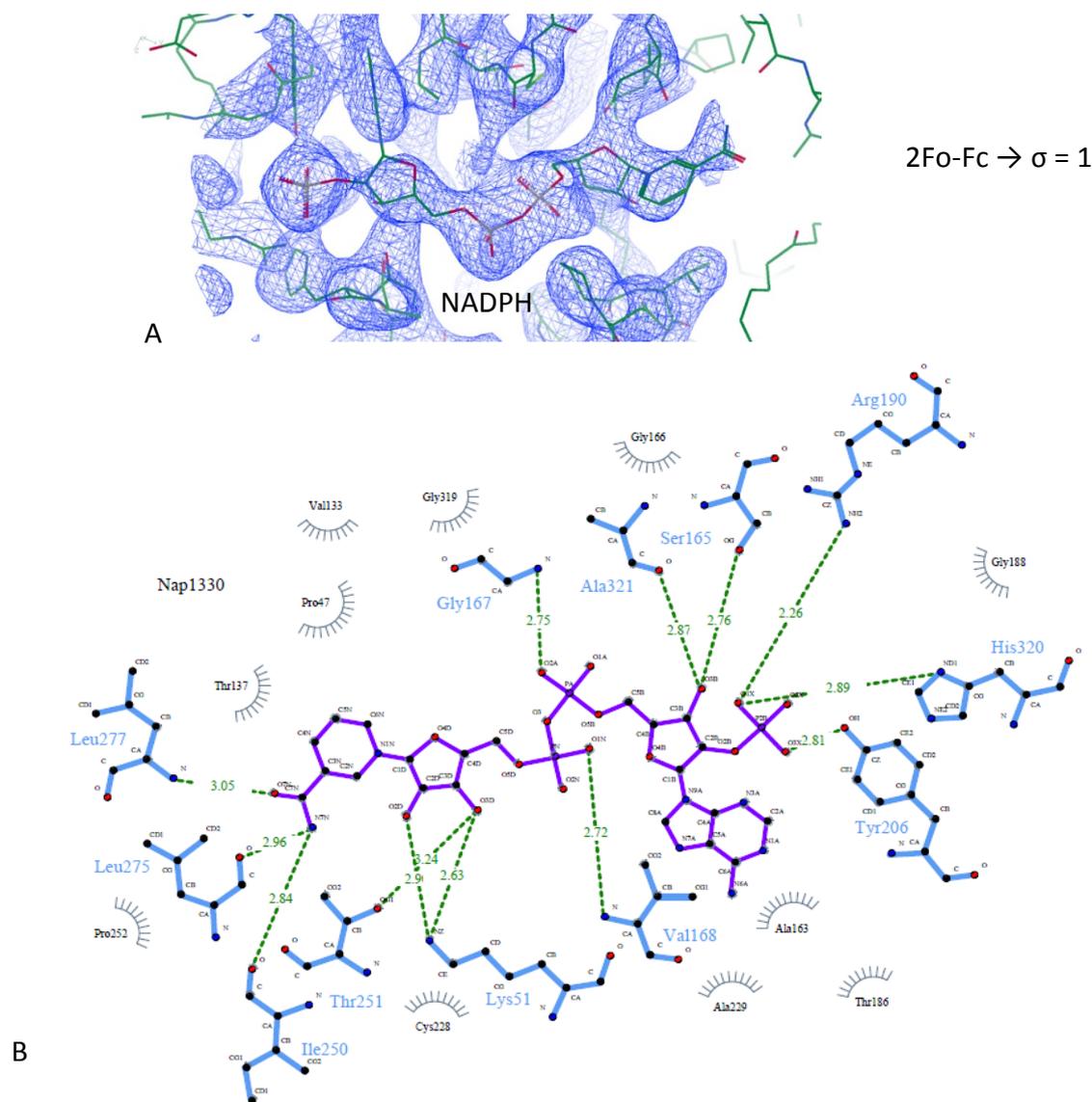


Figure n° 77. Interactions entre le cofacteur et la ceQORH dans QorNKt(d).

A. La densité électronique du NADPH, y compris du nicotinamide, est définie dans la structure du complexe QorNKd. B. Le ligand (NADP⁺) dans le complexe QorNKt est représenté en violet. Les acides aminés interagissant avec le ligand sont en bleu. Les liaisons hydrogène sont représentées en pointillé vert, la distance entre les deux atomes est indiquée en vert également. Les résidus impliqués dans les interactions hydrophobes sont représentés en gris. La figure est réalisée à l'aide de Ligplot⁺.

➤ Le 13KOT dans le tétramère

L'inhibiteur est localisé à l'interface de trois monomères (figure n° 78). Deux molécules de 13KOT sur les huit molécules ne sont pas clairement définies car la densité électronique est manquante. Par conséquent, elles n'ont pas été ajoutées. De plus, la densité électronique du 13KOT est partielle, seule la partie du carboxylate a été définie jusqu'à 11 atomes de carbone au maximum.

Il s'est avéré que le 13KOT initialement utilisé n'était pas pur. En effet, 20 % de la solution correspondrait à une autre molécule dérivée. L'identification de cette molécule n'a pas pu

aboutir. Il est possible que la seconde molécule soit une dégradation du 13KOT expliquant l'absence de densité électronique. Une autre possibilité est que la partie de la molécule du 13KOT non-déterminée soit agitée. Le plus surprenant dans ce constat, est que l'extrémité du 13KOT non-définie soit celle la plus enfouie dans le sillon principal de la protéine et celle la plus proche du nicotinamide. Cette extrémité devrait donc interagir davantage avec la protéine et donc être mieux stabilisée.

En se plaçant dans le tétramère, les résidus impliqués dans la stabilisation du 13KOT grâce à une liaison hydrogène sont (figure n° 78) :

- l'Arg58 dont le groupement guanidinium interagit avec le groupe carboxylate du 13KOT.
- la Tyr14 dont le groupement hydroxyle interagit avec le groupe carboxylate du 13KOT.

Les résidus placés à proximité du 13KOT contribuant également à sa stabilisation par des interactions de van der Waals sont la Pro59, l'Arg63, Leu100, Ile265 et Thr266.

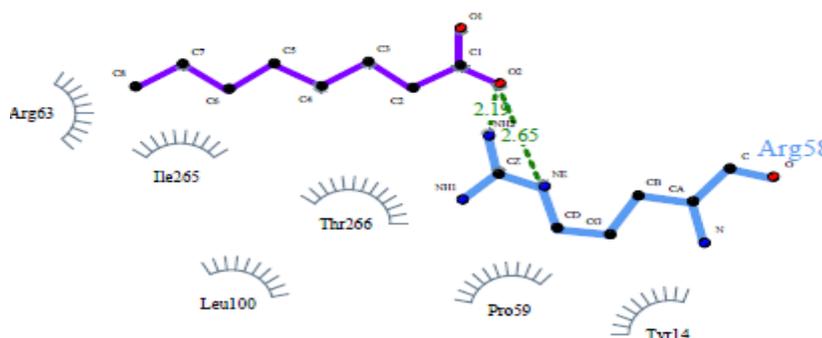


Figure n° 78. Interactions du 13KOT avec la ceQORH.

Le ligand (13KOT) est représenté en violet. Les acides aminés interagissant avec le ligand sont en bleu. Dans ce cas, la Tyr14 n'effectue pas de liaison hydrogène avec le 13KOT, car tous les 13KOT ne réalisent pas cette interaction. Les liaisons hydrogène sont représentées en pointillé vert, la distance entre les deux atomes est indiquée en vert. Les résidus impliqués dans les interactions hydrophobes sont colorés en gris. La figure est réalisée à l'aide de Ligplot⁺.

➤ Le 13KOD dans le tétramère

Tout comme le 13KOT, le 13KOD est défini dans six molécules de ceQORH sur huit. La structure du complexe QorNKd, bien qu'elle ait été résolue à une résolution plus haute, a permis de définir avec exactitude l'emplacement de la molécule inhibitrice y compris l'extrémité où se situe le carbonyle. Le 13KOD pourrait adopter deux types de conformation.

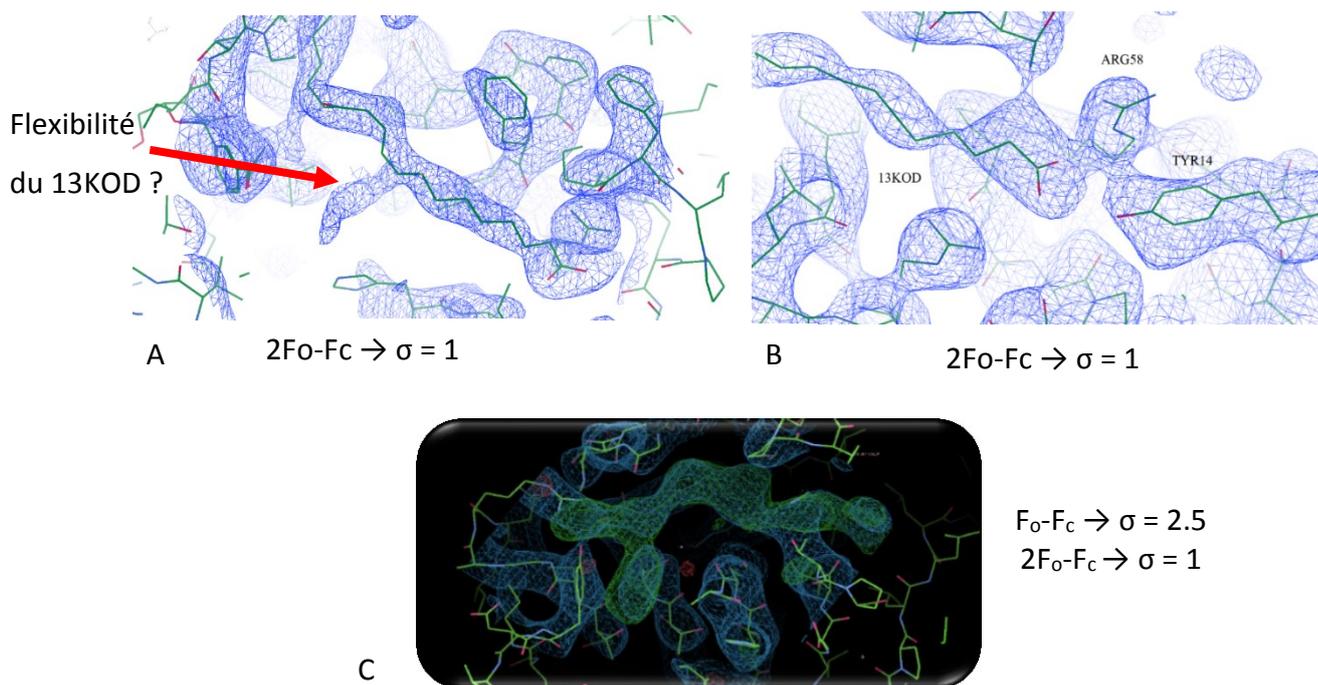


Figure n° 79. Densité électronique du 13KOD.

Les figures mettent en évidence la densité électronique du 13KOD obtenue après affinement de la structure QorNKd. **A.** et **C.** Ces figures présentent la possibilité d'une seconde conformation du 13KOD. **B.** La figure met en évidence l'interaction entre le 13KOD et l'Arg58 et la Tyr14.

Grâce à une meilleure définition de la densité électronique, l'environnement du 13KOD a été mieux défini que celui du 13KOT. Les résidus déterminés à proximité du 13KOD sont : **Tyr14**, Val48, Ile57, **Arg58**, **Pro59**, Phe60, Leu61, **Arg63**, His99, **Leu100**, **Ile265**, **Thr266**, Leu276 (résidus en rouge sont retrouvés également dans l'environnement du 13KOT). Ceux impliqués dans une liaison hydrogène avec le 13KOD sont la Tyr14 et l'Arg58 (figure n° 79).

Les résidus supplémentaires (en noir) sont ceux impliqués dans la fixation de l'inhibiteur au niveau du carbonyle. La Val48 appartient à la seconde partie de la structure qui ne superposait pas de la même manière entre la QorNKt et la QorNKd. Cette dernière se situe à proximité du 13KOD ce qui n'est pas le cas pour le 13KOT. L'orientation de ce résidu dépend donc de la présence de l'extrémité comprenant le carbonyle de la molécule inhibitrice dans la structure. Les différences structurales entre la QorNKt et la QorNKd sont induites par le fait que le 13KOT ne soit pas entièrement présent et qu'il soit probablement dégradé. De ce fait, la Val48 dans la structure QorNKt est positionnée comme si la structure ne comportait pas de molécules inhibitrices. Afin de vérifier cette hypothèse, la structure de la QorNKt est comparée à celle de la ceQORH en présence du 13KOT car celui-ci est mieux défini.

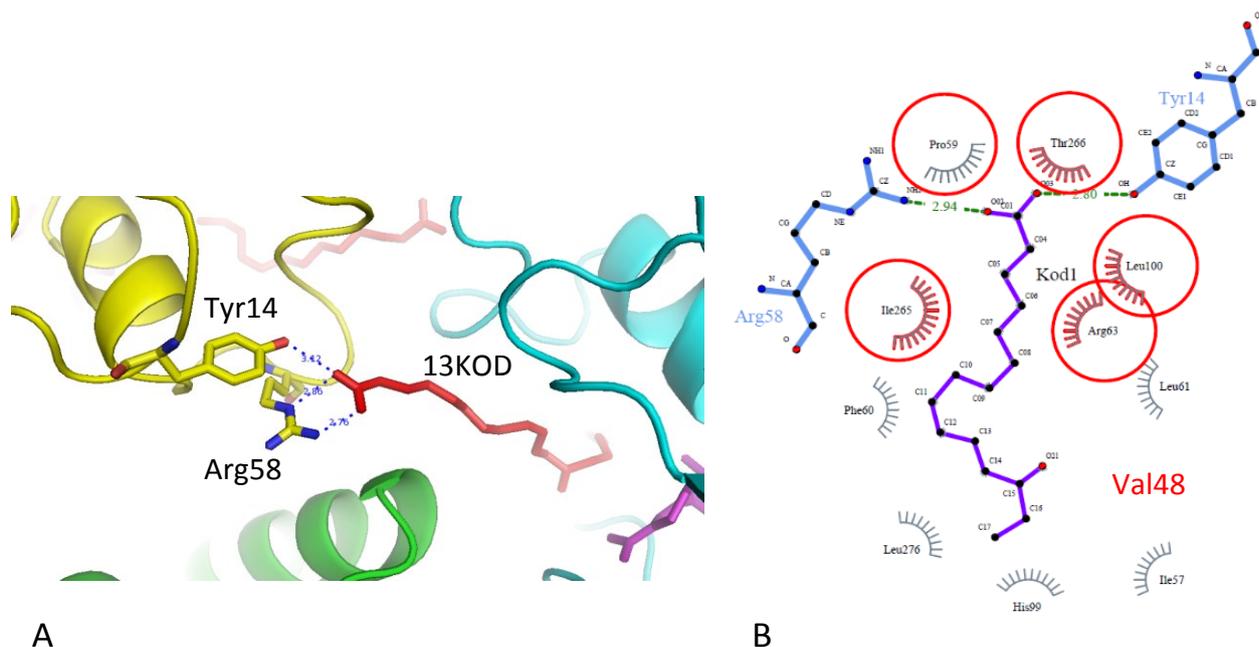


Figure n° 80. Interaction du 13KOD avec l'ensemble de la protéine.

A. La figure présente l'interaction du 13KOD avec la Tyr14 et l'Arg58. Le 13KOD est représenté par des bâtons rouges et chaque chaîne de la ceQORH est représentée en ruban de couleur différente.
B. Le ligand (13KOD nommé Kod1) est représenté en violet. Les acides aminés interagissant avec le ligand sont en bleu. Les liaisons hydrogène sont représentées en pointillé vert, la distance entre les deux atomes est indiquée en vert. Les résidus impliqués dans les interactions hydrophobes sont colorés en gris. Les résidus entourés par un cercle rouge sont ceux retrouvés également dans l'environnement du 13KOT. La figure est réalisée à l'aide de Ligplot⁺.

2.2.4 Comparaison entre la structure du complexe QorNKt et celle de la ceQORH-13KOT

Les résultats d'AUC ont mis en évidence que la fixation du cofacteur dans la QorNKt a un impact sur l'état d'oligomérisation de la ceQORH inhibée. Une comparaison entre la structure de la ceQORH-13KOT et ceQORH-NADP⁺-13KOT est donc réalisée.

➤ Différences concernant les monomères

Une première partie de la structure est modifiée comprenant la Pro209. La Tyr206 réalise un π stacking avec l'adénosine du NADP⁺. Ce résidu est localisé trois résidus avant la Pro209, la différence observée sur la Pro209 est donc une répercussion de cette interaction.

Une seconde partie de la protéine est modulée. L'hélice $\alpha 8$ est à nouveau positionnée différemment (plus précisément de la Thr251 à la Ser268). En observant la structure de la ceQORH-13KOT, on constate que l'Ile250 est avancée au niveau du site catalytique. La fixation du 13KOT réduit considérablement le site catalytique par rapport à la structure QorNKt.

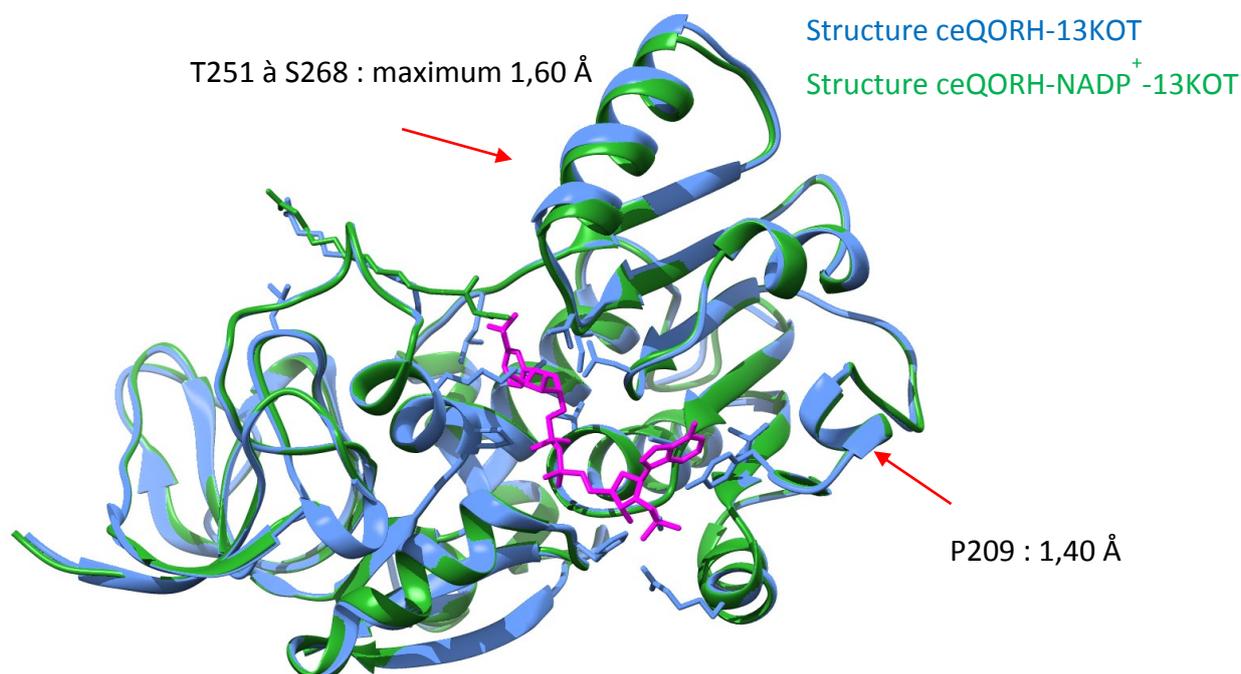


Figure n° 81. Superposition des structures QorNKt et ceQORH-13KOT.

➤ Différences concernant les résidus

En étudiant les différences entre QorNKt et la ceQORH-13KOT, cela permet de mettre en évidence l'implication du cofacteur dans le processus d'inhibition. La chaîne latérale de l'Arg190 n'a pas été définie dans la structure avec le 13KOT seul. Comme ce résidu est impliqué dans la fixation du cofacteur, en absence du cofacteur l'agitation de ce résidu doit être plus prononcée. Contrairement aux structures de la ceQORH apo et celle de la ceQORHR58A-NADP⁺, les deux résidus, l'Asn230 et l'His320, n'ont pas changé d'orientation entre la QorNKt et la ceQORH-13KOT. La Thr251, un des résidus dont la chaîne latérale changeait d'orientation entre la ceQORH apo et celle liée au NADP⁺, est également positionnée différemment entre les deux structures. Il a été prouvé que la Thr251 interagit avec le cofacteur. Cela explique la différence entre les deux structures. Cette différence engendre un **déplacement de l'ensemble du squelette carboné sur plusieurs résidus (de la Thr251 à la Lys269 : hélice $\alpha 8$) entre la structure avec et sans cofacteur**. Par conséquent, la présence ou non du cofacteur lorsque la ceQORH est inhibée participe au positionnement de l'hélice $\alpha 8$ et à la formation du site catalytique.

2.3 Comparaison entre les structures de la ceQORH inhibée et apo

Les rmsd sont compris entre 0,74 Å et 0,76 Å entre un monomère de la forme apo et un monomère du complexe QorNKt et entre 0,65 Å et 0,70 Å entre un monomère de la forme apo et un monomère du complexe QorNKd. Le monomère de la ceQORH apo et le monomère du complexe QorNKt sont identiques, sauf l'hélice $\alpha 8$ qui se déplace de plus de 1 Å entre les deux structures.

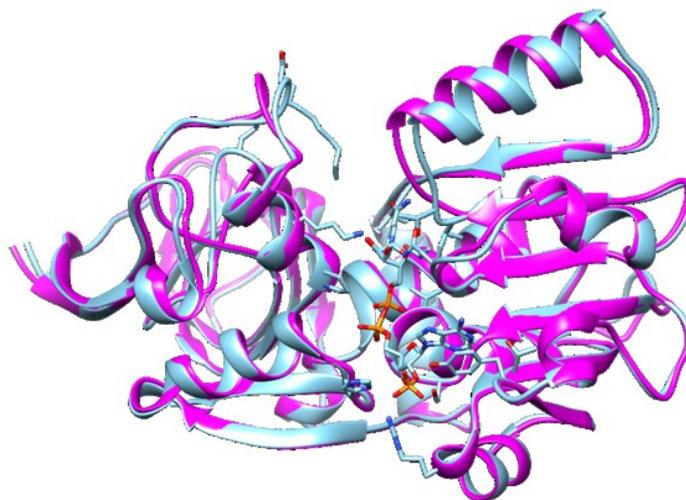


Figure n° 82. Superposition de la ceQORH apo et de QorNKt.

A. Superposition du monomère de la structure de la ceQORH apo (en violet) sur la structure du complexe QorNKt (en bleu). Les protéines sont représentées en ruban.

Grâce à ces structures où le nicotinamide est défini (contrairement à celle de la ceQORHR58A-NADP⁺), on s'aperçoit que le nicotinamide forme des liaisons hydrogène avec l'amine ou le carbonyle de la Leu275 et de la Leu277 et le ribose du nicotinamide avec le carbonyle de la Lys51 (hydroxyle du carbone 2' du ribose) et la chaîne latérale de la Thr251 (hydroxyle du carbone 3' du ribose). Dans le cas présent, on note l'absence d'interaction du cofacteur avec l'Asn230. En revanche, l'Ala231 interagit avec le cofacteur. L'Asn230 ne semble pas être impliquée directement dans la fixation du cofacteur. Cependant en adoptant la conformation d'un rotamère différent, elle favoriserait l'interaction entre l'Ala231 et le NADPH. On constate que l'Arg190, et l'His320 interagissent directement avec le cofacteur confirmant ainsi que leur changement d'orientation est induit par la fixation du cofacteur.

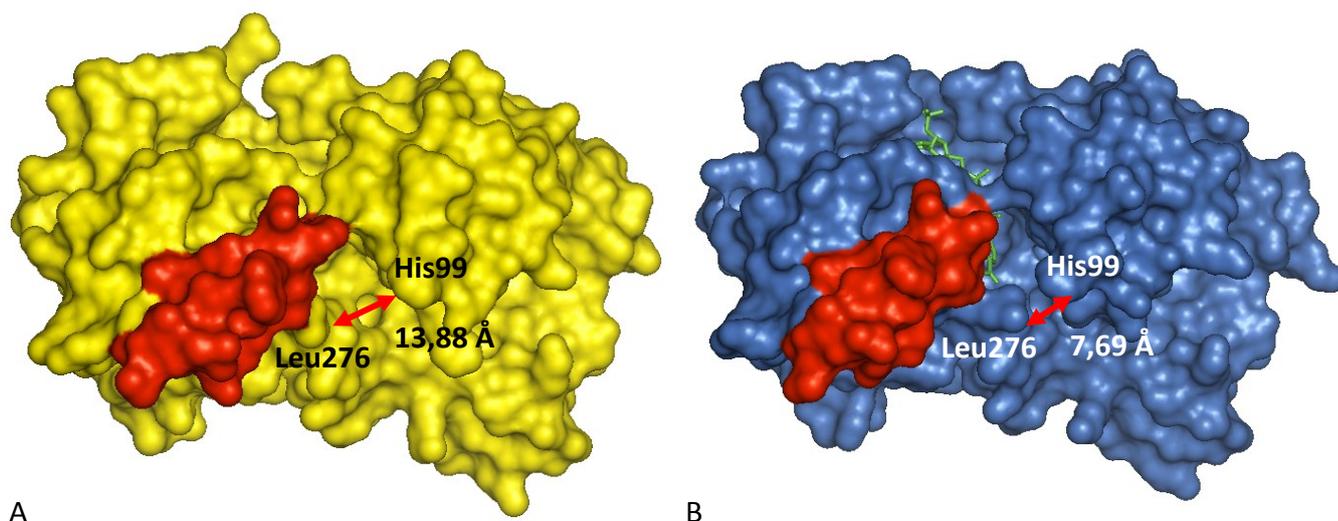


Figure n° 83. Site catalytique de la ceQORH apo et de la QorNKt.

Cette figure présente la différence dans la formation du site catalytique entre la forme apo (A) et celle du complexe QorNKt (B). L'hélice $\alpha 8$ est en rouge et la distance entre l'His99 et la Leu276 est indiquée par une flèche rouge.

Cela a pour conséquence la formation d'un site catalytique plus étroit. En effet, en observant la distance entre l'His99 et la Leu 276, celle-ci est divisée par deux entre la forme inhibée et apo (figure n° 83). A savoir que la Leu276 est impliquée dans une liaison hydrogène entre les deux monomères du dimère de la forme apo avec la Lys264. La dimérisation de la forme apo induit ce positionnement spécifique de l'hélice $\alpha 8$. De plus, l'His99 change radicalement d'orientation entre les différentes structures avec un rmsd de 2,4 Å du C_{α} de l'His99. Lorsque que le cofacteur se fixe l'His99 oriente son cycle à l'opposé du site catalytique permettant la fixation des substrats à l'inverse de la forme inhibée où l'His99 oriente son cycle aromatique au niveau du site catalytique empêchant probablement la fixation des substrats.

2.4 Discussions et conclusions sur le mode d'inhibition

2.4.1 Mécanisme de l'inhibition de la ceQORH

L'exemple utilisé sera celui du 13KOD car la molécule a été mieux définie que le 13KOT. Si on considère la molécule inhibitrice cette fois-ci dans un monomère, on constate qu'aucune liaison hydrogène ne maintient la molécule inhibitrice. Pour le 13KOD, seules la Phe60, la Leu61, l'His99, la Leu100, la Leu275 et la Leu276 seraient impliquées dans la stabilisation de la molécule inhibitrice (figure n° 84). Or le carboxylate serait libre. Cela explique pourquoi l'inhibition se ferait en deux phases : une rapide correspondant à la fixation de la molécule inhibitrice sur un monomère, et une phase plus lente correspondant à la formation des

tétramères notamment par l'intermédiaire des interactions entre les carboxylates des inhibiteurs et les résidus d'un autre monomère comme la Tyr14 et l'Arg58.

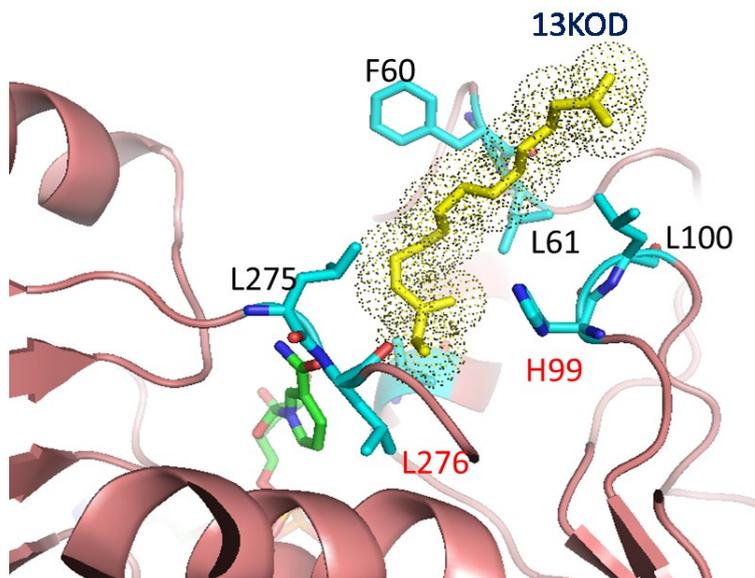


Figure n° 84. Stabilisation du 13KOD dans un monomère.

La ceQORH est représentée par des rubans roses. La molécule inhibitrice est représentée par des bâtons jaunes. Les résidus environnants sont mis en évidence par des bâtons bleus. L'His99 et la Leu276 sont deux résidus intéressants permettant d'évaluer la distance entre les structures secondaires au niveau du site catalytique.

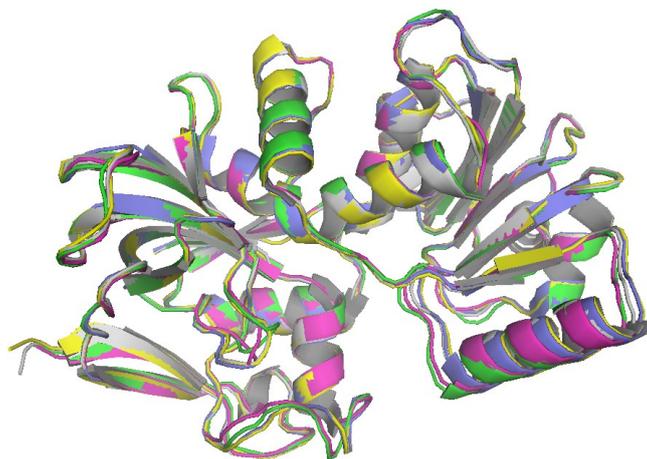


Figure n° 85. Superposition de l'ensemble des structures de la ceQORH.

La structure de la ceQORH apo est en jaune, la structure de la ceQORHR58A-NADP⁺ est en rose, la structure de la ceQORH-13KOT est en vert, la structure QorNKt est en bleu et la structure QorNKd est en rose.

En conclusion, la superposition des structures permet de proposer une hypothèse sur le mécanisme de fonctionnement de la ceQORH. L'analyse des structures a révélé que l'hélice $\alpha 8$ joue un rôle clé dans la dimérisation, la tétramérisation, et dans une modulation probable du site catalytique à la suite de la fixation du NADPH. **L'His99 est également fortement impliquée en rappelant qu'une des boucles très agitées est celle correspondants au résidu 98 à 106.** La stabilisation de cette boucle par la fixation du cofacteur au travers d'interaction permet de la stabiliser et semble donc indiquer qu'elle aurait également un rôle dans la fixation des substrats (cf. p.56). Il n'est pas rare que les boucles soient impliquées dans la constitution d'un site catalytique.

3 Comparaison avec les structures de la PDB

3.1 Comparaison du monomère des complexes QorNKt(d)

La comparaison de la structure du complexe QorNKt avec l'ensemble des structures de la PDB réalisée à l'aide de PDBefold, met en évidence une homologie avec la quinone oxydoréductase de *Coxiella burnetii* avec 1,55 Å de rmsd et un Q-score de 0,68 (tableau n° 25). Cette structure est sous la forme monomérique. Le meilleur résultat est donc identique à celui obtenu pour la ceQORH apo (1,40 Å). La forme apo est ensuite plus proche d'une énone oxydoréductase qui réalise le même type de réaction que la ceQORH. Les résultats avec la QorNKd sont semblables.

ORDRE	INFORMATIONS		STRUCTURES		STATISTIQUES		
	RMSD	ENZYMES	ORGANISMES	CODES PDB	LIGANDS	% SEQ	% SS
1,55	Quinone oxydoréductase	<i>Coxiella burnetii</i>	3TQH : A	-	32	92	0,68
1,56	Enone oxydoréductase	<i>Fragaria X Ananassa</i>	4id* : A (*c, f, d, e, b)	NADP(H) HMF / EHMF / EDHMF	25	76	0,53
1,61	Quinone oxydoréductase	<i>Thermus thermophilus</i>	1iz0 : A	NADPH	29	79	0,56
1,61	Alcool déshydrogénase	<i>Thermus thermophilus</i>	2eih : B	Zinc	32	81	0,56
1,62	Quinone oxydoréductase	<i>Thermus thermophilus</i>	1iyz : A	NADPH	30	79	0,55
1,63	VAT-1 homologue protéine	<i>Human</i>	4a27 : A	-	25	88	0,60
1,64	Quinone oxydoréductase	<i>Mycobacterial RV 1454C</i>	4rvu : (D, C)	NADPH	27	85	0,54

Tableau n° 25. Protéines dont la structure tridimensionnelle du monomère est proche de celle de la QorNKt.

3.2 Comparaison du dimère des complexes QorNKt(d)

On considère les dimères des deux complexes comme similaires. C'est pour cette raison que la comparaison n'est réalisée qu'avec le dimère de la QorNKd. La comparaison du dimère du complexe QorNKd avec l'ensemble de la PDB met en évidence trois structures homologues. La première est une alcool déshydrogénase de *rhizobium* (code PDB : 4DVJ) (rmsd = 3,48 Å, Q-score = 0,20). La seconde est une ζ -cristalline like quinone oxydoréductase ZTA1 (rmsd = 3,66 Å, Q-score = 0,22), et la dernière est une protéine synaptique humaine (rmsd = 4,58 Å, Q-score = 0,18). Les Q-score sont trop faibles pour pouvoir considérer cette comparaison comme pertinente.

4 Rôles essentiels de l'Arg58 et de la Tyr14

Deux résidus semblent être impliqués dans la fixation d'une molécule inhibitrice : Tyr14 et Arg58. Ils sont localisés sur un monomère différent du monomère de celui où l'inhibiteur se fixe. C'est pourquoi la mutation de ces deux résidus en un acide aminé dont l'encombrement stérique est équivalent puis dont l'encombrement stérique est différent a été réalisée. L'Arg58 a été mutée en Ala58 et en Glu58. Puis la Tyr14 a été mutée en Ala14 et en Phe14. Cependant par manque de temps, seulement un de ces mutants a été purifié : ceQORHR58A.

4.1 Purification du mutant ceQORHR58A

Le comportement de la protéine ceQORHR58A lors de sa purification est similaire à celui de la ceQORH non-mutée bien qu'il existe une différence majeure. En effet, la seconde étape de purification consistant à utiliser la SP Sepharose® (ou S Sepharose®), ne met en évidence qu'un seul pic d'absorbance à 280 nm (non résolu) de la ceQORHR58A. Le chromatogramme de la ceQORH non-mutée présente au moins deux pics d'absorbance à 280 nm (*cf.* p.127). Le mutant aurait alors moins d'affinité pour la molécule induisant un rapport d'absorbance de 260 nm sur 280 nm supérieur à 1 (molécule non-déterminée). En chromatographie d'exclusion moléculaire, les pics d'absorbance à 280 nm à 40 mL et à 120 mL correspondent au volume mort et volume maximale d'élution respectivement. Ce qui met en évidence une possible agrégation ou dégradation de la protéine. Le mutant élue à 83 mL avec un épaulement du pic localisé à 94 mL, un troisième pic à 68 mL est observé sur le chromatogramme. L'analyse sur un gel SDS permet de confirmer la présence de la protéine dans chacun de ces pics. Le mutant existe également sous différentes formes oligomériques : monomère, dimère et tétramère. La forme **dimérique est la forme majoritaire** alors que pour la ceQORH sauvage la forme

majoritaire est la forme monomérique. Le mutant semble être plus stable que la ceQORH non-mutée au cours de la purification.

4.2 Stabilité du mutant ceQORHR58A

Pour étudier la stabilité de la ceQORH par rapport à la ceQORHR58A, des tests de thermofluorescence ont été réalisés sur les deux protéines dans les mêmes conditions. La ceQORH et la ceQORHR58A sont instables dans l'eau avec un T_m de 28°C et de 25°C respectivement. L'ensemble des résultats obtenus pour la ceQORH non-mutée mettent en évidence l'importance de la présence de sel pour la stabilité de la protéine, comme le NaCl, et le pH optimal est situé entre 6 et 7.

4.3 Importance du résidu R58 dans l'activité ou l'inhibition de l'enzyme

Les tests d'activité du mutant, ceQORHR58A, et ceux de la non-mutée ne révèlent aucune différence entre les deux protéines (autant sur l'activité que sur l'inhibition de l'enzyme). Il est probable que l'action d'un des deux résidus (Tyr14 et Arg58) puisse être compensée par l'autre. Ainsi seule la présence d'un des résidus serait nécessaire pour induire la tétramérisation de l'enzyme et donc la deuxième phase de l'inhibition.

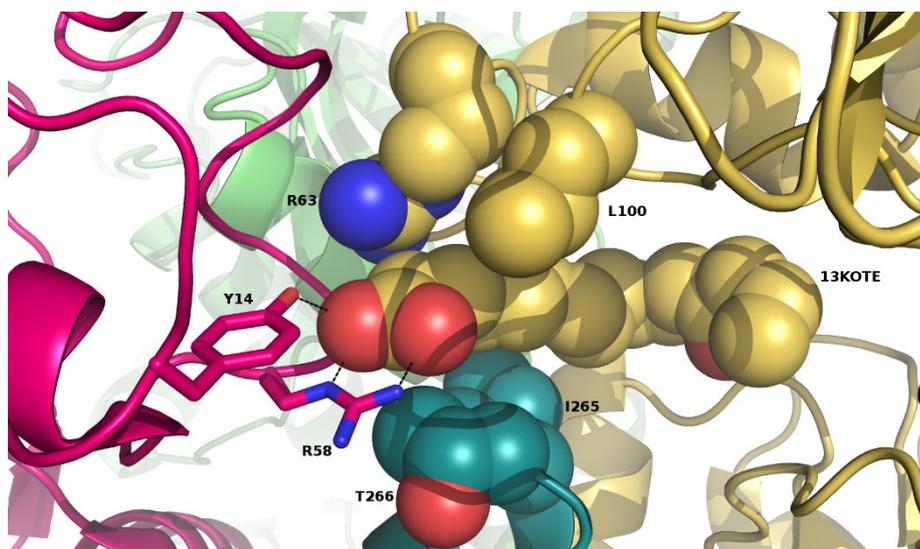


Figure n° 86. Position du 13KOT dans le tétramère.

Le 13KOT est représenté en sphère et les résidus environnants également. Seuls les deux résidus formant une liaison hydrogène avec le 13KOT (Tyr14 et Arg58) sont représentés en bâton.

On peut également supposer que les autres résidus localisés dans l'environnement de la molécule inhibitrice aient également un rôle important (figure n° 86). Par exemple, l'Arg63 est probablement impliquée dans la stabilisation de la molécule inhibitrice. Cependant elle est localisée sur le même monomère que celui auquel appartient l'inhibiteur. Si on considère que l'inhibition est possible sur un monomère, alors l'interaction avec ce résidu semble être primordiale. D'autres résidus par leur présence peuvent stabiliser également le 13KOT comme la Leu100 ou Ile265 ou encore la Thr266. La caractérisation biochimique et des études approfondies des autres mutants réalisés pourraient permettre d'obtenir davantage d'informations. Un double mutant de la ceQORH impliquant l'Arg58 et la Tyr14 serait également une étude intéressante à réaliser qui permettrait de confirmer ou d'infirmer certaines hypothèses sur la seconde phase de l'inhibition impliquant l'oligomérisation de l'enzyme. Une autre mutation intéressante serait celle de l'His99 afin de mesurer son implication autant dans l'activité de l'enzyme que dans l'inhibition.

5 Conclusion sur l'étude de la ceQORH en présence d'inhibiteur

La formation du tétramère pourrait alors être induite par la présence du 13KOT. En effet, l'AUC a montré que la ceQORH est sous la forme d'un tétramère en présence du 13KOT seul mais également en présence du 13KOT et du NADP⁺. De plus, l'analyse des résultats obtenus en AUC montre que cette forme oligomérique existe en solution. L'analyse des structures de la ceQORH cristallisée liée à des ligands tels que le 13KOT et le 13KOD a montré que le site de liaison des ligands est large lorsque le cofacteur se fixe. Cela peut permettre la fixation des molécules de taille moyenne (C>9) telles que la 1,3-bisphényl-2-propénone ou le 4-oxononéal mais aussi des molécules à longue chaîne telles que les 9,12 γ -kétols (C₁₈). Dans le cadre de notre étude cinétique, nous avons constaté que le 13KOT et le 13KOD inhibaient l'enzyme à haute concentration. Le 13KOD et le 13KOT occupent des positions similaires dans les structures analysées. La fonction alcène (C₁₁=C₁₂) située en β du groupement carbonyle pour le 13KOT est partiellement observée dans deux monomères du complexe ceQORH-NADP⁺-13KOT suggérant la flexibilité du 13KOT. La liaison C₁₁=C₁₂ du 13KOT est éloignée de la partie nicotinamide du NADP⁺ empêchant le transfert d'hydrure nécessaire à la réduction. Le positionnement du 13KOT dans le site catalytique pourrait donc expliquer que la ceQORH soit inactive sur ces kétodiènes et kétotriènes. Cette observation suggère fortement que le positionnement du γ -kétol dans le site de liaison de la ceQORH est différent car il doit permettre la réduction de la liaison carbone-carbone C₁₀=C₁₁ située en α du groupement carbonyle. Le

13KOT et le 13KOD sont localisés à proximité du nicotinamide cependant ils affectent également le dimère formé par la ceQORH apo impliquant un déplacement de l'hélice $\alpha 8$ et favorisant la formation de tétramères non-physiologiques.

L'étude du site catalytique de la ceQORH pourrait nous permettre de mieux appréhender l'impact de la fixation des inhibiteurs sur l'enzyme.

Partie V. Etudes préliminaires du site catalytique de la ceQORH

1 Cristallisation de la ceQORH-NADP⁺-substrat

La cristallogénèse de l'enzyme en présence de substrats nous a permis d'obtenir des cristaux. La diffraction des rayons X par ces cristaux a été testée et certains enregistrements de données nous ont permis de constater que l'enzyme se présentait sous la forme libre. D'autres cristaux de la ceQORH cocrystallisée avec le cofacteur NADP⁺ et un substrat ou alors la ceQORH avec le cofacteur NADPH, un inhibiteur et un substrat ont été obtenus dans des conditions de cristallisation différentes des précédentes. Les essais de cristallisation avec certains substrats ont permis d'obtenir des cristaux différents de ceux obtenus pour la forme apo. Cependant ces cristaux ne diffractent pas.

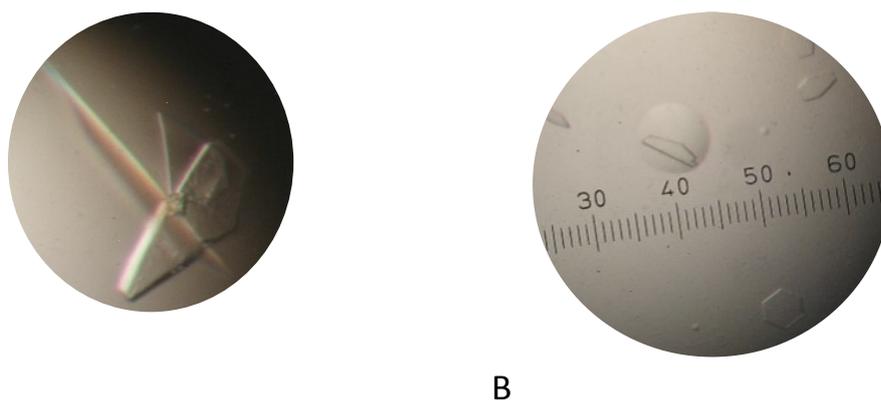


Figure n° 87. Cristaux de la ceQORH avec un des substrats (γ kétole en C18:3).
 Les conditions de cristallisation sont : **A.** 0,1 M de fluorure de potassium, 0,2 M Tris pH 8,5, 23 % PEG 3350 (120 μ m de long) et **B.** 0,1 M d'acétate de sodium, 0,2 M Tris pH 7,5, 34 % PEG 4000 (10 graduations équivalent à 75 μ m).

Malheureusement, par manque de temps, ces conditions n'ont pas pu être optimisées dans le but d'obtenir une meilleure résolution. Une approche théorique de la problématique a donc été abordée. La structure du monomère de l'apo-ceQORH a été résolue mais cette structure ne sera pas celle utilisée pour le docking de molécules substrats ou inhibitrices sur la ceQORH. Comme les études précédentes ont pu le démontrer, la fixation du NADPH joue un rôle primordial dans la monomérisation de la ceQORH (*cf.* p.132) et réorganise les résidus dans la poche de fixation du substrat. Bien qu'aucun changement conformationnel n'ait été déterminé sur l'ensemble de la protéine, il est préférable que la structure utilisée soit celle du monomère de la ceQORH en présence du cofacteur.

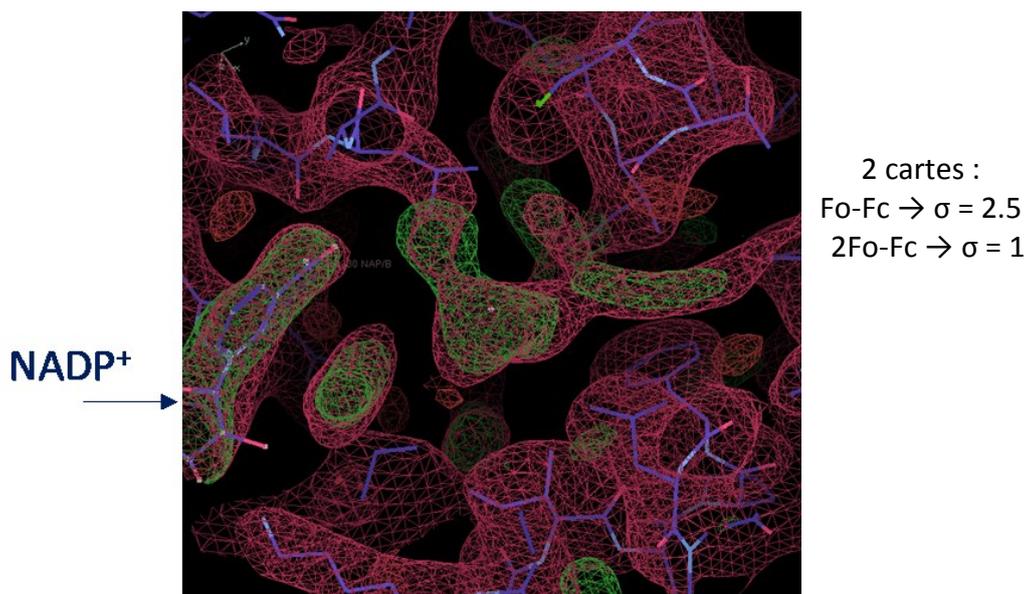


Figure n° 88. Carte de densité électronique pour un cristal composé de NADP⁺ + γ -kétol dérivé de C18:3 + acide gras C18:1.

Un jeu de données a été collecté à une résolution de 3,2 Å. Le groupe d'espace est P2(1). Par manque de temps, le jeu de données n'a pu être traité.

La structure de la ceQORH obtenue en présence d'une molécule inhibitrice et du NADP⁺ a révélé que l'inhibiteur se place à proximité du nicotinamide du cofacteur. La structure chimique des inhibiteurs et des substrats ne diffèrent que par une ou deux fonctions oxygénées (*cf.* p.119). Bien que les résultats préliminaires d'enzymologie (non-montrés) indiquent que le type d'inhibition est probablement non-compétitif, il semble intéressant de tester le docking de ces petites molécules sur la ceQORH en définissant la grille de potentiel sur le site de fixation de l'inhibiteur. Le docking est alors réalisé avec le monomère en présence de NADP⁺ et le tétramère obtenu pour le complexe QorNkt en supprimant la molécule inhibitrice afin d'observer si l'oligomérisation de l'enzyme peut avoir un rôle dans le mécanisme de reconnaissance des substrats bien que nos hypothèses et nos résultats semblent indiquer que la ceQORH est active sous la forme monomérique.

2 Docking des oxylipines de plante sur la ceQORH

2.1 Docking de la chalcone et des carbonyles réactifs appartenant aux oxylipines sur la ceQORH

2.1.1 Docking de la chalcone sur la ceQORH

Le docking de la chalcone sur le monomère de la ceQORH en présence du cofacteur positionne la chalcone à proximité du nicotinamide du NADP⁺ (figure n° 89). Le score est de -4,45, la pose de la chalcone est donc évaluée comme étant une solution plausible. En effet, plus le score est faible et plus il est considéré comme probable. Parmi les résidus placés à moins de 4 Å de la chalcone, se trouvent **la Lys51, l'His99 et la Thr251** (figure n° 90). Certains de ces résidus sont impliqués dans la fixation du cofacteur comme la Lys51 et la Thr251 qui forment des liaisons hydrogène avec le l'hydroxyle du carbone 3' du ribose du nicotinamide. De part sa structure chimique, la chalcone se stabilise essentiellement par des interactions hydrophobes et la fonction cétone ne forme pas de liaisons hydrogène avec la protéine. Excepté dans un cas, où une des poses obtenues permet à la chalcone de réaliser une liaison hydrogène avec la Lys51 (2,90 Å) et réalise un π -stacking avec l'His99 (4,44 Å). Le score de cette pose est de -3,85, elle est donc moins favorable que la précédente.

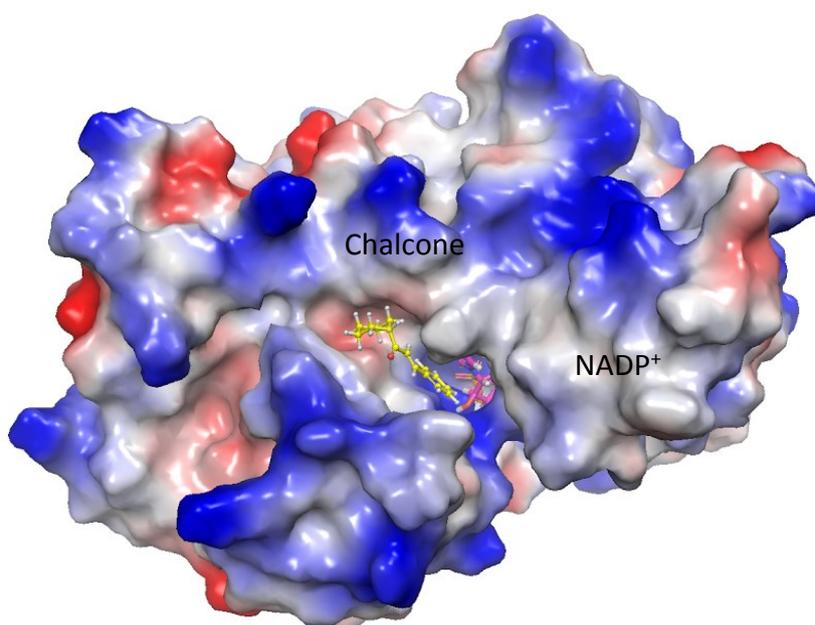


Figure n° 89. Docking de la chalcone sur la ceQORH.

La chalcone est représentée en bâton vert. Le NADPH est représenté en violet. L'hydrogène est en blanc, l'oxygène en rouge et les phosphates sont en orange. La structure de la ceQORH est représentée en ruban, les hélices sont en rouge et les brins sont en bleu.

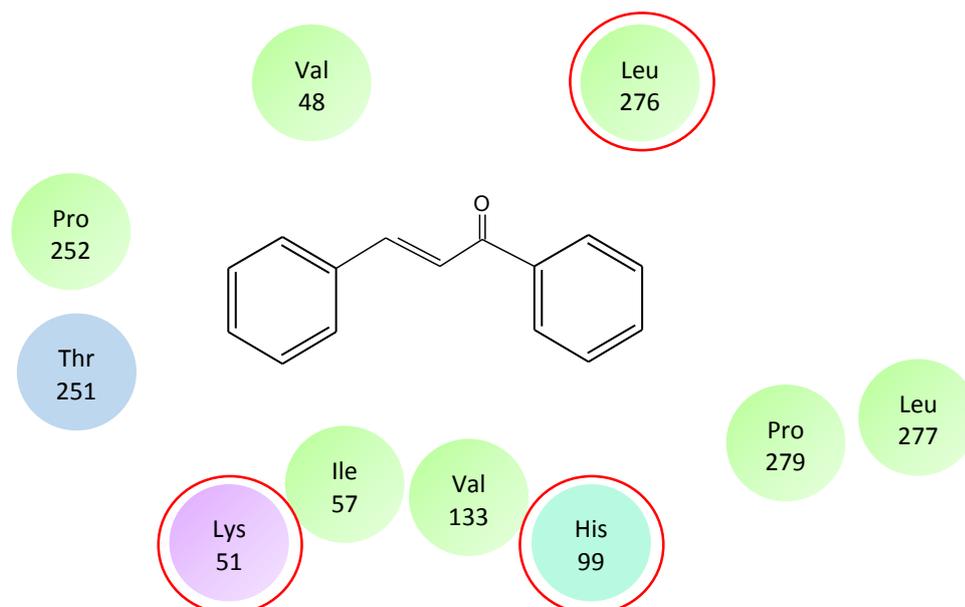


Figure n° 90. Résidus localisés dans le site de fixation de la chalcone.

Les résidus hydrophobes sont représentés par un cercle vert, ceux polaires sont représentés par un cercle bleu et ceux considérés comme non-spécifiques sont en violet. Cette figure s'appuie sur celle obtenue grâce à la suite de programmes de Schrodinger.

Le docking de la chalcone sur le tétramère a permis d'obtenir une pose avec un score de -5,9. La fonction alcène de la chalcone est positionnée également à proximité du nicotinamide. La différence entre les scores des deux docking n'étant pas significative, il est possible que l'enzyme puisse reconnaître la chalcone lorsqu'elle est sous la forme monomérique autant que sous la forme tétramérique. Cependant les substrats cibles de la ceQORH sont les carbonyles réactifs comme par exemple les γ -kétols. C'est pourquoi le docking de ces molécules sur la ceQORH pourra affirmer ou infirmer définitivement la tendance observée.

2.1.2 Docking du γ -kétol dérivé du C18 :1 sur la ceQORH

Sur le monomère, la meilleure pose du γ -kétol dérivé du C18 :1 permet d'obtenir un score de -6,32 (figure n° 91). Ce score est meilleur que celui obtenu pour la chalcone qui était de -4,45. Trois résidus de la ceQORH sont impliqués dans la fixation du γ -kétol en C18 :1 par des liaisons hydrogène : **Lys51**, **His99**, **Leu277** (figure n° 92). Les deux derniers résidus interagissent avec le ligand grâce aux carbonyles de la liaison peptidique. On retrouve les mêmes résidus que précédemment excepté **la Ser98** que l'on retrouve ici. Les positions de l'hydroxyle, du carbonyle et du carboxylate permettent de positionner la molécule de telle façon que la fonction alcène soit placée à une distance trop éloignée du nicotinamide pour produire la réaction souhaitée.

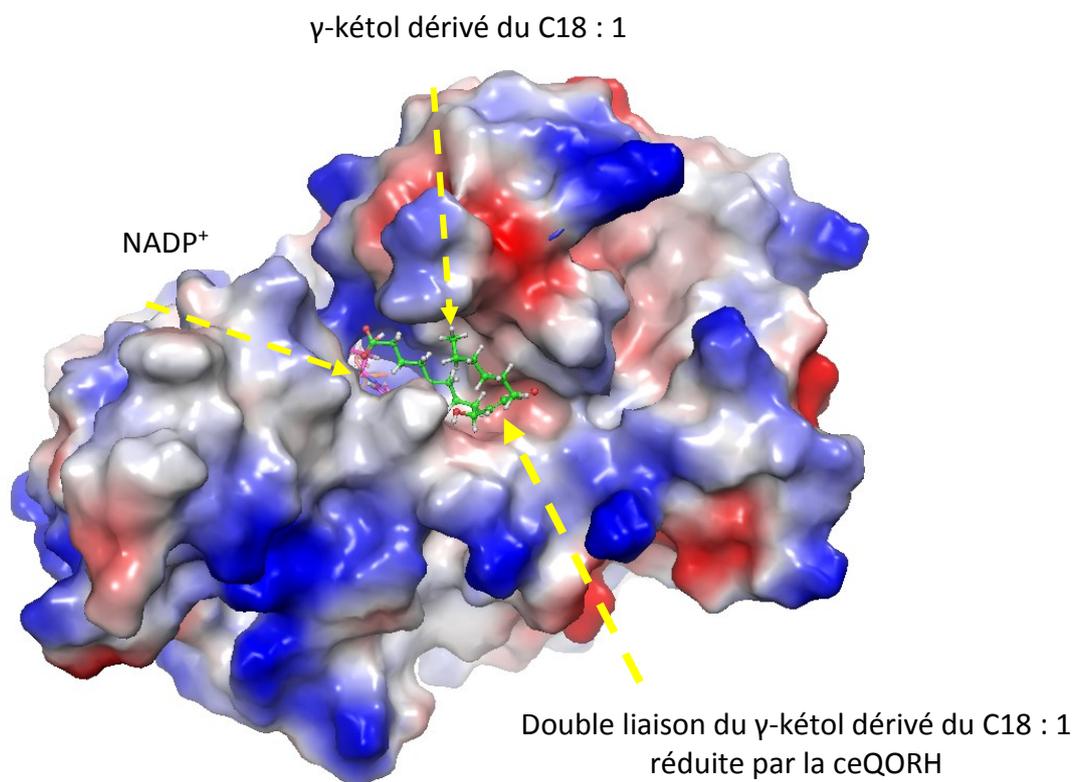
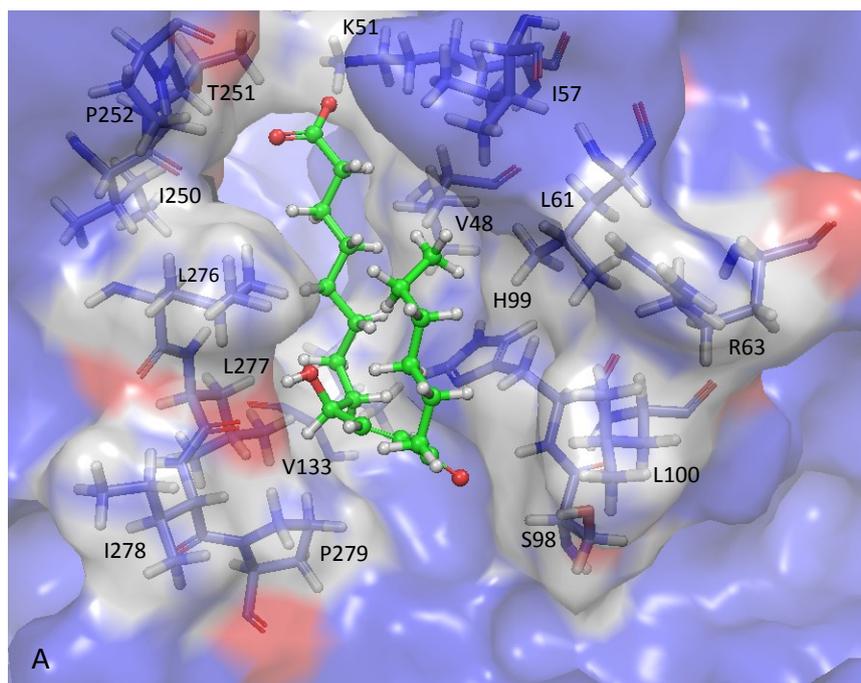


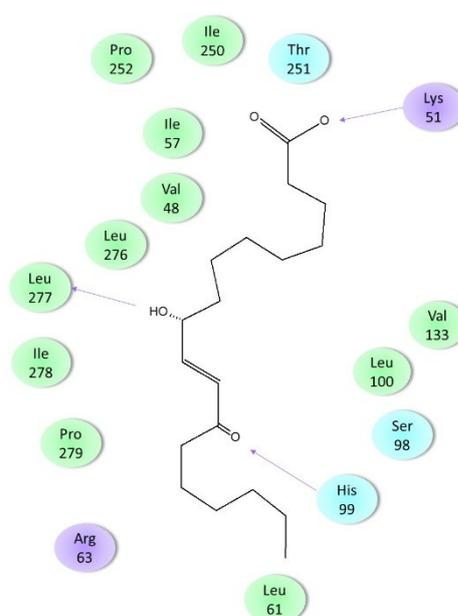
Figure n° 91. Docking du γ-kétol dérivé du C18 :1 sur la ceQORH.

Cette figure présente le docking de la molécule substrat, le γ-kétol dérivé du C18 :1 (en bâton vert) sur la ceQORH présentée en surface en fonction des charges électrostatiques (gris : hydrophobe, bleu : chargé positivement et rouge : chargé négativement). Les carbones du NADP⁺ représenté en bâton sont représentés en violet.

Le résidu Leu277 est un des résidus interagissant avec le nicotinamide. Il permet son orientation pour accueillir les molécules substrats. Il pourrait alors également interagir avec le substrat et une fois la réaction réalisée le nicotinamide change de conformation afin de relarguer le substrat et le cofacteur. Bien que le score soit intéressant, la molécule n'est pas orientée correctement pour que la fonction alcène puisse être théoriquement réduite par le cofacteur. En observant, sa position et ses interactions, le carbonyle du γ-kétol dérivé du C18 :1 réalise une liaison hydrogène avec le carbonyle du squelette carbonné de la Lys51 à la place du carboxylate du ligand. La fonction la plus favorable pour cette liaison hydrogène est le carbonyle car l'encombrement stérique entre le C₁₂ et C₁₈ est plus faible à placer dans la cavité de la ceQORH que celui entre le C₉ et C₁₈.



A



B

Figure n° 92. Résidus impliqués dans la fixation du γ -kétol dérivé du C18 :1.

A. Le ligand, le γ -kétol dérivé du C18 :1 est représenté en bâton vert. Les oxygènes sont en rouge, les hydrogènes sont en blanc et les azotes sont en bleu foncé. La protéine est représentée en surface. Les résidus environnants sont représentés par des carbones violets. Cette figure présente les résidus présents dans l'environnement du ligand jusqu'à 4 Å. **B.** Les résidus hydrophobes sont en vert, les résidus polaires sont en bleu et les non-spécifiques sont en violet d'après le programme de Schrodinger. Les liaisons hydrogènes sont représentées par des flèches violettes.

Le docking du γ -kétol dérivé du C18 :1 sur le tétramère propose différentes poses. Les scores des poses vont de -10,99 à -7,10. Les scores sont plus bas que ceux obtenus pour le monomère ce qui met en évidence que ces solutions sont vraisemblablement plus affines. Le carboxylate de la molécule est stabilisé par deux liaisons hydrogène : une avec le groupement guanidinium de l'Arg58 (A) et la seconde avec la Tyr13 (A), ces liaisons hydrogène impliquent les chaînes latérales de ces deux résidus localisés sur un autre monomère que celui où est localisé le cofacteur. Puis une troisième liaison hydrogène stabilise la molécule entre l'hydroxyle du C₉ du γ -kétol dérivé du C18 :1 et le carbonyle de la liaison peptidique de l'Ile265 (C). L'analyse des résultats suggère que la fixation des molécules substrats de la ceQORH est plus probable lorsqu'elle est sous forme tétramérique car les scores sont plus intéressants. Pour le γ -kétol dérivé du C18 :1, le score est de -10,99 sur le tétramère contre -6,32 avec le monomère.

2.1.3 Docking du γ -kétol dérivé du C18 :2 sur la ceQORH

Le résultat du docking de la molécule γ -kétol dérivé du C18 :2 donne des résultats similaires à ceux obtenus pour le γ -kétol dérivé du C18 :1. Le score est de -5,83 et elle réalise principalement trois liaisons hydrogène avec les mêmes résidus que précédemment (Lys51, His99 et Leu277) et dans la même orientation que précédemment.

Le docking sur le tétramère présente des poses avec des scores compris entre -9,65 et -6,20. Dans ce cas, le ligand réalise trois liaisons hydrogène avec les deux seuls résidus Arg58 (2) et Tyr14 (1).

2.2 Docking des molécules inhibitrices sur la ceQORH

2.2.1 Le docking de l'acide gras C18 :2 sur la ceQORH

Le C18 :2 se fixe au monomère par trois liaisons hydrogène. Les résidus à proximité du ligand sont : Met56, Pro252, Leu277, Pro279, Val133, Asn46, Val48, Leu276, His99, Leu61, Ile57, Ile52, Lys51, Thr251. La Lys51 réalise alors deux liaisons hydrogène avec le carboxylate du C18 :2. Le score est de -5,10.

Trois liaisons hydrogène stabilisent également le ligand dans le cas du docking sur le tétramère. Elles se forment entre le carboxylate de la molécule et la Tyr14 (A), l'Arg58 (A) et l'Arg63 (D). Les résidus hydrophobes dans l'environnement du ligand sont Pro59 (A), Phe60(D), Trp258 (B), Met257 (D), Pro254 (D), Pro252 (D), Ile57 (D), Leu276 (D), Ile265 (C), Leu61 (D), Leu100 (D). La cavité est donc de nature hydrophobe comme cela a pu être énoncé

précédemment. Un résidu polaire de la chaîne C se place également à moins de 4 Å du ligand, c'est la Thr266 (C). Et la Gly253 (D) est également dans le même environnement. Le score est de -9,66, c'est une solution fortement probable.

Les scores de ce docking sont de -5,10 sur le monomère et de -9,66 pour le docking sur le tétramère. La différence entre les résidus environnants entre les deux docking met en évidence que les résidus potentiellement impliqués sont différents en fonction de l'oligomérisation de l'enzyme.

2.2.2 Le docking du 13KOT sur la ceQORH

Le 13KOT accosté sur le tétramère donne un score de -6,55 alors que celui sur le monomère est de -5,85. Le docking sur le tétramère est donc plus favorable pour le 13KOT bien que la différence ne soit pas relevante. Le carbonyle placé sur le C₁₃ forme une liaison hydrogène avec la Lys51 et le carboxylate forme une liaison hydrogène avec l'His99. Pour l'une des poses obtenues sur le monomère, le ligand est stabilisé par une liaison hydrogène avec la Ser98 et une autre avec l'His99. Cette orientation ne permet d'obtenir qu'un score de -3,31. Au-dessus de -4, les poses sont peu probables car elles seraient moins affines.

3 Conclusion sur les études préliminaires du site catalytique de la ceQORH

Les poses des molécules inhibitrices obtiennent de meilleurs scores que celles des molécules substrats. Bien que l'enzyme soit monomérique et active en présence de NADP(H), il n'est pas anormale d'obtenir de meilleurs scores avec le tétramère car le carboxylate de la molécule de structure similaire à celle du 13KOT ou du 13KOD peut être stabilisée par le groupement guanidinium de l'Arg58. Ces résultats proviennent d'études *in silico* et doivent être confrontées à ceux obtenus en solution.

La principale faiblesse du docking est de ne pas considérer les mouvements inhérents aux protéines. GLIDE, qui est le programme utilisé, réalise une dynamique des acides aminés sans pouvoir atteindre ce qu'elle pourrait être en réalité. De plus, les molécules d'eau placées initialement dans le modèle sont supprimées lors de la préparation de la protéine avant le processus de docking. Or il n'est pas rare d'observer qu'une molécule d'eau puisse avoir un rôle structural entre le substrat et un cofacteur. Dans certains cas, certaines fonctions de scoring surévaluent les interactions possibles. En effet, une molécule possédant de nombreux groupements réactionnels est capable d'obtenir un score considéré comme correct alors qu'elle

ne serait pas intrinsèquement affine. L'ensemble de ces points rappellent qu'il est important d'associer les techniques théoriques aux techniques empiriques.

Une autre critique sur ces calculs concerne l'utilisation du cofacteur oxydé au lieu du cofacteur réduit. La structure cristallographique a été obtenue probablement avec le cofacteur oxydé, c'est pourquoi il a été conservé. Mais il n'est pas impossible que les chaînes latérales de certains résidus soient orientées différemment. Ainsi l'orientation des chaînes latérales des résidus fixant le NADP⁺ favoriseraient le départ du cofacteur oxydé une fois la réaction accomplie. Un impact sur les résidus du site de reconnaissance du substrat pourrait se répercuter. Dans certains cas, le départ du cofacteur se fait par un changement de configuration entre la forme réduite et oxydée ce qui l'expulse du domaine de Rossmann (figure n° 93). Pour la ceQORH, la structure en présence que du NADPH reste encore à déterminer mais nous pouvons avoir la certitude que le mécanisme est différent de celui exposé précédemment. En effet, la configuration de la forme oxydée place le nicotinamide en face du site de fixation du substrat entouré de deux résidus principaux la Lys51 et la Thr251 limitant les possibilités. Ainsi le NADPH doit se positionner de la même manière afin de pouvoir réaliser la réaction enzymatique.

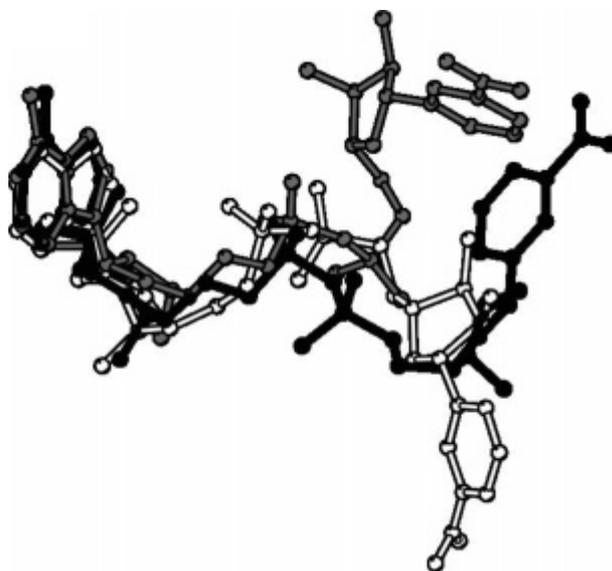


Figure n° 93. Conformation du NADPH.

Cette figure est extrait de la publication d'[Ambrosio et al., 2007](#). Elle présente les configurations adoptées par le cofacteur en fonction qu'il soit oxydé ou réduit.

ceQORH-CaM

Partie I. Présentation de la calmoduline

Ce chapitre traitera de l'interaction de la calmoduline avec la ceQORH. Après une brève introduction sur la calmoduline, les résultats préliminaires puis les résultats obtenus seront présentés.

1 Généralités sur la calmoduline

La CalModuline (CaM) appelée ainsi pour CALcium MODULated proteIN est une protéine qui a été découverte en 1970 (Cheung, 1970 ; Kakiuchi et Yamazaki, 1970). Chez *Arabidopsis thaliana*, neuf gènes codant pour différentes CaM ont été identifiés. Les sept premiers codent pour quatre isoformes (*CaM1/4-CaM2/3/5-CaM6-CaM7*) contenant 149 acides aminés alors que les deux derniers *CaM8* et *CaM9* codent pour des protéines de 151 acides aminés (Reddy *et al.*, 2002 ; McCormack *et al.*, 2005). L'identité de séquences entre chacune des formes est supérieure à 97 % ce qui représente au maximum cinq résidus différents. Contrairement au règne végétal, dans le règne animal, il n'existe qu'une seule isoforme de CaM.

2 Localisation de la calmoduline

La CaM est une protéine ubiquitaire. Elle est localisée dans différents compartiments cellulaires telles que la vacuole (Yamaguchi *et al.*, 2005), la mitochondrie (Chigri *et al.*, 2012) et peut être associée à la membrane cellulaire (Rodriguez-Concepción *et al.*, 1999, 2000). La CaM est présente également dans le chloroplaste (Jarret *et al.*, 1982).

En utilisant des programmes de prédictions servant à définir la localisation des CaM, quatre d'entre elles seraient potentiellement localisées à l'intérieur du chloroplaste (Chigri *et al.*, 2006). C'est pour cela que chez la plante, un peptide de transit peut être présent à l'extrémité *N*-terminale de la CaM afin qu'elle soit importée dans l'organite (*cf.* p.31). En utilisant Clustal W, il a été mis en évidence que certaines CaM possèdent un peptide de transit proche des peptides signaux de protéines de la levure et de l'homme (Chigri *et al.*, 2005). Cela soulève donc de nombreuses questions sur l'utilité de ce peptide de transit qui est normalement une séquence spécifique à l'adressage au chloroplaste.

3 Calmoduline : un senseur de calcium

3.1 Localisation et concentration en calcium

Dans les cellules végétales, la concentration en Ca^{2+} libre est estimée : à 200 nM dans la mitochondrie (Logan et Knight, 2003), entre 150 nM et 2 μM dans le peroxyosome (Drago *et al.*, 2008 ; Lasorsa *et al.*, 2008) et à 100 nM dans le noyau et dans le cytosol (Van der luit *et al.*, 1999). Dans le chloroplaste, la concentration en calcium libre est de 150 nM alors que la concentration totale est de 15 mM (pour revue Hochmal *et al.*, 2015).

3.2 Rôles essentiels du calcium

Le calcium sous forme ionique, Ca^{2+} , est un messenger impliqué dans la signalisation cellulaire. Le calcium peut être un messenger primaire dans le cas où il agit sur les canaux ioniques, et il peut également être un messenger secondaire en agissant sur d'autres molécules (Clapham *et al.*, 2007). Chez les végétaux, cet élément peut être retrouvé sous forme de cristaux CaCO_3 . Dans ce cas, il intervient dans la rigidification des parois des cellules végétales. Dans de nombreux cas, le calcium a une action sur la régulation allostérique de certaines enzymes. Parmi les protéines calcium dépendantes, on retrouve : la calmoduline, les protéines calmoduline-like, les protéines kinases, les protéines calcineurine B-like et les kinases calcineurine B-like. La plante possède de nombreuses CaM-like (McCormack *et al.*, 2005). Par exemple, *Arabidopsis thaliana* possède 50 gènes codant pour des protéines CaM-like.

3.3 Affinité entre le calcium et la calmoduline

La calmoduline est un senseur de calcium (Meador *et al.*, 1992, 1993). Elle fixe coopérativement quatre ions Ca^{2+} de manière séquentielle. Les constantes de dissociation des différents sites sont comprises entre 10^{-12} M et 10^{-6} M (Crouch et Klee, 1980 ; Andersson *et al.*, 1983 ; Chin et Means, 2000).

4 Activité de la calmoduline

4.1 Activité calcium dépendante de la calmoduline

La CaM est une protéine ne possédant pas d'activité intrinsèque. C'est une protéine régulatrice de nombreuses activités au sein d'une cellule, notamment grâce au fait qu'elle soit senseur de calcium. La CaM présente dans les cellules eucaryotes participe aux processus de signalisation cellulaire, à la régulation des activités enzymatiques, aux activités des canaux ioniques, aux transmissions synaptiques, à la plasticité, et à la régulation de l'expression des

gènes chez les eucaryotes (Xia *et al.*, 1998 ; Deisseroth *et al.*, 1998 ; Zuhlke *et al.*, 1999 ; Drum *et al.*, 2002 ; Halling *et al.*, 2005 ; Wayman *et al.*, 2008 ; Dick *et al.*, 2008).

Dans le règne végétal, elle est impliquée dans de nombreuses réponses physiologiques telles que la croissance, le phototropisme. La CaM est également impliquée dans la régulation de l'activité photosynthétique (Jarret *et al.*, 1982 ; Perochon *et al.*, 2011).

4.2 Activité calcium dépendante de la calmoduline en cas de stress

La CaM participe à la réponse aux stress environnementaux et à la défense de la plante contre les stress biotiques. En effet, la concentration en calcium augmente à la suite de stress tels que l'excès de lumière, la sécheresse, la température, la présence de molécules sécrétées par les pathogènes ou la présence de phytohormones (Albert *et al.*, 2010). Le calcium, impliqué dans la signalisation en cas de stress, aurait un effet sur l'affinité entre le peptide de transit et les récepteurs du complexe TOC (par exemple, le peptide de transit de la CaM). Le calcium favoriserait la translocation de certaines protéines dans le plaste (*cf.* p.34) (Chigri *et al.*, 2005). A la suite d'un choc thermique la concentration en CaM augmente également et joue un rôle dans l'expression des HSP. Cela met en évidence l'implication de la CaM dans la réponse au stress. Cela a été démontré, par exemple, chez le maïs (Gong *et al.*, 1997). De plus, il a été mis en évidence que la CaM interagit avec certains récepteurs du complexe TIC (*cf.* p.33 et Annexe n° 1). L'augmentation de l'affinité du peptide de transit pour le récepteur grâce à l'augmentation de la concentration en calcium et la production accrue de la CaM entraîne une régulation de l'import des protéines dans le chloroplaste au niveau des complexes TOC et TIC lors d'un stress (Kovacs-bogdan *et al.*, 2010a).

4.3 Activité calcium indépendante

Bien que cela soit plus rare, la CaM peut interagir avec d'autres protéines et être active sans la présence de calcium. C'est le cas de l'interaction entre la CaM et une protéine de l'enveloppe du chloroplaste ayant un poids moléculaire de 33 kDa qui n'a pas encore été identifiée (Roberts *et al.*, 1983 ; Wylie et Vanaman, 1998).

5 Description structurale des calmodulines

5.1 Motif de la main-EF

L'une des premières structures de CaM a été obtenue en 1985 (Babu *et al.*, 1985). La CaM est composée de quatre motifs de la main-EF (« EF-hand ») liant chacun un ion Ca^{2+} . Un motif de la main-EF est une structure composée de la succession de structures secondaires de la manière suivante : « hélice-boucle-hélice » et qui fixe un ion Ca^{2+} (figure n° 94). Ce motif est composé en moyenne de 29 résidus (Rigden *et al.*, 2011). Les séquences de chacun des domaines terminaux de la CaM ont une identité de séquences s'élevant à 46 %. Les motifs de la main-EF sont riches en résidus hydrophobes comme la phénylalanine et la méthionine ce qui permet à la CaM d'interagir avec d'autres protéines (Wilson *et al.*, 2000).

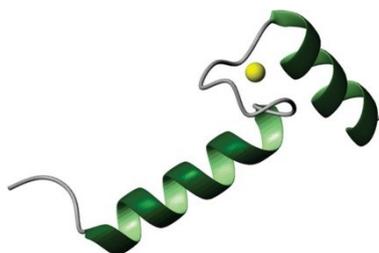


Figure n° 94. Motif de la main EF.

Un seul motif de la main EF du domaine *N*-terminal de la CaM. Il est composé de neuf résidus pour la première hélice puis neuf résidus pour la boucle et onze résidus pour l'hélice sortante (code PDB : 1EXR) (pour revue Gifford *et al.*, 2007).

5.2 Changement de conformation de la calmoduline

La CaM possède deux sites de fixation du calcium localisés sur son domaine *N*-terminal et deux autres sur son domaine *C*-terminal. Les deux domaines sont reliés par une hélice (Ikura *et al.*, 1992 ; Barbato *et al.*, 1992 ; Van der spoel *et al.*, 1996). La CaM a la particularité d'opérer un changement de conformation important à la suite de la fixation d'ions Ca^{2+} (Wriggers *et al.*, 1998 ; Kawasaki *et al.*, 1998) (figure n° 95). La CaM passe d'une conformation fermée à une conformation ouverte. Ce changement de conformation révèle une surface hydrophobe qui permet l'interaction avec les protéines cibles (Hoeflich et Ikura, 2002 ; Kranz *et al.*, 2002 ; Schumacher *et al.*, 2004).

Grâce à la flexibilité de l'hélice de connexion, la CaM peut adopter différentes conformations (Fallon et Quioco, 2003 ; Van Petegem *et al.*, 2005 ; Mori *et al.*, 2008). L'ensemble de ces caractéristiques permettent à la CaM d'interagir avec de nombreuses protéines en adoptant une conformation adaptée à la reconnaissance de chacune d'entre elles (Halling *et al.*, 2005 ; Ishida et Vogel, 2006) (figure n° 95 et 96). Il est à noter que les interactions indépendantes du calcium ont tendance à engendrer une structure semi-ouverte de la CaM (Urbauer *et al.*, 1995 ; Swindells et Ikura, 1996 ; Chagot et Chazin, 2011).

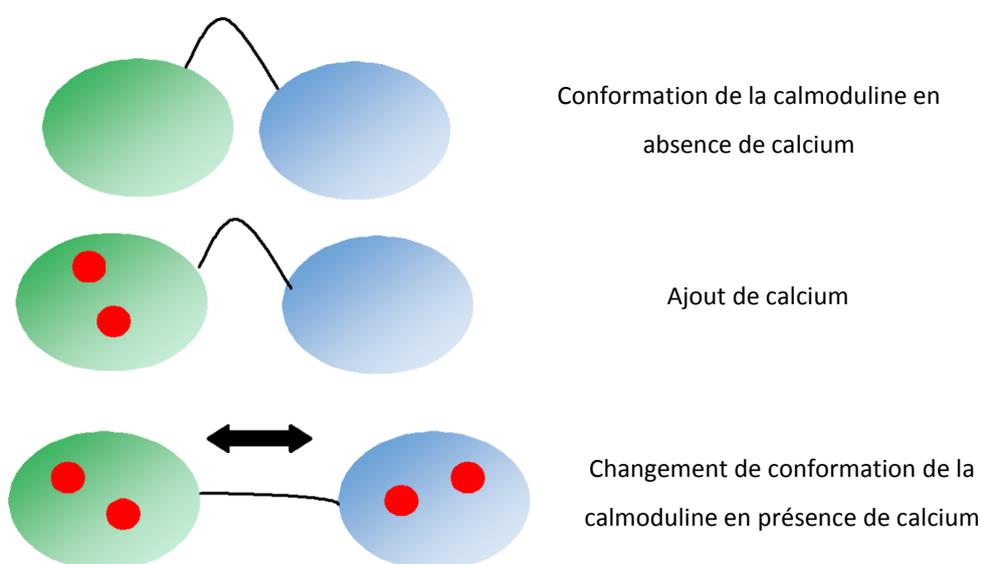


Figure n° 95. Changement de conformation de la CaM.

La figure présente de manière schématique le changement de conformation de la CaM à la suite de la fixation des quatre ions Ca^{2+} sur les motifs de la main-EF. Les sphères représentent un domaine et entre les deux domaines, le trait noir représente l'hélice permettant la connexion entre les deux domaines.

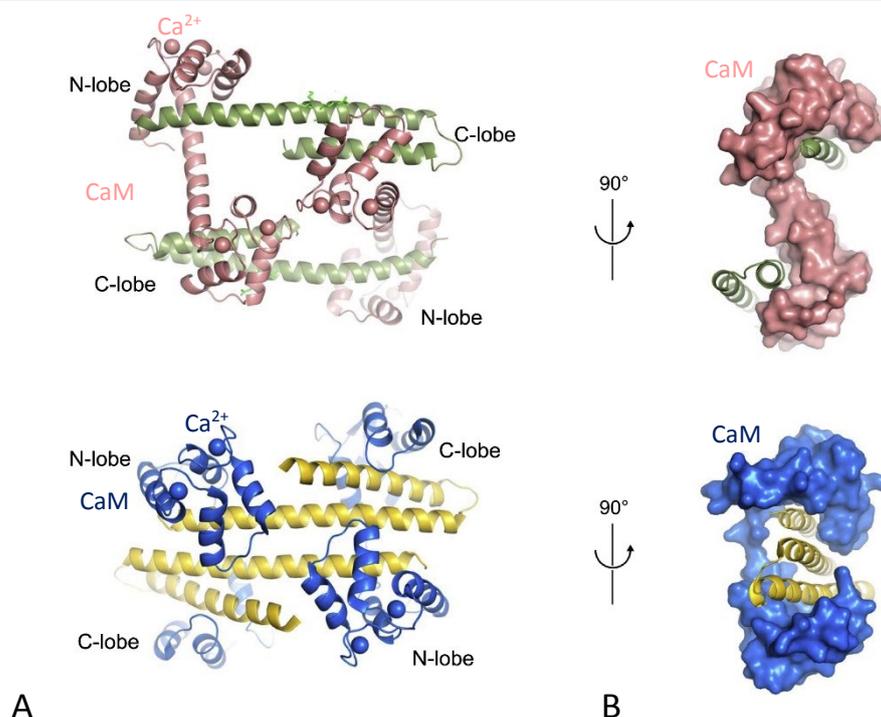


Figure n° 96. Conformation S ou C de la CaM.

Les figures représentent l'interaction de deux calmodulines (en rose et en bleu) avec deux peptides (en vert et en jaune). **A.** Les motifs de la main-EF sont localisés au niveau des « C-lobes » et des « N-lobes ». Les ions Ca^{2+} sont représentés par des sphères roses ou bleues. **B.** Les structures représentées en surface après une rotation de 90° montrent une conformation sous la forme de « S » ou de « C » (Zhang *et al.*, 2012).

Lors de la formation d'un complexe avec une autre protéine, l'affinité de la CaM pour les ions Ca^{2+} augmente (Peersen *et al.*, 1997). En 2012, l'équipe de Zhang met en évidence l'implication de certains résidus du polypeptide cible sur lequel se fixe la CaM dans la modification de l'affinité de la CaM pour le calcium et également dans la modification de la conformation de la CaM (Zhang *et al.*, 2012).

6 Interaction entre la calmoduline et ses partenaires protéiques

En interagissant avec ces différents partenaires, la CaM est impliquée dans des processus tels que :

- la phosphorylation et déphosphorylation (NADK2)
- la régulation de la transcription (protéines nucléaires PCBP)
- l'action sur le métabolisme (catalase)
- l'activation du transport (récepteur à la ryanodine)

6.1 Les sites de fixation de la calmoduline

Il est possible de prédire un site de fixation de la CaM sur une protéine. Les algorithmes du site **Calmoduline Target Database (CTD)** permettent de prédire, grâce à la séquence primaire d'une protéine, si cette dernière interagira avec la CaM. Lorsque c'est le cas, l'algorithme attribue un score à chaque acide aminé de la protéine cible (Yap *et al.*, 2000).

La CaM reconnaît une hélice amphipatique ayant une charge nette positive et contenant de nombreux résidus hydrophobes (Rhoads et Friedberg, 1997). Selon que l'interaction soit calcium dépendante ou non, les acides aminés reconnus seront différents. Pour les interactions indépendantes du calcium, ce sont les acides aminés en position 1, 2, 5, 6, 11 et 14 qui sont impliqués dans le mécanisme de reconnaissance (pour un motif défini). Pour les interactions calcium-dépendantes, seuls, le premier et le dernier résidu du motif sont impliqués. Ces deux résidus doivent être hydrophobes (Phe, Ile, Leu, Val, Trp) (Mruk *et al.*, 2014).

6.2 Exemple 1 : interaction ceQORH-calmoduline

La ceQORH est une protéine localisée au niveau de la membrane interne du chloroplaste. Selon des études préliminaires réalisées par nos collaborateurs (résultats non publiés), la ceQORH se lierait à la CaM1. L'interaction est calcium dépendante. L'affinité entre les deux protéines est de 12 nM (figure n° 97).

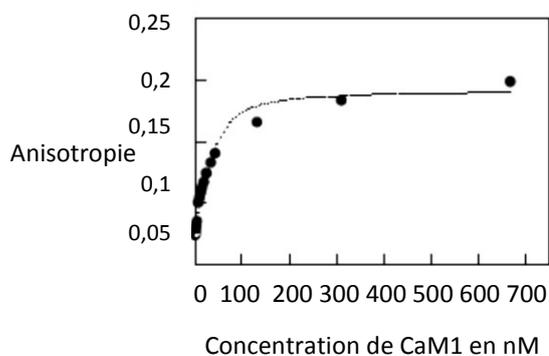


Figure n° 97. Affinité CaM1-ceQORH.

Courbe représentant le signal d'anisotropie en fonction de la concentration en CaM1 en nM (Thèse d'Elisa DELL'AGLIO). Le k_d est de 12 ± 4 nM.

Par la suite, nos collaborateurs (Lucas Moyet et Daniel Salvi) ont réalisé des mutants de la ceQORH (M267G, K269A, K270A) au niveau du motif de fixation de la CaM localisé sur la ceQORH. Les expériences d'anisotropie de fluorescence ont montré que la ceQORH mutée et la ceQORH sauvage ont une activité similaire. Ces mutations ne semblent pas empêcher l'interaction entre la ceQORH et la CaM de se faire.

6.3 Exemple 2 : interaction IEP32-calmoduline

IEP32 est une protéine de la membrane interne de l'enveloppe du chloroplaste. C'est une déshydrogénase NADPH dépendante impliquée dans la régulation de l'import des protéines dans le plaste. Aucun site de fixation de la CaM sur IEP32 n'est prédit. Pourtant l'interaction entre IEP32 et la CaM a été mise en évidence par spectrométrie de masse. L'interaction est calcium dépendante (Chigri *et al.*, 2006).

Le site de fixation reconnu par la CaM sur IEP32 est localisé entre les résidus Asp298 et Asp314 (figure n° 98). L'association de la CaM avec IEP32 serait impliquée dans la transmission du signal sur le statut redox du chloroplaste (*cf.* Annexe n° 1). Bien qu'il existe une interaction entre la CaM et IEP32, cette interaction n'a pas été étudiée plus en détails au cours de ma thèse.

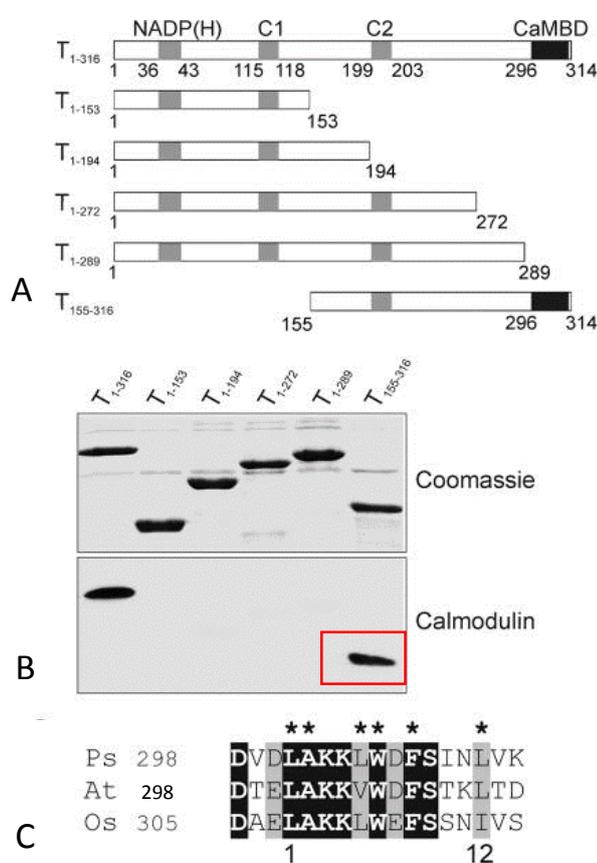


Figure n° 98. Identification de la séquence d'IEP32 ciblée par la CaM.

A. Cette figure montre les différentes constructions d'IEP32 (tronquées) utilisées. Les sites de fixation du NADP(H) ainsi que les deux zones du site actif (C1 et C2) sont en gris et le site de fixation de la CaM est en noir. **B.** Le premier gel est un gel de référence. Le second présente les résultats obtenus avec les différentes constructions d'IEP32. L'expérience consistait à utiliser une calmoduline biotinyllée afin de déterminer les constructions d'IEP32 interagissant avec la CaM. **C.** Alignement des séquences d'IEP32, du pois (Ps), d'*Arabidopsis thaliana* (At) et d'*Oryza sativa* (Os). Les résidus identiques sont en noir, et les résidus conservés sont en gris. Les résidus hydrophobes conservés sont indiqués par un astérisque. Le motif de fixation de la CaM comprend les résidus de 1 à 12 présenté dans la figure (Chigri *et al.*, 2006).

Partie II. Etude de l'interaction entre la ceQORH et la calmoduline

Une partie de l'étude sur la ceQORH porte sur son interaction avec la calmoduline (CaM). Cette interaction a été mise en évidence par les Dr Daniel SALVI et Dr Norbert ROLLAND au cours d'un contrôle dans une manipulation TapTag visant à identifier les partenaires de la ceQORH. Par la suite, cette interaction a été vérifiée par la technique d'overlay (interaction entre deux protéines) puis quantifiée par anisotropie de fluorescence. Des résultats préliminaires obtenus par le Dr Elisa DELL'AGLIO au cours de sa thèse, ont montré que la mutation de certains résidus de l'hélice de la ceQORH prédite pour interagir avec la CaM n'affecte pas l'affinité de la ceQORH pour la CaM (Dell'aglio *et al.*, 2013). L'interaction entre ces deux protéines mérite donc d'être davantage étudiée.

1 Prédictions des sites de fixation de la CaM sur la ceQORH

1.1 Premier site de prédiction de fixation de la CaM

A l'aide du programme Calmodulin Target Database, des sites de fixation de la calmoduline sur la ceQORH ont été identifiés. Dans le cas présent, la CaM se fixerait sur un premier site allant du résidu Ala256 jusqu'au résidu Leu277 (figure n° 99). Le score est de neuf pour la majorité de ces résidus. La valeur obtenue correspond au score le plus élevé possible et signifie que la probabilité que ces résidus soient impliqués dans l'interaction avec la CaM est forte. Ces résidus (Ala256-Leu277) sont localisés pour la majorité sur l'hélice $\alpha 8$ (Pro254-Thr266) de la ceQORH, celle impliquée dans la dimérisation de l'enzyme sous la forme apo (figure n° 100). Les autres résidus sont localisés sur le brin $\beta 13$ (Gln271-Leu275) et sont moins accessibles que les résidus de l'hélice $\alpha 8$.

1.2 Second site de prédiction de fixation de la CaM

Un second site sur la ceQORH serait potentiellement un site de fixation de la CaM avec un score de trois pour ces résidus (Lys177-Val195) (figure n° 100). La première partie des résidus (Lys177-Leu178) est localisée à l'extrémité C-terminale de l'hélice $\alpha 4$ puis une seconde partie (His182-Cys187) est localisée sur le brin $\beta 9$ et les derniers résidus (Ala189-Val195) sont localisés sur l'hélice $\alpha 5$. Il semble difficile à concevoir qu'il puisse avoir une interaction avec

l'ensemble de ces résidus. En effet, cette interaction impliquerait de nombreuses structures secondaires et certains résidus sont inaccessibles, notamment ceux localisés sur le brin $\beta 9$ (figure n° 100).

...1	MAGKLMHALQ	YNSYGGGAAG	LEHVQVPVPT	PKSNEVCLKL	EATSLNPVDW
.....	0000000000	0000000000	0000000000	0000000000	0000000000
...51	KIQKGMIRPF	LPRKFPCIPA	TDVAGEVVEV	GSGVKNFKAG	DKVVAVLSHL
.....	0000000000	0000000000	0000000000	0000000000	0000000000
..101	GGGGLAEFAV	ATEKLTVKRP	QEVGAAEAAA	LPVAGLTALQ	ALTNPAGLKL
.....	0000000000	0000000000	0000000000	0000000000	0000000000
..151	DGTGKKANIL	VTAASGGVGH	YAVQLAKLAN	AHVTATCGAR	NIEFVKSLGA
.....	0000000000	0000000000	0000003333	3333333333	3333330000
..201	DEVLDYKTPE	GAALKSPSGK	KYDAVVHCAN	GIPFSVFEPN	LSENGKVIDI
.....	0000000000	0000000000	0000000000	0000000000	0000000000
..251	TPGPNAMWTY	AVKKITMSKK	QLVPLLLIPK	AENLEFMVNL	VKEGKVKTVI
.....	0000036999	9999999999	9999963000	0000000000	0000000000
..301	DSKHPLSKAE	DAWAKSIDGH	ATGKIIVEP		
.....	0000000000	0000000000	0000000000		

Figure n° 99. Prédiction de la séquence favorisant de la fixation de la CaM sur la ceQORH.

La figure présente la prédiction des sites de fixation de la CaM sur la ceQORH. La séquence protéique est celle de la ceQORH. La valeur du score est comprise entre 0 et 9. Plus le score est élevé et plus le site réunit les critères pour être un site de fixation de la CaM sur la séquence de la protéine cible.

Il existerait donc **potentiellement deux sites de fixation de la CaM sur la ceQORH très éloignés** l'un de l'autre. Le site de fixation **le plus probable est constitué de résidus localisés majoritairement sur l'hélice $\alpha 8$** et partiellement sur le brin $\beta 13$ (figure n° 100).

L'existence de deux sites de fixation sur la ceQORH soulève quelques interrogations sur la stœchiométrie du complexe. Le complexe ceQORH-CaM a ensuite été étudié en solution afin de déterminer la stœchiométrie du complexe.

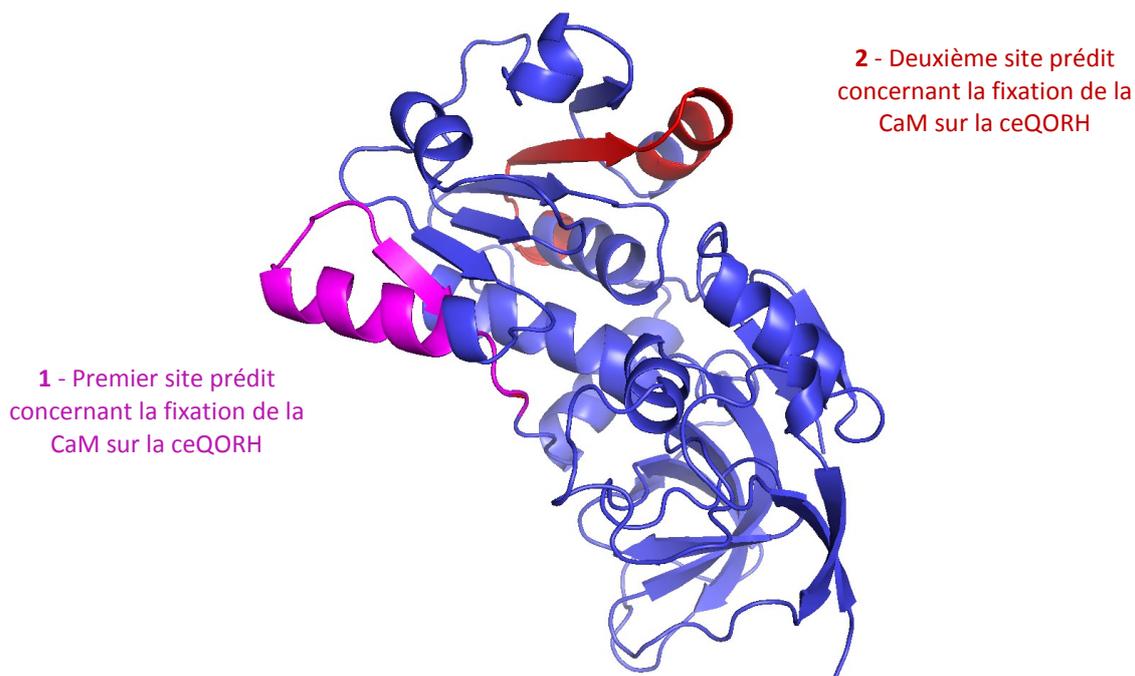


Figure n° 100. Sites de fixation de la CaM sur la structure de la ceQORH.

Le monomère de la ceQORH de la forme apo est représenté en rubans bleus. Deux sites de fixation de la CaM sur la ceQORH sont mis en évidence. **1** - Le premier site prédit concernant la fixation de la CaM sur la ceQORH comprenant les résidus entre l'Ala256 jusqu'à la Leu277 est en magenta. **2** - Le second site prédit concernant la fixation de la CaM sur la ceQORH comprenant les résidus entre la Lys177 à la Val195 est en rouge.

2 Etude de la stœchiométrie du complexe ceQORH-CaM par SEC

Une chromatographie d'exclusion stérique (SEC) analytique est réalisée afin de déterminer la stœchiométrie du complexe ceQORH-CaM. Au préalable une calibration de la colonne est réalisée. Deux échantillons de CaM (16,8 kDa) à 2,04 mg/mL (121 μ M) en présence de Ca^{2+} et deux échantillons de ceQORH à 5,6 mg/mL (163 μ M) et à 10 mg/mL (291 μ M) sont injectés. L'injection de ces échantillons de 100 μ L a été réalisée sur une même colonne, dans un tampon identique et permet ainsi d'obtenir les volumes d'éluion de référence de chaque protéine en fonction de leur état oligomérique. Puis, un échantillon du complexe ceQORH-CaM est injecté à deux reprises sur cette même colonne dans les mêmes conditions.

2.1 Résultats de l'échantillon de ceQORH seule par SEC

Le chromatogramme de la ceQORH à 163 μ M met en évidence deux pics d'absorbance à 280 nm aux volumes d'éluion suivants : 9,24 mL (dimère) et 15,36 mL (monomère). Pour l'échantillon de ceQORH à 291 μ M, un seul pic d'absorbance à 280 nm à un volume d'éluion de 8,43 mL (tétramère) est présent. Il est probable qu'il y ait **un effet de la concentration sur**

l'état oligomérique de la ceQORH apo. Plus la ceQORH est concentrée et plus la forme tétramérique est favorisée.

2.2 Résultats de l'échantillon de CaM seule par SEC

Le chromatogramme de la CaM à 121 μM met en évidence plusieurs pics d'absorbance à 280 nm. Il semblerait que cet échantillon ne soit pas pur. Des pics d'absorbance à 280 nm sont relevés aux volumes d'élution suivants : 9,5 mL, 13,7 mL et 15,6 mL. Celui correspondant à la CaM serait celui éluant à 15,6 mL car celui de la ribonucléase A (13,7 kDa) se situe à un volume d'élution de 12,49 mL. Ainsi en y ajoutant l'effet de la forme de la protéine, il serait possible que ce pic corresponde à celui de la CaM (bien que le volume d'élution doive être théoriquement inférieur à celui de la ribonucléase A).

2.3 Résultats de l'échantillon du complexe ceQORH-CaM par SEC

Le complexe a été préparé à un ratio d'une molécule de ceQORH pour une molécule de CaM. Le chromatogramme issu de l'injection du complexe met en évidence deux pics d'absorbance à 280 nm aux volumes d'élution suivants : 9,26 mL et 15,01 mL ainsi que deux pics minoritaires à 20,29 mL et à 27,24 mL (ces deux derniers ont une absorbance inférieure à 10 mAU et correspondent à des protéines dont la masse moléculaire serait inférieure à 13,7 kDa, ils ne sont donc pas pris en compte).

Les masses moléculaires déduites des volumes d'élution ne nous permettent pas de discriminer les protéines sous forme de complexe des protéines non complexées (par exemple deux molécules de ceQORH = 68,6 kDa, une molécule de ceQORH avec deux molécules de CaM = 67,9 kDa). Le pic d'absorbance à 280 nm sur le chromatogramme du complexe correspond à un volume d'élution de 9,26 mL et pourrait alors correspondre à un dimère de la ceQORH (9,24 mL) ou alors à la ceQORH complexée à deux molécules de CaM. Celui à 15,01 mL pourrait correspondre au complexe ceQORH – CaM à un ratio de 1 : 1 (cela est possible car le volume d'élution est inférieur à celui de la CaM seule (15,6 mL) et à celui du monomère de la ceQORH seule (15,36 mL).

Afin de définir la stoechiométrie du complexe et le nombre de complexe possible, l'analyse du (ou des) complexe(s) par SEC-MALLS aurait pu être entreprise car elle aurait été plus précise qu'une simple SEC analytique. Par manque de temps, cette expérience n'a pas pu être réalisée. En revanche, une étude par SPR a été réalisée afin d'obtenir davantage d'information sur la stoechiométrie du complexe.

3 Etude de la stœchiométrie du complexe ceQORH-CaM par SPR

3.1 Interaction ceQORH-CaM calcium dépendante

L'utilisation de la technique de la Résonance Plasmonique de Surface (SPR) en immobilisant la CaM a permis de confirmer que l'interaction entre la ceQORH et la CaM ne se produit qu'en présence de Ca^{2+} car aucune interaction n'est observée en l'absence de calcium. **L'interaction ceQORH-CaM est donc calcium dépendante.**

3.2 Interaction favorisée par la présence du cofacteur, le NADPH

Lorsque l'analyte est injecté en présence de calcium **sans NADPH**, sur un temps défini (600 secondes pour l'injection), la phase d'association ne se termine pas par une phase stationnaire ce qui met en évidence que **l'équilibre n'est pas atteint** (figure n° 101).

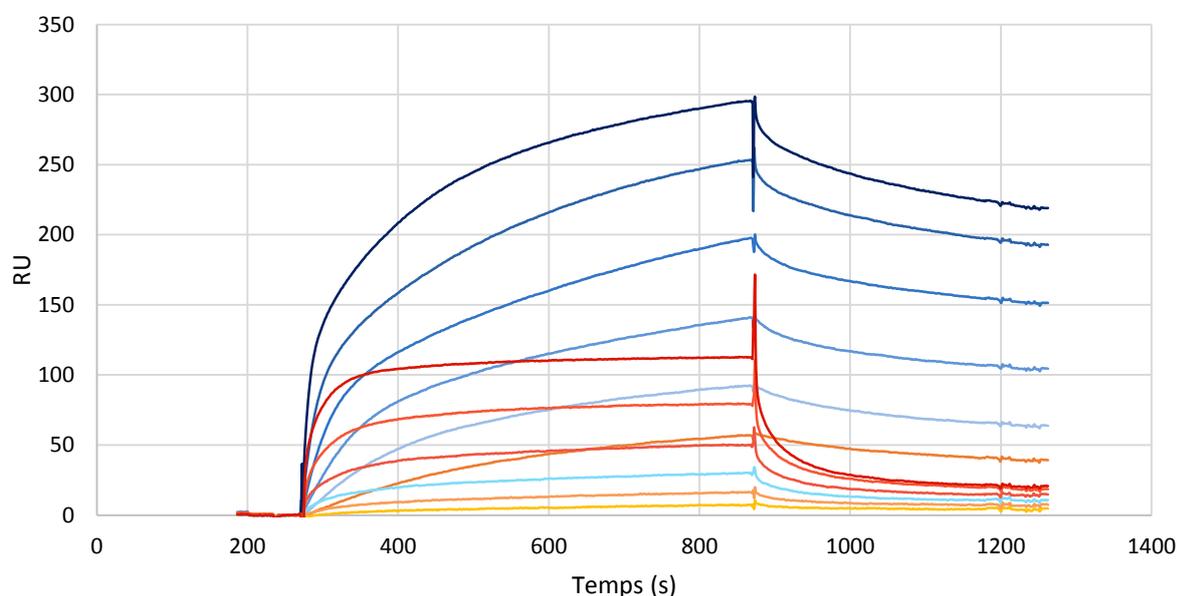


Figure n° 101. Interaction ceQORH-CaM avec ou sans NADPH étudiée par SPR.

La figure représente les courbes exprimant les RU en fonction du temps (en seconde). Le signal enregistré est celui correspondant à la fixation de la ceQORH sur la CaM en présence de Ca^{2+} et avec ou sans NADPH. La série des échantillons sans NADPH est en bleu et avec le NADPH est en rouge. Les séries sont composées d'échantillons de ceQORH à différentes concentrations : 2,5 nM, 5 nM, 10 nM, 20 nM et 40 nM. Cependant pour la série avec le NADPH, les échantillons de ceQORH sont aux concentrations suivantes : 1,25 nM, 2,5 nM, 5 nM, 10 nM et 20 nM.

Lorsque l'analyte (ceQORH) est injecté en présence de calcium et en présence du NADPH, la fin de la phase d'association se rapproche de l'équilibre mais sans l'atteindre. **En présence du NADPH, l'interaction se fait plus rapidement** (figure n° 101). Grâce à l'étude d'un état stationnaire (steady state), **le k_a entre la CaM et la ceQORH a été estimé à 25 nM**. Ce résultat semble valide car la valeur obtenue par les collaborateurs était de 12 nM (*cf.* p.199).

3.3 Interaction entre la CaM et la ceQORHR58A

Le comportement de la ceQORHR58A est similaire à celui de la ceQORH sauvage. Le k_d obtenu est le même pour la protéine mutante ceQORHR58A en présence de NADPH et de calcium (figure n° 102). Aucune différence des résultats de SPR n'a été observée entre la ceQORH et la ceQORHR58A (figures n° 101 et n° 102).

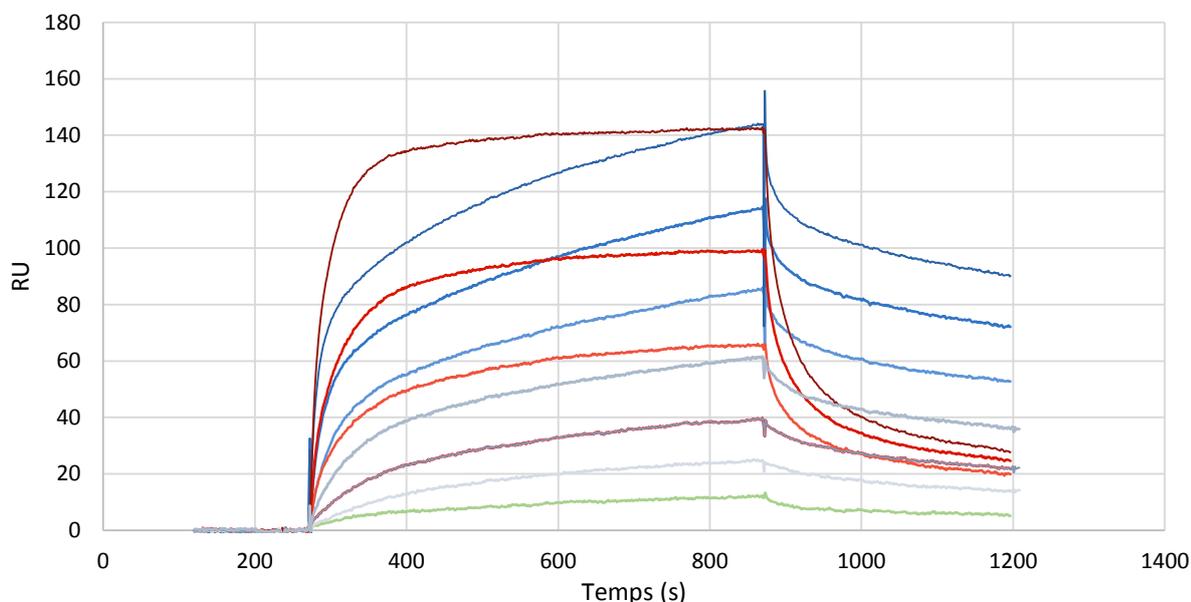


Figure n° 102. Interaction ceQORHR58A-CaM avec ou sans NADPH par SPR.

La figure représente les courbes exprimant les RU en fonction du temps (en seconde). Le signal enregistré correspond à la fixation de la ceQORHR58A sur la CaM en présence de Ca^{2+} et avec ou sans NADPH. La série sans NADPH est en bleu et avec le NADPH la série est en rouge. Les séries sont composées d'échantillons de ceQORH à différentes concentrations : 2,5 nM, 5 nM, 10 nM, 20 nM et 40 nM.

3.4 Interprétations des résultats obtenus en SPR

Ce type de modèle est appelé **bi-phasique** car dans un premier temps, l'interaction se fait rapidement mais ensuite, un processus lent empêche d'atteindre l'équilibre d'association. Ceci pourrait conforter l'hypothèse selon laquelle le complexe pourrait avoir un ratio différent d'une molécule de ceQORH pour une molécule de CaM (i). Ou alors, ces résultats suggèrent que la fixation du NADPH sur la ceQORH induit un changement conformationnel qui favoriserait l'interaction avec la CaM (ii). Cette dernière hypothèse serait en inadéquation avec les interprétations des structures de la ceQORH apo et complexée au $NADP^+$ (*cf.* p.155). L'hypothèse la plus favorable serait donc la première.

Les résultats de la chromatographie d'exclusion moléculaire mettent en évidence deux pics d'absorbance à 280 nm, il est donc possible **que plusieurs complexes différents de ceQORH-**

CaM se forment avec des ratios différents. C'est pourquoi des gels non-dénaturants ont été réalisés afin de vérifier la formation de différents complexes.

4 Un ou des complexes ceQORH-CaM : étude par gels non-dénaturants

L'analyse des gels non-dénaturants montrent qu'en augmentant la concentration de la ceQORH par rapport à la concentration de CaM, la formation du complexe ceQORH-CaM est favorisée (figure n° 103). De plus, les gels non-dénaturants montrent un minimum de deux bandes, ce qui pourrait correspondre à deux types de complexe (figure n° 103).

L'analyse des gels non dénaturants propose qu'il y ait probablement **deux molécules de ceQORH pour une molécule de CaM**. Afin d'obtenir des informations structurales sur la nature du complexe, une étude en utilisant la technique de SAXS a été réalisée.

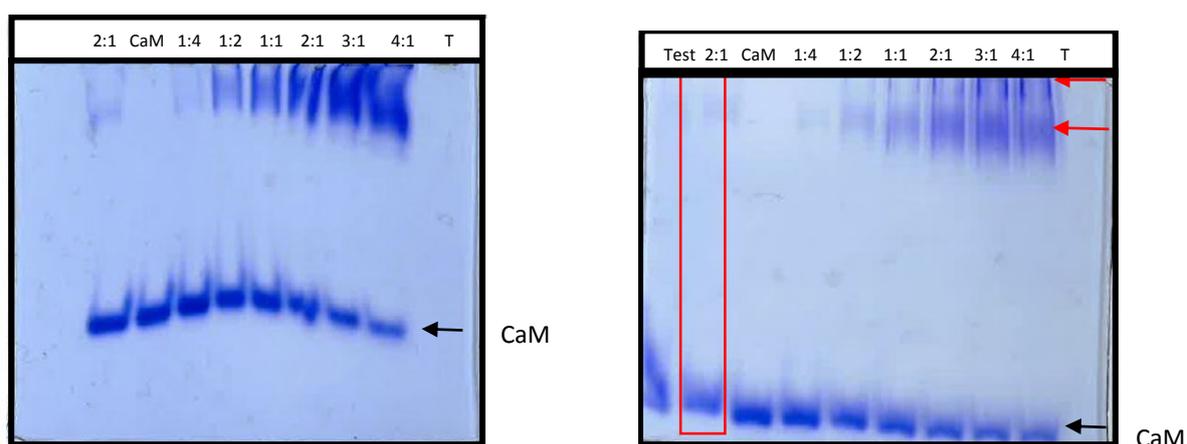


Figure n° 103. Gels non-dénaturants du complexe ceQORH-CaM.

Les deux gels sont des gels non-dénaturants sur lesquels sont représentés le ratio molaire entre la ceQORH et la CaM (ceQORH : CaM). T : témoin de migration, Test : complexe sans NADPH à un ratio 2:1. Le complexe a été formé en présence de NADPH et de Ca^{2+} . Les flèches rouges indiquent les bandes correspondant aux complexes observés. La flèche noire montre la migration de la CaM seule. La piste sur laquelle a été déposé l'échantillon dont le ratio est de deux molécules de ceQORH pour une molécule de CaM localisé à gauche du témoin « CaM » encadrée en rouge ne contient pas de Ca^{2+} .

5 Etude du complexe ceQORH-CaM par la technique du SAXS

Dans un premier temps, la technique a été utilisée pour définir l'enveloppe de la CaM seule afin de pouvoir la replacer dans le complexe une fois l'enveloppe du complexe obtenue.

5.1 Enveloppe structurale de la CaM-Ca²⁺ par la technique du SAXS

Les échantillons de CaM sont aux concentrations suivantes : 0,50 mg/mL, 1 mg/mL, 2,5 mg/mL et 5 mg/mL. Le calcium est présent dans l'échantillon car il influe sur les résultats de SAXS (Seaton *et al.*, 1985). Pour l'ensemble des échantillons, **aucune agrégation** n'est visible ce qui met en évidence la stabilité de la protéine. L'échantillon concentré à **0,5 mg/mL n'est pas suffisamment concentré** pour exploiter les données SAXS (Rg et un volume de Porod nettement inférieur aux autres échantillons).

Pour les trois autres échantillons, on constate que sur la courbe représentant la $p(r)$ se forme un épaulement sur le premier pic. Cela pourrait alors correspondre à l'allure d'une $p(r)$ d'une protéine **dont les deux domaines sont bien distincts** comme la CaM. L'ensemble des résultats traités automatiquement donnent un poids moléculaire entre 16 et 21 kDa excepté pour celui concentré à 2,5 mg/ml où le poids moléculaire est estimé entre 20,4 et 27,2 kDa. Le poids moléculaire de la CaM étant de 16,8 kDa, il semblerait que l'échantillon à 2,5 mg/mL ne soit pas de bonne qualité puisque l'estimation de son poids moléculaire est erronée. Les traitements automatiques des données des échantillons à 1 mg/mL et 5 mg/mL ont donné, grâce à *damfit*, une forme générale de l'enveloppe correspondante à la structure de la CaM. Cependant celle-ci ne correspond pas à celle de la structure connue de la CaM6 par exemple.

5.2 Enveloppe structurale du complexe ceQORH-CaM par la technique du SAXS

L'enveloppe du complexe de la CaM avec la ceQORH n'a pas pu être obtenue. En effet, la qualité du domaine de Guinier est approximativement de 58 % à 3 mg/mL et lorsqu'on observe la valeur du d_{max} on constate qu'il est proche de celui de la CaM seule et que le volume de Porod est inférieur à celui de la CaM seule. Pourtant ces échantillons ne sont pas agrégés d'après le traitement automatique des données.

Un autre échantillon à 3 mg/mL a été testé. Pour cet échantillon, il existe une trop grande différence entre le Rg défini par le domaine de Guinier et le Rg obtenu par *gnom*, ce qui n'est pas cohérent car nous devrions obtenir une valeur similaire car c'est une constante pour un système donné. Puis concernant l'échantillon à 1 mg/mL, il n'est pas agrégé mais le signal est trop faible et le volume de Porod est approximativement le même que celui de la CaM seule ce qui n'est pas cohérent pour un complexe.

L'enveloppe discontinue obtenue est l'exemple même de données non-exploitable et met en évidence qu'en plus de tous les paramètres qui invalident les données, on obtient à la fin du traitement **une enveloppe fausse du complexe ceQORH-CaM**. Les résultats obtenus étaient

prévisibles. En effet, s'il existe différents complexes de ceQORH-CaM, la solution protéique n'est pas homogène. Or pour une expérience en SAXS, il est primordial que la solution soit homogène.

6 Cristallisation du complexe ceQORH-CaM

6.1 Résultats sur la cristallogénèse du complexe ceQORH-CaM

La cristallisation de la ceQORH avec la CaM a été tentée en utilisant la plateforme HTXlab de l'EMBL. Les tests ont été réalisés à 20°C car la CaM se purifie à température ambiante. Deux ratios différents ceQORH:CaM ont été testés 1:1 et 2:1. Au bout de 24 heures, 93 % des gouttes étaient toujours limpides, puis au bout de trois semaines 85 % des gouttes sont limpides. Cela signifie que si on se base sur le diagramme de phase, on doit se situer en dessous de la courbe de solubilité (*cf.* p.86). Les résultats sont identiques pour les deux ratios testés. **La concentration des protéines n'est donc pas suffisante.** De plus, s'il existe **plusieurs complexes la polydispersité de la solution serait également un problème majeur** pour la cristallisation du complexe.

6.2 Résultats sur la stabilité du complexe ceQORH-CaM par thermofluorescence

Un test sur la stabilité du complexe est réalisé dans la condition suivante : 150 mM de chlorure de sodium, 100 mM d'HEPES pH 7,5. Les courbes commencent à leur maximum de fluorescence ce qui signifie que la ou les protéines sont dénaturées. Une des explications serait que la dénaturation serait induite par le changement de tampon réalisé avant le test de la thermofluorescence. En effet, un changement de tampon a été nécessaire pour une des protéines. Seulement si ce changement de tampon n'est pas en cause, ce résultat expliquerait, en partie, pourquoi le complexe n'a pas cristallisé. Cependant dans le cas d'une dénaturation de l'ensemble de l'échantillon ou même d'un seul partenaire, on aurait pu s'attendre à un pourcentage de précipitation plus élevé dans les gouttes de cristallisation. L'hypothèse du changement de tampon impliqué dans la dénaturation semble alors plausible.

Les tentatives de cristallisation de ce complexe ont échoué en raison d'une concentration **trop faible en protéine, et/ou de la dénaturation des protéines et/ou de l'existence de plusieurs entités en solution.** Des tests de cristallisation du complexe à une concentration plus élevée auraient pu être réalisés. L'homogénéité de la solution aurait pu être vérifiée par diffusion dynamique de la lumière. On aurait pu également vérifier la stabilité de ce complexe dans

différents tampons par étude de la thermofluorescence du complexe pour déterminer le tampon optimale dans lequel placer le complexe avant de commencer la cristallogénèse ainsi que pour déterminer la température de cristallisation adéquate.

A la suite de toutes les précédentes manipulations non-fructueuses, une analyse du complexe *in silico* a été réalisée.

7 Analyses *in silico* du complexe ceQORH-CaM

Une modélisation du complexe de la ceQORH avec la CaM a été réalisée à l'aide de Z-dock. Ce programme positionne la CaM sur la ceQORH. La liste des résultats prédits se fait dans l'ordre des meilleurs scores.

7.1 Docking de la CaM6 sur le monomère de la ceQORH apo

Les structures entières de CaM de plante ne sont pas nombreuses. L'une retenue est appelée CaM6, elle provient de *Solanum tuberosum* et le code PDB est 1RFJ (Yun *et al.*, 2004). Elle possède 149 résidus et la structure a été obtenue par cristallographie aux rayons X en présence de calcium. La CaM possède deux domaines quasi-identiques et séparés par une hélice. Celle utilisée pour les précédentes expériences est la CaM1.

La CaM6 a été dockée sur la structure du monomère de la ceQORH sous forme apo. Le dimère de l'apo-ceQORH n'aurait pas pu être utilisé car les hélices $\alpha 8$ sont enfouies dans le dimère (*cf.* p.140) or les prédictions supposent que l'interaction avec la CaM se fait grâce à cette même hélice. Z-DOCK classe les meilleures prédictions dans l'ordre décroissant. La prédiction n°1 puis la prédiction n°2, et n° 3 sont présentées dans la figure n° 104.

Pour les meilleures prédictions, les domaines C-terminal et N-terminal de la CaM sont impliqués dans l'interaction. Cependant, la suite des prédictions propose que l'interaction se fasse grâce à l'hélice centrale servant de connexion entre les deux domaines de la CaM ce qui semble être peu probable. La pose correspondant au 3^{ième} meilleur score, se positionne sur l'hélice clef, l'hélice $\alpha 8$ de la ceQORH, qui semble être la cible de la CaM. La fixation des deux autres meilleures prédictions de la CaM sur la ceQORH se fait également sur l'hélice $\alpha 8$. Cependant l'orientation de chacune est différente (figure n° 104). La CaM peut interagir avec la ceQORH en la positionnant sur l'un de ses deux domaines. Il ne serait pas impossible qu'elle puisse fixer une molécule de ceQORH par domaine. L'orientation dans l'espace de la CaM montre qu'un premier domaine peut se fixer sur la ceQORH et que le second domaine étant éloigné de la première molécule de ceQORH pourrait à son tour fixer une molécule de

ceQORH. Ceci serait **favorable à la fixation d'une seconde molécule** de ceQORH car il n'y aurait donc pas de gênes stériques.

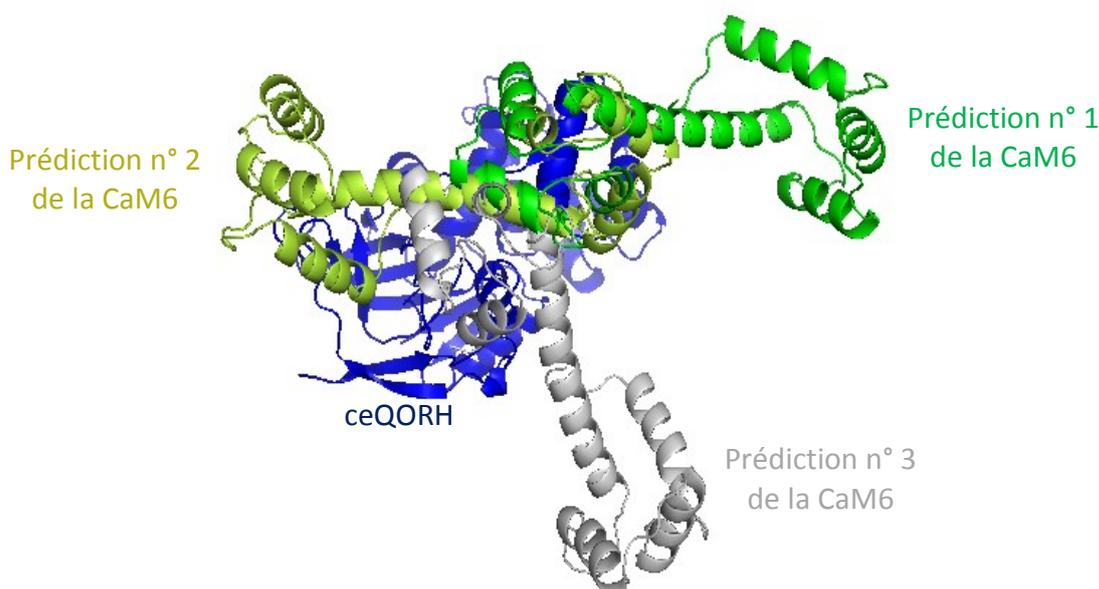


Figure n° 104. Docking de la CaM6 sur la ceQORH.

Cette figure représente la CaM6 (code PDB : 1RFJ) en vert, en jaune et en gris dockée sur la ceQORH apo en bleu. Cette figure présente la prédiction n° 1 en vert, la prédiction n° 2 en jaune et la prédiction n° 3 en gris d'après Z-DOCK.

7.2 Comparaison du doking avec une autre CaM : la CaM7

La seconde structure de CaM retenue est celle de la CaM7 d'*Arabidopsis thaliana* dont le code PDB est 4AQR (Tidow *et al.*, 2012). La structure cristallographique de la CaM7 a été obtenue sous forme de complexe avec un domaine régulateur. Elle possède 149 résidus. La configuration de la CaM est celle en présence de calcium et associée à une autre protéine. La différence entre les deux CaM (CaM6 et CaM7) se situe dans la position du second domaine par rapport au premier. Le rmsd entre les deux protéines est de 0,41 Å et leur identité de séquence est de 98,6 %. La structure de la CaM7 a été isolée d'un complexe protéique, ce qui a probablement généré le changement de conformation observé entre les deux CaM (figure n° 105). En effet, les programmes de docking ne peuvent en aucun cas prévoir des changements de conformation importants, c'est pourquoi cette seconde étude a été réalisée.

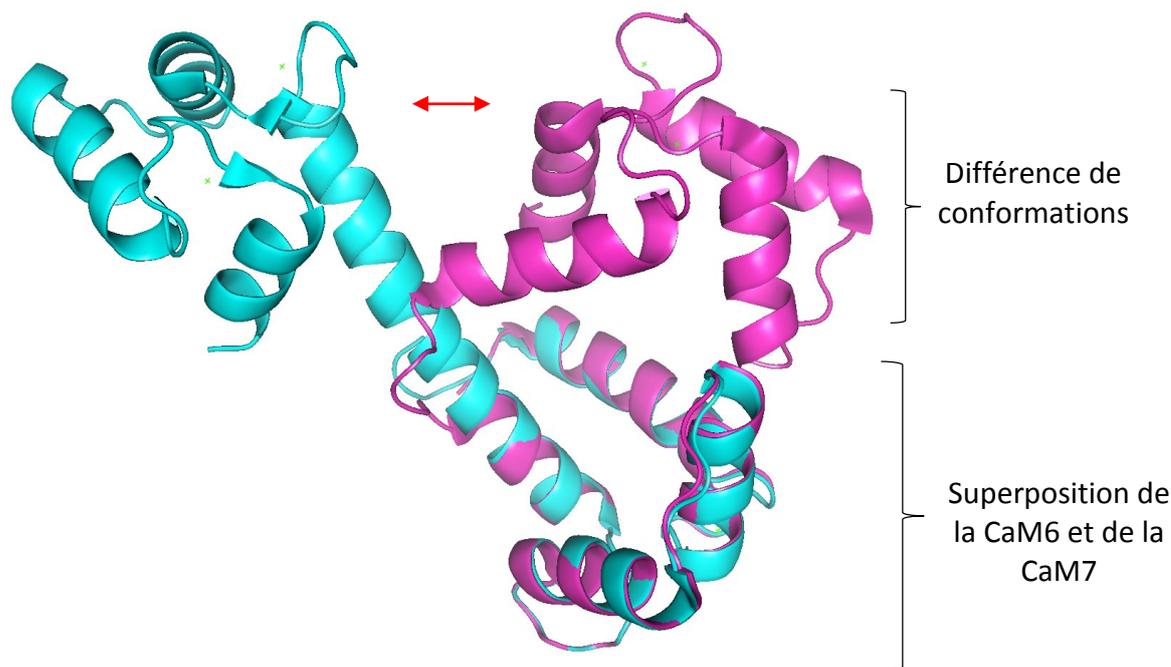


Figure n° 105. Comparaison entre la CaM6 et la CaM7.

Cette figure représente la superposition de la structure de la CaM6 (code PDB : 1RFJ) en bleu et la structure de la CaM7 (code PDB : 4AQR) en magenta.

Le docking de la CaM7 sur le monomère de l'apo-ceQORH révèle des positions similaires à celles obtenues pour la CaM6 et ce, malgré le changement de conformation de la CaM.

Les résultats du docking de la CaM6 de *Solanum tuberosum* et de la CaM7 d'*Arabidopsis thaliana* avec le monomère de la ceQORH apo ont permis de mettre en évidence **deux sites de docking différents sur la CaM**. C'est pourquoi une étude du docking de la ceQORH sur la CaM a été réalisée.

7.3 Docking d'un monomère de la ceQORH sur la CaM6 et la CaM7

Le modèle 1 de la ceQORH, assez proche du modèle 2 de la ceQORH, se positionne sur le même site de la CaM6. Cependant, les autres modèles proposés comme le modèle 3 ou 5 de la ceQORH se positionnent à l'opposé du modèle 1 de la ceQORH. Les modèles 1 et 3 mettraient en évidence que la CaM libre ou sous forme de complexe pourrait fixer deux molécules de ceQORH. En effet, sur la CaM7 les deux meilleurs modèles sont directement placés sur les deux domaines de la CaM7.

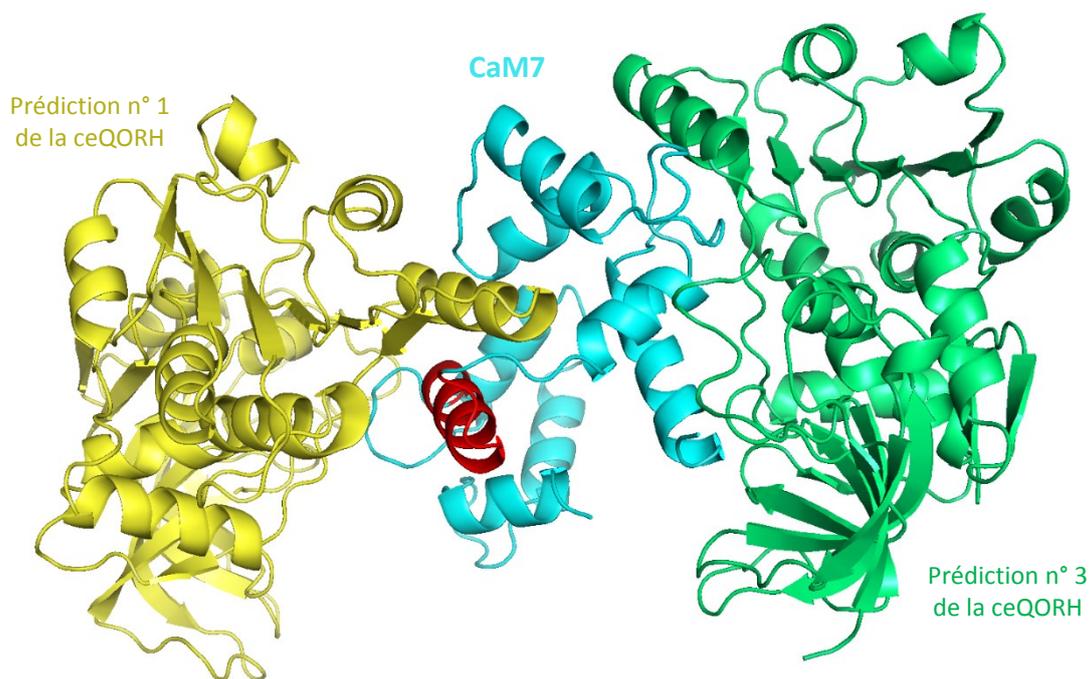


Figure n° 106. Modèles 1 et 3 du docking de la ceQORH sur la CaM7.

La CaM7 (code PDB : 4AQR) est en bleu et le monomère de la ceQORH apo se fixant sur la CaM est en jaune ou en vert (modèle 1 : jaune et modèle 3 : vert). Cette figure correspond à la prédiction n°1 et n° 3 d'après Z-DOCK.

7.4 Résultats sur le complexe ceQORH-CaM et l'inhibition de la ceQORH

Les tests enzymatiques réalisés par Dr Gilles CURIEN ont mis en évidence que la CaM empêche l'inhibition de la ceQORH par les inhibiteurs utilisés. Ceci a été observé par un regain d'activité à la suite de l'inhibition de la ceQORH en ajoutant la CaM et le calcium. La CaM se lierait au monomère de la ceQORH et empêcherait ainsi la multimérisation de l'enzyme qui est observée lors de l'inhibition. Elle serait impliquée dans la première phase d'inhibition celle définie comme étant rapide et correspondant à la fixation sur le monomère. Cependant elle ne pourrait empêcher l'inhibition lorsque le tétramère est formé lors de l'inhibition. Cela s'évalue par le fait que peu importe la concentration en CaM l'inhibition ne peut être complètement abolie. Il y a donc une phase irréversible dans ce phénomène.

Partie III. Conclusion sur l'interaction ceQORH-calmoduline

La CaM interagirait avec l'hélice $\alpha 8$ de la ceQORH. Lors de l'analyse des structures obtenues de la ceQORH, cette hélice avait déjà été mise en évidence pour être moduler en fonction des ligands fixés. En effet, certains résidus à proximité de cette hélice comme la Leu276 pourraient être impliqués dans la reconnaissance d'un substrat. La position de l'hélice favorisant l'interaction avec la CaM serait identique à celle favorisant la fixation d'un substrat car la ceQORH est active même lorsqu'elle interagit avec la CaM. L'interaction ceQORH-CaM est possible qu'en présence de calcium et la présence du cofacteur NADPH favoriserait l'interaction entre les deux protéines. Les résultats *in silico* ont été obtenus en utilisant la ceQORH apo car l'obtention de la structure avec le cofacteur a été plus tardive. Pourtant la présence du cofacteur est importante comme j'ai pu le démontrer par les manipulations de SPR. Il serait alors intéressant de comparer les résultats qui seraient obtenus avec la structure de la ceQORH en présence du NADPH avec ceux obtenus avec la ceQORH apo. De plus, la CaM empêche l'inhibition de la ceQORH, de ce fait, cela conforte l'hypothèse selon laquelle la ceQORH serait active sous la forme de monomère.

IEP32

Partie I. Présentation d'IEP32

1 Découverte d'IEP32 au sein du chloroplaste

1.1 IEP32 essentielle à la plante

En 2004, l'équipe d'Hörmann a découvert l'existence et les rôles de « Tic32 » (Translocon inner chloroplast 32) qui sera appelée, par la suite, IEP32 (Inner Envelope Protein) (Nada *et al.*, 2004). IEP32 est une protéine essentielle à la viabilité de la plante : la délétion du gène codant pour cette protéine est fatale pour la plante (figure n° 107) (Hörmann *et al.*, 2004).

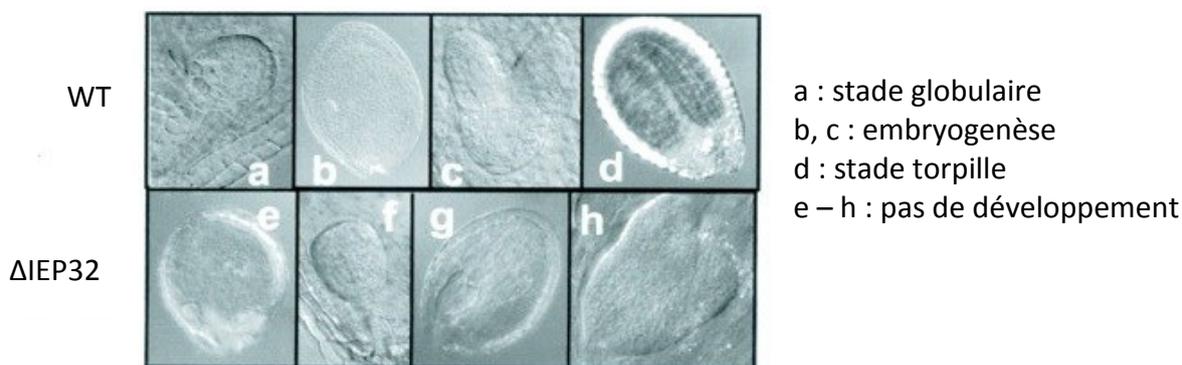


Figure n° 107. Micrographes de graines (IEP32 sauvage ou un mutant).

Cette figure présente les différents stades du développement de la plante pour un génotype différent. Pour l'un, la plante exprime IEP32 sauvage et pour le second, une invalidation du gène d'IEP32 a été réalisée afin de mettre en évidence l'importance d'IEP32 pour la viabilité de la plante au stade embryonnaire (Hörmann *et al.*, 2004).

La protéine a été identifiée grâce aux études menées sur les interactions de Tic110 avec différents partenaires chloroplastiques. IEP32 s'avère être le partenaire ayant le plus d'affinité pour Tic110. IEP32 interagit également avec d'autres protéines du complexe de translocation TIC (*cf.* p.39) comme Tic22 (Hörmann *et al.*, 2004).

1.2 Localisation d'IEP32 au sein du chloroplaste

La protéine a été localisée au niveau de la membrane interne de l'enveloppe du chloroplaste et en plus faible proportion au niveau de la membrane externe de l'enveloppe du chloroplaste (figure n° 108).

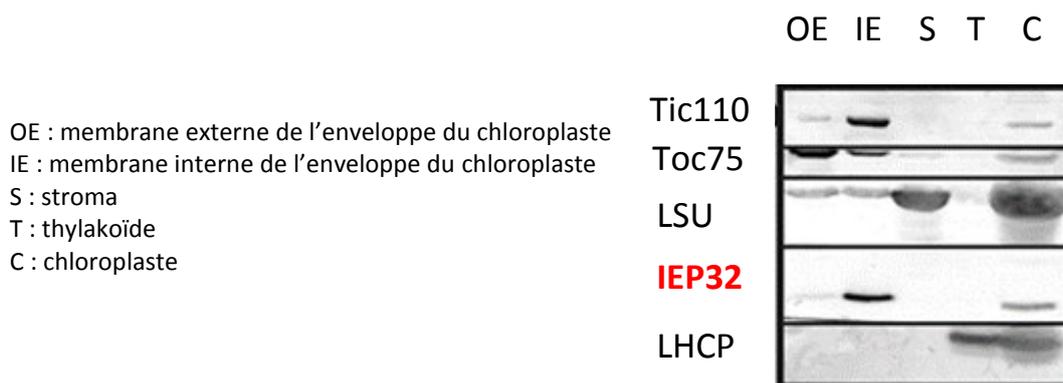


Figure n° 108. Localisation d'IEP32 au sein du chloroplaste.

La figure met en évidence la localisation d'IEP32 à l'aide d'un western blot et d'anticorps dirigés contre IEP32.

2 Présentation de la superfamille des déshydrogénases/réductases à chaîne courte

Les homologies de séquences d'IEP32 avec d'autres protéines de plante, de bactérie, et de mammifère ont mis en évidence qu'elle appartient à la famille des déshydrogénases/réductases à chaîne courte ("Short chain Dehydrogenase/Reductase" : SDR).

2.1 Rôles des SDR

Les SDR sont retrouvées chez les *Archae*, les eucaryotes, les procaryotes et les virus (Kallberg *et al.*, 2002). La superfamille des SDR ne cesse de croître (Persson *et al.*, 2003). 374 familles sont retrouvées chez les bactéries, 236 chez les eucaryotes, et 50 familles chez les *Archae*.

Les SDR sont impliquées dans différents processus de la vie cellulaire. Elles sont impliquées dans l'homéostasie des cellules ; elles participent à la synthèse des acides gras et des sucres ; elles contrôlent le niveau d'hormones en régulant la transcription, et elles ont également un rôle dans l'apoptose cellulaire. Les SDR sont fréquemment liées aux membranes tout comme les **R**étinols **D**és**H**ydrogénases (RDH). Chez la plante, les SDR sont essentiellement impliquées dans la biosynthèse d'hormones et dans la signalisation cellulaire. Elles sont impliquées, par exemple, dans le métabolisme des stéroïdes ou des rétinoïdes. Elles sont impliquées dans la synthèse de l'acide abscissique (ABA) qui est une hormone importante pour la croissance de la plante, pour son développement et pour la réponse au stress (*cf.* p.47) (Sindhu et Walton, 1987 ; Schwartz *et al.*, 1997 ; Cheng *et al.*, 2002). Les substrats cibles des SDR sont nombreux. De manière générale, les substrats possibles sont les stéroïdes, les alcools, les sucres et les composés aromatiques. L'activité de ces enzymes ne requiert pas la présence de métaux.

2.2 Description structurale des SDR

Au sein de la superfamille des SDR, les enzymes ont entre 15 à 30 % d'identité de séquences. Bien que les séquences des SDR soient très divergentes, toutes les SDR possèdent des similarités structurales (Krook *et al.*, 1993 ; Ghosh *et al.*, 2001 ; Filling *et al.*, 2001 ; Kavanagh *et al.*, 2008). En 2015, seules huit structures de SDR ont été déterminées chez *Arabidopsis thaliana*. Les enzymes appartenant à la superfamille des SDR peuvent être monomérique, dimérique ou tétramérique.

2.2.1 Domaine de Rossmann des SDR

Les SDR sont NAD(H) ou NADP(H) dépendantes et le site de fixation du cofacteur est localisé du côté *N*-terminal. Le domaine de Rossmann a été décrit pour la première fois en 1973 (Rossmann *et al.*, 1974 ; Ohlsson *et al.*, 1974). Sa composition est un enchaînement précis de structures secondaires telles que « $\beta\alpha\beta\alpha\beta$ » permettant de fixer un mononucléotide. En répétant ce motif deux fois, alors les deux motifs de fixation de mononucléotide peuvent fixer le NAD(H) et le NADP(H). L'ensemble forme un feuillet β de six brins parallèles entourés par quatre à six hélices α de part et d'autre de chaque brin β . Le motif de fixation est du type « GXGXXG » où G correspond au résidu glycine et X à un quelconque acide aminé. Ces trois glycines sont conservées et jouent un rôle important dans la fixation du cofacteur. Elles sont localisées sur la boucle entre l'hélice α_1 et le brin β_1 (Rescigno et Perham, 1994 ; Eschenbrenner *et al.*, 2001). Une mutation d'une ou de plusieurs de ces glycines diminue ou abolit l'activité des enzymes. Le motif de fixation du cofacteur peut être légèrement différent. Par exemple, il peut être constitué de ces motifs : TGXXXGXG ou GXXXGXG où on retrouve, à nouveau, trois glycines hautement conservées.

2.2.2 Site catalytique des SDR

La différence principale entre les structures de SDR s'observe au niveau des structures désordonnées (boucles). Certaines sont impliquées dans la fixation du substrat ce qui leur permet d'agir sur des substrats très différents (Persson *et al.*, 2003). Le site catalytique est constitué de quatre résidus qui forment la tétrade catalytique nécessaire aux réactions enzymatiques (Jornvall *et al.*, 1995 ; Oppermann *et al.*, 1997 ; Filling *et al.*, 2001). Cependant le site catalytique diffère en fonction du type de SDR.

2.3 Les types de SDR

La classification des SDR se base sur la séquence protéique et prend également en compte la structure tridimensionnelle de l'enzyme (Moummou *et al.*, 2012). La superfamille des SDR est subdivisée en sept types : classique, étendue, atypique, intermédiaire, divergente, complexe, et non-classée. Chaque type de SDR est défini par le motif composant son site catalytique et le motif de fixation du cofacteur (tableau n° 26) (pour revue Bancroft *et al.*, 2000). Seuls deux à trois résidus de la tétrade catalytique sont mis en évidence dans le tableau ci-dessous.

Types	Motif de liaison au cofacteur	Site actif
Classique	TGxxx[AG]xG	YxxxK
Etendu	[ST]GxxGxxG	YxxxK
Intermédiaire	[GA]xxGxx[GA]	YxxxK
Divergent	GxxxxSxA	YxxMxxxK
Complexe	GGxGxxG	YxxxN

Tableau n° 26. Les différents types de SDR.

Les classiques sont des oxydoréductases possédant un domaine de fixation du NAD(P)(H) et un site catalytique. La protéine est constituée de 250 résidus (Jornvall *et al.*, 1995). Le type étendu a une extension à l'extrémité C-terminale et est composée de 350 résidus. Les SDR appartenant aux types classique et étendu présentent essentiellement des activités déshydrogénase, déshydratase, épimérase, ou isomérase. Chez *Arabidopsis thaliana*, il existe 90 SDR classiques et 72 SDR étendues. Ce sont les deux types les plus répandus.

3 IEP32 est une SDR

La séquence d'IEP32 est annotée A2RVM0 (bases de données TAIR). D'après le serveur SDR (www.sdr-enzymes.org), IEP32 est définie comme étant une rétinol réductase NADPH dépendante. Elle serait donc liée à la famille « RDH14_human » qui est composée de 1513 membres (<http://www.genenames.org/genefamilies/SDR>). La rétinol déshydrogénase 14 correspond à la famille SDR7C4. D'après ce même site, sept protéines ont été identifiées chez *Arabidopsis thaliana* comme appartenant à la famille SDR7C (tableau n° 27). Chez *Arabidopsis thaliana*, aucune structure tridimensionnelle de protéine appartenant à la famille SDR7C n'a été déterminée.

Code Uniprot	Nom de la protéine	Début de la séquence	Fin de la séquence
O22985	Ribitol déshydrogénase	34	312
O80924	Oxydoréductase putative	33	308
Q0WRL1	Protéine putative non-caractérisée At4g11410	29	217
A2RVM0	SDR TIC 32 chloroplastique	29	305
Q8H0Y3	Protéine At4g23420 avec activité oxydoréductase	29	218
Q8LCE7	Déshydrogénase SAC25	33	308
Q9SGV6	At1g64590/F1N19_15	34	312

Tableau n° 27. La famille SDR7C chez *Arabidopsis thaliana*.

4 Rôles d'IEP32 au sein du chloroplaste

La lumière, ayant un impact sur l'état rédox du chloroplaste, elle affecte également l'import des protéines dans le chloroplaste (Hirohashi *et al.*, 2001). IEP32 serait une sous-unité sensible à l'état rédox qui régulerait l'import de protéines photosynthétiques dans le chloroplaste. Cette régulation pourrait se faire par l'intermédiaire de son interaction avec la CaM qui est calcium-dépendante (Chigri *et al.*, 2005, 2006). En effet, cette interaction varie en fonction de la fixation du NADPH sur IEP32 car le NADPH modifie l'affinité entre IEP32 et la CaM (*cf.* Annexe n°1). De plus, il semblerait également qu'IEP32 participe à la détoxification de la plante en réduisant des aldéhydes de plus de six atomes de carbones comme le nonanal ou l'hexanal.

Les particularités biologiques de cette protéine ont été présentées dans l'introduction (*cf.* p.37, 39). Son implication dans autant de processus moléculaires justifie des études structurales plus poussées, et en particulier l'obtention de la structure tridimensionnelle à une résolution atomique.

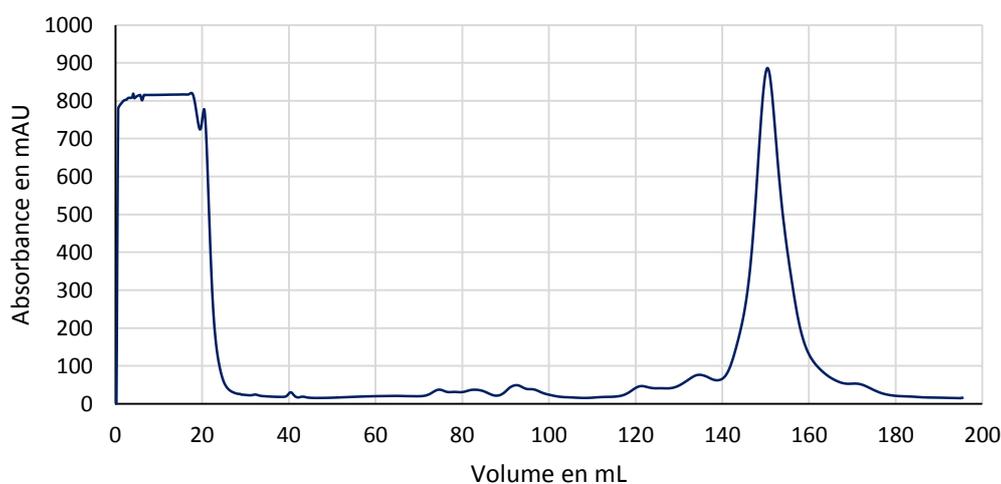
Partie II. Etude d'IEP32

1 Production et purification d'IEP32

IEP32 est une protéine soluble qui peut être surexprimée dans les différentes souches d'*E. coli*. Nous avons utilisé la souche Rosetta 2 car cette souche nous permet d'obtenir une grande quantité de protéine soluble. IEP32 est une protéine de 34,74 kDa possédant un pI théorique de 8,95. La première étape de purification consiste à utiliser une résine échangeuse d'anions qui est la DiEthylAminoEthyl-Sepharose® (DEAE-Sepharose®). Le tampon utilisé est à un pH de 7,5, valeur nettement inférieure au point isoélectrique théorique d'IEP32, la charge globale d'IEP32 sera donc positive. La protéine n'est donc pas retenue par la DEAE-Sepharose® qui fixe tous les contaminants dont la charge globale nette est négative. Les protéines non-retenues sont collectées et fractionnées. Le fractionnement est important car il sépare la protéine d'intérêt des autres contaminants qui ne se fixent pas sur la résine.

Ensuite afin de séparer les contaminants chargés positivement d'IEP32, l'étape suivante consiste à utiliser une échangeuse de cations, la S-Sepharose®. Le pourcentage de pureté de la protéine à la fin de cette étape est élevé (>90 %) (figure n° 109).

Une chromatographie d'exclusion moléculaire (Superdex S200 HiLoad 16/60) est réalisée afin de séparer la protéine IEP32 d'un contaminant de faible poids moléculaire (< 25 kDa). Un seul pic d'absorbance à 280 nm est obtenu indiquant qu'IEP32 est probablement dans un **seul état d'oligomérisation**.



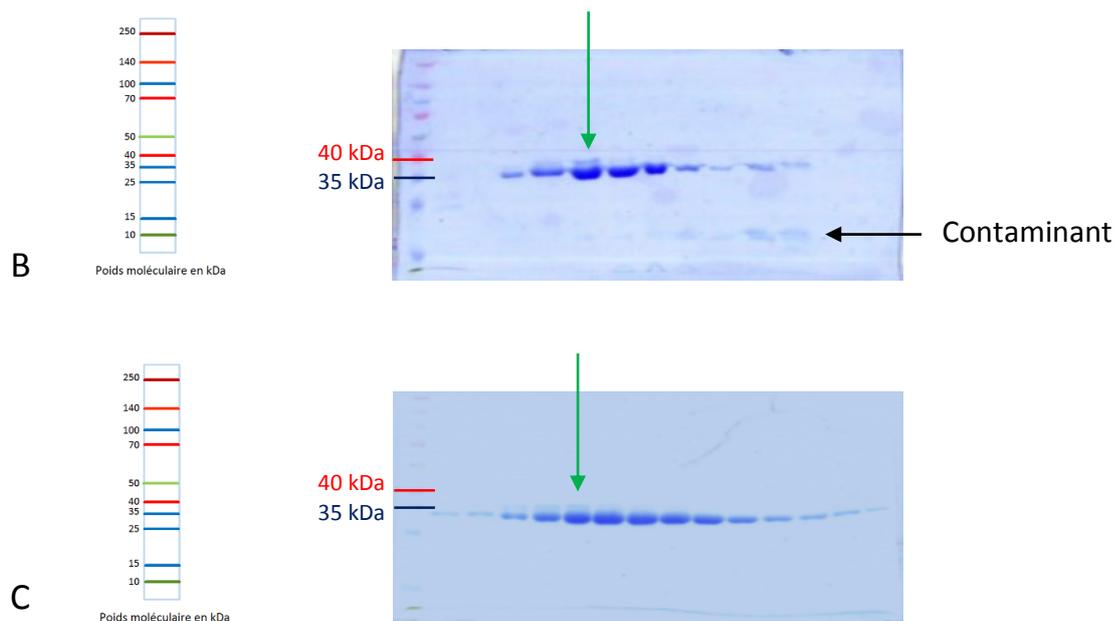


Figure n° 109. Chromatogramme et gels SDS-PAGE de la S-Sepharose® et de la S200.

A. Chromatogramme de l'étape de la S-Sepharose® correspondant à la première étape de purification d'IEP32. Le chargement de la protéine sur la colonne correspond à la courbe du volume 0 mL à 25 mL. Un gradient de sel est utilisé pour obtenir la protéine d'intérêt éluant à 150 mL. **B.** Gel SDS-PAGE après la première étape de la purification (après la S-Sepharose®). La flèche noire indique le contaminant dont le poids moléculaire est inférieur à 25 kDa. La flèche verte indique la seconde protéine retrouvée également sur la figure C. Gel SDS-PAGE réalisé après l'étape de la chromatographie d'exclusion moléculaire.

Lors des différentes purifications d'IEP32, deux bandes sur les gels SDS-PAGE sont observées (figure n° 109.C). Cette seconde bande pourrait être un contaminant ou une dégradation de la protéine d'intérêt. Malgré tout, la protéine est obtenue avec un taux de pureté supérieur à 90 % ce qui permet **d'envisager des études de cristallogénèse.**

2 Cristallogénèse d'IEP32

2.1 Cristallogénèse d'IEP32 à 9 mg/mL

La cristallisation d'IEP32, d'IEP32-NADPH et d'IEP32-NADP⁺-nonanal (substrat de l'enzyme) à 20 °C a été réalisée à l'aide de la plateforme HTXlab à l'EMBL. La concentration de la protéine est de 9 mg/mL. Une des conditions de cristallisation (0,2 M magnésium acétate pH 7,9, 20 % (w/v) PEG 3350) nous a permis d'obtenir des cristaux d'IEP32-NADPH et d'IEP32-NADP⁺. La mise à l'échelle par des méthodes traditionnelles au laboratoire (goutte suspendue avec un réservoir de 500 µL et des gouttes de 0,5µL/0,5µL) n'a pas été réussie. Aucun cristal n'a été obtenu au laboratoire manuellement. On pouvait observer dans les gouttes

des précipités amorphes. Le pourcentage de gouttes précipitées sur la totalité des gouttes réalisées était élevé, c'est pourquoi d'autres essais de cristallisation ont été réalisés avec **une concentration en protéine plus faible** (5,5 mg/mL).

2.2 Cristallogenèse à 5,5 mg/mL d'IEP32

Cinq matrices d'échantillonnage commerciales ont été testées pour la cristallisation d'IEP32, d'IEP32 - NADPH et d'IEP32 - NADP⁺ représentant 480 conditions de cristallisation différentes. Aucune condition de cristallisation ne s'est avérée être intéressante pour l'enzyme seule car seuls des précipités amorphes étaient observés. Pour IEP32-NADPH ou IEP32-NADP⁺, des oursins ont été obtenus en présence de 0,1 M cacodylate de sodium, 0,2 M acétate de magnésium pH 6,5, 20 % (w/v) PEG 8000 à 20°C (figure n° 110).

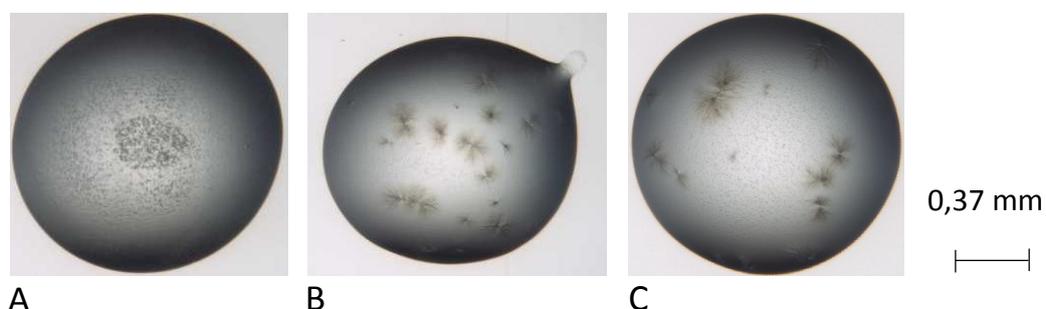


Figure n° 110. Cristallisation d'IEP32 apo ou en complexe.

Cette figure présente les gouttes obtenues dans la condition de cristallisation : 0,1 M de cacodylate de sodium, 0,2 M acétate de magnésium pH 6,5, 20 % (w/v) PEG 8000, à 20°C pour l'apo-IEP32 (A), pour IEP32-NADP⁺ (B) et pour IEP32-NADPH (C).

En plus de cette condition, deux autres conditions de cristallisation d'IEP32 en présence du NADPH ou NADP⁺ semblent intéressantes :

- ✓ 1 : 0,1 M CHES pH 9,5, 20 % (w/v) PEG 8000
- ✓ 2 : 0,2 M chlorure de sodium, 0,1 M CAPS pH 10,5, 20 % (w/v) PEG 8000

La condition 1 a permis **d'obtenir un cristal du complexe IEP32-NADPH dont la surface est irrégulière** (figure n° 111.A). La mise à l'échelle n'a pas permis d'aboutir à la formation de cristaux exploitables. Pour la condition 1, 0,1 M CHES pH 9,5, 20 % (w/v) PEG 8000, une variation du pourcentage de précipitant a été réalisée de 8 % à 20 % d'un pas de 2 % pour des gouttes de 0,5µL/0,5µL (protéine/solution mère). Les complexes testés sont IEP32 liée au NADPH (complexe donnant le cristal en plaque de 96 puits) et IEP32 liée au NADP⁺. Aucun cristal n'a été obtenu. La stratégie a donc été de se concentrer sur la seconde condition.

La condition **2 a permis d'obtenir des cristaux d'IEP32-NADP⁺ et d'IEP32-NADPH au bout de 24 heures** en forme d'étoiles dans les plaques de 96 puits (figure n° 111.B). Pour la condition **2**, 0,2 M chlorure de sodium, 0,1 M CAPS pH 10,5, 20 % (w/v) PEG 8000, une variation du pourcentage de précipitant a été réalisée de 6 % à 11 % et de 20 % à 25 % avec un pas de 1 %, puis de 12 % à 18 % avec un pas de 2 %. Les gouttes ont un volume de 1 μ L/1 μ L et de 0,5 μ L/0,5 μ L. Les complexes utilisés ont été IEP32-NADPH, IEP32-NADP⁺ et IEP32-NADP⁺-nonanal. Même si le complexe avec le nonanal n'a pas été testé avec les plaques de 96 puits, il était intéressant de vérifier si cette condition pouvait être également favorable à la cristallisation de ce complexe. Pour les deux autres complexes, des formes apparaissaient donc au bout de deux semaines dans la goutte mais l'aspect mettait en évidence que **les cristaux se formaient, grandissaient pour ensuite « rétrécir »**. Les cristaux en présence de NADP⁺ et NADPH se sont formés dans un précipité. Il est alors possible que la protéine ou le cofacteur soient instables dans le temps ce qui expliquerait l'observation précédente sur le rétrécissement des cristaux. Ceci se confirme par le fait que le NADPH est instable en solution. Ce comportement a été observé pour le complexe IEP32 liée au NADP⁺ à la concentration en précipitant de 12 %. A 14 % de précipitant, un précipité s'est formé bien qu'il y ait des points de nucléation supplémentaire. Cela indique donc que la condition se situe à la limite de la zone de nucléation et que pour favoriser l'apparition et la croissance des cristaux, la concentration en précipitant doit être inférieure à 14 %. Des tests d'ensemencement auraient pu être réalisés.

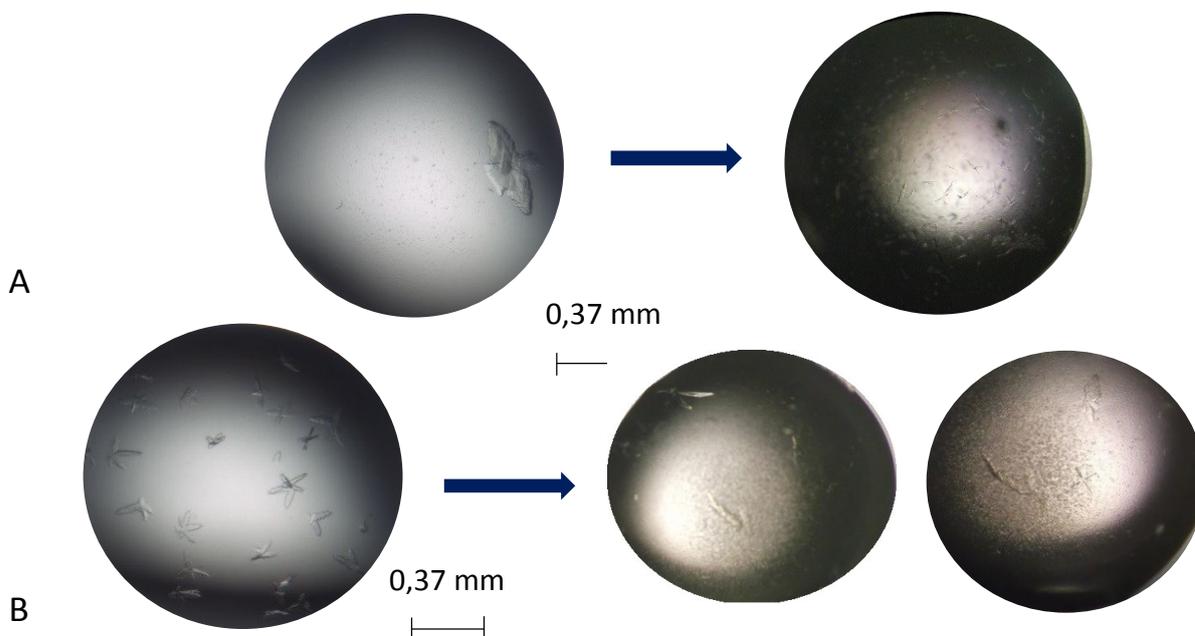


Figure n° 111. Cristaux d'IEP32-NADPH.

La première goutte est celle obtenue à l'aide du robot de cristallisation suivi des gouttes reproduites manuellement dans les conditions : **A.** 0,1 M CHES pH 9,5, 20 % PEG 8000 et **B.** 0,2 M chlorure de sodium, 0,1 M CAPS pH 10,5, 12 % PEG 8000.

2.3 Diffraction des cristaux d'IEP32-NADPH

Les cristaux présentés précédemment ont été congelés sans ou avec cryoprotectant (20 % de glycérol). Seul un cristal d'IEP32-NADPH a diffracté les rayons X à 7 Å de résolution (figure n° 112). Ce jeu n'a pas pu être traité faute d'une résolution suffisante.

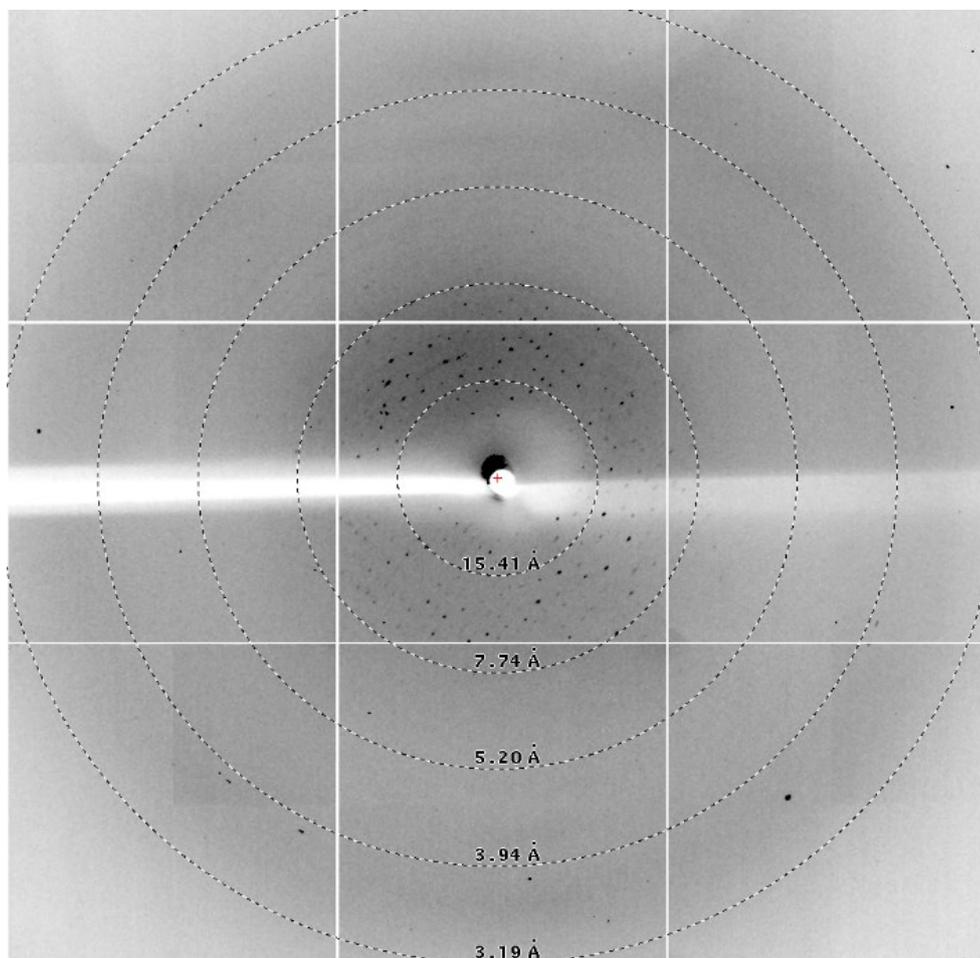


Figure n° 112. Cliché de diffraction d'un cristal d'IEP32-NADPH.

Les conditions de cristallisation obtenues sont difficilement reproductibles. La seconde protéine observée sur le gel SDS-PAGE en fin de purification d'IEP32 pourrait jouer un rôle d'impureté et occasionner un frein à la cristallisation de la protéine. L'objectif est donc de s'en affranchir. La partie suivante décrit la méthode utilisée.

Partie III. Etude d'IEP32HT

1 Insertion d'une étiquette poly-histidine en *N*-terminal d'IEP32 : IEP32HT

Dans le but d'augmenter le taux de pureté d'IEP32 et de favoriser la cristallisation, une étiquette poly-histidine a été insérée (IEP32HT). Précédemment, le Dr Gilles CURIEN avait inséré une étiquette poly-histidine à l'extrémité *C*-terminale ce qui rend la protéine inactive. L'étiquette poly-histidine a donc été insérée à l'extrémité *N*-terminale suivie d'un site de clivage à la protéase Tabacco Etch Virus (TEV).

2 Expression et purification d'IEP32HT dans différentes souches d'*E. coli*

Des tests d'expression et de solubilité ont été réalisés afin de déterminer dans quelles souches et dans quelles conditions, la protéine est présente majoritairement dans la fraction soluble. La condition retenue est une surexpression dans la souche Rosetta 2 avec une induction sur la nuit à 20 °C dans un milieu LB (figure n° 113).

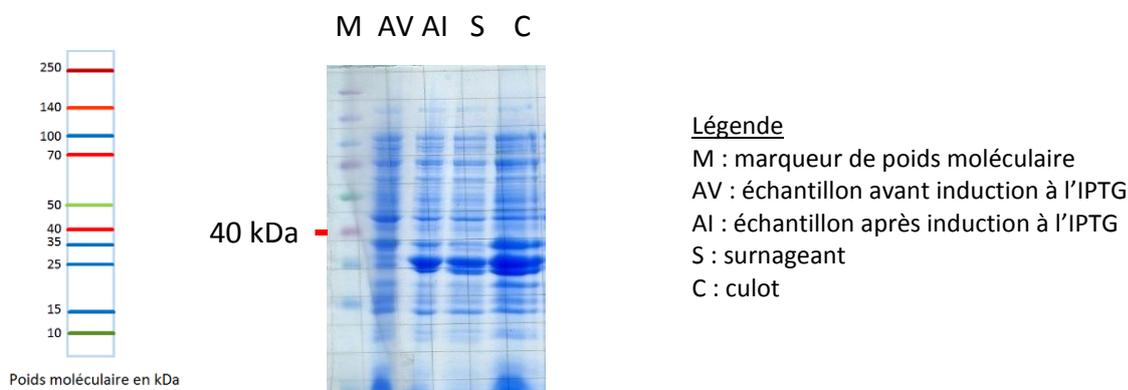


Figure n° 113. Test d'expression et de solubilité d'IEP32HT.

3 Purification d'IEP32HT

Lors de la première étape de purification d'IEP32HT qui est une colonne d'affinité, le contaminant (supposé) présent lors de la purification d'IEP32 co-élue avec IEP32HT jusqu'à une concentration d'environ 0,30 M d'imidazole (P1). En augmentant la concentration en imidazole jusqu'à 0,55 M d'imidazole la protéine dont le poids moléculaire est le plus élevé devient majoritaire jusqu'à ce que la seconde ne soit plus présente (P2) (figure n° 114).

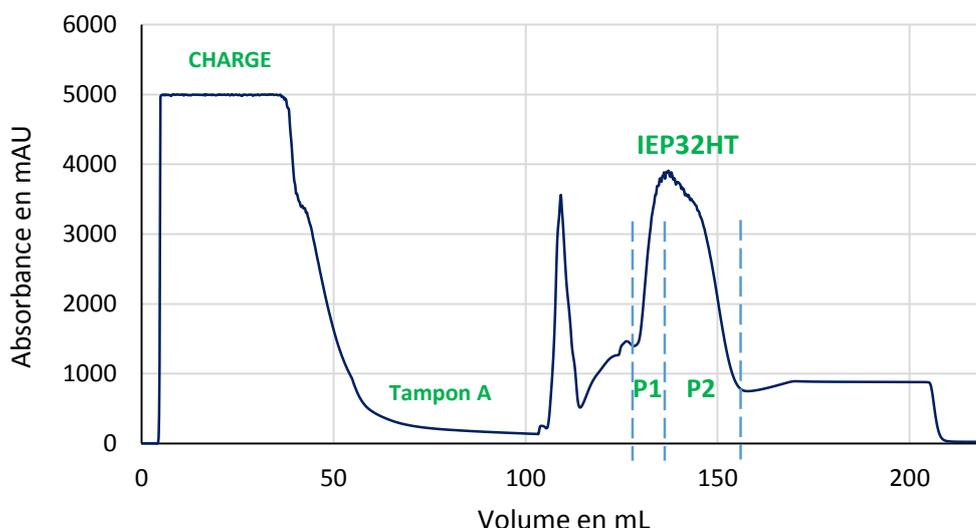


Figure n° 114. Chromatogramme de la colonne de nickel d'IEP32HT.

La charge de l'échantillon a été réalisée jusqu'à 35 mL, puis le retour à la ligne de base s'effectue avec un lavage avec le tampon A (cf. Annexe n° 3), puis l'élution commence à 100 mL. P1 signifie « pool 1 » où les deux protéines (contaminants et IEP32) sont éluées puis celle dont le poids moléculaire est le plus élevé est élue seule au niveau de P2 qui signifie « pool 2 ».

Le clivage de l'étiquette en utilisant la TEV n'a pas fonctionné et a entraîné l'apparition d'un précipité. La TEV ayant un poids moléculaire proche d'IEP32HT, il est difficile de distinguer l'une de l'autre. Après la suppression de ce précipité, une nouvelle étape sur la colonne de nickel a été réitérée afin de savoir si la protéine possédait toujours l'étiquette poly-histidine. Finalement, la protéine avait encore son étiquette poly-histidine car elle a élué à la même concentration en imidazole que précédemment. Les fractions les plus pures ont été concentrées et injectées sur une chromatographie d'exclusion stérique afin de séparer la TEV d'IEP32HT. Une colonne de type Superdex75 HiLoad 16/60 a été utilisée. Deux chromatographies d'exclusion stérique ont été réalisées à la suite de la séparation des fractions de la figure n° 116 contenant une (P1) ou deux (P2) protéines de poids moléculaire avoisinant 34 kDa. Concernant l'échantillon P1, on observe qu'une seule protéine. Concernant l'échantillon P2, le gel SDS-PAGE révèle la présence de deux protéines dans les fractions éluées (figure n° 115).

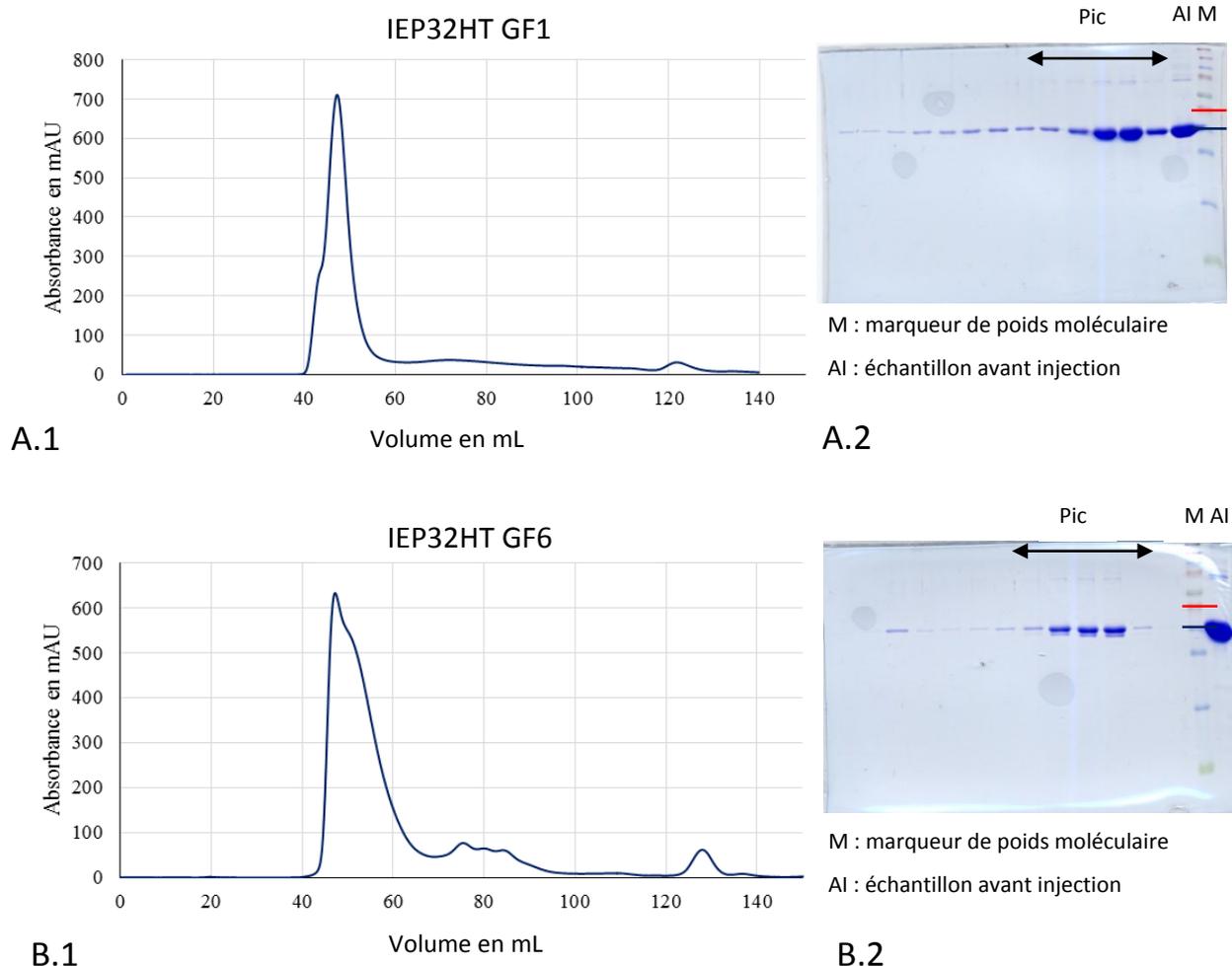


Figure n° 115. Chromatogrammes et gels SDS-PAGE de la purification d'IEP32HT.

A1 et **A2**. Chromatogramme de la « GF1 » avec le gel SDS-PAGE correspondant. La « GF1 » correspond à l'étape où l'échantillon P1 est injecté sur une chromatographie d'exclusion stérique. **B1** et **B2**. Chromatogramme de la « GF6 » avec le gel SDS-PAGE correspondant. La « GF6 » correspondant à l'étape où l'échantillon P2 est injecté sur une chromatographie d'exclusion stérique. Les bandes en rouge et en bleu représentent respectivement la migration pour une protéine de 40 kDa et de 35 kDa.

4 Caractérisation du contaminant présent lors des purifications d'IEP32 et IEP32HT

4.1 Western blot anti-IEP32

Un western blot anti-IEP32 a été réalisé. L'échantillon correspondant au contrôle négatif est la ceQORH. Sur cette piste-là, aucune protéine n'est révélée. Un second échantillon a été déposé correspondant à la protéine IEP32 sans étiquette afin de s'assurer de la spécificité de l'anticorps qui est donc le contrôle positif. Afin d'obtenir des résultats lisibles, différentes concentrations en protéine ont été déposées (figure n° 116).

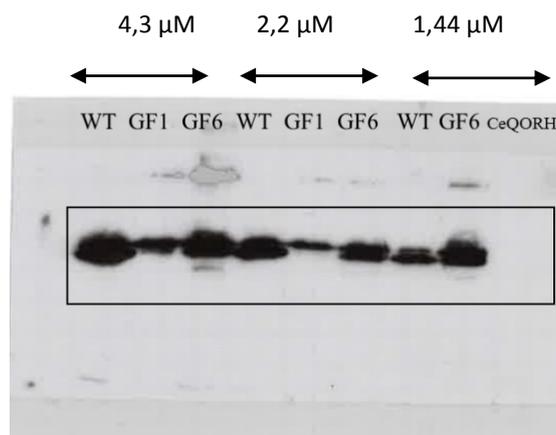


Figure n° 116. Western blot anti-IEP32.

WT : IEP32, GF1 : pool 1 une bande sur gel SDS-PAGE, GF6 : pool 2 deux bandes sur gel SDS-PAGE.

Concernant la piste sur laquelle a été déposée la protéine IEP32 sans étiquette, deux protéines ont été révélées par ce western blot. Il met en évidence que les deux bandes observées sur les gels SDS-PAGE précédents sont bien IEP32 (sauvage ou avec une étiquette). Il est alors fortement probable qu'une des deux bandes observées résultent d'une dégradation de la protéine. Afin de le vérifier cette hypothèse, un western blot anti-histidine a été réalisé.

4.2 Western blot anti-histidine

La ceQORH et IEP32 sans étiquette ont été utilisées comme contrôles négatifs pour le western blot anti-histidine.

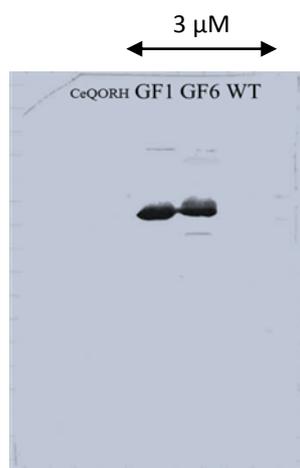


Figure n° 117. Western blot anti-histidine.

WT : IEP32, GF1 : pool 1 une bande sur gel SDS-PAGE, GF6 : pool 2 deux bandes sur gel SDS-PAGE.

L'échantillon **GF1** ne possède qu'une seule protéine possédant l'étiquette **poly-histidine** ce qui est cohérent avec les résultats obtenus pour le western blot anti-IEP32 (une seule protéine aussi). Il en est de même pour l'échantillon GF6 (figure n° 117). Il semblerait que **la dégradation se réalise du côté N-terminal** puisque la seconde protéine n'est pas révélée dans l'échantillon GF6 lors du western anti-histidine. Dans le but de vérifier ces résultats, nous avons effectué un séquençage *N-terminal* d'un échantillon d'IEP32.

4.3 Détermination du contaminant par séquençage *N-terminal*

Le séquençage de l'extrémité *N-terminale* d'un échantillon d'IEP32 révèle **quatre séquences N-terminale différentes**. La première correspond à la séquence sauvage (MWFFG...) dont la population serait majoritaire. La seconde met en évidence la suppression des trois premiers résidus (FGSKG...). La troisième débute au résidu 145 (TKLLL...) puis la dernière commence au résidu 108 (PLNLL...). Ces deux dernières formes seraient minoritaires. Cette analyse a mis en évidence que **la solution est hétérogène** à cause de la présence de plusieurs dégradations d'IEP32 ce qui pourrait expliquer pourquoi la protéine ne cristallise pas ou mal. Cependant lors de la purification d'IEP32HT, la GF1 nous a permis de nous affranchir de la protéine dégradée. C'est pourquoi des tests de cristallogénèse ont été réalisés avec ce lot de protéine.

5 Cristallogénèse d'IEP32HT et IEP32HT-NADPH

5.1 Cristallogénèse d'IEP32HT à l'aide des matrices d'échantillonnage commerciales

Des essais de cristallisation à 20°C d'IEP32HT (NADPH) à la concentration de 5,5 mg/mL ont été réalisés en utilisant la plateforme de l'EMBL. Les mêmes matrices d'échantillonnage que celles utilisées pour IEP32 ont été utilisées. Des micro-cristaux d'IEP32HT-NADPH ont été obtenus dans les conditions suivantes :

- ✓ **1** : 0,2 M sulfate d'ammonium, 0,1 M Bis-Tris pH 6,5, 25 % (w/v) PEG 3350
- ✓ **2** : 0,2 M sulfate de lithium, 0,1 M Bis-Tris pH 6,5, 25 % (w/v) PEG 3350

Ces deux conditions ont été sélectionnées pour l'optimisation manuelle. Pour la condition **1**, une variation de la concentration du PEG 3350 a été testée de 10 à 30 % (avec un pas de 4 %). Puis avec cette même variation, le tampon Bis-Tris pH 6,5 a été remplacé par du Tris pH 8,5 à 0,1 M. Par la suite, d'autres tests ont été réalisés en diminuant le pas du pourcentage de PEG 3350 à 1 %, ceci de 25 % à 30 %. Puis avec cette même variation, le tampon Bis-Tris pH 6,5 a été remplacé par du Tris pH 8,5 à 0,1 M également. Pour la première condition, le tampon retenu est le Bis-Tris pH 6,5. La variation du précipitant est comprise entre 13 à 26 % avec un pas de 1 % (0,5 µL/0,5 µL). Pour la condition **1**, **aucun cristal** n'a été obtenu après diverses tentatives d'amélioration de la condition en changeant la concentration de la protéine, la concentration du PEG, la concentration du tampon et sa nature, le pH...

Pour la condition **2**, une variation de la concentration en PEG 3350 a été testée de 10 à 30 % (avec un pas de 4 %). Puis avec cette même variation, le tampon Bis-Tris pH 6,5 a été remplacé par du Tris pH 8,5 à 0,1 M. Par la suite, d'autres tests ont été réalisés en diminuant le pas de variation du pourcentage de PEG 3350 à 1 %, ceci de 25 % à 30 %. Puis avec cette même variation, le tampon Bis-Tris pH 6,5 a été remplacé par du Tris pH 8,5 à 0,1 M également.

Pour la seconde condition, le tampon retenu est Tris pH 8,5. La variation du précipitant est comprise entre 13 et 26 % avec un pas de 1 %. Par la suite, d'autres tests ont été réalisés en diminuant le pas de variation du pourcentage de PEG 3350 à 1 %, ceci donnant de 18 % à 29 % (0,5 µL/0,5 µL). Des cristaux ont été obtenus avec 0,2 M de lithium sulfate 0,1 M de Tris pH 8,5 et 27 %, 28 % et 29 % de PEG 3350. Les cristaux sont plus réguliers à 28 % de PEG 3350. Ensuite, l'objectif est de savoir si cette condition est reproductible.

Par la suite, pour les mêmes conditions, **des aiguilles ont été obtenues** à 30 % de PEG 3350 et non à 28 %. Puis des cristaux ont été obtenus à 25 % de PEG 3350 que ce soit en présence du tampon initial Bis-Tris pH 6,5 ou de Tris pH 8,5 au bout d'une semaine. L'affinement de la condition **2** a permis d'obtenir des cristaux et de retenir la condition de cristallisation suivante : 0,2 M de sulfate de lithium, 0,1 M de Tris pH 8,5 et entre 25 % et 30 % de PEG 3350 (figure n° 118).

Les conditions identifiées pour IEP32HT-NADPH ont été également testées pour IEP32HT-NADP⁺. Cependant il est difficile de reproduire ces cristaux. Différents tests d'optimisation pour les deux conditions ont été réalisés tels que : la suppression du sel avec une variation de tampon et de précipitant, puis une variation de tampon avec une variation de pH et de précipitant, puis en supprimant le précipitant, ici le PEG, et en variant la concentration du sel

et sa nature avec la nature du tampon, puis la température. Aucune de ces variations n'a pu nous **permettre d'obtenir d'autres cristaux** en plus de ceux obtenus précédemment ou tout simplement **de les reproduire**.

Un test d'ensemencement a été également réalisé mais n'a pu permettre d'obtenir de cristaux. Les conditions testées à 4°C ont induit la formation de précipité. Il semblerait que cela soit dû à la dégradation du NADPH. En effet, le NADPH est reconnu pour être une molécule instable en solution au cours du temps ([Wu et al., 1986](#)). Les tests d'ensemencement n'ont pas permis d'obtenir de cristaux tout comme les tests de cristallisation réalisés à 4°C en utilisant les mêmes conditions.

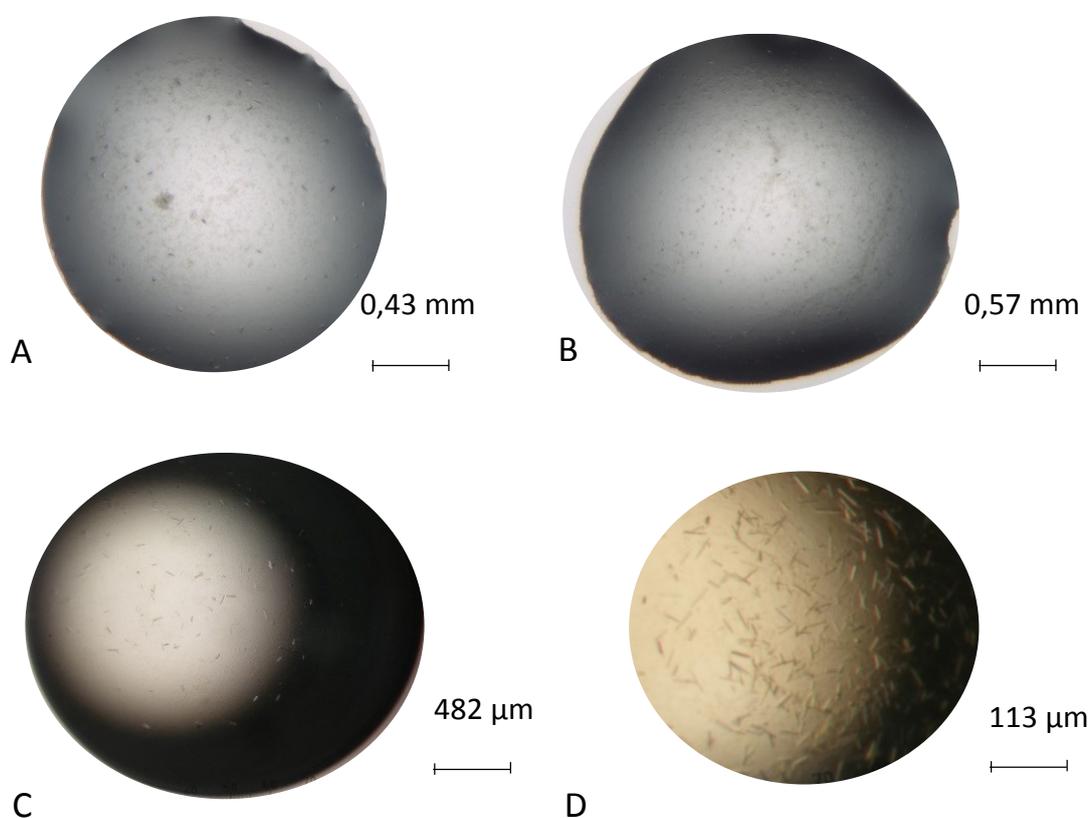


Figure n° 118. Cristaux d'IEP32HT-NADPH.

Cette figure présente les gouttes obtenues avec le robot de cristallisation : **A.** pour la condition 1 : 0,2 M sulfate d'ammonium, 0,1 M Bis-Tris pH 6,5, 25 % (w/v) PEG 3350 **B.** pour la condition 2 : 0,2 M sulfate de lithium, 0,1 M Bis-Tris pH 6,5, 25 % (w/v) PEG 3 350. La seconde partie de la figure présente les gouttes obtenues manuellement dans la condition : **C.** 0,2 M sulfate de lithium, 0,1 M Bis-Tris pH 6,5, 25 % (w/v) PEG 3 350, **D.** 0,2 M sulfate de lithium, 0,1 M Bis-Tris pH 6,5, 28 % (w/v) PEG 3350 (gouttes 0,5 μL/0,5 μL).

5.2 Diffraction des cristaux d'IEP32HT-NADPH

Les cristaux obtenus ont été utilisés pour des tests de diffraction des rayons X sur les lignes FIP-BM30A et ID23 à l'ESRF. Un seul de ces cristaux a diffracté les rayons X à 2,8 Å de résolution, les paramètres de maille sont a, b, c : 77 Å, 111 Å, 154 Å, et α, β, γ : 90°, 90°, 90°.

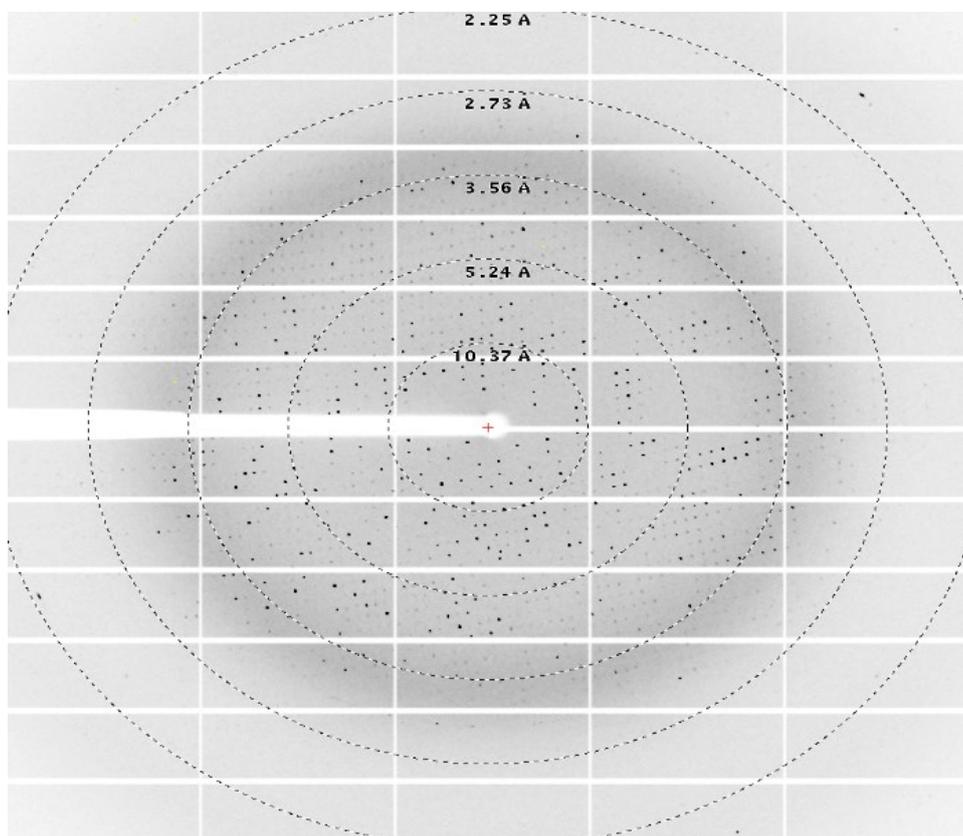


Figure n° 119. Cliché de diffraction d'IEP32HT-NADPH.

Ce cliché de diffraction a été enregistré sur la ligne ID23 à l'ESRF.

Pour résoudre cette structure, nous avons utilisé la technique du remplacement moléculaire en utilisant comme modèle une oxydoréductase de *Mycobacterium paratuberculosis* (code PDB : 3RD5). La séquence de cette protéine recouvre 90 % de celle d'IEP32 et elle possède 42 % d'identité de séquences avec IEP32. Son numéro d'accèsion est Q741V7. Son groupe d'espace est $P2_12_12_1$ et elle a été résolue à une résolution de 1,5 Å. Les paramètres de sa maille sont a, b, c : 64,92 Å; 78,10 Å; 86,22 Å et α, β, γ : 90° ; 90° ; 90°. Le coefficient de Matthews est de 47 % soit indiquant qu'il y a quatre molécules dans l'unité asymétrique. Malheureusement, cette méthode ne nous a pas permis de déterminer les phases du jeu de données d'IEP32HT-NADPH, le modèle n'étant probablement pas suffisamment proche structuralement d'IEP32 et ce même avec 42 % d'identité de séquences.

Partie IV. Conclusions et perspectives sur l'étude d'IEP32

IEP32 a été purifiée en présence d'une seconde forme d'IEP32 qui est une forme d'IEP32 dégradée. La cristallogénèse, nous a permis d'obtenir des cristaux IEP32-NADPH mais diffractant à basse résolution (7 Å). Afin de pallier à ces problèmes, une étiquette poly-histidine a été insérée en *N*-terminal (IEP32HT) et un protocole de purification permettant l'obtention d'une protéine pure a été établi. Nous avons pu obtenir des cristaux **d'IEP32HT-NADPH mais ils ne sont pas reproductibles**. Cependant leur **diffraction est bien meilleure que celle des cristaux d'IEP32-NADPH**. Un jeu de données à 2,8 Å de résolution a pu être enregistré mais le remplacement moléculaire n'a pu aboutir à une solution, faute de l'existence d'homologues structuraux suffisamment proches. N'ayant pas pu reproduire les cristaux, le trempage dans une solution de métaux lourds afin de résoudre le problème de la phase aurait pu être une solution mais sans cristaux cela ne pouvait pas se faire. Seule la méthode de la diffusion anormale à plusieurs longueurs d'ondes (MAD : Multiwavelength Anomalous Diffusion) pourrait être utilisée pour la détermination de la structure d'IEP32 après substitution des méthionines par des sélénométhionines afin d'utiliser le signal anormal du sélénium.

CONCLUSION

GENERALE

CONCLUSION GENERALE

L'étude d'IEP32 a permis de proposer un protocole de purification permettant d'obtenir une protéine pure et cristallisable. Les cristaux d'IEP32HT-NADPH n'ont pas pu être reproduits. Faute d'homologue structural suffisamment proche, la production de la protéine sélénée devra être entreprise pour résoudre le problème de la phase en utilisant la méthode MAD.

L'étude sur la ceQORH a mis en évidence que les molécules substrats de cette enzyme sont des molécules composées d'au minimum de neuf atomes de carbone possédant une insaturation en α , β du carbonyle. Les molécules possédant ce motif sont appelées les carbonyles réactifs. L'affinité de l'enzyme pour les molécules possédant un groupement hydroxyle en γ du carbonyle est meilleure que pour les autres molécules. La concentration cellulaire des γ -kétols dérivés des C18 : 1 et C18 : 2 provenant de la voie des 13-LOX, nous laisse penser que ce sont des substrats biologiques de l'enzyme. Ces molécules sont formées spontanément dans le chloroplaste et sont toxiques pour l'organisme. La ceQORH possédant une activité γ -kétols réductase et étant présente dans le chloroplaste pourrait être impliquée dans la détoxification de la cellule en réduisant ces composés.

En combinant les résultats issus des études de cinétique enzymatique et ceux obtenus en cristallographie aux rayons X ainsi que ceux obtenus en AUC, il est alors possible d'émettre des hypothèses sur le fonctionnement de l'enzyme. Le comportement de la protéine en solution lors de ces expériences met en évidence l'apparition de trois états oligomériques différents de la ceQORH, un monomère, un dimère et un tétramère. Cependant la protéine cristallise dans la forme dimérique. La forme dimérique serait donc la forme la plus stable. Lorsque la ceQORH fixe le NADPH, le cofacteur permettant de réduire le substrat, la ceQORH est sous la forme monomérique en solution et la structure obtenue est dimérique. Aucun changement global de conformation n'est relevé après la fixation du NADPH ou du NADP⁺. Seuls quelques changements structuraux locaux comme la rotation de la chaîne latérale de l'Arg190 permettant de stabiliser le 2^e phosphate du NADPH sont observés. L'enzyme pourrait alors être active sous la forme monomérique ou dimérique. Cependant la ceQORH est active lorsqu'elle interagit avec la calmoduline. L'hélice ciblée par la calmoduline est responsable de la dimérisation de la ceQORH. Ainsi la ceQORH serait active sous la forme monomérique.

CONCLUSION GENERALE

De nombreuses molécules issues des voies métaboliques des acides gras s'avèrent être des inhibiteurs de la ceQORH. Les inhibiteurs sont issus de voies enzymatiques (13KOT et 13KOD par exemple) ou sont les acides gras libres comme le C18:1, C18:2 et le C18:3. Leur ressemblance chimique et structurale avec les γ -kétols nous laisse supposer que la ceQORH dissocie les molécules substrats des molécules inhibitrices selon un mécanisme complexe et précis que nous n'avons pas pu déterminer avec exactitude.

Nous supposons cependant que l'inhibition de la ceQORH se ferait en deux étapes en solution. Une première phase rapide correspondrait à la fixation de la molécule inhibitrice sur l'enzyme puis une seconde plus lente pourrait être la formation des tétramères observés dans les structures des complexes ceQORH-13KOT, QorNKt et QorNKd et observés en solution. Le positionnement du 13KOT et du 13KOD dans les structures déterminées pourrait expliquer que la ceQORH soit inactive en présence de ces kétodiènes et kétotriènes. Cette observation suggère que le positionnement du γ -kétol dans le site de catalytique de la ceQORH est différent de celui observé pour le 13KOT et le 13KOD.

La formation du complexe de la ceQORH avec le NADPH et le complexe CaM-Ca²⁺ empêcherait la phase lente de l'inhibition de se réaliser. Lorsque la ceQORH inhibée est en présence de la CaM-Ca²⁺, la totalité du substrat ne peut être réduit mais l'enzyme est de nouveau active. La CaM se fixerait alors sur le monomère de la ceQORH d'après les résultats de docking. Le rôle de cette interaction est encore inconnu. Il se pourrait que la CaM puisse réguler l'activité de la ceQORH. La ceQORH n'agit pas seule dans la réponse au stress oxydant. D'autres enzymes de détoxification interviennent également pour diminuer l'activité des molécules hyper-réactives produites à la suite d'un stress. La redondance des mécanismes de détoxification permet de protéger l'intégrité de la cellule végétale nécessaire à son développement.

PUBLICATIONS



Contents lists available at ScienceDirect

Phytochemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/phytochem



The chloroplast membrane associated ceQORH putative quinone oxidoreductase reduces long-chain, stress-related oxidized lipids

Gilles Curien^{a,b,c,d,*}, Cécile Giustini^{a,b,c,d}, Jean-Luc Montillet^e, Sarah Mas-y-Mas^f, David Cobessi^f, Jean-Luc Ferrer^f, Michel Matringe^{a,b,c,d}, Alexander Grechkin^g, Norbert Rolland^{a,b,c,d}

^a Univ. Grenoble Alpes, F-38054 Grenoble, France

^b Commissariat à l'Energie Atomique et aux Energies Alternatives, Direction des Sciences du Vivant, Institut de Recherches en Technologies et Sciences pour le Vivant, F-38054 Grenoble, France

^c INRA, USC1359, 17 rue des Martyrs, F-38054 Grenoble, France

^d CNRS, Laboratoire de Physiologie Cellulaire & Végétale, UMR 5168, 17 rue des Martyrs, F-38054 Grenoble, France

^e Commissariat à l'Energie Atomique et aux Energies Alternatives, Centre de Cadarache, Direction des Sciences du Vivant (DSV), Institut de Biologie Environnementale et Biotechnologie (IBEB), Service de Biologie Végétale et de Microbiologie Environnementale (SBVME), Laboratoire d'Ecophysiologie Moléculaire des Plantes, UMR 7265, Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS)/CEA/Aix-Marseille Université, F-13108 Saint-Paul-lez-Durance, France

^f Institut de Biologie Structurale, Univ. Grenoble Alpes, CNRS, CEA, 71 Avenue des Martyrs, 38044 Grenoble, France

^g Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics, Russian Academy of Sciences, P.O. Box 30, 420111 Kazan, Russia

ARTICLE INFO

Article history:

Received 11 August 2015

Received in revised form 16 November 2015

Accepted 30 November 2015

Available online xxx

Keywords:

Chloroplast

Alkenone reductase

Reactive electrophile species

γ -Ketols

Jasmonate

Oxylipin

ABSTRACT

Under oxidative stress conditions the lipid constituents of cells can undergo oxidation whose frequent consequence is the production of highly reactive α,β -unsaturated carbonyls. These molecules are toxic because they can add to biomolecules (such as proteins and nucleic acids) and several enzyme activities cooperate to eliminate these reactive electrophile species. CeQORH (chloroplast envelope Quinone Oxidoreductase Homolog, At4g13010) is associated with the inner membrane of the chloroplast envelope and imported into the organelle by an alternative import pathway. In the present study, we show that the recombinant ceQORH exhibits the activity of a NADPH-dependent α,β -unsaturated oxoene reductase reducing the double bond of medium-chain ($C \geq 9$) to long-chain (18 carbon atoms) reactive electrophile species deriving from poly-unsaturated fatty acid peroxides. The best substrates of ceQORH are 13-lipoxygenase-derived γ -ketols. γ -Ketols are spontaneously produced in the chloroplast from the unstable allene oxide formed in the biochemical pathway leading to 12-oxo-phytodienoic acid, a precursor of the defense hormone jasmonate. In chloroplasts, ceQORH could detoxify 13-lipoxygenase-derived γ -ketols at their production sites in the membranes. This finding opens new routes toward the understanding of γ -ketols role and detoxification.

© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Among biomolecules, lipids are particularly prone to oxidation. Enzymatic processes mediated by lipoxygenases (LOXs¹) and α -dioxygenases (α -DOX) or non-enzymatic mechanisms depending on reactive oxygen species (ROS) can lead to peroxidation of

poly-unsaturated fatty acids, giving rise to accumulation of aldehydes, ketones, and α,β -unsaturated carbonyls of various chain lengths, collectively known as oxylipins (Andreou et al., 2009; Blée, 1998, 2002; Farmer and Davoine, 2007, 2013; Leonarduzzi et al., 2000; Mueller and Berger, 2009). These events take place in oxidative stress conditions in both animal and plant cells. α,β -unsaturated carbonyls are considered among the most reactive oxidized molecules, and are toxic because of their ability to form adducts with cysteine, lysine, histidine and nucleic acids (Blair, 2008; Esterbauer et al., 1991). As shown in Fig. 1, four mechanisms contribute to metabolize α,β -unsaturated carbonyls: (a) NAD(P)⁺ oxidation of the aldehyde function, (b) NAD(P)H reduction of the carbonyl function, (c) NAD(P)H reduction of the double bond and (d) coupling the double bond with glutathione. In addition to their cytotoxic effects several reactive electrophile species oxylipins,

Abbreviations: 12-OPDA, 12-oxo-phytodienoic acid; AtAER, *Arabidopsis thaliana* alkenal reductase; AtAOR, *Arabidopsis thaliana* alkenone reductase; ceQORH, chloroplast envelope Quinone Oxidoreductase Homolog; LOX, lipoxygenase; RES, reactive electrophile species; ROS, reactive oxygen species.

* Corresponding author at: Laboratoire de Physiologie Cellulaire et Végétale, Commissariat à l'Energie Atomique et aux Energies Alternatives, Direction des Sciences du Vivant, Institut de Recherches en Technologies et Sciences pour le Vivant, 17 avenue des Martyrs, F-38054 Grenoble, France.

E-mail address: gilles.curien@cea.fr (G. Curien).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.phytochem.2015.11.015>
0031-9422/© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Please cite this article in press as: Curien, G., et al. The chloroplast membrane associated ceQORH putative quinone oxidoreductase reduces long-chain, stress-related oxidized lipids. *Phytochemistry* (2015), <http://dx.doi.org/10.1016/j.phytochem.2015.11.015>

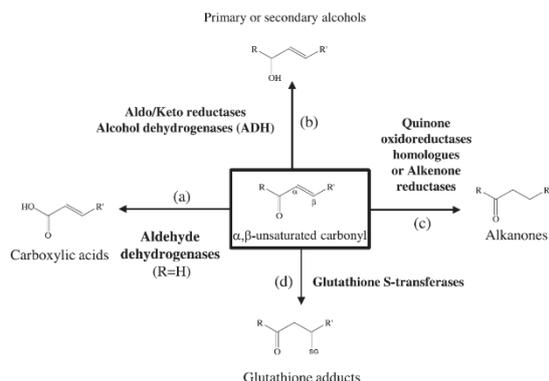


Fig. 1. Detoxification of reactive α,β -unsaturated carbonyl compounds.

(RES oxylipins) such as oxophytodienoic acid (OPDA) and phyto prostanes have been shown to exert signaling functions given they are able to induce the expression of genes related to detoxification and defense (Mueller et al., 2008).

In plants, polyunsaturated fatty acids in the chloroplast membranes are the most prone to oxidation due to photosynthetic activity and enzyme specific peroxidation mechanisms (Schaller and Stintzi, 2009; Yamauchi et al., 2008; Zoeller et al., 2012). Plastidial mechanisms of detoxification of lipid oxidation products are not completely understood but it was recently shown that plant chloroplasts are equipped with the following enzymes to detoxify α,β -unsaturated carbonyls: an aldehyde dehydrogenase ALDH3I1 (At4g34240, (Kirch et al., 2001; Kotchoni et al., 2006; Stiti et al., 2011, 2014)), two aldehyde reductases (At1g54870, At3g04000, (Yamauchi et al., 2011)) an aldoketoreductase AKR4C9 (At2g37770, (Yamauchi et al., 2011)), a glutathione S-transferase (AtGSTF8, (Foley et al., 2006; Thatcher et al., 2007; Wagner et al., 2002)) and an alkenone oxidoreductase AtAOR, also annotated quinone oxidoreductase (At1g23740, (Yamauchi et al., 2012, 2011)).

We previously identified a protein of the chloroplast envelope (Ferro et al., 2003; Miras et al., 2002) annotated as a quinone oxidoreductase (ceQORH, At4g13010). We discovered that this protein enters the chloroplast by an alternative import pathway (Miras et al., 2002, 2007), but its enzymatic activity was not yet characterized. Recently, the activity and specificity of a homolog of ceQORH in Arabidopsis, the alkenone oxidoreductase named AtAOR (Yamauchi et al., 2012), which is located in the stroma was elucidated. This protein was shown to reduce the double bond of α,β -unsaturated carbonyls in molecules containing less than 5 carbon atoms.

In the present work we show that – in marked difference with AtAOR, – ceQORH is inactive on α,β -unsaturated ketone in molecules containing less than 5 carbon atoms. Instead, it presents a *bona fide* oxoene reductase activity on a specific class of long-chain (C18) α,β -unsaturated ketones called γ -ketols, produced spontaneously in the jasmonate biosynthetic pathway. This work represents the first molecular identification of a γ -ketol reductase activity. This finding opens new routes toward the understanding of γ -ketols role in plant physiology.

2. Results

2.1. ceQORH oxidizes NADPH in the presence of long-chain (C > 9) α,β -unsaturated carbonyls

ceQORH belongs to the quinone oxidoreductase (QOR) family, a member of the large superfamily of zinc-independent Medium

chain Dehydrogenases/Reductases (MDR) (Nordling et al., 2002). Despite its annotation as a “quinone oxidoreductase” ceQORH was inactive with the following quinones: duroquinone, decylubiquinone, coenzyme Q0, menadione, menaquinone and phyloquinone.

Recently, a soluble quinone oxidoreductase-like protein from *Arabidopsis thaliana* chloroplast (At1g23740, AtAOR, for *A. thaliana* Alkenone Reductase (Yamauchi et al., 2011)) has been shown to catalyse the NADPH-dependent reduction of double bond of short carbon chain alkenes such as α,β -unsaturated aldehydes (propenal, butenal) or ketones (3-buten-2-one, 1-penten-3-one and 4-hexen-3-one). However, the AtAOR enzyme was inactive on molecules having more than 6 carbon atoms.

As the chloroplastic AtAOR is a homolog of ceQORH, we have tested ceQORH activity on similar molecules in the presence of NADPH. However, in contrast to AtAOR (Yamauchi et al., 2012), ceQORH was unable to reduce the double bond of short-chain alkenals and alkenones such as acrolein, crotonaldehyde, 3-buten-2-one, 4-hexen-3-one or *trans*-2-hexenal (compound 1, Table 1). Yet, very low catalytic efficiencies (k_{cat}/K_M) were measured on 9 and 10 carbon compounds such as *trans*-2-nonenal ($6 \cdot 10^{-4} \mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$, compound 2, Table 1 and Fig. 2A) and *trans*-3-decen-2-one ($3 \cdot 10^{-4} \mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$, compound 3, Table 1 and Fig. 2B). These results suggest that ceQORH displays an alkenal/one reductase activity as observed for AtAOR but with a preference for α,β -unsaturated carbonyls with carbon chain lengths higher than 9.

Another homolog of ceQORH from *A. thaliana* is a broad specific cytosolic alkenal reductase, AtAER (Babiychuk et al., 1995; Mano et al., 2000, 2005, 2002) which was shown to reduce with high efficiency the double bond of 9 carbon-chain highly reactive alkenals such as 4-hydroxynonenal, 4-oxo-nonenal and the 18 carbon ketodienes 9-KODE and 13-KODE (Mano et al., 2005).

These molecules have been assessed as potential substrates of ceQORH. We could detect NADPH-dependent reduction in the presence of 4-hydroxynonenal (compound 4, Table 1 and Fig. 2C), but the apparent affinity was so low that a catalytic constant could not be determined.

The ketodienes 9-KODE (14) and 13-KODE (15) are not substrates of ceQORH (Table 1) and this differs from what had been observed with the cytosolic AtAER which displayed high catalytic efficiencies for both ketodienes (Mano et al., 2005). On the contrary, ceQORH apparent affinity was high for 4-oxo-nonenal (6, Table 1 and Fig. 2D) with a K_M of 200 μM and a high catalytic constant (14 s^{-1}).

2.2. ceQORH is a NADPH-dependent double bond reductase

In the experiments described above a stoichiometry of one NADPH consumed per substrate molecule was measured (not shown), suggesting that only one chemical function was reduced (either the carbonyl function or the carbon-carbon double bond). Both AtAER and AtAOR are specific for the double bond function (Mano et al., 2005; Yamauchi et al., 2011) and considering their high sequence similarity with ceQORH, we expected the same specificity for the latter. However, the differences in substrate specificity described above prompted us to verify this assumption. For this purpose we used an artificial α,β -unsaturated ketone, *trans*-1,3-diphenyl-2-propenone (7, Table 1) that proved to be a substrate for ceQORH (Fig. 3A) and displays specific spectral properties. Reduction of the double bond leads to disappearance of absorption at 312 nm but absorption at 250 nm remains, allowing detection of the reduced molecule.

HPLC analyses (Fig. 3B–D) showed that the reduction of 1,3-diphenyl-2-propenone is concomitant with a decrease in absorbance at 312 nm indicating that conjugated enone was lost.

Table 1
Long-chain α,β -unsaturated carbonyls reduced (circles) or not reduced by ceQORH.

	Molecule name	Structure	k_{cat}/K_M ($\mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$)
1	<i>Trans</i> -2-hexenal		0
2	<i>Trans</i> -2-nonenal		0.0006
3	<i>Trans</i> -3-decen-2-one		0.0003
4	4-Hydroxynonenal		0.001
5	Traumatin		0.002
6	4-Oxononenal		0.073
7	<i>Trans</i> -1,3 diphenyl-2-propenone		0.25
8	<i>Trans</i> -1,4-diphenyl-2-butene-1,4-dione		0.4
9	<i>Trans</i> -EKODE-Ib ^a		0.17
10	9,12 γ -ketol 18:1 ^b		0.43
11	9,12 γ -ketol 18:2 ^c		0.3
12	10-keto-9,13-diol ^d		0.07
13	α -ketol ^e		0
14	9-KODE ^f		0
15	13-KODE ^g		0
16	12-OPDA ^h		0

^a 9-Oxo-12,13-epoxy-(10E)-octadecenoic acid.

^b 9-Hydroxy-12-oxo-10(E)-octadecenoic acid.

^c 9-Hydroxy-12-oxo-10(E),15(Z)-octadecadienoic acid.

^d 9,13-Dihydroxy-10-oxo-11-octadecenoic acid.

^e 13-Hydroxy-12-oxo-9(Z)-octadecenoic acid.

^f 9-Oxo-10(E),12(Z)-octadecadienoic acid.

^g 13-Oxo-9(Z),11(E)-octadecadienoic acid.

^h 12-Oxo-10,15(Z)-phytyldienoic acid.

A new compound absorbing at 250 nm appears, eluted before 1,3-diphenyl-2-propenone (Fig. 3D). In order to discriminate between the reduction of the carbonyl or the carbon-carbon double bonds, we compared the HPLC elution profile of the reaction product (Fig. 4) with that of the genuine *trans*-1,3-diphenyl-2-propen-1-ol (i.e. the molecule that would be obtained by reduction of the ketone group). Chromatograms (Fig. 4) revealed that complete reduction of 1,3-diphenyl-2-propenone by ceQORH in the presence of NADPH leads to the appearance of a compound slightly less hydrophobic than 1,3-diphenyl-2-propenone (Fig. 4D), that does not absorb anymore at 312 nm (Fig. 3C) and with an elution profile

different from that of 1,3-diphenyl-2-propen-1-ol (Comparison of elution profiles of Fig. 4B and D). Mass analyses (Fig. 5) using the *trans*-1,3 diphenyl propenone as substrate showed a gain of mass of 2 Da after reaction with ceQORH and NADPH (Fig. 5A–C) that is consistent with reduction of the double bond of the substrate (Fig. 5D). Together, these data indicate that ceQORH catalyses the NADPH-dependent reduction of the carbon-carbon double bond of α,β -unsaturated carbonyls but does not reduce the ketone function. No NADPH consumption could be observed in the presence of 1,3-diphenyl-2-propen-1-ol indicating that the enzyme activity requires the presence of a ketone function.

Please cite this article in press as: Curien, G., et al. The chloroplast membrane associated ceQORH putative quinone oxidoreductase reduces long-chain, stress-related oxidized lipids. *Phytochemistry* (2015), <http://dx.doi.org/10.1016/j.phytochem.2015.11.015>

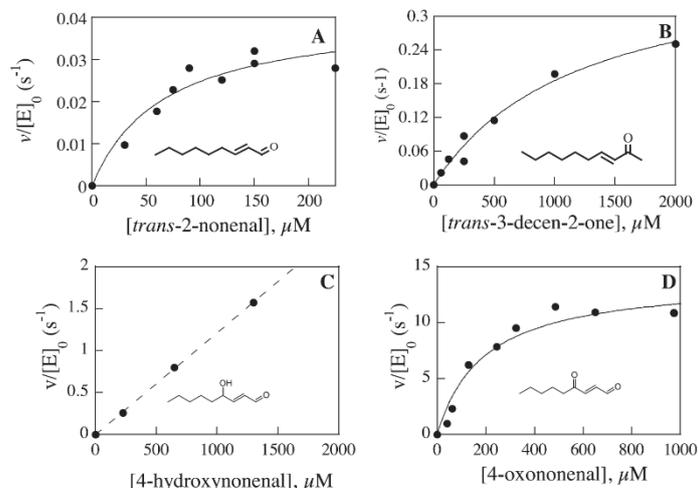


Fig. 2. ceQORH activity in the presence of C9 and C10 α,β -unsaturated carbonyls. (A) ceQORH activity was measured as a function of *trans*-2-nonenal concentration. $k_{\text{cat}} = 0.04 \pm 0.005 \text{ s}^{-1}$, $K_M = 66 \pm 25 \text{ }\mu\text{M}$. (B) ceQORH activity was measured as a function of *trans*-3-decen-2-one concentration. The apparent affinity was too low to determine K_M and k_{cat} parameters accurately. (C) ceQORH activity was measured as a function of 4-hydroxynonenal concentration. The apparent affinity for this molecule was very low and neither k_{cat} nor K_M could be determined. (D) ceQORH activity was measured as a function of 4-oxo-nonenal concentration. $k_{\text{cat}} = 14 \pm 1 \text{ s}^{-1}$, $K_M = 190 \pm 50 \text{ }\mu\text{M}$.

ceQORH is highly specific for NADPH rather than NADH with a specificity constant 360-times higher for NADPH ($k_{\text{cat}}/K_M = 0.6 \text{ }\mu\text{M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) than for NADH ($k_{\text{cat}}/K_M = 0.00165 \text{ }\mu\text{M}^{-1} \text{ s}^{-1}$), (not shown).

2.3. ceQORH shows a preference for long-chain α,β -unsaturated ketones with an oxygenated substituent in the γ position

The catalytic efficiency (k_{cat}/K_M) of ceQORH for the substrates 4-hydroxy-nonenal and 4-oxo-nonenal are respectively 6500-times and 220-times lower than that of *A. thaliana* cytosolic AtAER (Mano et al., 2005) with the same molecules (Table 2), suggesting that these two compounds are not the physiological substrates of ceQORH. We thus searched for long-carbon chain molecules containing an enone motif as possible substrates. We first assayed the commercially available unsaturated γ -diketone, *trans*-1,4-diphenyl-2-butene-1,4-dione (compound 8 in Table 1). Compared to 1,3-diphenyl-2-propenone (7), this molecule displays an additional ketone in the γ position. However, the activity of ceQORH on *trans*-1,4-diphenyl-2-butene-1,4-dione ($K_M = 9 \text{ }\mu\text{M}$, $k_{\text{cat}} = 4.5 \text{ s}^{-1}$, Fig. 6A, Table 1) was similar to that observed on 1,3-diphenyl-2-propenone (Fig. 3A, Table 1), indicating that the presence of an additional ketone in position γ does not modify neither affinity nor turn-over of the enzyme.

In vivo, peroxidation of polyunsaturated fatty acids can generate metabolites with α,β -unsaturated ketone and an oxygenated substituent in the γ position. For example the unsaturated epoxy ketone (epoxy-keto-octadecenoic acid or *trans*-EKODE-(*E*)-Ib) can be produced in mammals (Adachi et al., 2006; Gardner et al., 1974; Lin et al., 2007). As shown in Fig. 6B, *trans*-EKODE-(*E*)-Ib (9, Table 1) is efficiently reduced by ceQORH ($k_{\text{cat}}/K_M = 0.18 \text{ }\mu\text{M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, Table 1).

Based on these observations we thus tested γ -ketols (Feng et al., 1981; Gardner et al., 1975; Grechkin, 1998; Grechkin et al., 1991b, 2000a,b), another class of α,β -unsaturated ketones bearing a hydroxyl group in position γ (9,12 γ ketol 18:1, 10; 9,12 γ ketol 18:2, 11; 10-keto 9,13 diol, 12, Table 1). γ -ketols are interesting putative physiological substrates as they can be produced in plants

under normal growth conditions (Theodoulou et al., 2005), and their concentration increases in damaged tissues (Buseman et al., 2006) or at a distance from the bite zone when they are attacked by caterpillars (Schulze et al., 2007). As shown in Fig. 6C and D a strong reducing activity was detected on γ -ketols deriving from peroxidation of linoleate or linolenate in position 13 (9,12 γ -ketol 18:1, $k_{\text{cat}} = 6 \text{ s}^{-1}$, $K_M = 14 \text{ }\mu\text{M}$, Fig. 6C, and 9,12 γ -ketol 18:2, $k_{\text{cat}} = 3 \text{ s}^{-1}$, $K_M = 10 \text{ }\mu\text{M}$, Fig. 6D).

In 2000, Grechkin et al. (2000a), reported existence in tulip bulb extract of a reductase activity that was able to reduce a γ -ketol produced from 18:2 9-hydroperoxide (10-keto-9,13-diol, 12, Table 1). This molecule has been tested in the present study and proved to be also reduced by ceQORH ($k_{\text{cat}}/K_M = 0.08 \text{ }\mu\text{M}^{-1} \text{ s}^{-1}$), though k_{cat} value was about ten-fold lower than for the γ -ketols 10 and 11.

Another interesting putative substrate was the wound hormone traumatin (12-oxo-10(*E*) dodecanoate), which is implicated in wound signaling in plants (Zimmerman and Coudron, 1979). This molecule is a twelve carbon atom α,β -unsaturated aldehyde (5, Table 1) produced in the chloroplast envelope by hydroperoxide lyase (Blée and Joyard, 1996) downstream of 13-LOXs. As shown in Fig. 6F, this molecule was indeed a substrate of ceQORH. However, the apparent affinity was low and kinetic parameters could not be determined. Specificity constant, estimated as the slope of the curve in the range 0–250 μM , was only twofold higher than for 4-hydroxynonenal ($0.002 \text{ }\mu\text{M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, Table 1).

No activity was detected with the α -ketol (13-hydroxy-12-oxo-9(*Z*)-octadecenoic acid, 13, Table 1). α -ketols are produced along with γ -ketols from allelic oxides (see discussion) but are not α,β -unsaturated ketones. Also ceQORH did not reduce the double bond of 12-OPDA (16, Table 1), hence does not participate to the jasmonate biosynthesis (Schaller and Stintzi, 2009). The 12-oxo-cis-10,15-phytyldienoate reduction is thus only provided by the oxophytodienoic acid reductase OPR3 (AT2G06050, (Schaller et al., 2000)).

Together our data enable to summarize the substrate specificity of ceQORH, as follows. The apparent affinity of the enzyme for *trans*-3-decen-2-one (3, 10 carbon atoms) was much lower than

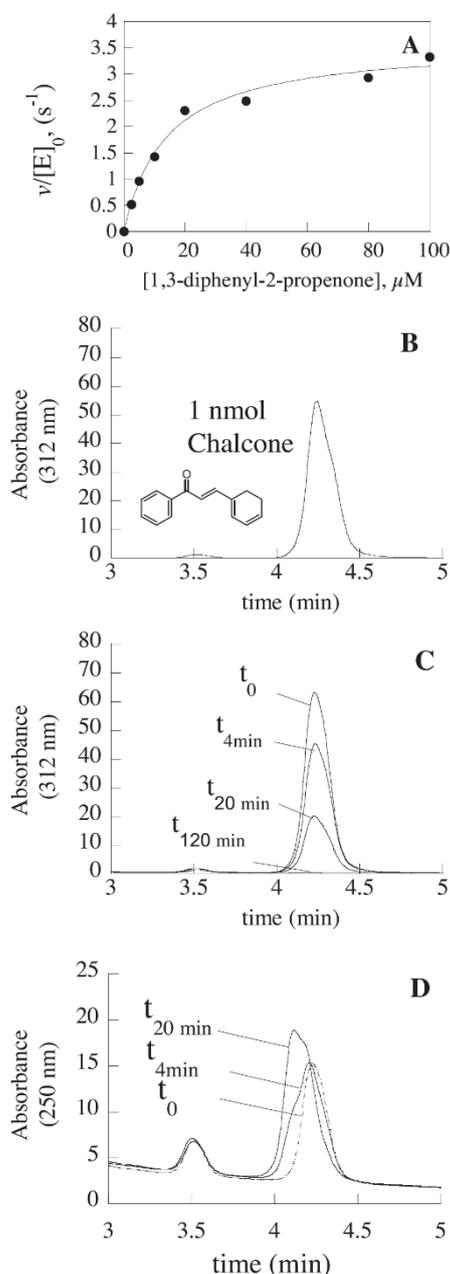


Fig. 3. HPLC analyses of the reaction catalyzed by ceQORH in the presence of *trans*-1,3-diphenyl-2-propenone and NADPH at 312 nm (maximum of absorption of bisphenylpropenone). (A) ceQORH activity was measured as a function of the *trans*-1,3-diphenyl-2-propenone concentration in the presence of NADPH ($k_{cat} = 3.6 \pm 1.5 \text{ s}^{-1}$, $K_M = 14 \pm 2 \mu\text{M}$). (B) HPLC profile of 1 nmol of *trans*-1,3-diphenyl-2-propenone. The alkene function is responsible of the absorption at 312 nm. (C) Chromatograms of the complete reaction mixture at different reaction times. The decrease in absorbance at 312 nm demonstrates that CeQORH reduces the alkene function. (D) Same as in C with the absorption measured at 250 nm showing the time dependent appearance of a novel product eluted earlier. The absorption of the peak eluted at 3.5 min does not change at 312 nm or 250 nm and most certainly corresponds to the *cis*-isomer of 1,3-bisphenyl-2-propenone.

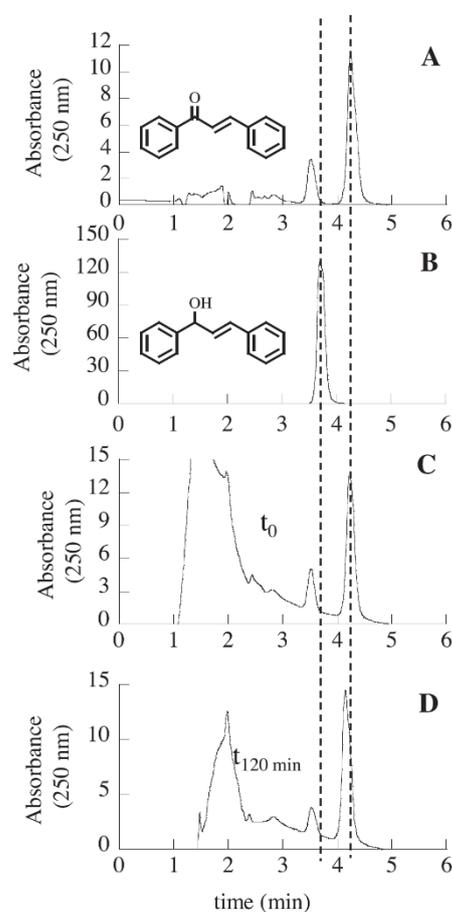


Fig. 4. Characterization of the C=C double bond reductase activity of ceQORH by HPLC at 250 nm (maximum of absorption of the phenyl groups). (A) HPLC profile of *trans*-1,3-diphenyl-2-propenone elution. (B) HPLC profile of *trans*-1,3-diphenyl propene-2-ol. (C) Zero time and D time 120 min of a reaction carried out in the presence of 200 μM NADPH, 100 μM *trans*-1,3-diphenyl-2-propenone and ceQORH. The figure shows that *trans*-1,3-diphenyl propene-2-ol is not formed after reaction with NADPH, *trans*-1,3-diphenyl-2-propenone and ceQORH, indicating that ceQORH does not display any carbonyl reductase activity.

for 18 carbon atom enones such as γ -ketols. This strongly suggests that ceQORH affinity increases with the carbon-chain length of the substrate.

In oxylipins that contain an α,β -unsaturated ketone motif, the position of the ketone group with respect to the carboxylate function does not appear to be a strict determinant of the apparent affinity. Indeed, though this position is different in *trans*-EKODE-(*E*)-1b (the ketone is on carbon 9), in 10-keto 9,13 diol (the ketone is on carbon 10) and in 13-LOX-derived γ -ketols (the ketone is on carbon 12), the K_M values remained in the micromolar range. It should be noted, however, that ceQORH is about five/ten-fold more active on the 13-LOX-derived γ -ketols than on *trans*-EKODE-(*E*)-1b and 10-keto-9,13-diol (Table 1).

The presence of an oxygenated substituent in position γ of the ketone does not contribute to the affinity for the substrate as 1,3-diphenyl-2-propenone and the γ -diketone 1,4-diphenyl-2-butene-1,4-dione are metabolized with similar efficiencies.

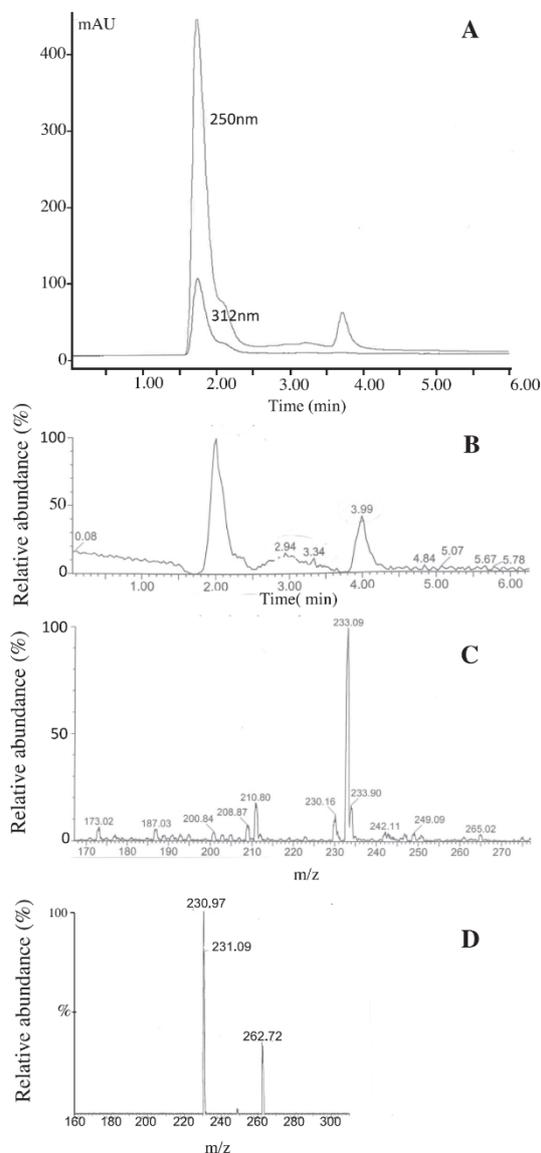


Fig. 5. LC/MS analyses of the reaction catalyzed by ceQORH in the presence of *trans*-1,3-diphenyl-2-propenone and NADPH. (A) HPLC chromatogram recorded at 250 and 312 nm of a 90 min reaction. (B) LC/MS chromatogram. (C) MS spectrum of the elution peak at 3.99 min. The peak with $m/z = 233.09$ corresponds to the sodium ion of *trans*-1,3-diphenyl-2-propanone (D) MS spectrum of *trans*-1,3-diphenyl-2-propenone ($m/z = 230.97$ corresponds to the sodium ion of *trans*-1,3-diphenyl-2-propenone).

Finally, the carboxylate group in *trans*-EKODE-(*E*)-Ib or γ -ketols does not contribute to the apparent affinity for the substrate as the enzyme displays very similar K_M values for γ -ketols and for *trans*-1,3 diphenyl-2-propenone or *trans*-1,4-diphenyl-2-butene-1,4-dione but low affinity for carboxylate bearing traumatin molecule.

Unexpectedly, the ketodienes 9-KODE and 13 KODE were not substrates of ceQORH. Thus, if an α,β -unsaturated carbonyl motif in ceQORH substrate is a prerequisite for activity (α -ketols are

Table 2
Comparison of ceQORH and AtAER activities with different α,β -unsaturated carbonyls.

	Molecule name	k_{cat}/K_M ($\mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$)	
		ceQORH	AtAER
1	<i>Trans</i> -2-nonenal	0.0006	8.7 ¹
4	4-Hydroxynonenal	0.001	6.5 ¹
5	Traumatin	0.002	1.5
6	4-Oxononenal	0.073	16 ²
7	1,3-Diphenyl-2-propenone	0.25	0.37
8	<i>Trans</i> -1,4-diphenyl-2-butene-1,4-dione	0.4	1.32
9	9,12 γ -ketol C18:1	0.43	1.9
12	10-Keto 9,13 Diol	0.07	0.81
14	9-KODE ^a	0	0.09 ²
15	13-KODE ^b	0	0.28 ²

Figures in bold are from this work.

¹ Mano et al. (2002).

² Mano et al. (2005).

^a 9-Oxo-10(*E*),12(*Z*)-octadecadienoic acid.

^b 13-Oxo-9(*Z*),11(*E*)-octadecadienoic acid.

not substrates), the α,β -unsaturated carbonyl motif, which is present in ketodiene, is not sufficient as these molecules cannot be reduced by ceQORH.

Unsaturated carbonyls are also present in isoflavonoid molecules such as in daidzein but ceQORH did not display any activity on this molecule. Finally, ceQORH did not reduce the double bond in 13(*R,S*)-hydroperoxy-9(*Z*),11(*E*)-octadecadienoic acid (13-HPOD) and 9(*S*),12(*S*),13(*S*)-trihydroxy-10(*E*)-octadecadienoic acid.

Together our results indicate that ceQORH is a γ -ketol reductase. It is also the first enzyme described with the ability to reduce the double bond of γ -ketols and, though with lower efficiency, *trans*-EKODE-(*E*)-Ib.

2.4. Re-examination of AtAER substrate specificity

Arabidopsis cells contain a homolog of ceQORH, AtAER, localized in the cytosol (Mano et al., 2005) and its best substrates are the C9 α,β -unsaturated carbonyls 4-oxo-nonenal and 4-hydroxynonenal (K_M in the micromolar range and k_{cat} of about 50–80 s^{-1}) but it is also active on the ketodienes 9-KODE and 13-KODE (Table 2). Thus it was important to examine whether another enzyme in another compartment could also display a γ -ketol reductase activity. AtAOR (Yamauchi et al., 2011) reduces only molecules with short carbon chain (<6) whereas the cytosolic AtAER is active on the C18 ketodienes. In order to complete the characterization of AtAER, the recombinant protein was produced in *E. coli* and purified so as to evaluate its kinetic properties with respect to γ -ketol and the other α,β -unsaturated ketones specifically tested here.

We observed the NADPH-dependent reduction of 9-KODE and 13-KODE with kinetic parameters similar to those already published (Mano et al., 2005). As indicated in Table 2, the enzyme was also active on 1,3-diphenyl-2-propenone ($K_M = 10 \pm 2 \mu\text{M}$ and $k_{cat} = 3.8 \pm 0.2 \text{s}^{-1}$) and on γ -diketone 1,4-diphenyl-2-butene-1,4-dione ($K_M = 3.7 \pm 0.6 \mu\text{M}$ and $k_{cat} = 4.9 \pm 0.2 \text{s}^{-1}$). Kinetic parameters for *trans*-EKODE-(*E*)-Ib, γ -ketol 18:1 and 10-keto-9,13-diol were similar ($k_{cat} = 2-3 \text{s}^{-1}$ and K_M of about 1–2 μM , Table 2) and close to the parameters obtained for the ketodienes (Mano et al., 2005). Finally AtAER reduced traumatin efficiently ($K_M = 6.6 \pm 2 \mu\text{M}$, $k_{cat} = 10 \pm 1 \text{s}^{-1}$, Table 2).

3. Discussion

Much progress has been made in the last years both in plants (Mano et al., 2005, 2002; Yamauchi et al., 2011; Youn et al., 2006) and mammals (Dick and Kensler, 2004; Dick et al., 2001;

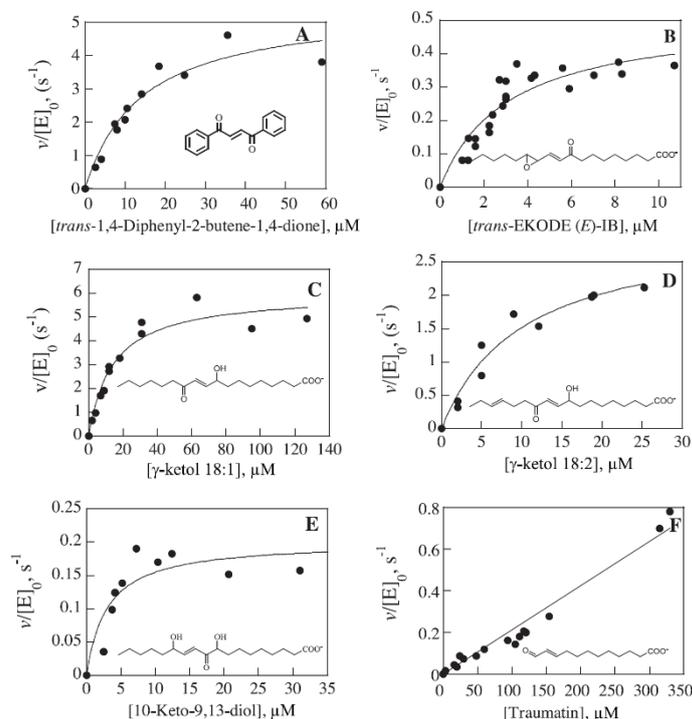


Fig. 6. Characterization of ceQORH properties with long-chain α,β -unsaturated ketone with an oxygenated substituent in position γ . (A) ceQORH activity as a function of *trans*-1,4-diphenyl-2-butene-1,4-dione concentration. k_{cat} is $5.5 \pm 0.6 \text{ s}^{-1}$, K_M is $14 \pm 3.5 \text{ }\mu\text{M}$. (B) As a function of *trans*-EKODE(*E*)-IB concentration. k_{cat} is $0.5 \pm 0.1 \text{ s}^{-1}$, K_M is $3 \pm 1 \text{ }\mu\text{M}$. (C) As a function of γ -ketol 18:1 concentration. k_{cat} is $6 \pm 0.4 \text{ s}^{-1}$, K_M is $14 \pm 3 \text{ }\mu\text{M}$. (D) As a function of γ -ketol-18:2 concentration. k_{cat} is $3 \pm 0.34 \text{ s}^{-1}$, K_M is $10 \pm 3 \text{ }\mu\text{M}$. (E) ceQORH activity as a function of 10-keto-9,13-diol concentration. k_{cat} is $0.2 \pm 0.03 \text{ s}^{-1}$, K_M is $3 \pm 1.4 \text{ }\mu\text{M}$. (F) ceQORH activity as a function of traumatin concentration; The apparent affinity was too low to measure K_M and k_{cat} parameters (see Table 1).

Hori et al., 2004; Porte et al., 2011) regarding the identification of enzymes able to detoxify lipid RES by reduction of the double bond of α,β -unsaturated carbonyl. In plants, AtAER in the cytosol and AtAOR in the chloroplast were proposed to contribute to oxidative stress resistance (Mano et al., 2005; Yamauchi et al., 2012). Both reductases belong to the zinc-independent MDR superfamily (Nordling et al., 2002) and more specifically to the NAD(P)H quinone reductase family. Enzymes of this family are known to display broad substrate specificity and their function cannot be easily predicted from their similarity with MDR/QOR of known function. Thus biochemical trial and error assays are the only way to decipher the substrate specificity of these enzymes as a hint towards the elucidation of their physiological functions.

In this study, we have investigated the substrate specificity of a chloroplastic membrane-associated MDR/QOR from *A. thaliana*, annotated homolog of chloroplast envelope quinone oxidoreductase (ceQORH, At4g13010). We show that the ceQORH recombinant protein reduces the double bond of long-chain ($C > 9$) α,β -unsaturated ketones both artificially produced – such as 1,3-diphenyl-2-propenone or γ -diketone *trans*-1,4-diphenyl-2-butene-1,4-dione – and of natural origin – such as 4-oxononenal, *trans*-EKODE-(*E*)-IB and γ -ketols. ceQORH best substrates are the 13-LOX-derived γ -ketols, which are produced in the chloroplast at the allene oxide synthase step of the jasmonate biosynthesis pathway (Fig. 7). ceQORH is the sole γ -ketol reductase so far identified in the chloroplast.

In contrast to its close chloroplastic homolog, AtAOR, (Yamauchi et al., 2012), which was shown to reduce the double

bond in short-chain ($C < 5$) unsaturated carbonyls, ceQORH was inactive with these molecules. Thus, the two chloroplastic alkenone reductases AtAOR and ceQORH are not redundant as their substrate specificities are not overlapping. Together they complement to reduce a range of RESs, from 3 to 18 carbon chain length.

In contrast, AtAER and ceQORH substrate specificities overlap *in vitro*, though ceQORH shows a much more restricted substrate specificity than AtAER. In that case functional specialization may derive from their different subcellular localizations: AtAER is a soluble cytosolic enzyme (Mano et al., 2005) whereas ceQORH is associated to the inner membrane of the chloroplast envelope (Ferro et al., 2003; Miras et al., 2002). Although both ceQORH and AtAER showed activity on the wound hormone traumatin, ceQORH more probably does not contribute quantitatively to the *in vivo* metabolism of this molecule. Indeed, ceQORH was about 750-fold less efficient than AtAER for the reduction of traumatin (Table 2). In addition, traumatin production in response to wounding is initiated by hydroperoxide lyase (Bate et al., 1998; Blée and Joyard, 1996; Hatanaka, 1993), which is associated to the cytosolic side of the chloroplast outer membrane (Froehlich et al., 2001). Thus, the cytosolic localization of AtAER and the high catalytic efficiency on traumatin observed in the present work suggest that AtAER, rather than ceQORH, could control traumatin signaling in the cytosol.

Trans-EKODE-(*E*)-IB, 10-keto 9,13 diol and γ -ketols are metabolized with similar kinetic efficiencies by AtAER and ceQORH. No data could be found on the production of *trans*-EKODE-(*E*)-IB in plants and we will not comment further about the possible physiological significance of this common activity. As 10-keto 9,13 diol

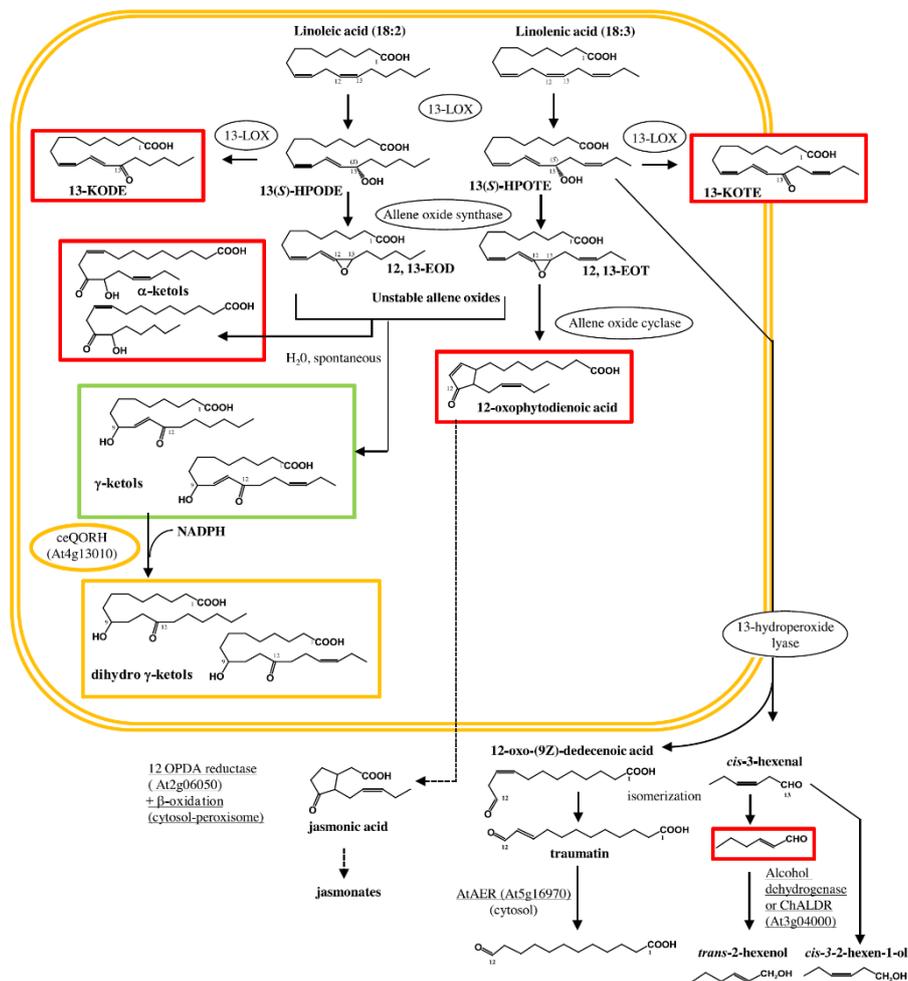


Fig. 7. Enzymatically derived RES oxylipins produced in the chloroplast that are reduced (green box) and not reduced by ceQORH (red boxes). The yellow box indicates the ceQORH reduction products. ceQORH reduces traumatins *in vitro* but with very low efficiency compared to AtAER (see text). As traumatins is produced on the cytosolic side of the chloroplast and AtAER is cytosolic we considered ceQORH activity on traumatins as non physiological. 13(S)-HPOD: (9Z,11E,13S)-13-hydroperoxy-octadecadienoic acid; 13(S)-HPOT: (9Z,11E,13S,15Z)-13-hydroperoxy-octadecatrienoic acid; 12,13-EOD: 12,13-epoxyoctadecadienoic acid; 12,13-EOT: 12,13-epoxyoctadecatrienoic acid.

derives from the 9-LOX pathway—a cytosolic pathway in *A. thaliana* – the cytosolic AtAER could metabolize this molecule *in vivo*. On the contrary, AtAER cannot reduce 13-LOX derived γ -ketols produced inside the chloroplast (see Fig. 7). As yet no reductase able to detoxify 13-KOD(T)E in the chloroplast has been identified.

We extensively searched the literature on lipid oxidation to find various commercially available natural occurring α,β -unsaturated carbonyls deriving either from polyunsaturated fatty acids or flavonoids. The highest activity was detected with γ -ketols. α,β unsaturated carbonyls with more than 18 carbon atoms do not exist in *Arabidopsis* chloroplast and ceQORH activity with shorter molecules was lower. This provides a strong rationale to consider that ceQORH is indeed a γ -ketol reductase. Together, kinetic data and the previously proven chloroplastic localization of ceQORH (Ferro et al., 2003; Miras et al., 2002) thus strongly suggest a major role of ceQORH in plastidial γ -ketol metabolism.

γ -ketols (Buseman et al., 2006; Theodoulou et al., 2005) as well as the products of their reduction, dihydro γ -ketols (Buseman et al., 2006) have been detected in *Arabidopsis*. γ -ketols have long been known (Gardner et al., 1975) but their roles and those of their downstream metabolites are still totally unknown (Grechkin et al., 2000a). 9,12- γ -ketol 18:2 can reach important concentrations as observed in *Phaseolus lunatus* where they reach about 1–3 μ M – 20-fold more than the jasmonate concentration (Schulze et al., 2007). The concentration of γ -ketols increases upon leaf wounding or in response to herbivores attacks (Buseman et al., 2006; Schulze et al., 2007).

In *Arabidopsis* chloroplasts, 9,12 γ -ketol is produced by non-enzymatic hydrolysis of 12,13-epoxyoctadecatrienoic acid (12,13-EOT, Fig. 7), the precursor of 12-OPDA and jasmonate derivatives (Grechkin et al., 1991b). In normal conditions, one can expect a complete conversion of 12,13-EOT to 12-OPDA by allene oxide

cyclase. By contrast, in stress conditions 12,13-EOT production rate increases and allene oxide cyclase activity may be limiting. This could lead to accumulation of 12,13-EOT which is highly unstable and hydrolyses spontaneously (half-time 15–30 s in water at 0 °C, (Brash et al., 1988; Hamberg, 1987)), forming 9,12 γ -ketol 18:2 or α -ketol in a circa 1:20 ratio (Gardner et al., 1975) *in vitro* and a 1:4 ratio *in vivo* (Schulze et al., 2007). Additionally, when peroxidation occurs on linoleate (18:2), the lack of the ethylenic function in position 15–16 (See Fig. 7) prevents the cyclization (Brash et al., 1988; Grechkin, 1998), thus favoring the production of ketols 18:1 (both α and γ). ceQORH could thus control the accumulation of 9,12 γ -ketols 18:1 downstream of 18:2 peroxidation and of 9,12 γ -ketols 18:2 when uncoupling at the allene oxide synthase/cyclase steps occurs (Fig. 7).

RES oxylipins are highly reactive toward cysteine in proteins and glutathione and can also covalently bind to lysine, histidine, and bases of nucleic acids (Doorn and Petersen, 2003; Esterbauer et al., 1991). Upon reduction of the C=C double bond, reactive α , β unsaturated carbonyls lose their electrophilic β -carbon which cannot form anymore adducts with histidine, lysine, thiols and nucleic bases, (Allevi et al., 1995; Dick et al., 2001). Thus ceQORH might participate in the detoxification processes of these potentially harmful compounds. A γ -ketol was isolated from a water corn extract and this molecule showed cytotoxic activity against various cell lines with an IC₅₀ between 5 and 17 μ g/ml (15–50 μ M). Under normal growth conditions physiological concentration of γ -ketol in *Arabidopsis* is about 0.08 μ M (20 ng/g FW, (Theodoulou et al., 2005)) and this concentration increases upon wounding (Buseman et al., 2006). γ -ketols concentration vary from 1 to 3 μ M (0.25–0.75 μ g/g FW) in the feeding zone of *P. lunatus* attacked by *Spodoptera littoralis* (Schulze et al., 2007). These values assume homogenous distribution in the cell. As γ -ketols accumulate primarily in chloroplast, concentrations can be 10-fold higher in this compartment. At this concentration γ -ketols can reach cytotoxic levels as observed for other reactive electrophile species. γ -ketol can also be detoxified by forming an adduct with glutathione (Zimmerman and Vick, 1988), but export of glutathione adducts to the vacuole and their metabolism are energy-dependent, as well as the re-synthesis of the glutathione, destroyed in the reaction process with α,β -unsaturated ketones (Jian et al., 2007; Zhu et al., 2009). ceQORH-mediated NADPH-dependent reduction is predicted to be less energy-consuming.

In conclusion, the present work shows that the plastidial protein ceQORH is a NADPH-dependent reductase specific for highly reactive lipid-derived compounds, in particular γ -ketols. Our data also open new routes toward the understanding of γ -ketols role and the routes to their detoxification using reverse genetic approaches.

4. Experimental procedures

4.1. Chemicals

NADPH, NADP⁺, *trans*-2-nonenal (**1**), *trans*-3-decen-2-one (**2**), *trans*-1,3-diphenyl-2-propenone (**7**), *trans*-1,3-diphenyl-2-propen-1-ol, *trans*-1,4-diphenyl-2-butene-1,4-dione (**8**) and daidzein were purchased from Sigma Aldrich (Saint Quentin-Fallavier, France). 4-Hydroxynonenal (**4**), 4-oxo-nonenal (**6**) and 9-oxo-12,13-epoxy-(10*E*)-octadecenoic acid (*trans*-EKODE-(*E*)-Ib, **9**) were purchased from Cayman chemical (Ann Arbor, Michigan, USA). Traumatin (**5**), 9-hydroxy-12-oxo-10(*E*)-octadecenoic acid (9,12 γ -ketol 18:1, **10**), 9-hydroxy-12-oxo-10(*E*),15(*Z*)-octadecadienoic acid (9,12 γ -ketol 18:2, **11**), 13-hydroxy-12-oxo-9(*Z*)-octadecenoic acid (α -ketol, **13**), 9-oxo-10(*E*),13(*Z*),16(*Z*)-octadecadienoic acid (9-KODE, **14**), 13-oxo-9(*Z*),11(*E*)-octadecadienoic acid (13-KODE,

15), and 12-oxo-10,15(*Z*)-phytyldienoic acid (12-OPDA, **16**), 13(*R*,*S*)-hydroperoxy-9(*Z*),11(*E*)-octadecadienoic acid (13 HPOD) and 9(*S*),12(*S*),13(*S*)-trihydroxy-10(*E*)-octadecenoic were purchased from Larodan fine chemicals (Malmö, Sweden). 9,13-dihydroxy-10-oxo-11-octadecenoic acid (10-Keto-9,13-diol, **12**), was prepared via the α ketol hydroperoxide (Grechkin et al., 1991a), which was converted to ketodiol by potassium iodide reduction.

4.2. Protein production and purification

A. thaliana ceQORH cDNA sequence (At4g13010) was excised with Nde I and BamHI enzymes from the pET15b 6-HisCeQORH vector (Miras et al., 2002). The fragment containing the cDNA and corresponding to the full length protein was ligated into pET-30a(+) vector digested by the same enzymes in order to express the untagged protein. Fresh colonies of transformed BL21 (DE3) Rosetta2 bacteria (Novagen, Darmstadt, Germany) were transferred into 15 ml of LB media supplemented with carbenicillin (100 μ g mL⁻¹) and chloramphenicol (34 μ g mL⁻¹) and grown at 37 °C. The saturated culture was transferred into 800 ml LB medium supplemented with antibiotics and growth was continued for 3 h at 37 °C. IPTG was added (0.4 mM) at A_{600nm} = 0.6. Growth was continued for 18 h at 16 °C. After centrifugation, (4000g for 15 min at 4 °C), pelleted bacteria were resuspended in 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM EDTA, 5 mM DTT, protease inhibitors (5 mM ϵ -aminocaproic acid and 1 mM benzamide) and sonicated for 10 min at 4 °C on a Vibracell disruptor. Streptomycin sulfate (0.1% (w/v)) was added to precipitate DNA and the solution was centrifuged for 35 min at 30,000g at 4 °C. Using this procedure (high concentration of DTT, absence of His-Tag), recombinant ceQORH was found in the soluble fraction. Purification steps were carried out at room temperature. The first step consisted in an anion exchange chromatography [DEAE EMD 650(M) column 26 mm \times 260 mm, (Merk, Darmstadt, Germany)], equilibrated in 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 10 mM DTT, 1 mM EDTA, 10% glycerol (v/v). The protein was recovered in the pass through due to its high isoelectric point. Active fractions were pooled and loaded on a Superdex 200 26/60 column (Amersham Pharmacia) equilibrated with 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 200 mM KCl, 1 mM EDTA, 5 mM DTT and 10% glycerol (v/v). Pure protein was concentrated to 180 μ M (6.5 mg/ml) using centricon (Pall Filtron), quickly frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C.

Arabidopsis AtAER cDNA (At5g16970, (Babiychuk et al., 1995)) was cloned into pET-28 vector between Nde I and Sal I restriction sites. The recombinant protein displayed a *N*-terminal His-Tag as described in (Mano et al., 2000) and was purified by Ni²⁺ affinity chromatography according to the published procedure (Mano et al., 2000).

4.3. Enzyme assay

Trans-1,3-diphenyl-2-propenone and *trans*-1,4-diphenyl-2-butene-1,4-dione were dissolved in dimethylformamide (DMF). 9,12 γ -ketol 18:1, 9,12 γ -ketol 18:2 and 10-keto-9,13-diol were used as ethanolic solutions and 4-oxo-nonenal and 4-hydroxynonenal were solubilized in methylacetate. The enzyme was dialyzed against 10 mM K-HEPES, pH 7.5, 150 mM KCl prior to enzyme assay. NADPH oxidation was recorded in the initial linear phase of decrease of absorbance at 340 nm using a molar extinction coefficient of (6250 M⁻¹ cm⁻¹). Enzymatic activity was measured at 25 °C in a reaction mixture containing 10 mM K-HEPES, pH 7.5, 150 mM KCl. Activity was proportional to protein concentration in the whole range tested (2–1000 nM). Routine activity measurements were carried out with *trans*-1,3 diphenyl-2-propenone and 25 nM enzyme. In that case, reduction of the alkene function of *trans*-1,3 diphenyl-2-propenone lead to a decrease in absorbance at 340 nm (ϵ_{340nm} = 15,000 M⁻¹ cm⁻¹) that added to NADPH

Please cite this article in press as: Curien, G., et al. The chloroplast membrane associated ceQORH putative quinone oxidoreductase reduces long-chain, stress-related oxidized lipids. *Phytochemistry* (2015), <http://dx.doi.org/10.1016/j.phytochem.2015.11.015>

oxidation ($\epsilon_{340\text{nm}} = 6250 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) allowing a greater sensitivity of the assay. K_M and k_{cat} values were determined by fitting the experimental data to the Michaelis–Menten equation using Kaleidagraph software (Synergy Software, Reading, PA).

4.4. HPLC analyses

HPLC chromatography was performed on an Agilent 1100 HPLC system with a Spherisorb ODS2 C18 column (250 mm \times 4 mm, ID 5 μm). Elutions were carried out with the solvent mixture H₂O: methanol (83:17, v/v) at a flow rate of 1 ml min⁻¹. Detection was carried out with a DAD Agilent system.

4.5. Mass spectrum analysis

Mass spectrum analyses were performed using a VG QUATTRO II high resolution instrument (Waters) connected to a LC-Packings-Dionex Waters X-Terra-MS column (3 μm 1 \times 10 mm), flow rate 40 $\mu\text{L}/\text{min}$, mobile phase isocratic H₂O/EtOH/HCOOH (83/17/0.1), injection volume 5 μL , UV detector 230 and 290 nm. The tuning parameters were as follows, Source: capillary 2.45 kV, cone 22 V, source bloc temperature 90 °C, desolvation temperature 120 °C, MS: low mass resolution 15, high mass resolution 15, multiplier 650 V.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

Acknowledgments

We thank Elisa Dell'Aglio for critical reading of the manuscript. This study received financial support from the French National Research Agency GRAL Labex (ANR-10-LABX-49-01) and partly by a grant from the Russian Academy of Sciences (program No 6, «Molecular and Cell Biology»). S. M. M was funded by the Labex GRAL (Alliance Grenobloise pour la Biologie Structurale et Cellulaire intégrées).

References

Adachi, J., Asano, M., Yoshioka, N., Nushida, H., Ueno, Y., 2006. Analysis of phosphatidylcholine oxidation products in human plasma using quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Kobe J. Med. Sci.* 52, 127–140.

Allevi, P., Anastasia, M., Cajone, F., Ciuffreda, P., Sanvito, A.M., 1995. Structural requirements of aldehydes produced in lipo for the activation of the heat-shock genes in HELA-cells. *Free Radical Biol. Med.* 18, 107–116.

Androu, A., Brodhun, F., Feussner, I., 2009. Biosynthesis of oxylipins in non-mammals. *Prog. Lipid Res.* 48, 148–170.

Babiychuk, E., Kushnir, S., Bellesboix, E., Vanmontagu, M., Inze, D., 1995. *Arabidopsis thaliana* NADPH oxidoreductase homologs confer tolerance of yeasts toward the thiol-oxidizing drug diamide. *J. Biol. Chem.* 270, 26224–26231.

Bate, N.J., Sivasankar, S., Moxon, C., Riley, J.M.C., Thompson, J.E., Rothstein, S.J., 1998. Molecular characterization of an *Arabidopsis* gene encoding hydroperoxide lyase, a cytochrome P-450 that is wound inducible. *Plant Physiol.* 117, 1393–1400.

Blair, I.A., 2008. DNA adducts with lipid peroxidation products. *J. Biol. Chem.* 283, 15545–15549.

Blée, E., 1998. Phytooxylipins and plant defense reactions. *Prog. Lipid Res.* 37, 33–72.

Blée, E., 2002. Impact of phyto-oxylipins in plant defense. *Trends Plant Sci.* 7, 315–319.

Blée, E., Joyard, J., 1996. Envelope membranes from spinach chloroplasts are a site of metabolism of fatty acid hydroperoxides. *Plant Physiol.* 110, 445–454.

Brash, A.R., Baertschi, S.W., Ingram, C.D., Harris, T.M., 1988. Isolation and characterization of natural allene oxides: unstable intermediates in the metabolism of lipid hydroperoxides. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 85, 3382–3386.

Buseman, C.M. et al., 2006. Wounding stimulates the accumulation of glycerolipids containing oxophytodienoic acid and dimor-oxophytodienoic acid in *Arabidopsis* leaves. *Plant Physiol.* 142, 28–39.

Dick, R.A., Kensler, T.W., 2004. The catalytic and kinetic mechanisms of NADPH-dependent alkenal/one oxidoreductase. *J. Biol. Chem.* 279, 17269–17277.

Dick, R.A., Kwak, M.K., Sutter, T.R., Kensler, T.W., 2001. Antioxidative function and substrate specificity of NAD(P)H-dependent alkenal/one oxidoreductase – a new role for leukotriene B-4 12-hydroxydehydrogenase/15-oxoprostaglandin 13-reductase. *J. Biol. Chem.* 276, 40803–40810.

Doorn, J.A., Petersen, D.R., 2003. Covalent adduction of nucleophilic amino acids by 4-hydroxynonenal and 4-oxononenal. *Chem. Biol. Interact.* 143–144, 93–100.

Esterbauer, H., Schaur, R.J., Zollner, H., 1991. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malondialdehyde and related aldehydes. *Free Radical Biol. Med.* 11, 81–128.

Farmer, E.E., Davaio, C., 2007. Reactive electrophile species. *Curr. Opin. Plant Biol.* 10, 380–386.

Farmer, E.E., Mueller, M.J., 2013. ROS-mediated lipid peroxidation and RES-activated signaling. *Ann. Rev. Plant Biol.* 64, 429–450.

Feng, P., Vick, B.A., Zimmerman, D.C., 1981. Formation of γ -ketols from 13- and 9-hydroperoxides of linolenic acid by flaxseen hydroperoxide isomerase. *Lipids* 16, 377–379.

Ferro, M. et al., 2003. Proteomics of the chloroplast envelope membranes from *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Cell. Proteomics* 2, 325–345.

Foley, R.C., Sappl, P.G., Perl-Treves, R., Millar, A.H., Singh, K.B., 2006. Desensitization of GSTF8 induction by a prior chemical treatment is long lasting and operates in a tissue-dependent manner. *Plant Physiol.* 142, 245–253.

Froehlich, J.E., Itoh, A., Howe, G.A., 2001. Tomato allene oxide synthase and fatty acid hydroperoxide lyase, two cytochrome P450s involved in oxylipin metabolism, are targeted to different membranes of chloroplast envelope. *Plant Physiol.* 125, 306–317.

Gardner, H.W., Kleiman, R., Weisleder, D., 1974. Homolytic decomposition of linoleic-acid hydroperoxide – identification of fatty-acid products. *Lipids* 9, 696–706.

Gardner, H.W., Kleiman, R., Christianson, D.D., Weisleder, D., 1975. Positional specificity of γ -ketol formation from linoleic acid hydroperoxides by a corn germ enzyme. *Lipids* 10, 602–608.

Grechkin, A.N., 1998. Recent developments in biochemistry of the plant lipoxygenase pathway. *Prog. Lipid Res.* 37, 313–352.

Grechkin, A.N., Kuramshin, R.A., Latypov, S.K., Safonova, Y.Y., Gafarova, T.E., Ilyasov, A.V., 1991a. Hydroperoxides of alpha-ketols – novel products of the plant lipoxygenase pathway. *Eur. J. Biochem.* 199, 451–457.

Grechkin, A.N., Kuramshin, R.A., Safonova, E.Y., Latypov, S.K., Ilyasov, A.V., 1991b. Formation of ketols from linolenic acid 13-hydroperoxide via allene oxide. Evidence for two distinct mechanisms of allene oxide hydrolysis. *Biochim. Biophys. Acta* 1086, 317–325.

Grechkin, A.N., Mukhtarova, L.S., Hamberg, M., 2000a. The lipoxygenase pathway in tulip (*Tulipa gesneriana*): detection of the ketol route. *Biochem. J.* 352, 501–509.

Grechkin, A.N., Mukhtarova, L.S., Hamberg, M., 2000b. Lipoxygenase pathway in tulip: biosynthesis of ketols. *Biochem. Soc. Trans.* 28, 851–853.

Hamberg, M., 1987. Mechanism of corn hydroperoxide isomerase – detection of 12,13(s)-oxido-9(z),11-octadecadienoic acid. *Biochim. Biophys. Acta* 920, 76–84.

Hatanaka, A., 1993. The biogeneration of green odour by green leaves. *Phytochemistry* 34, 1201–1218.

Hori, T. et al., 2004. Structural basis of leukotriene B-4 12-hydroxydehydrogenase/15-oxo-prostaglandin 13-reductase catalytic mechanism and a possible Src homology 3 domain binding loop. *J. Biol. Chem.* 279, 22615–22623.

Jian, W., Lee, S.H., Mesaros, C., Oe, T., Eliche, M., Blair, I., 2007. A novel 4-oxo-2(E)-nonenal-derived endogenous thiazabicyclo glutathione adduct formed during cellular oxidative stress. *Chem. Res. Toxicol.* 20, 1008–1018.

Kirch, H.H., Nair, A., Bartels, D., 2001. Novel ABA- and dehydration-inducible aldehyde dehydrogenase genes isolated from the resurrection plant *Craterostigma plantagineum* and *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 28, 555–567.

Kotchoni, S.O., Kuhns, C., Ditzer, A., Kirch, H.H., Bartels, D., 2006. Over-expression of different aldehyde dehydrogenase genes in *Arabidopsis thaliana* confers tolerance to abiotic stress and protects plants against lipid peroxidation and oxidative stress. *Plant, Cell Environ.* 29, 1033–1048.

Leonarduzzi, G., Arkan, M.C., Bašaga, H., Chiarpotto, E., Sevanian, A., Poli, G., 2000. Lipid oxidation products in cell signaling. *Free Radical Biol. Med.* 28, 1370–1378.

Lin, D., Zhang, J.Y., Sayre, L.M., 2007. Synthesis of six epoxyketoctadecenoic acid (EKODE) isomers, their generation from nonenzymatic oxidation of linoleic acid, and their reactivity with imidazole nucleophiles. *J. Org. Chem.* 72, 9471–9480.

Mano, J. et al., 2000. A novel NADPH: diamide oxidoreductase activity in *Arabidopsis thaliana* P1 zeta-crystallin. *Eur. J. Biochem.* 267, 3661–3671.

Mano, J. et al., 2002. The NADPH: quinone oxidoreductase P1-zeta-crystallin in *Arabidopsis* catalyzes the alpha, beta-hydrogenation of 2-alkenals: detoxication of the lipid peroxide-derived reactive aldehydes. *Plant Cell Physiol.* 43, 1445–1455.

Mano, J. et al., 2005. Protection against photooxidative injury of tobacco leaves by 2-alkenal reductase. Detoxication of lipid peroxide-derived reactive carbonyls. *Plant Physiol.* 139, 1773–1783.

Miras, S., Salvi, D., Ferro, M., Grunwald, D., Garin, J., Joyard, J., Rolland, N., 2002. Non-canonical transit peptide for import into the chloroplast. *J. Biol. Chem.* 277, 47770–47778.

Miras, S. et al., 2007. Toc159- and Toc75-independent import of a transit sequence-precursor into the inner envelope of chloroplasts. *J. Biol. Chem.* 282, 29482–29492.

Mueller, M.J., Berger, S., 2009. Reactive electrophilic oxylipins: pattern recognition and signalling. *Phytochemistry* 70, 1511–1521.

Please cite this article in press as: Curien, G., et al. The chloroplast membrane associated ceQORH putative quinone oxidoreductase reduces long-chain, stress-related oxidized lipids. *Phytochemistry* (2015), <http://dx.doi.org/10.1016/j.phytochem.2015.11.015>

- Mueller, S., Hilbert, B., Dueckershoff, K., Roitsch, T., Krischke, M., Mueller, M.J., Berger, S., 2008. General detoxification and stress responses are mediated by oxidized lipids through TGA transcription factors in Arabidopsis. *Plant Cell* 20, 768–785.
- Nordling, E., Jornvall, H., Persson, B., 2002. Medium-chain dehydrogenases/reductases (MDR) – family characterizations including genome comparisons and active site modelling. *Eur. J. Biochem.* 269, 4267–4276.
- Porte, S., Moeini, A., Reche, I., Shafiqat, N., Oppermann, U., Farres, J., Pares, X., 2011. Kinetic and structural evidence of the alkenal/one reductase specificity of human zeta-crystallin. *Cell. Mol. Life Sci.* 68, 1065–1077.
- Schaller, A., Stintzi, A., 2009. Enzymes in jasmonate biosynthesis – structure, function, regulation. *Phytochemistry* 70, 1532–1538.
- Schaller, F., Biesgen, C., Mussig, C., Altmann, T., Weiler, E.W., 2000. 12-oxophytodienoate reductase 3 (OPR3) is the isoenzyme involved in jasmonate biosynthesis. *Planta* 210, 979–984.
- Schulze, B., Dabrowska, P., Boland, W., 2007. Rapid enzymatic isomerization of 12-oxophytodienoic acid in the gut of lepidopteran larvae. *ChemBioChem* 8, 208–216.
- Stiti, N., Adewale, I.O., Petersen, J., Bartels, D., Kirch, H.-H., 2011. Engineering the nucleotide coenzyme specificity and sulfhydryl redox sensitivity of two stress-responsive aldehyde dehydrogenase isoenzymes of *Arabidopsis thaliana*. *Biochem. J.* 434, 459–471.
- Stiti, N., Podgorska, K., Bartels, D., 2014. Aldehyde dehydrogenase enzyme ALDH3H1 from *Arabidopsis thaliana*: identification of amino acid residues critical for cofactor specificity. *Biochim. Biophys. Acta* 1844, 681–693.
- Thatcher, L.F., Carrie, C., Andersson, C.R., Sivasithamparam, K., Whelan, J., Singh, K.B., 2007. Differential gene expression and subcellular targeting of *Arabidopsis glutathione S-transferase F8* is achieved through alternative transcription start sites. *J. Biol. Chem.* 282, 28915–28928.
- Theodoulou, F.L. et al., 2005. Jasmonic acid levels are reduced in comatose ATP-binding cassette transporter mutants. implications for transport of jasmonate precursors into peroxisomes. *Plant Physiol.* 137, 835–840.
- Wagner, U., Edwards, R., Dixon, D.P., Mauch, F., 2002. Probing the diversity of the Arabidopsis glutathione S-transferase gene family. *Plant Mol. Biol.* 49, 515–532.
- Yamauchi, Y., Furutera, A., Seki, K., Toyoda, Y., Tanaka, K., Sugimoto, Y., 2008. Malondialdehyde generated from peroxidized linolenic acid causes protein modification in heat-stressed plants. *Plant Physiol. Biochem.* 46, 786–793.
- Yamauchi, Y., Hasegawa, A., Taninaka, A., Mizutani, M., Sugimoto, Y., 2011. NADPH-dependent reductases involved in the detoxification of reactive carbonyls in plants. *J. Biol. Chem.* 286, 6999–7009.
- Yamauchi, Y., Hasegawa, A., Mizutani, M., Sugimoto, Y., 2012. Chloroplastic NADPH-dependent alkenal/one oxidoreductase contributes to the detoxification of reactive carbonyls produced under oxidative stress. *FEBS Lett.* 586, 1208–1213.
- Youn, B. et al., 2006. Mechanistic and structural studies of apoform, binary, and ternary complexes of the Arabidopsis alkenal double bond reductase At5g16970. *J. Biol. Chem.* 281, 40076–40088.
- Zhu, P., Jian, W., Blair, I., 2009. A 4-oxo-2(E)-nonenal-derived glutathione adduct from 15-lipoxygenase-1-mediated oxidation of cytosolic and esterified arachidonic acid. *Free Radical Biol. Med.* 47, 953–961.
- Zimmerman, D.C., Coudron, C.A., 1979. Identification of traumatin, a wound hormone, as 12-oxo-trans-10-dodecanoid acid. *Plant Physiol.* 63, 536–541.
- Zimmerman, D.C., Vick, B.A., 1988. Lipid peroxidation in plants-products and physiological roles. In: Sevanian A (Ed.), *Lipid peroxidation in biological systems* (Sevanian, Alex, Ed.), Champaign, 1988, p. 205.
- Zoeller, M., Stengl, N., Krischke, M., Fekete, A., Waller, F., Berger, S., Mueller, M.J., 2012. Lipid profiling of the Arabidopsis hypersensitive response reveals specific lipid peroxidation and fragmentation processes: Biogenesis of pimelic and azelaic acid. *Plant Physiol.* 160, 365–378.



Analytical ultracentrifugation and preliminary X-ray studies of the chloroplast envelope quinone oxidoreductase homologue from *Arabidopsis thaliana*

Sarah Mas y mas,^a Cécile Giustini,^b Jean-Luc Ferrer,^c Norbert Rolland,^b Gilles Curien^b and David Cobessi^{d*}

Received 20 January 2015
Accepted 9 March 2015

Edited by R. A. Pauptit, Macclesfield, England

Keywords: chloroplast envelope quinone oxidoreductase homologue; chloroplast; oxidoreductase; analytical ultracentrifugation.

Supporting information: this article has supporting information at journals.iucr.org/f

^aInstitut de Biologie Structurale, Université Grenoble Alpes, CNRS, CEA, 71 Avenue des Martyrs, 38044 Grenoble, France, ^bLaboratoire de Physiologie Cellulaire et Végétale, CNRS, Université Grenoble Alpes, CEA, INRA, 17 Rue des Martyrs, 38054 Grenoble, France, ^cInstitut de Biologie Structurale, CEA, Université Grenoble Alpes, CNRS, 71 Avenue des Martyrs, 38044 Grenoble, France, and ^dInstitut de Biologie Structurale, CNRS, Université Grenoble Alpes, CEA, 71 Avenue des Martyrs, 38044 Grenoble, France. *Correspondence e-mail: david.cobessi@ibs.fr

Quinone oxidoreductases reduce a broad range of quinones and are widely distributed among living organisms. The chloroplast envelope quinone oxidoreductase homologue (ceQORH) from *Arabidopsis thaliana* binds NADPH, lacks a classical N-terminal and cleavable chloroplast transit peptide, and is transported through the chloroplast envelope membrane by an unknown alternative pathway without cleavage of its internal chloroplast targeting sequence. To unravel the fold of this targeting sequence and its substrate specificity, ceQORH from *A. thaliana* was overexpressed in *Escherichia coli*, purified and crystallized. Crystals of apo ceQORH were obtained and a complete data set was collected at 2.34 Å resolution. The crystals belonged to space group C222₁, with two molecules in the asymmetric unit.

1. Introduction

The chloroplast plays central roles in plant growth and development by catalyzing a remarkable range of metabolic and physiological functions (Armbruster *et al.*, 2009; Rolland *et al.*, 2012). Most of the chloroplast proteins are encoded by the nuclear genome, synthesized in the cytosol and then imported into the chloroplast through the TOC/TIC (translocons at the outer and inner envelope of the chloroplast) machineries (Strittmatter *et al.*, 2010). If most of the outer envelope proteins are excluded, these chloroplast proteins possess a predictable and cleavable transit peptide at their N-terminus (Jarvis & López-Juez, 2013; Richardson *et al.*, 2014). Recently, some chloroplast proteins, such as the inner envelope protein IEP32, also called Tic32 (Nada & Soll, 2004), and the chloroplast envelope quinone oxidoreductase homologue (ceQORH; Miras *et al.*, 2002, 2007), have been shown to be targeted to the chloroplast inner envelope membrane while lacking this predictable and cleavable transit peptide. Moreover, the two abovementioned chloroplast proteins were also shown to be targeted to the chloroplast by an as yet unknown alternative targeting pathway (Miras *et al.*, 2007).

While information for the targeting of canonical chloroplast proteins is located at their N-terminus (*i.e.* within the transit peptide sequence), ceQORH displays a nonterminal hydrophilic domain (residues 59–100) that is essential for its targeting to the chloroplast (Miras *et al.*, 2007). Based on sequence alignment, the 329-residue ceQORH protein was proposed to belong to the quinone oxidoreductase (QOR)



© 2015 International Union of Crystallography

research communications

Table 1
Macromolecule-production information.

Source organism	<i>A. thaliana</i>
DNA source	AT4G13010 cDNA
Cloning vector	pET-30a+
Expression vector	pET-30a+
Expression host	<i>E. coli</i> Rosetta2 (DE3)
Complete amino-acid sequence of the construct produced	AGKLMHALQYNSYGGGAAGLEHVQVPVTPKSNE-VCLKLEATSLNPVDWKIQKGMIRPFLPRKFP-IPATDVAGEVVEVSGVKNFKAGDKVAVLSH-LGGGLAEFAVATEKLTVKRPQEVGAAEAAAL-PVAGLTALQALTNPAGLKLDGTGKKANILVTA-ASGGVGHYAVQLAKLANAHVTATCGARNIEFV-KSLGADEVLDYKTPEGAALKSPSGKKYDAVVH-CANGIPFSVFEPNLSSENGKVIDITPGPNAMWT-YAVKKITMSKKQLVPLLLIPKAENLEFVNLV-KEGKVKTVIDSKHPLSKAEDAWAKSIDGHATG-KIIVEP

family (Miras *et al.*, 2002). This enzyme family shares common structural motifs and oxidizes NADPH to reduce a broad range of quinones, and is widely distributed among living organisms (Pan *et al.*, 2009). Enzymes belonging to the quinone oxidoreductase (QOR) family are often dimeric, such as those from *Escherichia coli* (Thorn *et al.*, 1995) and *Saccharomyces cerevisiae* (Guo *et al.*, 2011), but can also be monomeric, such as that from *Coxiella burnetii*, which is the only known structure of a monomeric QOR (PDB entry 3tqh; M. C. Franklin, J. Cheung, M. Rudolph, M. Cassidy, E. Gary, F. Burshteyn & J. Love, unpublished work). No significant sequence identity is observed between the region corresponding to the transit peptide of ceQORH and the QOR sequences of known structures. Recently, ceQORH has also been reported to bind calmodulin (CaM; Dell’Aglia *et al.*, 2013), as does IEP32 (Chigri *et al.*, 2006), a property that has never been reported for other QORs.

In order to unravel the structural characteristics of the uncleaved transit peptide and to obtain insights into the substrate specificity and binding of CaM to ceQORH, we undertook structural studies of this protein. Here, we report the cloning, purification and crystallization of ceQORH from *Arabidopsis thaliana* and data collection from crystals of the apo form. Analytical ultracentrifugation studies are also discussed.

2. Materials and methods

2.1. Macromolecule production

2.1.1. Protein expression and purification. The AT4G13010 cDNA coding for a 329-amino-acid protein was inserted into a pET-30a+ vector to transform *E. coli* Rosetta2 (DE3) cells. The cells were grown overnight in 20 ml LB with 30 µg ml⁻¹ kanamycin and 34 µg ml⁻¹ chloramphenicol at 37°C. This first culture was used to inoculate 2 l LB (with antibiotics). Growth was continued at 37°C. When the OD₆₀₀ reached 0.6, the temperature was decreased to 20°C and 0.4 mM isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) was added. After overnight induction, the bacteria were harvested by centrifugation at 5500g for 30 min at 4°C. The cell pellet was suspended in 50 ml lysis buffer [50 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM EDTA, 1 mM

Table 2
Crystallization.

Method	Hanging drop
Plate type	Linbro plate
Temperature (K)	293
Protein concentration (mg ml ⁻¹)	5
Buffer composition of protein solution	50 mM Tris-HCl pH 7.5, 200 mM KCl, 2 mM DTT, 1 mM EDTA, 10% glycerol
Composition of reservoir solution	0.2 M sodium acetate, 0.1 M Tris-HCl pH 8.5, 32% (v/v) PEG 4000
Volume and ratio of drop	2 µl + 2 µl
Volume of reservoir (µl)	500

DTT, 10% (v/v) glycerol]. A cOmplete protease-inhibitor cocktail tablet (Roche) and, after lysis, 0.2% (w/v) streptomycin sulfate were added. The lysate was centrifuged at 14 000g for 30 min at 4°C. The purification was performed at 4°C. The supernatant was applied onto a DEAE Sepharose column in 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 5 mM DTT, 1 mM EDTA, 10% (v/v) glycerol. ceQORH displays a high theoretical isoelectric point (pI = 9.05) and thus eluted in the flow through. It was collected, concentrated and applied onto an SP Sepharose column. ceQORH was eluted with a linear gradient to 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 M KCl, 5 mM DTT, 1 mM EDTA, 10% (v/v) glycerol. The fractions containing ceQORH eluted between 150 and 180 mM KCl. They were pooled and concentrated with an Amicon Ultra 4 ml centrifugal filter with a 10 kDa membrane cutoff; they were then loaded onto a HiLoad 16/60 Superdex 200 column and eluted with 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 200 mM KCl, 2 mM DTT, 1 mM EDTA, 10% (v/v) glycerol. The pool containing pure ceQORH was concentrated and frozen in liquid nitrogen before use. Macromolecule-production information is summarized in Table 1.

2.1.2. Analytical ultracentrifugation. The analytical ultracentrifugation experiment was performed with an ProteomeLab XL-I analytical ultracentrifuge from Beckman Coulter (Palo Alto, USA) and an An-60 Ti rotor (Beckman Coulter). The cells had a double sector (Nanolytics) with optical routes of either 12, 3 or 1.5 mm and were equipped with Sapphire windows. Absorbance and interference measurements were performed with the *ProteomeLab XL-I* v.6.0 software. The samples were prepared at 0.6 and 6.0 mg ml⁻¹ in 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl (AUC buffer) supplemented with NADPH (1.45 mM) as indicated in Supplementary Table S1. The interference and absorbance were recorded for 12 h at 50 000 rev min⁻¹ at 20°C. ceQORH was considered to be a compact spherical protein (molecular weight 34 304 Da) with $\bar{v} = 0.745 \text{ ml g}^{-1}$, $ff_{\text{min}} = 1.25$, $\rho = 1.005 \text{ g ml}^{-1}$ and $\eta = 1.02 \text{ cP}$ at a temperature of 20°C. Using these parameters, the sedimentation coefficient was estimated by *SEDNTERP* assuming several oligomerization states (Supplementary Table S2). Data analysis was performed with *SEDFIT* v.14.c.

2.2. Crystallization

ceQORH at 5 mg ml⁻¹ in 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 200 mM KCl, 2 mM DTT, 1 mM EDTA, 10% (v/v) glycerol was subjected to crystallization in its apo form using the sitting-

research communications

drop vapour-diffusion technique and the high-throughput crystallization facility at EMBL, Grenoble at 4°C. Crystallization hits were optimized using Linbro plates at 20°C. Crystallization information is summarized in Table 2.

2.3. Data collection and processing

Diffraction data were collected on beamline FIP-BM30A (Roth *et al.*, 2002) at the European Synchrotron Radiation Facility (ESRF), Grenoble, France at a wavelength of 0.9800 Å at 100 K using an ADSC 315r detector. The crystal-to-detector distance was 412.20 mm. The data were processed and scaled using XDS (Kabsch, 2010).

3. Results and discussion

3.1. Purification and analytical ultracentrifugation

After overnight expression, ceQORH was found mainly in the soluble fraction. Most of the contaminants were eliminated using a DEAE Sepharose column (Fig. 1). Two peaks of ceQORH with different OD₂₆₀/OD₂₈₀ ratios were obtained from the SP Sepharose column, suggesting that ceQORH in one of these peaks is bound to nucleic acids or other absorbing molecules. The peak with the lower OD₂₆₀/OD₂₈₀ ratio was selected and subjected to gel filtration. Pure protein was obtained with a yield of 14 mg per litre of culture. Analysis of the AUC sedimentation results for apo ceQORH showed numerous peaks between 2 and 10 S (Fig. 2a) corresponding to monomer, dimer and tetramer and possible aggregation at the two protein concentrations. When NADPH was added, only one peak at 2.7 ± 0.1 S (*s*_{20,w} = 2.8 S) was observed and the frictional ratio was 1.27. The theoretical frictional ratio for

a globular monomeric protein is 1.25 (Fig. 2b). Therefore, ceQORH-NADPH is monomeric (Supplementary Table S3). The results suggest that ceQORH undergoes a conformational change upon NADPH binding, leading to a transition from a dimer or a tetramer to a monomer.

3.2. Crystallization and data collection

Crystallization trials with ceQORH-NADPH failed even though this enzyme form was monodisperse in solution. These results suggest that ceQORH bound to NADPH is probably flexible and prevents crystal nucleation and growth. This is a difference from other QORs, since crystals of QOR from *E. coli* or *S. cerevisiae* bound to NADP⁺ or of QOR from *C. burnetii* bound to NADPH were obtained. Surprisingly, apo ceQORH crystallized in the presence of 0.2 M sodium acetate, 0.1 M Tris-HCl pH 8.5, 32% (v/v) PEG 4000, as according to the AUC result apo ceQORH has different oligomeric states in solution. A complete X-ray diffraction data set was collected to 2.34 Å resolution from a crystal of apo ceQORH (Fig. 3). The crystals belonged to the orthorhombic system, with unit-cell parameters *a* = 44.72, *b* = 142.65, *c* = 209.89 Å.

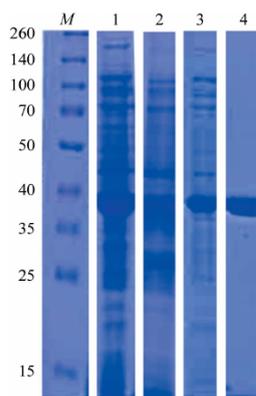


Figure 1 Purification of recombinant *A. thaliana* ceQORH. Proteins were separated on a 12% SDS-PAGE stained with Coomassie Brilliant Blue R-250. Lane M, molecular-weight markers (labelled in kDa); lane 1, crude soluble extract; lane 2, flow through from the DEAE Sepharose column containing ceQORH; lane 3, pool of the fractions containing ceQORH eluted from the SP Sepharose column; lane 4, fraction containing ceQORH eluted from the gel-filtration column.

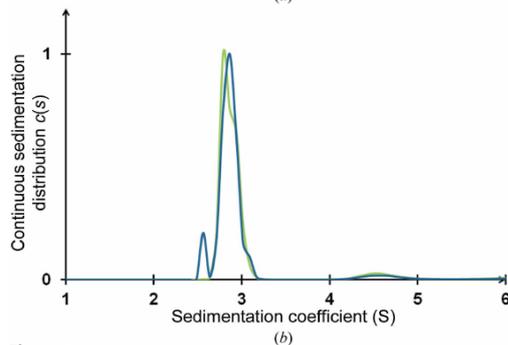
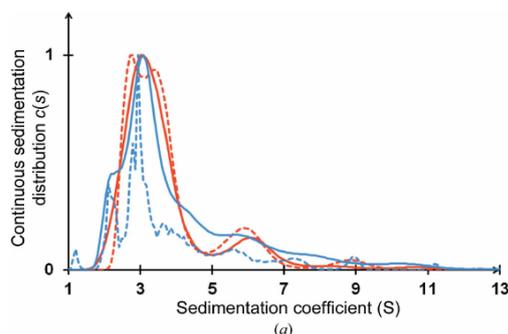


Figure 2 (a) Sedimentation curves of ceQORH calculated from absorbance (solid line) and interference (dashed lines) measurements for two ceQORH concentrations: 6 mg ml⁻¹ (red) and 0.6 mg ml⁻¹ (blue). (b) Sedimentation curves of ceQORH-NADPH calculated from absorbance (green) and interference (blue) experiments (ceQORH concentration 6 mg ml⁻¹; NADPH concentration 1.45 mM).

research communications

Table 3
Data collection and processing.

Values in parentheses are for the outer shell.

Diffraction source	FIP-BM30A, ESRF
Wavelength (Å)	0.9800
Temperature (K)	100
Detector	ADSC 315r
Crystal-to-detector distance (mm)	412.20
Rotation range per image (°)	0.75
Rotation range (°)	180
Mosaicity (°)	0.13
Space group	C222 ₁
<i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> (Å)	44.72, 142.65, 209.89
α , β , γ (°)	90, 90, 90
Resolution range (Å)	41.82–2.34 (2.49–2.34)
Total No. of reflections	172766 (13536)
No. of unique reflections	28220 (4078)
Completeness (%)	97.9 (88.9)
Multiplicity	6.12 (3.31)
<i>I</i> / σ (<i>I</i>)	13.03 (2.62)
<i>R</i> _{meas} (%)	13.20 (45.30)

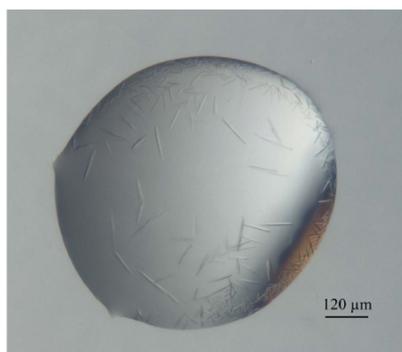


Figure 3
ceQORH crystals obtained at 4°C using 0.2 M sodium acetate, 0.1 M Tris-HCl pH 8.5, 32% PEG 4000 with the protein at 5 mg ml⁻¹.

Data statistics are summarized in Table 3. Systematic extinctions along the 00*l* axis showed that the crystals belonged to space group C222₁. Solvent-content analysis suggests that two molecules are present in the asymmetric unit, with a solvent content of 45.8%. Analysis of the self-rotation function reveals the presence of a peak corresponding to a noncrystallographic twofold axis ($\kappa = 180$, $\omega = 55$, $\varphi = 155^\circ$). Therefore, a dimer of apo ceQORH is present in the asymmetric unit.

Ligand screening to study the activity of the protein has been undertaken. Combined with X-ray crystallography, these studies should provide new insights into the ligand-binding specificity, protein-protein interaction (CaM binding) and the structure of the internal transit peptide sequence.

Acknowledgements

The diffraction experiments were conducted on beamline FIP-BM30A at the ESRF, Grenoble, France. We thank the beamline staff for technical help. This work used the platforms of the Grenoble Instruct centre (ISBG; UMS 3518CNRS-CEA-UJF-EMBL) with support from FRISBI (ANR-10-INSB-05-02) and GRAL (ANR-10-LABX-49-01) within the Grenoble Partnership for Structural Biology (PSB).

References

- Armbruster, U., Hertle, A., Makarenko, E., Zühlke, J., Pribil, M., Dietzmann, A., Schliebner, L., Aseeva, E., Fenino, E., Scharfenberg, M., Voigt, C. & Leister, D. (2009). *Mol. Plant*, **2**, 1325–1335.
- Chigri, F., Hörmann, F., Stamp, A., Stammers, D. K., Bölter, B., Soll, J. & Vothknecht, U. C. (2006). *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **103**, 16051–16056.
- Dell'Aglio, E., Giustini, C., Salvi, D., Brugièrè, S., Delpierre, F., Moyet, L., Baudet, M., Seigneurin-Berny, D., Matringe, M., Ferro, M., Rolland, N. & Curien, G. (2013). *Mol. Biosyst.* **9**, 1234–1248.
- Guo, P.-C., Ma, X.-X., Bao, Z.-Z., Ma, J.-D., Chen, Y. & Zhou, C.-Z. (2011). *J. Struct. Biol.* **176**, 112–118.
- Jarvis, P. & López-Juez, E. (2013). *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* **14**, 787–802.
- Kabsch, W. (2010). *Acta Cryst.* **D66**, 133–144.
- Miras, S., Salvi, D., Ferro, M., Grunwald, D., Garin, J., Joyard, J. & Rolland, N. (2002). *J. Biol. Chem.* **277**, 47770–47778.
- Miras, S., Salvi, D., Piette, L., Seigneurin-Berny, D., Grunwald, D., Reinbothe, C., Joyard, J., Reinbothe, S. & Rolland, N. (2007). *J. Biol. Chem.* **282**, 29482–29492.
- Nada, A. & Soll, J. (2004). *J. Cell Sci.* **117**, 3975–3982.
- Pan, X., Zhang, H., Gao, Y., Li, M. & Chang, W. (2009). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **390**, 597–602.
- Richardson, L. G. L., Paila, Y. D., Siman, S. R., Chen, Y., Smith, M. D. & Schnell, D. J. (2014). *Front. Plant Sci.* **5**, 269.
- Rolland, N., Curien, G., Finazzi, G., Kuntz, M., Maréchal, E., Matringe, M., Ravanel, S. & Seigneurin-Berny, D. (2012). *Annu. Rev. Genet.* **46**, 233–264.
- Roth, M., Carpentier, P., Kaikati, O., Joly, J., Charraut, P., Pirocchi, M., Kahn, R., Fanchon, E., Jacquamet, L., Borel, F., Bertoni, A., Israel-Gouy, P. & Ferrer, J.-L. (2002). *Acta Cryst.* **D58**, 805–814.
- Strittmatter, P., Soll, J. & Bölter, B. (2010). *Methods Mol. Biol.* **619**, 307–321.
- Thorn, J. M., Barton, J. D., Dixon, N. E., Ollis, D. L. & Edwards, K. J. (1995). *J. Mol. Biol.* **249**, 785–799.

Crystal structures of the chloroplastic oxoene reductase ceQORH from *Arabidopsis thaliana*.

Mas y mas Sarah^{1,2,3}, Curien Gilles^{4,5,6,7}, Giustini Cécile^{4,5,6,7}, Rolland Norbert^{4,5,6,7}, Ferrer Jean-Luc^{3,1,2} and Cobessi David^{2,1,3*}

Address :

1 Univ. Grenoble Alpes, IBS, F-38044 Grenoble, France

2 CNRS, IBS, F-38044 Grenoble, France

3 CEA, IBS, F-38044 Grenoble, France

4 CNRS, Laboratoire de Physiologie Cellulaire et Végétale, UMR 5168, 17 rue des Martyrs, F-38054 Grenoble, France.

5 Univ. Grenoble Alpes, LPCV, F-38054 Grenoble, France.

6 CEA, DSV, iRTSV, LPCV, F-38054 Grenoble, France.

7 INRA, LPCV, USC1359, 17 rue des Martyrs, F-38054 Grenoble, France.

*** to whom correspondence should be addressed**

Abbreviations:

13KOD: 13-oxo-9,11-octadecadienoic acid

13KOT: 13-oxo-9(Z), 11(E), 15(Z)-octadecatrienoic acid

ceQORH: chloroplast envelope quinone oxidoreductase homologue

AtAER: alkenal/one reductase from *Arabidopsis thaliana* (cytosolic enzyme)

AtAOR: alkenone reductase from *Arabidopsis thaliana* (chloroplastic enzyme)

Abstract

Enzymatic and non-enzymatic peroxidation of polyunsaturated fatty acids give rise to accumulation of aldehydes, ketones, and α , β -unsaturated carbonyls of various chain lengths, collectively known as oxylipins. Oxylipins with α , β -unsaturated carbonyls are reactive electrophile species and are toxic due to their ability to react with thiols, proteins and nucleic acids. Cells have evolved several mechanisms to scavenge reactive electrophile oxylipins and decrease their reactivity by coupling with glutathione, and have evolved NAD(P)H-dependent reductases and dehydrogenases with various substrate specificities. Plant cells produce specific reactive electrophile oxylipins named γ -ketols. γ -ketols form spontaneously from an allene oxide intermediate in the 12-oxophytodienoic acid and jasmonate metabolic pathway. The chloroplast envelope quinone oxidoreductase homologue (ceQORH) from *Arabidopsis thaliana* was shown to reduce with high efficiency the reactive double bond of 13-lipoxygenase derived γ -ketols. In marked difference with its cytosolic homologue alkenal reductase (AER), ceQORH binds 13KOD and 13KOT, which play as inhibitors, but does not reduce them and is much less active than AER on 4-hydroxynonenal and short chain α , β -unsaturated carbonyls. In addition, ceQORH is transported into the plastid by using an alternative import pathway to the TOC/TIC machinery and displays an internal targeting sequence that is not cleaved after import. Analytical ultracentrifugation experiments and 3D structure determination of ceQORH in the absence of ligands and presence of NADPH or 13KOT and NADP⁺ showed that the enzyme has several oligomeric states, and that ceQORH-NADPH is a monomer. ceQORH displays a large ligand binding site, also observed in the structure of the broad specific cytosolic alkenal/one reductase. Positioning of the α , β -unsaturated carbonyl of 13KOT in the structure of ceQORH-NADP⁺-13KOT, far away from the NADP⁺ nicotinamide ring, provides a rational for the absence of activity with the ketodienes and ketotrienes. The internal chloroplast targeting sequence is partially solvent accessible. It is folded in the same manner in other quinone oxidoreductase homologues suggesting that the targeting information is sequence specific.

Introduction

Cell membranes are the sites of enzymatic and non-enzymatic oxidation of polyunsaturated fatty acids resulting in the production of aldehydes, ketones, and α , β -unsaturated carbonyls of various chain lengths, collectively known as oxylipins. Some oxylipins such as 4-oxononenal, 4-hydroxynonenal, ketodienes (13KOD, 9KOD), ketotrienes (9KOT and 13KOT), or the plant specific γ -ketols (Figure 1) are α , β -unsaturated carbonyls and reactive electrophile species. They can react with important cellular nucleophiles such as proteins, thiols and nucleic acids, modifying their biochemical properties. Thus, α , β -unsaturated carbonyls are toxic molecules (Esterbauer *et al.*, 1991; Szweda *et al.*, 1993). Due to the toxicity of these electrophiles, cells have developed an armory of defense to decrease the activity of reactive electrophile oxylipins. One class of enzymes involved in detoxification of reactive electrophile oxylipins are NADPH-oxidoreductases belonging to the zinc-independent MDR superfamily and more specifically to the QOR subfamily to which alkenal/one reductases belong (Porté *et al.*, 2009). These enzymes can decrease the activity of reactive electrophile oxylipins by reducing the unsaturated carbon-carbon bond located in α , β of the carbonyl group to a single bond (Yamauchi *et al.*, 2011) (Figure 1).

The chloroplast envelope Quinone Oxidoreductase Homologue (ceQORH; At4g13010) from the chloroplast envelope in *Arabidopsis thaliana* is involved in detoxification of reactive electrophile oxylipins. It is associated to the chloroplast inner membrane where it represents 1-2 % of the envelope proteins (Miras *et al.*, 2002). Despite its annotation as a “quinone oxidoreductase”, ceQORH is inactive

on quinones but preferentially reduces γ -ketols in the presence of NADPH (Curien *et al.*, 2015).

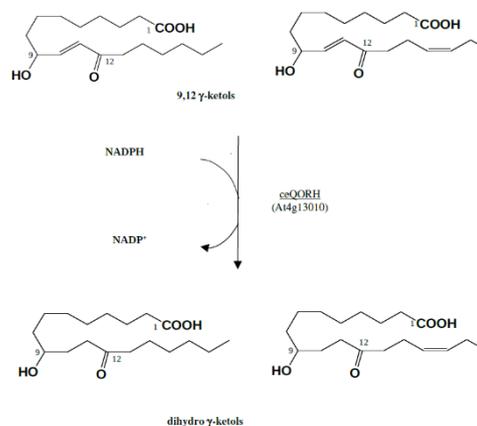


Figure 1: schema of the plant specific γ -ketols and the reduction of the unsaturated carbon-carbon bond to a single bond by the NADPH-dependent ceQORH.

γ -ketols (Figure 1) are long-chain reactive electrophile oxylipins spontaneously produced in the jasmonate biosynthetic pathway by hydrolysis of an allene oxide intermediate. ceQORH is also active though to a lesser extent on the C₉ α , β -unsaturated carbonyl 4-oxononenal (Curien *et al.*, 2015). ceQORH is thus probably dedicated to detoxification of γ -ketols which can be produced at high levels under particular conditions in plant chloroplasts (Curien *et al.*, 2015). ceQORH bears similar characteristics and sequence homology to members of the medium-chain dehydrogenase/reductase (MDR) superfamily, which includes chloroplastic alkenone reductase (*AtAOR*), *Arabidopsis thaliana* alkenal reductase (*AtAER*) (Mano *et al.*, 2002), yeast ζ -crystallin (Crosas *et al.*, 2011), human eye ζ -crystallin (Porté *et al.*, 2011), and *Escherichia coli* quinone reductase (Thorn *et al.*, 1995). However in marked difference with the chloroplastic *AtAOR*,

ceQORH does not reduce small chain α,β -unsaturated carbonyls ($C<6$). Also, compared to the cytosolic broad specific alkenal/one reductase *AtAER*, ceQORH showed a restricted substrate specificity, being inactive on the ketodienes 9 and 13KOD, or 13KOT and virtually inactive on 4-hydroxynonenal and traumatin (12-oxo-10(*E*) dodecenoate). In addition to these specific kinetic properties, ceQORH is a peculiar protein from the chloroplast envelope. It is encoded by the nuclear genome and is targeted to the chloroplast by an alternative pathway than the TOC/TIC import channel, without cleavage of its internal chloroplast targeting sequence (Miras *et al.*, 2007). This peculiarity, together with the ceQORH restricted substrate specificity, prompted us to carry out crystallographic studies in combination with analytical ultracentrifugation. Structure comparisons with those reported of *AtAER* and the model built for *AtAOR* provided insights into the molecular basis of substrate specificity. Whereas *AtAER* reduces ketodienes and ketotrienes, the reactive double bond $C_{11}=C_{12}$ located in α,β of the carbonyl group in 13KOT is far away from the $NADP^+$ nicotinamide ring in ceQORH, preventing its reduction by hydride transfer. This 13KOT location highlights why ceQORH is inactive with ketodienes or ketotrienes. Whereas apo-ceQORH is observed as a dimer and ceQORH- $NADP^+$ -13KOT or ceQORH-13KOT are tetrameric in crystals, ceQORH bound to $NADPH$ is a monomer in solution. Structures of ceQORH were also compared with those of QORs highlighting molecular bases responsible for differences in the oligomerization state.

Material and methods

Expression, purification, and analytical ultracentrifugation studies

Cloning, expression and purification of ceQORH were described previously (Mas y mas *et al.*, 2015). Analytical Analytical Analytical ultracentrifugation (AUC) studies of ceQORH bound to the 13-Oxo-9(*Z*),11(*E*),15(*Z*)-octadecatrienoic acid (13KOT) and $NADP^+$ and only bound to 13KOT were performed with a XLI from Beckman Coulter (Palo Alto, USA) and an Anti-60 rotor (Beckman Coulter). The cells have a double-sector (Nanolytics) with optical routes either of 12 mm, 3 mm or 1.5 mm, equipped with Sapphire windows. Absorbance and interference measurements were performed with the Proteomelab XLI V 6.0 software.

The samples were prepared at 0.6 mg/mL (17.9 mM), 4 mg/mL (116.6 mM) and 6.0 mg/mL (174.9 mM) in 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl (AUC buffer) supplemented with 13KOT (1.45 mM) or $NADP^+$ (1.45 mM) and 13KOT (1.45 mM). The interference and absorbance were recorded for 12 hours at 50,000 rpm, at 20°C. ceQORH was considered as a compact spherical protein (MW: 34,304 Da) with $v= 0.745$ mL/g, $f/f_{min}= 1.25$, $r= 1.005$ g/mL and $h= 1.02$ cP for a temperature of 20°C. Using these parameters, the sedimentation coefficient was estimated by Sednterp assuming several oligomerisation states (Table 1A). Data analysis was done with the software Sedfit V14.c (Table 1B). Analytical ultracentrifugation studies for ceQORH and ceQORH- $NADPH$ were performed using the same procedure (Mas y mas *et al.*, 2015).

Number of molecules	1	2	4	6
MW (kDa)	34.30	68.60	137.21	205.82
S (S)	2.8	4.4	6.9	9.1

Table 1. A: theoretical sedimentation coefficients corresponding to several oligomerisation states of ceQORH.

ceQORH-13KOT (mg/mL)	Optic	Monomer		Dimer		Tetramer	
		S (S)	% (>2S)	S (S)	% (>2S)	S (S)	% (>2S)
0.6	Absorbance	2.5	23.5	3.5	37.6	6.6	28.7
6	Absorbance	3.3	24.2	4.2	43.5	6.5	15.2
6	Interference	3.0	22.8	4.2	45.2	6.2	14.7

ceQORH-NADP ⁺ -13KOT (mg/mL)	Optic	Monomer		Dimer		Tetramer	
		S (S)	% (>2S)	S (S)	% (>2S)	S (S)	% (>2S)
0.6	Interference	2.8	14	4	54	6.6	16
4	Absorbance	2.2	8	4.3	62	6.4	31
4	Interference	2.9	11	4.1	49	6.1	32
6	Absorbance	-	-	4.1	60	5.7	40
6	Interference	-	-	4	58	5.5	42

Table 1. B: sedimentation coefficients (Svedberg) obtained. Only those superior to 2 S showing significant values were considered. The tables show percentages of monomer/dimer/tetramer in the samples of ceQORH-13KOT and ceQORH-NADP⁺-13KOT. The calculations were performed from absorbance and interference measurements.

Crystallization and data collection

Crystallization and data collection for apo-ceQORH were described (Mas y mas *et al.*, 2015). ceQORH-13KOT (1.45 mM 13KOT) and ceQORH-13KOT-NADP⁺ (1.45 mM NADP⁺, 1.45 mM 13KOT) at 5 mg/mL in 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 200 mM KCl, 2 mM DTT, 1 mM EDTA, 10% glycerol (v/v) were subjected to crystallization using the sitting-drop vapor-diffusion technique and the high throughput crystallization facility at EMBL, Grenoble, at 4°C.

Crystallization hits were optimized using Limbro plates, at 20°C. Crystals of ceQORH-13KOT-NADP⁺ were obtained in 0.2 M sodium chloride, 0.1 M Tris HCl pH 8.5, 15.5 % PEG 4K. Crystals of ceQORH-13KOT were obtained in 0.2 M ammonium tartrate pH 7.2, 20% PEG3350. Crystals of ceQORH-NADPH-13KOD (1.45 mM NADPH, 1.45 mM 13KOD) were also obtained in 0.2 M sodium chloride, 0.1 M Tris HCl pH 7.5, 28% PEG3500, but despite all our efforts, it was not possible to obtain diffraction good enough and the resulting structure was not used here.

All the diffraction data were collected on FIP-BM30A (Roth *et al.*, 2002) at the European Synchrotron Radiation Facility, Grenoble, France, at 100 K, using an ADSC 315r detector. The data (Table 2) were processed and scaled using XDS (Kabsch, 2010).

	ceQOR-13KOT	ceQORH-NADP ⁺ -13KOT
Resolution range (Å)	40.21-2.78 (2.94-2.78)	49.58-2.81 (2.98-2.81)
Space group	P1	P2 ₁
Unit cell parameters (Å, °)	a= 82.87, b= 121.01, c= 122.94 α= 66.73, β= 79.10, γ= 79.99	a= 82.16, b= 128.60, c= 150.12 γ= 97.76
Molecules in au	12	8
Number of total reflections	186,642 (27,138)	283,856 (45,069)
Unique reflections	102,756 (15,212)	75,277 (11,943)
Multiplicity	1.82 (1.78)	3.8 (3.8)
Data completeness (%)	94.8 (87.0)	99.4 (98.2)
Rsym (%)	14.5 (75.4)	8.6 (62.6)
<I/σ(I)>	6.08 (1.11)	13.67 (2.19)

Table 2: statistics of data collection $R_{sym} = \frac{\sum |I_i - I_m|}{\sum I_i}$, where I_i is the intensity of the measured reflection and I_m is the mean intensity of this reflection. Values indicated in parentheses correspond to the statistics in the highest resolution shell.

Phasing and model refinement

Phasing was performed by molecular replacement using Phaser (McCoy *et al.*, 2007) from CCP4 (CCP4, 1994). The structure of the quinone oxidoreductase from *Coxiella burnetii* (PDB entry: 3TQH) was used as model and modified based on sequence alignment with ceQORH using CHAINSAW (Stein, 2008) from CCP4 to calculate the phases for the data of ceQORH-13KOT. The other structures were solved using the monomer of ceQORH-13KOT as search model for molecular replacement. All the model refinements were performed using TLS (Painter & Merrit, 2006) and non-crystallographic symmetry. The refinements and rebuilding were done using PHENIX (Adams *et al.*, 2010) and COOT (Emsley & Cowtan, 2004), respectively. Water molecules were added in apo-ceQORH using PHENIX. Refinement statistics are summarized in Table 3.

	Apo-ceQORH	ceQORH-13KOT	ceQORH-NADP ⁺ -13KOT
Resolution (Å)	42.26-2.34 (2.42-2.34)	40.21-2.78 (2.81-2.78)	49.58-2.81 (2.84-2.81)
R _{cryst} (%)	18.23 (22.40)	20.03 (32.28)	18.82 (32.46)
R _{free} (%)	25.13 (33.21)	25.75 (36.90)	22.47 (38.87)
Number of atoms	5,276	28,354	19,584
Water molecules	388	0	0
B average (Å ²)	25.64	45.46	57.86
Rmsd bonds (Å)	0.011	0.011	0.008
Rmsd angle (°)	1.350	1.286	1.214
Ramachandran favored (%)	97.74	97.02	97.72
Ramachandran outliers (%)	1.06	1.05	0.42

Table 3: refinement statistics : Values indicated in parentheses correspond to the statistics in the highest resolution shell. $R_{cryst} = \sum ||F_{obs} - |F_{calc}|| / \sum |F_{obs}|$. R_{free} (Brunger, 1992) is the same as R_{cryst} but calculated for 5% data omitted from the refinement.

Atomic coordinates and X-ray data were deposited in the PDB with the accession numbers: apo-ceQORH (5A3V), ceQORH-13KOT (5A3J) and ceQORH-NADP⁺-13KOT (5A4D). Structure of ceQORH-NADPH-13KOD was not used for analysis since statistics of X-ray data were poor. It is roughly similar to that of ceQORH-NADP⁺-13KOT and 13KOD is located at a similar position than 13KOT.

Results

We previously showed that ceQORH, despite its annotation as a quinone oxidoreductase, does not display activity with quinones but reduces the double bond of α , β -unsaturated carbonyls (Figure 1). Its best natural substrates are 4-oxononenal and γ -ketols (both 9,12 γ -ketol 18:1 and 9,12 γ -ketol 18:2) (Curien *et al.*, 2015). ceQORH is about 6-fold more efficient on γ -ketols than on 4-oxononenal (Curien *et al.*, 2015). The enzyme was also able to reduce the carbon-carbon double bond of artificial α , β -unsaturated ketones such as *trans*-1,3-diphenyl propenone and *trans*-1,4-diphenyl-2-butene-1,4-dione. Other physiologically important α , β -unsaturated carbonyls, the ketodienes 13KOD and 13KOT, were not substrates. Interestingly, 13KOD and 13KOT proved to be inhibitors at high concentration, and 13KOT and 13KOD were used successfully for crystallization assays. Crystals were also obtained in the absence of ligands. No crystal was obtained either in the presence of γ -ketols or NADPH.

The ceQORH oligomers

Analysis of sedimentation curves from AUC experiments for ceQORH-13KOT and ceQORH-NADP⁺-13KOT showed peaks between 1.5 and 7.0 S (Figure 2A and 2B).

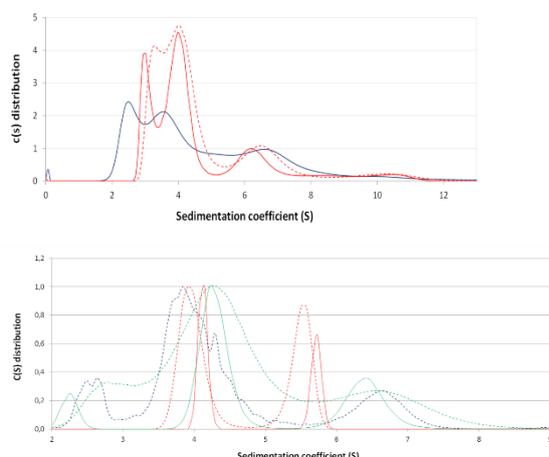


Figure 2: **A/** Sedimentation curves of ceQORH-13KOT calculated from absorbance (solid line) and interference (dashed lines) measurements for two ceQORH concentrations: 0.6 mg/mL (blue color) and 6 mg/mL (red color). **B/** Sedimentation curves of ceQORH-NADP⁺-13KOT calculated from absorbance (solid line) and interference (dashed line) experiments for three ceQORH concentrations: 0.6 mg/mL (blue color); 4.0 mg/mL (green color) and 6 mg/mL (red color).

Peaks at 3 S, 4 S and 6 S (Table 1B) correspond to several oligomeric states (*ie*: monomers, dimers and tetramers) in equilibrium. In solution, apo-ceQORH is in equilibrium between three forms, monomer, dimer and tetramer, and ceQORH-NADPH is a monomer (Mas y mas *et al.*, 2015). In crystals, apo-ceQORH is a dimer (Figure 3) and the monomers are similar with a value of root mean square deviation (rmsd) between monomers of 0.247 Å (Table 4).

	Apo-ceQORH	ceQORH-13KOT (12 mol/au)	ceQORH-NADP ⁺ -13KOT (8 mol/au)
Apo-ceQORH	0.000-0.247	0.610-0.766	0.690-0.802
ceQORH-13KOT (12 mol/au)		0.123-0.380 (0.617-0.865)	0.286-0.442 (0.657-1.158)
ceQORH-NADP ⁺ -13KOT (8 mol/au)			0.028-0.132 (1.188)

Table 4: ranges of values of root mean square deviations (in Å) between the monomers and between the tetramers (value in parentheses) of ceQORH structures, calculated using PDBeFold (Krissinel & Henrick 2004).

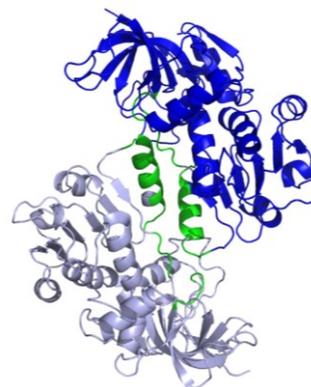


Figure 3: view of the ceQORH dimer. The β -strands are drawn in arrows and the α -helices are represented in ribbons. The interacting zones between monomers are colored in green.

The buried area in the monomer interface is 2,410 Å². On the contrary to apo-ceQORH, ceQORH-13KOT and ceQORH-NADP⁺-13KOT are tetramers in crystals (Figure 4).

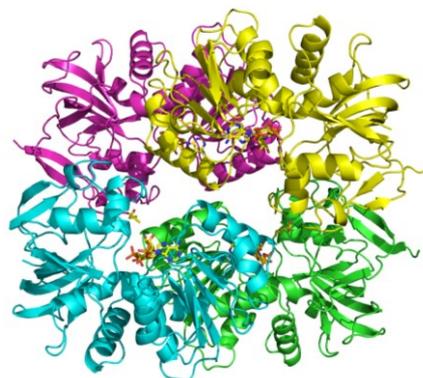


Figure 4: drawing of the ceQORH-NADP⁺-13KOT tetramer. The β -strands are drawn in arrows and the α -helices are represented in ribbons. NADP⁺ and 13KOT are drawn in sticks

Structure of tetramers are similar as characterized by low values of rmsd when they are superimposed, in a range from 0.617 to 1.188 Å (Table 4). The monomers of the three ceQORH structures can be superimposed with low rmsd going from 0.028 to 0.802 Å (Table 4). The highest differences in rmsd are observed between the monomers of apo-

ceQORH and those of complexes (Table 4). In tetramers, the buried area at the monomer interface is lower than that calculated for apo-ceQORH. The interactions between monomers are the main differences between apo-ceQORH and the tetrameric complexes. The dimer of apo-ceQORH does not superimpose on any dimer of tetramers (Figure 5).

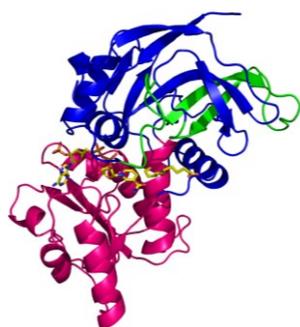


Figure 5: view of the ceQORH monomer from ceQORH-NADP⁺-13KOT. The catalytic domain (Gly3-Gly124, Lys280-Pro329) is colored in blue. The cofactor binding domain (Ala125-Pro279) is colored in pink. The internal chloroplast targeting sequence peptide (Pro59-Leu100) is colored in green. NADP⁺ and 13KOT are drawn in sticks.

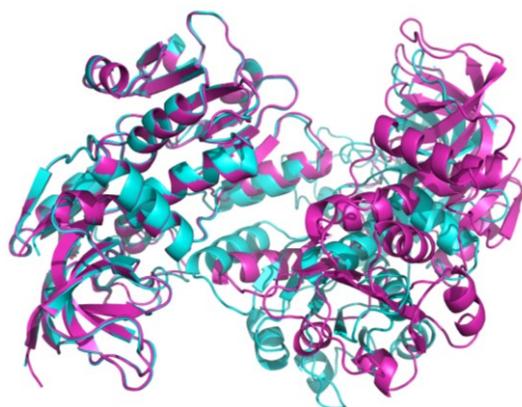


Figure 6: view of the superimposition of apo-ceQORH (blue) onto ceQORH-NADP⁺-13KOT (purple). For clarity only a dimer from tetramer was drawn.

Apo-ceQORH and ceQORH bound to ligands

The monomer of ceQORH can be divided in two domains. The catalytic domain includes residues

from Gly3 to Gly124 and from Lys280 to Pro329. The cofactor binding domain goes from Ala125 to Pro279 and displays the classical motif of Rossmann fold. Pro59 to Leu100 is the internal chloroplast targeting sequence (Figure 6). In apo-ceQORH, interactions between monomers mainly involve residues in α -helix (Pro254-Thr266) belonging to the cofactor binding domain. Each α -helix in the dimer contributes for 723 Å² to the buried area, being 60 % of the overall buried area at the monomer interface.

In ceQORH-NADP⁺-13KOT, NADP⁺ is bound at the interface of the two domains. When NADP⁺ binds to ceQORH, no overall conformational change is observed in monomers as shown by the low values of rmsd between monomers and local changes are observed. Orientation of the Arg190 side chain is modified to stabilize the 2'-phosphate of the NADP⁺ adenosine moiety, and the loop containing Thr251 in the Rossmann fold shifts to stabilize the ribose group of the NADP⁺ nicotinamide moiety by interacting with the Thr251 hydroxyl group. The main chain from Ile250 to Lys269 containing the α -helix Pro254-Thr266 is shifted when apo-ceQORH is compared either to the binary (ceQORH-13KOT) or ternary complex (ceQORH-NADP⁺-13KOT).

In tetramers of binary and ternary complexes, residues of three ceQORH monomers stabilize 13KOT by hydrogen bonds and van der Waals interactions (Figure 7). Upon 13KOT binding, the loops from Lys51 to Leu61 and from Leu97 to Gly103 moved to stabilize ligand. The 13KOT carboxylate group in one monomer is hydrogen bonded to the Arg58 guanidinium group and Tyr14 hydroxyl group from another monomer (Figure 7).

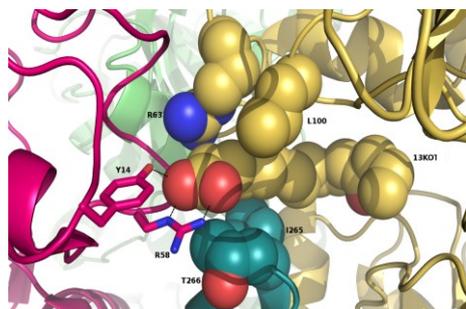


Figure 7: view of residues stabilizing the first atoms of 13KOT in tetramer of ceQORH-13KOT. 13KOT, Arg63 and Leu100 from one monomer, and Ile265, Thr266 from a second monomer are represented in van der Waals spheres. Arg58 and Tyr14 from a third monomer are drawn in stick. Hydrogen bonds between the 13KOT carboxylate group and Tyr14 and Arg58 are drawn in dashed lines.

The ligand binding site is large and solvent accessible (Figure 8). In ceQORH-NADP⁺-13KOT, the aliphatic chain of 13KOT is observed in electron density till the C₁₁ atom of the α , β -unsaturated carbon-carbon bond (C₁₁=C₁₂) and only in two monomers, suggesting flexibility of the ligand. The distance average between the C₁₁ atom and the C₄ atom of the NADP⁺ nicotinamide ring bearing the hydride is 6.84 Å. This flexibility and large distance are not compatible for a hydride transfer and the reduction of the α , β -unsaturated carbon-carbon bond (C₁₁=C₁₂).

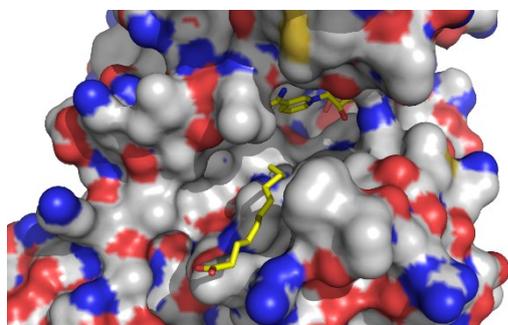


Figure 8: view of the ligand binding site of ceQORH. 13KOT until the carbon C₁₁ and NADP⁺ are drawn in stick.

To see whether inhibition by ketodienes required oligomerization, tryptophan fluorescence anisotropy measurement of ceQORH were carried out in the same experimental conditions as *in vitro* kinetics (*i.e.* 150 mM KCl, low protein concentration) where inhibition could be detected. No change in fluorescence anisotropy upon addition of NADPH, NADP⁺, 13KOD or substrates (not shown) was observed. These results are consistent with the fact that ceQORH is a monomer in solution. Therefore, oligomerization observed in crystals and AUC experiments occurs at high protein concentrations under conditions that are irrelevant of physiological conditions.

Comparisons with QORs

The apo-ceQORH monomer was used for searching homologues and comparisons with structures from the PDB using PDBefold (Krissinel & Henrick, 2004). The values of rmsd go from 1.42 Å (comparison with the quinone oxidoreductase from *Coxiella burnetii*, PDB entry: 3TQH) to 2.65 Å (comparison with a putative NADPH quinone reductase from *Mesorhizobium loti*, PDB entry: 3PI7). The sequence identity based on structure comparison goes from 20 % to 32 %. The fold of QORs is roughly conserved and also similar to that of alcohol dehydrogenases belonging to the MDR family. QORs are either monomeric or dimeric enzymes. The main difference is observed when dimeric QORs are compared with apo-ceQORH. Analysis of dimeric QORs of known structures showed that interactions between the monomers occur by involving a β -strand of the Rossmann fold leading to the formation of a dimer of QOR displaying a 12 stranded β -sheet. Residues from Gly239 to Ser258 in QOR from *Escherichia coli* (Thorn *et al.*, 1995, PDB entry: 1QOR) are folded

in a loop- β -strand (Thr246-Asn249)-loop and they connect the two last β -strands of the Rossmann fold. In ceQORH, the corresponding residues (Thr251-Lys269) are folded in a loop- α -helix (Pro254-Thr266)-loop and they also connect the two last β -strands of the Rossmann fold. This α -helix interacts with the non-crystallographic symmetry related α -helix in the dimer, as described above. Orientation and location of these secondary structures constitute the major large differences between QORs and ceQORH (Figure 9). Orientation of the α -helix (Pro254-Thr266) prevents the monomer of ceQORH to interact with another monomer to form a dimer similar to that observed in dimeric QORs. When bound to NADP⁺ or NADPH, the QORs are still dimeric while AUC studies showed that ceQORH is a monomer (Mas y mas *et al.*, 2015) in these conditions. Several interactions between NADPH and QORs are observed in ceQORH-NADP⁺-13KOT. However, residues of the catalytic site are not conserved except for Asn46 which was proposed for substrate stabilization (Guo *et al.*, 2011). Ile50, Tyr59 and Leu131 proposed for quinone orientation in catalytic site of ζ -crystallin (Zta1) from *Saccharomyces cerevisiae* (Guo *et al.*, 2011) are replaced by Val48, Ile57 and Val133 in ceQORH.

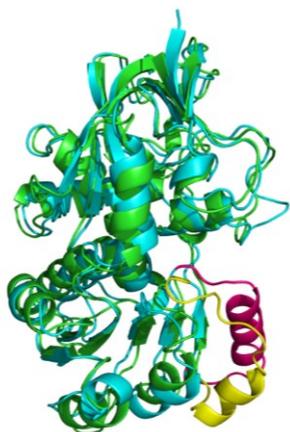


Figure 9: view of the superimposition of the monomer from 1QOR (green) onto that of ceQORH (blue). Gly239 to Ser258 in 1QOR is colored in yellow and the corresponding zone (Thr251-Lys270) in ceQORH is colored in pink.

One important feature of ceQORH is its capacity to enter the chloroplast by an alternative import pathway involving an internal targeting sequence (Miras *et al.*, 2007). The internal chloroplast targeting sequence (Pro59 to Leu100) described for ceQORH has a similar fold in the other QORs. It is folded as a two anti-parallel β -strands (Asp72 to Val80 and Lys92 to Val96 in ceQORH) connected by a long loop (Gly81 to Asp91 in ceQORH). It is partially solvent exposed in the dimer and tetramer of ceQORH.

Ligand specificity in alkenal/alkenone reductases

To gain in understanding of the ligand specificity at the molecular level, structures of the *Arabidopsis* alkenal double bond reductase At5g16970 (AtAER) bound to *p*-coumaryl aldehyde or 4-hydroxy-2-nonenal (PDB entries: 2J3J and 2J3K, respectively) (Youn *et al.*, 2006), AtAOR (Yamauchi *et al.*, 2012) and ceQORH were compared. Since no 3D structure of alkenone reductase from *A. thaliana* (AtAOR) was available in PDB for comparison, its structure was modeled using MODELER (Marti-Renom *et al.*, 2000) and the structure of the enone oxidoreductase from *Fragaria x ananassa* (PDB entry 4IDA; Schiefner *et al.*, 2013) which displays 70.4 % sequence identity with AtAOR. Analysis of the structures showed that the 3 enzymes have a large substrate binding site. However, in AtAOR the loop corresponding to Leu97-Glu107 in ceQORH and located in the vicinity of the binding site is larger than that of ceQORH and AtAER. In AtAOR this loop protrudes inside the ligand binding site.

Superimposition of *AtAOR* structure with the structures of *AtAER* and ceQORH show clashes in *AtAOR* with the ligands *p*-coumaryl aldehyde in 2J3J or 4-hydroxy-2-nonenal in 2J3K of *AtAER* and with 13KOT of ceQORH. This provides an explanation for the substrate specificity of *AtAOR*, restricted to small chain α , β -unsaturated carbonyl ($C < 5$).

Discussion

Enzymatic and non-enzymatic lipid peroxidation occurs in all organisms with an aerobic metabolism leading to production of oxylipins. Among the large family of oxylipins, some are reactive electrophile species bearing a reactive α , β -unsaturated carbonyl function. As these molecules can add to important cell constituents (DNA, proteins) and deplete glutathione (Mano *et al.*, 2009) their amount has to be tightly controlled and different enzyme activities cooperate to achieve this. Several oxidoreductases from mammals and plants belonging to the large family of MDR were shown to have the ability to detoxify α , β -unsaturated carbonyl by reducing the carbon-carbon double bond. A plant specific class of reactive electrophile oxylipins are 9,12 γ -ketols. These molecules are produced spontaneously in plant chloroplasts downstream of 13-lipoxygenase specific peroxidation at the allene oxide step (Blée, 2002, Curien *et al.*, 2015). Until recently no enzyme with the ability to detoxify γ -ketol was identified. In a previous paper (Curien *et al.*, 2015), we showed that ceQORH reduces efficiently γ -ketol, the epoxy ketone trans-EKODE Ib and the highly reactive 9 carbon atom reactive electrophile oxylipin, 4-oxonoenal. The enzyme was also active with non-natural α , β -unsaturated ketone such as 1,3-diphenyl-2-propenone and the γ -diketone 1,4-diphenyl-2-butene-1,4-dione (Curien *et al.*, 2015).

Structure analyses of ceQORH crystallized bound to ligands showed that the ligand binding site is large and solvent exposed. These properties probably allow binding of medium-sized ($C > 9$) molecules such as 1,3-diphenyl-2-propenone or 4-oxonoenal but also the long-chain molecules 9,12 γ -ketols (18 carbon atoms) (Curien *et al.*, 2015). In the course of our kinetic study, we noted that 13KOT and 13KOD could inhibit the enzyme when used at high concentration. The unsaturated carbon-carbon ($C_{11}=C_{12}$) located in α , β of the carbonyl group in 13KOT is partially observed in 2 monomers suggesting flexibility of 13KOT. The $C_{11}=C_{12}$ bond in 13KOT is far away from the NADP⁺ nicotinamide moiety. The hydride transfer cannot occur to reduce 13KOT. The positioning of 13KOT could therefore explain that ceQORH is inactive on these ketodienes and ketotrienes. This observation strongly suggests that positioning of γ -ketol in the ligand binding site of ceQORH is different from that observed for 13KOT, allowing the reduction of the unsaturated carbon-carbon bond $C_{10}=C_{11}$ (Figure 1).

Using AUC and tryptophan fluorescence anisotropy measurements, we showed that ceQORH is a monomer in solution. Therefore, ceQORH is active as a monomer, and oligomerization observed in crystals and AUC experiments occurs at high protein concentrations under conditions that are irrelevant of physiological conditions. The tetramers of ceQORH-13KOT and ceQORH-NADP⁺-13KOT are similar, and low values of rmsd between monomers or tetramers are observed. Structure comparison between tetramers and apo-ceQORH showed that dimers in the tetramers cannot be superimposed onto apo-ceQORH due to changes in oligomerisation areas between the monomers. Using AUC, we showed that apo-ceQORH is in equilibrium between monomers, dimers and tetramers (Mas y mas *et al.*,

2015). Altogether, these observations suggest that apo-ceQORH is first dissociated into monomers upon NADPH binding resulting in displacement of the equilibrium between the oligomeric forms, from oligomers to monomers, before tetramerisation upon 13KOT binding in the conditions used for AUC and crystallization.

ceQORH oligomerisation mainly occurs by involving several residues of the α -helix Pro254-Thr266 from the Rossmann fold, while the interface between monomers in dimeric QORs involves a β -strand of the Rossmann fold leading to the formation of a 12 stranded β -sheet. This dimerisation mode is prevented by orientation of the α -helix Pro254-Thr266 in ceQORH. An equivalent α -helix is observed in QOR from *Coxellia Burnetii* (PDB entry: 3TQH) bound to NADPH, which is also a monomeric QOR. Apo-ceQORH and QORs dimers highly differ due to this structural difference observed in the Rossmann fold.

Structure comparison with QORs and sequence alignment showed that the residues of the binding site are not well conserved. This probably explains the differences in ligand specificity. Unfortunately we could not obtain crystal in the presence of the substrate and the molecular basis of ceQORH versus other QOR specificity cannot be examined.

Structure comparisons and kinetic studies (Curien *et al.*, 2015) showed that ceQORH shares also structural similarities and overlapping substrate specificity with the cytoplasmic NADPH-dependent oxidoreductase 2-alkenal reductase (AER; EC 1.3.1.74) from *Arabidopsis thaliana* (PDB entries: 2J3J and 2J3K) (Mano *et al.*, 2005; Youn *et al.*, 2006). The alkenal and alkenone reductases belong to the AER/AOR families, and to the MDR

superfamily (Porté *et al.*, 2009). Kinetic studies showed that *AtAER* is able to reduce the same substrates than ceQORH and with similar efficiencies. However *AtAER* substrate specificity is much larger than that of ceQORH. The structure comparison shows that both enzymes have a large ligand binding site. ceQORH displays a very weak affinity for 4-hydroxy-2-nonenal and traumatin compared to *AtAER* (Curien *et al.*, 2015). This difference could result from the amino-acid composition of the substrate binding site. In chloroplast, small reactive aldehydes are reduced by *AtAOR*. Structure comparisons of *AtAOR* with ceQORH and *AtAER* suggested that the specificity of *AtAOR* for small compounds could result from the presence of a long loop located in the vicinity of the binding site, preventing the binding of large molecules in the *AtAOR* binding site.

The general import pathway (TOC/TIC pathway) to the chloroplast is the route taken by the majority of chloroplast proteins. During recent years, it however turned out that several proteins travel to the chloroplast through different pathways (Jarvis, 2008; Jaris & López-Juez, 2013). ceQORH is one of these peculiar proteins as it is imported into the chloroplast by an alternative import pathway, independent from the trimeric TOC159/75/34 complex (Miras *et al.*, 2007; Chang *et al.*, 2014). For most chloroplast proteins (excluding outer envelope proteins), the cleavable *N*-terminal transit peptide contains essential targeting information. This is even the case for psTIC32 which, while previously reported to be imported into the chloroplast through an alternative pathway, has its non-cleavable targeting signal in the *N*-terminus (Nada & Soll, 2004). The only known exception is ceQORH, which requires internal sequence information (located between Pro59-Leu100) to be routed to the chloroplast (Miras *et al.*,

2002). This sequence is not cleaved after import. In the ceQORH structure, this Pro59-Leu100 internal chloroplast targeting sequence is folded as a two anti-parallel β -strands (Thr71 to Gly81 and Lys92 to Val96 in ceQORH) connected by a long loop (Gly81 to Asp91 in ceQORH). This part of the protein is present in the other QORs and the fold is conserved. Therefore the information for ceQORH targeting most probably relies on the primary sequence of this internal chloroplast targeting sequence.

Acknowledgments

The diffraction experiments were conducted on beamLine FIP-BM30A at the ESRF (Grenoble, France). We thank the beamLine staff for technical help. This work used the platforms of the Grenoble Instruct centre (ISBG; UMS 3518 CNRS-CEA-UJF-EMBL) with support from FRISBI (ANR-10-INSB-05-02) and GRAL (ANR-10-LABX-49-01) within the Grenoble Partnership for Structural Biology (PSB).

References

Adams, P. D., Afonine, P. V., Bunkóczi, G., Chen, V. B., Davis, I. W., Echols, N., Headd, J. J., Hung, L.-W., Kapral, G. J., Grosse-Kunstleve, R. W., McCoy, A. J., Moriarty, N. W., Oeffner, R., Read, R. J., Richardson, D. C., Richardson, J. S., Terwilliger, T. C. and Zwart, P. H. (2010). PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Cryst.*, D **66**, 213-221.

Blée, E. (2002). Impact of phyto-oxylipins in plant defense. *Trends Plant Sci.*, **7**, 315-322.

Brunger, A. T. (1992). Free R value: a novel statistical quantity for assessing the accuracy of crystal structures. *Nature*, **355**, 472-475.

CCP4. Collaborative computational project, Number 4. The CCP4 suite: programs for protein crystallography. (1994). *Acta Cryst.*, D **50**, 760-763.

Chang, W., Soll, J. & Bölter, B. (2014). A new member of the psToc159 family contributes to distinct protein targeting pathways in pea chloroplast. *Front. Plant Sci.*, **5**, 239.

Crosas, E., Porté, S., Moeini, A., Farrés, J., Biosca, J. A., Parés, X. & Fernández, M. R. (2011). Novel alkenal/one

reductase activity of yeast NADPH:quinone reductase Zta1p. Prospect of the functional role for the ζ -crystallin family. *Chem. Biol. Interact.*, **191**, 32-37.

Curien, G., Giustini, C., Mas y mas, S., Cobessi, D., Matringe, M., Grechkin, A. & Rolland, N. (2015). ceQORH, a chloroplast membrane associated quinone oxidoreductase homolog is $\alpha\gamma$ -ketol reductase. *Phytochemistry*, submitted.

Emsley, P., Lohkamp, B., Scott W. G. & Cowtan, K. (2010). Features and development of Coot. *Acta Cryst.*, D **66**, 486-501.

Esterbauer, H., Schaur, R. J. & Zollner, H. (1991). Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malondialdehyde and related aldehydes. *Free Radic. Biol. Med.*, **11**, 81-128.

Guo, P. C., Ma, X. X., Bao, Z. Z., Ma, J. D., Chen, Y. & Zhou, C. Z. (2011). Structural insights into the cofactor-assisted substrate recognition of yeast quinone oxidoreductase Zta1. *J. Struct. Biol.*, **176**, 112-118.

Howe, G. A. & Schilmiller, A. L. (2002). Oxylipin metabolism in response to stress. *Curr. Opin. Plant Biol.*, **5**, 230-236.

Jarvis, P. (2008). Targeting of nucleus-encoded proteins to chloroplasts in plants. *New Phytol.*, **179**, 257-285.

Jarvis, P. & López-Juez, E. (2013). Biogenesis and homeostasis of chloroplasts and other plastids. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, **14**, 787-802.

Kabsch, W. (2010). XDS. *Acta Cryst.*, D **66**, 125-132.

Krissinel, E. & Henrick, K. (2004). Secondary-structure matching (SSM), a new tool for fast protein structure alignment in three dimensions. *Acta Cryst.*, D **60**, 2256-2268.

Krissinel, E. & Henrick, K. (2007). Inference of macromolecular assemblies from crystalline state. *J. Mol. Biol.*, **372**, 774-797.

Mano, J., Torii, Y., Hayashi, S., Takimoto, K., Matsui, K., Nakamura, K., Inzé, D., Babiychuk, E., Kushnir, S. & Asada K. (2002). The NADPH:quinone oxidoreductase P1-zeta-crystallin in *Arabidopsis* catalyzes the alpha,beta-hydrogenation of 2-alkenals: detoxication of the lipid peroxide-derived reactive aldehydes. *Plant Cell Physiol.*, **43**, 1445-1455.

Mano, J., Belles-Boix, E., Babiychuk, E., Inzé, D., Torii, Y., Hiraoka, E., Takimoto, K., Slooten, L., Asada, K. & Kushnir, S. (2005). Protection against photooxidative injury of tobacco leaves by 2-alkenal reductase. Detoxication of lipid peroxide-derived reactive carbonyls. *Plant Physiol.*, **139**, 1773-1783.

Mano, J., Miyatake, F., Hiraoka, E. & Tamoi, M. (2009). Evaluation of the toxicity of stress related aldehydes to photosynthesis in chloroplasts. *Planta*, **230**, 63-648.

Marti-Renom, M.A., Stuart, A., Fiser, A., Sánchez, R., Melo, F. & Sali, A. (2000). Comparative protein structure modeling of genes and genomes. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, **29**, 291-325.

- Mas y mas, S., Guistini, C., Ferrer, J.-L., Rolland, N., Curien, C. & Cobessi, D. (2015). Analytical ultracentrifugation and preliminary X-ray studies of the chloroplast envelope quinone oxidoreductase homologue from *Arabidopsis thaliana*. *Acta Cryst. F*, **71**, 455-458.
- McCoy, A. J., Grosse-Kunstleve, R. W., Adams, P. D., Winn, M. D., Storoni, L. C. & Read R. J. (2007). Phaser crystallographic software. *J. Appl. Cryst.*, **40**, 658-674.
- Miras, S., Salvi, D., Ferro, M., Grunwald, D., Garin, J., Joyard, J. & Rolland, N. (2002). Non-canonical transit peptide for import into the chloroplast. *J. Biol. Chem.*, **277**, 47770-47778.
- Miras, S., Salvi, D., Piette, L., Seigneurin-Berny, D., Grunwald, D., Reinbothe, C., Joyard, J., Reinbothe, S. & Rolland, N. (2007). Toc159- and Toc75-independent import of a transit sequence-less precursor into the inner envelope of chloroplasts. *J. Biol. Chem.*, **282**, 29482-29492.
- Nada, A & Soll, J. (2004). Inner envelope protein 32 is imported into chloroplasts by a novel pathway. *J. Cell Sci.*, **117**, 3975-3982.
- Painter, J. & Merritt, E. A. (2006). Optimal description of a protein structure in terms of multiple groups undergoing TLS motion. *Acta Cryst. D*, **62**, 439-450.
- Pan, X., Zhang, H., Gao, Y., Li, M. & Chang, W. (2009). Crystal structures of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 quinone oxidoreductase and its complex with NADPH. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **390**, 597-602.
- Porté, S., Crosas, E., Yakovtseva, E., Biosca, J. A., Farrés, J., Fernández, M. R. & Parés, X. (2009). MDR quinone oxidoreductases: the human and yeast zeta-crystallins. *Chem. Biol. Interact.*, **178**, 288-294.
- Porté, S., Moeini, A., Reche, I., Shafqat, N., Oppermann, U., Farrés, J. & Parés X. (2011). Kinetic and structural evidence of the alkenal/one reductase specificity of human ζ-crystallin. *Cell Mol. Life Sci.*, **68**, 1065-1077.
- Prost, I., Dhondt, S., Rothe, G., Vicente, J., Rodriguez, M. J., Kift, N., Carbonne, F., Griffiths, G., Esquerré-Tugayé, M. T., Rosahl, S., Castresana, C., Hamberg, M. & Fournier, J. (2005). Evaluation of the antimicrobial activities of plant oxylipins supports their involvement in defense against pathogens. *Plant Physiol.*, **139**, 1902-1913.
- Roth, M., Carpentier, P., Kaikati, O., Joly, J., Charrault, P., Pirocchi, M., Kahn, R., Fanchon, E., Jacquamet, L., Borel, F., Bertoni, A., Israel-Gouy, P. & Ferrer, J. -L. (2002). *Acta Cryst. D*, **58**, 805-814.
- Schiefner, A., Sinz, Q., Neumaier, I., Schwab, W. & Skerra, A. (2013) Structural basis for the enzymatic formation of the key strawberry flavor compound 4-hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanone. *J. Biol. Chem.*, **288**, 16815-16826.
- Sommer, M. S., Daum, B., Gross, L. E., Weis, B. L., Mirus, O., Abram, L., Maier, U. G., Kühlbrandt, W. & Schleiff, E. (2011). Chloroplast Omp85 proteins change orientation during evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 13841-13846.
- Stein, N. (2008). CHAINSAW: a program for mutating pdb files used as templates in molecular replacement. *J. Appl. Cryst.*, **41**, 641-643.
- Szweda, L. I., Uchida, K., Tsai, L. & Stadtman, E. R. (1993). Inactivation of glucose-6-phosphate-dehydrogenase by 4-hydroxy-2-nonenal - selective modification of an active-site lysine. *J. Biol. Chem.* **268**, 3342-3347.
- Thorn, J. M., Barton, J. D., Dixon, N. E., Ollis, D. L. & Edwards, K. J. (1995). Crystal structure of *Escherichia coli* QOR quinone oxidoreductase complexed with NADPH. *J. Mol. Biol.*, **249**, 785-799.
- Vollenweider, S., Weber, H., Stolz, S., Chételat, A. & Farmer, E. E. (2000). Fatty acid ketodienes and fatty acid ketotrienes: Michael addition acceptors that accumulate in wounded and diseased *Arabidopsis* leaves. *Plant J.*, **24**, 467-476.
- Yamauchi, Y., Hasegawa, A., Taninaka, A., Mizutani, M. & Sugimoto, Y. (2011). NADPH-dependent reductases involved in the detoxification of reactive carbonyls in plants. *J. Biol. Chem.* **286**, 6999-7009.
- Yamauchi, Y., Hasegawa, A., Mizutani, M. & Sugimoto, Y. (2012). Chloroplastic NADPH-dependent alkenal/one oxidoreductase contributes to the detoxification of reactive carbonyls produced under oxidative stress. *FEBS Lett.*, **586**, 1208-1213.
- Youn, B., Kim, S. J., Moinuddin, S. G., Lee, C., Bedgar, D. L., Harper, A. R., Davin, L. B., Lewis, N. G. & Kang, C. (2006). Mechanistic and structural studies of apoform, binary, and ternary complexes of the *Arabidopsis* alkenal double bond reductase At5g16970. *J. Biol. Chem.*, **281**, 40076-40088.

ANNEXES

Annexe n° 1. Conditions oxydantes du complexe TIC.

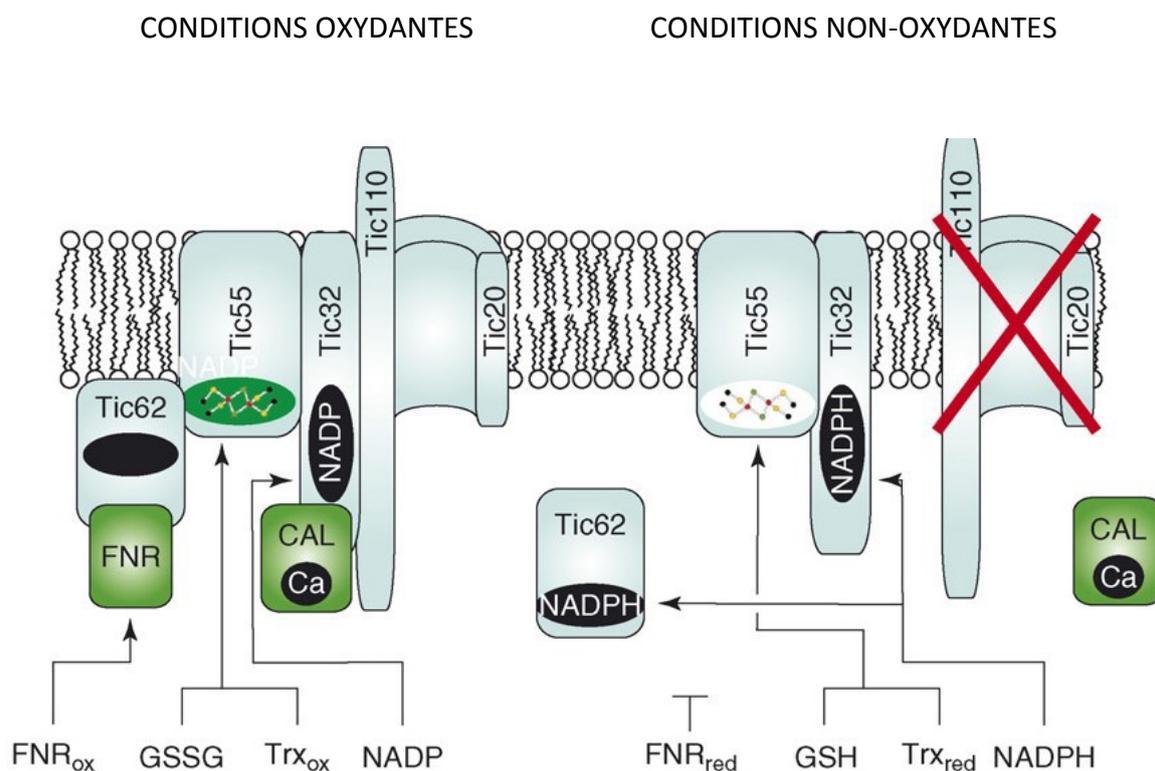


Figure n° 120. Complexe TIC dans les conditions oxydantes.

Cette figure est extrait de la publication de [Misla et al., 2007](#). Elle présente les différences d'interactions entre les différentes protéines en condition oxydante et non-oxydante. L'abréviation CAL signifie calmoduline et Ca signifie calcium, FNR signifie ferrédoxine. Dans ce complexe lorsque Tic32 appelée aussi IEP32 interagit avec le NADP⁺ alors la calmoduline peut interagir avec IEP32 en présence de calcium. A l'inverse si IEP32 fixe dans les conditions non-oxydantes le NADPH alors elle n'interagit pas avec la calmoduline.

Annexe n° 2. Les espèces réactives de l'oxygène.

1. Présentation des espèces réactives de l'oxygène

L'oxygène moléculaire est avide d'électrons. Il présente un nombre pair d'électrons avec deux d'entre eux qui sont non appariés. Ces deux électrons ont le même nombre quantique de spin. Ceci signifie que l'oxygène moléculaire ne peut transférer qu'un seul électron à la fois engendrant la production des ERO. Les ERO peuvent être des molécules radicalaires ou non radicalaires. Les radicaux libres sont des molécules possédant un ou des électrons non appariés ce qui fait d'eux des molécules très instables (Halliwell *et al.*, 2006 ; Noctor *et al.*, 2006). Ces espèces moléculaires sont :

- l'oxygène singulet : $1O_2$
- le radical anion superoxyde : $O_2^{\cdot -}$
- le peroxyde d'hydrogène : H_2O_2
- le radical hydroxyle : HO^{\cdot}

2. Production des espèces réactives de l'oxygène

- L'oxygène singulet est obtenu par irradiation du dioxygène par les rayons ultraviolets, ou par peroxydation lipidique ou dans la chaîne respiratoire. Cette forme est la plus instable et se désactive en libérant de l'énergie.
- Le radical anion superoxyde est obtenu par la capture d'un électron par la molécule d'oxygène dans des processus comme la photo-oxydation ou lors du transport des électrons dans la chaîne respiratoire mitochondriale (Fridovich *et al.*, 1978a). Cette forme est peu réactive.

Ces deux espèces sont les plus abondantes. Elles sont également la principale source pour la formation des autres ERO (Scandalios *et al.*, 2005).

- Le peroxyde d'hydrogène se forme par l'intermédiaire des superoxydes dismutases (Fridovich *et al.*, 1978b ; Fridovich *et al.*, 1995). C'est également un produit de la β -oxydation des acides gras. Cette espèce est non-radicalaire, donc plus stable que les autres ERO.

- Le radical hydroxyle est la forme la plus délétère car elle est très réactive. Il est formé à partir du peroxyde d'hydrogène via la présence de catalyseurs métalliques tels que Fe^{2+} ou Cu^{2+} par la réaction de Fenton ou alors il peut être formé par la réaction de Haber-Weiss entre $\text{O}_2^{\cdot-}$ et H_2O_2 (Mullineaux et Baker, 2010).

Annexe n° 3. Composition des solutions du matériel et méthodes.

Solutions de purification purification n°1 de la ceQORH

- ✓ Tampon de sonication : 20mM Tris pH 7,5; 150mM NaCl; 1 mM EDTA, 2 mM DTT
- ✓ Tampon A DEAE : 50mM Tris pH 7,5; 50mM KCl; 1 mM EDTA, 2 mM DTT
- ✓ Tampon de dialyse 1 : 50mM Tris pH 7,5; 20mM KCl; 1 mM EDTA, 2 mM DTT
- ✓ Tampon A S Sepharose : 50mM Tris pH 7,5; 20mM KCl; 1 mM EDTA, 2 mM DTT
- ✓ Tampon B S Sepharose : 50mM Tris pH 7,5; 500mM KCl; 1 mM EDTA, 2 mM DTT
- ✓ Tampon de dialyse 2 : 50mM Tris pH 7,5; 25mM KCl
- ✓ Tampon GF : 50mM Tris pH 7,5; 25mM KCl

Solutions de purification n°2 de la ceQORH

- ✓ Tampon de sonication : 20mM Tris pH 7,5; 150mM NaCl; 1 mM EDTA, 2 mM DTT
- ✓ Tampon A DEAE : 25mM Tris pH 7,5; 10mM NaCl; 1 mM EDTA, 2 mM DTT
- ✓ Tampon de dialyse 1 : 25mM Tris pH 7,5; 1 mM EDTA, 2 mM DTT
- ✓ Tampon A S Sepharose : 25mM Tris pH 7,5; 1 mM EDTA, 2 mM DTT
- ✓ Tampon B S Sepharose : 25mM Tris pH 7,5; 1 M NaCl; 1 mM EDTA, 2 mM DTT
- ✓ Tampon de dialyse 2 : 25mM Tris pH 7,5; 50mM NaCl
- ✓ Tampon GF : 25mM Tris pH 7,5; 50mM NaCl
- ✓ Tampon de sonication : 25 mM Tris pH 7,5; 150 mM NaCl
- ✓ Tampon A DEAE : 50 mM Tris pH 7,5; 50 mM NaCl, 3 mM DTT
- ✓ Tampon B DEAE : 50 mM Tris pH 7,5; 1 M NaCl, 3 mM DTT
- ✓ Tampon de dialyse 1 : 50 mM Tris pH 7,5; 10 mM NaCl, 3 mM DTT
- ✓ Tampon A S Sepharose : 50 mM Tris pH 7,5; 10 mM NaCl, 3 mM DTT
- ✓ Tampon B S Sepharose : 50 mM Tris pH 7,5; 1 M NaCl, 3 mM DTT
- ✓ Tampon de dialyse 2 : 50 mM Tris pH 7,5; 50 mM NaCl
- ✓ Tampon GF : 50 mM Tris pH 7,5; 50 mM NaCl

Solutions de purification d'IEP32

- ✓ Tampon de sonication : 50 mM HEPES pH 7,5; 20 mM KCl; 10% glycérol; 1 mM EDTA; 1 mM DTT

- ✓ Tampon A Q sepharose : 50 mM HEPES pH 7,5; 10% glycerol; 1 mM EDTA; 1 mM DTT
- ✓ Tampon B Q sepharose : 50 mM HEPES pH 7,5; 500 mM KCl; 10% glycerol; 1 mM EDTA; 1 mM DTT
- ✓ Tampon de dialyse 1 : 50 mM HEPES pH 7,5; 10% glycérol; 1 mM EDTA; 1 mM DTT
- ✓ Tampon A S sepharose : 25 mM HEPES pH 7,5; 10% glycerol; 1 mM EDTA; 1 mM DTT
- ✓ Tampon B S sepharose : 50 mM HEPES pH 7,5; 500 mM KCl; 10% glycerol; 1 mM EDTA; 1 mM DTT
- ✓ Tampon de dialyse 2 : 50 mM HEPES pH 7,5; 10% glycérol; 1 mM EDTA; 1 mM DTT
- ✓ Tampon GF : 50 mM HEPES pH 7,5; 25 mM KCl ; 10% glycérol

Solutions de purifications d'IEP32HT

- ✓ Tampon de sonication : 50 mM Tris pH 7,5; 150 mM NaCl
- ✓ Tampon A Ni-NTA : 50 mM Tris pH 7,5; 150 mM NaCl; 20 mM imidazole
- ✓ Tampon B Ni-NTA : 50 mM Tris pH 7,5; 150 mM NaCl; 500 mM Imidazole
- ✓ Tampon dialyse : 50 mM Tris pH 7,5; 150 mM NaCl
- ✓ Tampon GF : 50 mM Tris pH 7,5; 150 mM NaCl

Solutions de purification de la TEV

- ✓ Tampon de sonication : 50 mM Tris pH 7,5; 300 mM NaCl
- ✓ Tampon A Ni-NTA : 50 mM Tris pH 7,5; 300 mM NaCl; 10% Glycérol; 25 mM imidazole
- ✓ Tampon B Ni-NTA : 50 mM Tris pH 7,5; 300 mM NaCl; 10% Glycérol; 250 mM imidazole
- ✓ Tampon dialyse : 50 mM Tris pH 7,5; 200 mM NaCl; 10% Glycérol

Solutions de purification de la CaM

- ✓ Tampon de sonication : 25 mM Tris pH 7,5; 150 mM NaCl
- ✓ Tampon A DEAE : 25 mM Tris pH 7,5; 10 mM NaCl; 1 mM EDTA; 2 mM DTT
- ✓ Tampon B DEAE : 25 mM Tris pH 7,5, 1 M NaCl, 1 mM EDTA, 2 mM DTT
- ✓ Tampon de dialyse 1 : 25 mM Tris pH 7,5
- ✓ Tampon A MonoQ : 25 mM Tris pH 7,5

- ✓ Tampon B MonoQ : 25 mM Tris pH 7,5; 1 M NaCl
- ✓ Tampon de dialyse 2 : 25 mM Tris pH 7,5; 50 mM NaCl
- ✓ Tampon GF : 25 mM Tris pH 7,5; 50 mM NaCl

Solutions pour les westerns blots

- ✓ Tampon PBSt : Phosphate Buffer Saline pH 7,4 à 1 X final, 0,1% Tween
- ✓ Tampon PBStl : Phosphate Buffer Saline pH 7,4 à 1 X final, 0,1% Tween, 5% lait en poudre
- ✓ Tampon de transfert : 25 mM Tris-HCl, 250 mM glycine à 10 X à pH 8,3, 15% éthanol

Annexe n° 4. Alignement de séquences.

					### #				
gi 67460977	9	[1].QYNSYGG.[8].QVPVP.[5].EVCLKL.[1].ATSLNPEYDWKI.[15].IPATDVAG.[12].KAGDKVVA	95						
	9	[1].QYNSYGG.[8].QVPVP.[5].EVCLKL.[1].ATSLNPEYDWKI.[15].IPATDVAG.[12].KAGDKVVA	95						
gi 116252111	4	[1].QYHQYGG.[9].ELASP.[3].QVAVKI.[1].FAAINPTDWKL.[15].AMGMDISG.[12].KIGDAVFG	89						
gi 32473083	16	[1].VYDDYGD.[7].VVPLP.[5].QVLIDV.[1].ASSVNEFDYKI.[15].VPGYDVAG.[11].EVDGDRVMA	100						
gi 168016771	9	[1].QYSTFGG.[8].EIPMP.[5].QLLIKV.[1].AASVNEFDYKI.[15].IPGTDVAG.[12].AVGDKVSC	96						
gi 215481750	4	[1].TSDRYGP.[7].QVARP.[5].GVLVRV.[1].ASSVNEFDYKI.[15].ILGTDLAG.[12].QPGDDVVG	95						
gi 196182132	4	[1].AINQYGG.[7].DLPTP.[5].EILVKV.[1].ATSLNPEYDWKI.[15].ILGFDISG.[12].QPGDQIYA	89						
gi 158339308	4	[1].VLSNYGS.[9].EKPIP.[3].EVLVKV.[1].ATTINDNDWLL.[20].VPGVEMAG.[12].QPGDITVS	94						
gi 209549893	4	[1].QYDRHGG.[7].DYDLP.[5].EVRVSV.[1].AAAINPTDWKL.[15].GMGTFDAG.[12].RVGDEVFG	89						
gi 119509292	4	[1].VIRRYGS.[7].EVAQP.[5].QLLVKV.[1].ASSVNEFDYKI.[15].ILGFDLAG.[12].QPGDAVYG	89						
					### #				
gi 67460977	96	[7].GGLAEFAVA.[5].VKRPQEVG.[3].AAALFVAGLTALQAL.[13].KANIIVTAASGGVGHYAVQLAKLA	179						
	96	[7].GGLAEFAVA.[5].VKRPQEVG.[3].AAALFVAGLTALQAL.[13].KANIIVTAASGGVGHYAVQLAKLA	179						
gi 116252111	90	[7].GALGEAVVT.[5].AKKPDTVS.[3].AACLGTPGAAWNGL.[8].GEHVEINSGTGAVQPAAVQIAQIL	168						
gi 32473083	101	[7].GASADFAVA.[5].AAIPDSMS.[3].AAAVFLAGTALQSL.[8].GKRLLINGASGGVGMFAVQIAKAF	179						
gi 168016771	97	[7].GSLAEYAAV.[5].AKRPETVS.[3].GASFGVAGTALQAV.[13].DKNLLITTAASGGVGHYAVQIAKLG	180						
gi 215481750	96	[7].GAFAEYVCV.[5].VAKPVHIS.[3].AAAVFPAAGMALQGL.[8].GQRLLVCGASGGVGLAVQIGKAL	174						
gi 196182132	90	[7].GAYTEYAVV.[5].CPKPEKLS.[3].AAAVFLAGTALQAL.[8].GYNVIVINGASGGVGLAVQIAKAF	168						
gi 158339308	95	[7].GGFAEYVCV.[5].APMPEGMT.[3].AAAIPTAAMAIQGL.[8].GQRLLINGASGGVGLAVQIANAV	173						
gi 209549893	90	[7].GAFAEAVLV.[5].AKKPPQLS.[3].AASLPTAAMAWVAI.[8].GARIEINGCSGAVCALAIQLAVSR	168						
gi 119509292	90	[6].GAYAEFAAV.[5].APKPKNLT.[3].AATVFLAALALQAL.[8].GQRVIVINGASGGVGMFAVQIAKAL	167						
					##				
gi 67460977	180	[3].VTATCG.[2].NIEFVKSLG.[1].DEVLDYK.[11].GKKYDAVVHCA.[3].PFSVFE.[6].GKVIDITP	252						
	180	[3].VTATCG.[2].NIEFVKSLG.[1].DEVLDYK.[11].GKKYDAVVHCA.[3].PFSVFE.[6].GKVIDITP	252						
gi 116252111	169	[3].VSGSFS.[2].ATERARGLG.[1].QTVFDIR.[7].RERFDVVYDTA.[7].GLGLLR.[2].GRFVDLNP	237						
gi 32473083	180	[3].VDAVNS.[2].NEKFCRSLG.[6].YETDITP.[2].DERWDLIFDLA.[4].YWDVKK.[5].GRYVTEP	248						
gi 168016771	181	[3].VTATCG.[2].NVALIKSLG.[1].DEVLDYK.[11].GRKYDAVHCA.[3].PFSDFK.[6].GKVIDITP	253						
gi 215481750	175	[3].VTALAR.[2].KMEMLRGLG.[1].DDVVDIN.[8].GQHYDVILDLA.[3].PVADYR.[6].GAYILVGG	244						
gi 196182132	169	[3].VTGVNS.[2].SEFVKQLG.[1].DRVIDITP.[7].TAKYDIIFDVI.[3].SFWGCQ.[6].GVYITTP	237						
gi 158339308	174	[4].VTGIDR.[2].KFTLMRSVG.[1].THTIDITP.[7].QERYDVILDTK.[4].PFKYLS.[5].GTIVTVGG	243						
gi 209549893	169	[3].VAGACG.[2].SRESARAAG.[4].FHYSDS-PAGEQ.[4].QGTYDAVFDIT.[7].GFAMLN.[2].GVFVDTNP	237						
gi 119509292	168	[3].VTAVNS.[2].NIEFVKSLG.[1].DRVIDITP.[7].GGQYDIIFDVI.[1].KRSLSN.[8].GIYISTIP	236						
					###				
gi 67460977	253	[18].QLVPLLL.[6].LEFMVNLV.[2].GKVKTVIDSKH.[5].EDAWAKS.[4].ATGKIIV	327						
	253	[18].QLVPLLL.[6].LEFMVNLV.[2].GKVKTVIDSKH.[5].EDAWAKS.[4].ATGKIIV	327						
gi 116252111	238	[12].RLKVVVQ.[6].LDRIARAA.[2].ENLRPLIAEIV.[2].SEAIPLI.[8].LAGKALV	307						
gi 32473083	249	[16].SGTVMLA.[6].LRTLIEMR.[2].GQLQITIDAIY.[5].SQAQHV.[4].ERKVVVL	321						
gi 168016771	254	[18].RFVPLML.[6].LAVLTSLV.[2].GKLKTVVDSTF.[5].EKAWKQ.[4].STGKVLV	328						
gi 215481750	245	[21].RIRCLSS.[6].LTTLCDWL.[2].GILTPFIDRTF.[5].SEAIRYV.[4].VRGKVVV	322						
gi 196182132	238	[17].KAKVVVV.[6].LKSLKELI.[2].QKVRPVIAQTY.[5].GKAHQES.[4].VVGKLVV	311						
gi 158339308	244	[21].SVRLVSL.[5].LAYVNELW.[2].GQLKPAIDGPY.[5].PRLIQYF.[4].HQGKVVV	320						
gi 209549893	238	[12].RYKLAFV.[6].LPAIAELA.[2].GTLRPAIGLEA.[2].TDALSVI.[8].TSGKTVL	307						
gi 119509292	237	[17].KAKFVIE.[6].LVYLKELI.[2].GKMRTVIDRSF.[5].AAAHNYS.[4].TVGKIAI	310						

Figure n° 121. Alignement de séquences de protéines de la famille MDR1.

Sur cette figure les résidus impliqués dans la fixation du cofacteur sont surlignés en jaune et ceux présentant le motif de fixation du cofacteur par la famille de MDR1 est encadré en rouge. La première séquence est celle de la ceQORH (10-327). Les autres séquences définissent ces protéines suivantes :

gi 116252111 = Alcool déshydrogénase de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*

gi 32473083 = Quinone oxydoréductase de *Rhodopirellula baltica* SH 1

gi 168016771 = Protéine prédite de *Physcomitrella patens*

gi 215481750 = Quinone réductase de *Synechococcus elongatus* PCC 7942

gi 196182132 = Alcool déshydrogénase GroES-like de *Coleofasciculus chthonoplastes* PCC 7420

gi 158339308 = Oxydoréductase liant le zinc d'*Acaryochloris marina* MBIC11017

gi 209549893 = Alcool déshydrogénase GroES-like de *Rhizobium leguminosarum* bv. *Trifolii* WSM2304

gi 119509292 = Quinone oxydoréductase de *Nodularia spumigena* CCY9414

REFERENCES

REFERENCES

A

- Abdallah F., Salamini F. and Leister D. (2000). A prediction of the size and evolutionary origin of the proteome of chloroplasts of *Arabidopsis*. *Trends Plant Sci.* *5*, 141–142.
- Adams P.D., Afonine P.V., Bunkóczi G., Chen V.B., Davis I.W., Echols N., Headd J.J., Hung L.W., Kapral G.J., Grosse-Kunstleve R.W., *et al.* (2010). *PHENIX*: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography.* *66*, 213–221.
- Albert M., Kaiser B., van der Krol S. and Kaldenhoff R. (2010). Calcium signaling during the plant-plant interaction of parasitic *Cuscuta reflexa* with its hosts. *Plant Signal Behav.* *5*, 1144–1146.
- Allen J.F. (2015). Why chloroplasts and mitochondria retain their own genomes and genetic systems: collocation for redox regulation of gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* *112*, 10231–10238.
- Almérás E., Stolz S., Vollenweider S., Reymond P., Mène-Saffrané L. and Farmer E.E. (2003). Reactive electrophile species activate defense gene expression in *Arabidopsis*. *The Plant Journal.* *34*, 205–216.
- Andersson A., Forsén S., Thulin E. and Vogel H.J. (1983). Cadmium-113 nuclear magnetic resonance studies of proteolytic fragments of calmodulin: assignment of strong and weak cation binding sites. *Biochemistry.* *22*, 2309–2313.
- Andreou A., Brodhun F. and Feussner I. (2009). Biosynthesis of oxylipins in non-mammals. *Progress in Lipid Research.* *48*, 148–170.
- Andrès C., Agne B. and Kessler F. (2010). The TOC complex: Preprotein gateway to the chloroplast. *Biochimica and Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research.* *1803*, 715–723.
- Apel, K. and Hirt, H. (2004). Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu Rev Plant Biol.* *55*, 373–399.
- Aronsson H. and Jarvis P. (2011a). Dimerization of TOC receptor GTPases and its implementation for the control of protein import into chloroplasts. *Biochem. J.* *436*, e1–e2.
- Aronsson H. and Jarvis R.P. (2011b). Rapid isolation of *Arabidopsis* chloroplasts and their use for in vitro protein import assays. *Methods Mol. Biol.* *774*, 281–305.

B

- Babu Y.S., Sack J.S., Greenhough T.J., Bugg C.E., Means A.R. and Cook W.J. (1985). Three-dimensional structure of calmodulin. *Nature.* *315*, 37–40.
- Bachmann A., Hause B., Maucher H., Garbe E., Vörös K., Weichert H., Wasternack C. and Feussner I. (2002). Jasmonate-induced lipid peroxidation in barley leaves initiated by distinct 13-LOX forms of chloroplasts. *Biol. Chem.* *383*, 1645–1657.
- Bailey-Serres J. (2006). The roles of reactive oxygen species in plant cells. *Plant physiology.* *141*, 311–311.
- Baldwin A., Wardle A., Patel R., Dudley P., Park S.K., Twell D., Inoue K. and Jarvis P. (2005). A molecular-genetic study of the *Arabidopsis* Toc75 gene family. *Plant Physiol.* *138*, 715–733.
- Balsera M., Stengel A., Soll J. and Bölder B. (2007). Tic62: a protein family from metabolism to protein translocation. *BMC Evolutionary Biology.* *7*, 43.
- Bancroft I. (2000). Insights into the structural and functional evolution of plant genomes afforded by the nucleotide sequences of chromosomes 2 and 4 of *Arabidopsis thaliana*. *Yeast* *17*, 1–5.
- Barbato G., Ikura M., Kay L.E., Pastor R.W. and Bax A. (1992). Backbone dynamics of calmodulin studied by ¹⁵N relaxation using inverse detected two-dimensional NMR spectroscopy: the central helix is flexible. *Biochemistry.* *31*, 5269–5278.
- Baudisch B., Langner U., Garz I. and Klösgen R.B. (2014). The exception proves the rule? Dual targeting of nuclear-encoded proteins into endosymbiotic organelles. *New Phytol.* *201*, 80–90.
- Bauer J. (2002). Essential role of the G-domain in targeting of the protein import receptor atToc159 to the chloroplast outer membrane. *The Journal of Cell Biology.* *159*, 845–854.
- Bauer J., Hiltbrunner A. and Kessler F. (2001). Molecular biology of chloroplast biogenesis: gene expression, protein import and intraorganellar sorting. *Cell. Mol. Life Sci.* *58*, 420–433.

REFERENCES

- Becker T., Hritz J., Vogel M., Caliebe A., Bukau B., Soll J. and Schleiff E. (2004a). Toc12, a novel subunit of the intermembrane space preprotein translocon of chloroplasts. *Mol. Biol. Cell.* *15*, 5130–5144.
- Becker T., Jelic M., Vojta A., Radunz A., Soll J. and Schleiff E. (2004b). Preprotein recognition by the Toc complex. *EMBO J.* *23*, 520–530.
- Beckmann R.P., Mizzen L.E. and Welch W.J. (1990). Interaction of Hsp70 with newly synthesized proteins: implications for protein folding and assembly. *Science* *248*, 850–854.
- Ben Rejeb K., Benzarti M., Debez A., Bailly C., Sauré A. and Abdelly C. (2015). NADPH oxidase-dependent H₂O₂ production is required for salt-induced antioxidant defense in *Arabidopsis thaliana*. *J. Plant Physiol.* *174*, 5–15.
- Benz J.P., Stengel A., Lintala M., Lee Y.H., Weber A., Philippar K., Gügel I.L., Kaieda S., Ikegami T., Mulo P., *et al.* (2009a). *Arabidopsis* Tic62 and ferredoxin-NADP(H) oxidoreductase form light-regulated complexes that are integrated into the chloroplast redox poise. *Plant Cell.* *21*, 3965–3983.
- Benz J.P., Soll J. and Bölter B. (2009b). Protein transport in organelles: the composition, function and regulation of the TIC complex in chloroplast protein import. *FEBS J.* *276*, 1166–1176.
- Bhattacharyya M., Upadhyay R. and Vishveshwara S. (2012). Interaction signatures stabilizing the NAD(P)-binding Rossmann fold: a structure network approach. *PLoS ONE.* *7*, e51676.
- Bhushan S., Kuhn C., Berglund A.K., Roth C. and Glaser E. (2006). The role of the *N*-terminal domain of chloroplast targeting peptides in organellar protein import and miss-sorting. *FEBS Letters* *580*, 3966–3972.
- Biggar K., Dawson N. and Storey K. (2012). Real-time protein unfolding: a method for determining the kinetics of native protein denaturation using a quantitative real-time thermocycler. *BioTechniques.* *53*, 231–238.
- Bionda T., Koenig P., Oreb M., Tews I. and Schleiff E. (2008). pH sensitivity of the GTPase Toc33 as a regulatory circuit for protein translocation into chloroplasts. *Plant Cell Physiol.* *49*, 1917–1921.
- Blée, E. (1998). Phytooxylipins and plant defense reactions. *Progress in Lipid Research* *37*, 33–72.
- Blée E. (2002). Impact of phyto-oxylipins in plant defense. *Trends Plant Sci.* *7*, 315–322.
- Blobel J., Bernadó P., Svergun D.I., Tauler R. and Pons M. (2009). Low-resolution structures of transient protein-protein complexes using small-angle X-ray scattering. *J. Am. Chem. Soc.* *131*, 4378–4386.
- Block M.A., Douce R., Joyard J. and Rolland N. (2007). Chloroplast envelope membranes: a dynamic interface between plastids and the cytosol. *Photosyn. Res.* *92*, 225–244.
- Blokhina O. (2003). Antioxidants, Oxidative Damage and Oxygen Deprivation Stress: a Review. *Annals of Botany* *91*, 179–194.
- Bose K.S. and Sarma R.H. (1975). Delineation of the intimate details of the backbone conformation of pyridine nucleotide coenzymes in aqueous solution. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *66*, 1173–1179.
- Boyer P.M. and Hsu J.T. (1993). Protein purification by dye-ligand chromatography. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* *49*, 1–44.
- Breuers F.K.H., Bräutigam A. and Weber A.P.M. (2011). The Plastid Outer Envelope - A highly dynamic interface between plastid and cytoplasm. *Front Plant Sci.* *2*, 97.
- Bruce B.D. (2001). The paradox of plastid transit peptides: conservation of function despite divergence in primary structure. *Biochimica and Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research.* *1541*, 2–21.
- Bruch E.M., Rosano G.L. and Ceccarelli E.A. (2012). Chloroplastic Hsp100 chaperones ClpC2 and ClpD interact in vitro with a transit peptide only when it is located at the *N*-terminus of a protein. *BMC Plant Biology.* *12*, 57.
- Brunger A. T. (1992). Free R value: a novel statistical quantity for assessing the accuracy of crystal structures. *Nature.* *355*, 472–475.

C

- Caliebe A., Grimm R., Kaiser G., Lübeck J., Soll J. and Heins L. (1997). The chloroplastic protein import machinery contains a Rieske-type iron-sulfur cluster and a mononuclear iron-binding protein. *EMBO J.* *16*, 7342–7350.
- Carol P. and Kuntz M. (2001). A plastid terminal oxidase comes to light: implications for carotenoid biosynthesis

REFERENCES

- and chlororespiration. *Trends in Plant Science*. 6, 31–36.
- Chagot B. and Chazin W.J. (2011). Solution NMR structure of apo-calmodulin in complex with the IQ motif of human cardiac sodium channel NaV1.5. *Journal of Molecular Biology*. 406, 106–119.
- Chechetkin I.R., Medvedeva N.V. and Grechkin A.N. (2004). The novel pathway for ketodiene oxylipin biosynthesis in Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus*) tubers. *Biochim. Biophys. Acta* 1686, 7–14.
- Chen X. and Schnell D.J. (1999). Protein import into chloroplasts. *Trends Cell Biol.* 9, 222–227.
- Chen K., Chen X. and Schnell D.J. (2000a). Mechanism of protein import across the chloroplast envelope. *Biochem. Soc. Trans.* 28, 485–491.
- Chen K., Chen X. and Schnell D.J. (2000b). Initial binding of preproteins involving the Toc159 receptor can be bypassed during protein import into chloroplasts. *Plant Physiology*. 122, 813–822.
- Chen X. (2002). In Vivo Analysis of the Role of atTic20 in Protein Import into Chloroplasts. *The Plant Cell online*. 14, 641–654.
- Chen F., Tholl D., D'Auria J.C., Farooq A., Pichersky E. and Gershenzon J. (2003). Biosynthesis and emission of terpenoid volatiles from *Arabidopsis* flowers. *Plant Cell*. 15, 481–494.
- Chen R, Li L, Weng Z. (2003) ZDOCK: An Initial-stage Protein Docking Algorithm. *Proteins* 52(1): 80-7.
- Cheng W.H. (2002). A Unique Short-Chain Dehydrogenase/Reductase in *Arabidopsis* glucose signaling and abscisic acid biosynthesis and functions. *The Plant Cell online*. 14, 2723–2743.
- Cheung W.Y. (1970). Cyclic3',5'-nucleotide phosphodiesterase. Demonstration of an activator. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 38, 533–538.
- Chew O. and Whelan J. (2004). Just read the message: a model for sorting of proteins between mitochondria and chloroplasts. *Trends Plant Sci.* 9, 318–319.
- Chi W., Feng P., Ma J. and Zhang L. (2015). Metabolites and chloroplast retrograde signaling. *Current Opinion in Plant Biology*. 25, 32–38.
- Chigri F., Soll J. and Vothknecht U.C. (2005). Calcium regulation of chloroplast protein import. *Plant J.* 42, 821–831.
- Chigri F., Hörmann F., Stamp A., Stammers D.K., Bölder B., Soll J. and Vothknecht U.C. (2006). Calcium regulation of chloroplast protein translocation is mediated by calmodulin binding to Tic32. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 16051–16056.
- Chigri F., Flosdorff S., Pilz S., Kölle E., Dolze E., Gietl C. and Vothknecht U.C. (2012). The *Arabidopsis* calmodulin-like proteins AtCML30 and AtCML3 are targeted to mitochondria and peroxisomes, respectively. *Plant Mol. Biol.* 78, 211–222.
- Chin D. and Means A.R. (2000). Calmodulin: a prototypical calcium sensor. *Trends Cell Biol.* 10, 322–328.
- Chou M.L., Fitzpatrick L.M., Tu S.L., Budziszewski G., Potter-Lewis S., Akita M., Levin J.Z., Keegstra K. and Li H.M. (2003). Tic40, a membrane-anchored co-chaperone homolog in the chloroplast protein translocon. *EMBO J.* 22, 2970–2980.
- Chou M.L., Chu C.C., Chen L.J., Akita M. and Li H. (2006). Stimulation of transit-peptide release and ATP hydrolysis by a cochaperone during protein import into chloroplasts. *J. Cell Biol.* 175, 893–900.
- Chu C.C. and Li H. (2012). The amino-terminal domain of chloroplast Hsp93 is important for its membrane association and functions in vivo. *Plant Physiol.* 158, 1656–1665.
- Clapham D.E. (2007). Calcium signaling. *Cell*. 131, 1047–1058.
- Cline K. and Dabney-Smith C. (2008). Plastid protein import and sorting: different paths to the same compartments. *Curr. Opin. Plant Biol.* 11, 585–592.
- Collaborative Computational Project, Number 4 (1994). The CCP4 suite: programs for protein crystallography. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 50, 760–763.
- Crouch T.H. and Klee C.B. (1980). Positive cooperative binding of calcium to bovine brain calmodulin. *Biochemistry*. 19, 3692–3698.
- Crowther R.A. and Blow D.M. (1967). A method of positioning a known molecule in an unknown crystal

REFERENCES

structure. *Acta Cryst.* 23, 544–548.

D

Danpure C.J. (1995). How can the products of a single gene be localized to more than one intracellular compartment? *Trends Cell Biol.* 5, 230–238.

Dash C., Vathipadikeal V., George S.P. and Rao M. (2002). Slow-tight binding inhibition of xylanase by an aspartic protease inhibitor: kinetic parameters and conformational changes that determine the affinity and selectivity of the bifunctional nature of the inhibitor. *Journal of Biological Chemistry.* 277, 17978–17986.

Deisseroth K., Heist E.K. and Tsien R.W. (1998). Translocation of calmodulin to the nucleus supports CREB phosphorylation in hippocampal neurons. *Nature.* 392, 198–202.

DeLano M.C., Cao Y. (2002). High b-value diffusion imaging. *Neuroimaging Clin. N. Am.* 12, 21–34.

Dell'Aglio E., Giustini C., Salvi D., Brugiè S., Delpierre F., Moyet L., Baudet M., Seigneurin-Berny D., Matringe M., Ferro M., *et al.* (2013). Complementary biochemical approaches applied to the identification of plastidial calmodulin-binding proteins. *Mol. Biosyst.* 9, 1234–1248.

DeLong L.J., Blasie J.K. (1993). Effect of Ca²⁺ binding on the profile structure of the sarcoplasmic reticulum membrane using time-resolved x-ray diffraction. *Biophys J.* 64(6):1750-9.

Demarsy E., Lakshmanan A.M. and Kessler F. (2014). Border control: selectivity of chloroplast protein import and regulation at the TOC-complex. *Front Plant Sci.* 5, 483.

Demidchik V. (2015). Mechanisms of oxidative stress in plants: from classical chemistry to cell biology. *Environmental and Experimental Botany.* 109, 212–228.

Dick I. E., Tadross M.R., Liang H., Tay L.H., Yang W. and Yue D.T. (2008). A modular switch for spatial Ca²⁺ selectivity in the calmodulin regulation of CaV channels. *Nature.* 451, 830–834.

Dietz K.J. and Scheibe R. (2004). Redox regulation: an introduction. *Physiol Plant.* 120, 1–3.

Dobberstein B., Blobel G. and Chua N.H. (1977). In vitro synthesis and processing of a putative precursor for the small subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 74, 1082–1085.

Donald J.E. and Shakhnovich E.I. (2009). SDR: a database of predicted specificity-determining residues in proteins. *Nucleic Acids Research.* 37, 191–194.

Douce R. and Joyard J. (1990). Biochemistry and function of the plastid envelope. *Annu. Rev. Cell Biol.* 6, 173–216.

Douwe de Boer A. and Weisbeek P.J. (1991). Chloroplast protein topogenesis: import, sorting and assembly. *Biochim. Biophys. Acta.* 1071, 221–253.

Drago I., Giacomello M., Pizzo P. and Pozzan T. (2008). Calcium dynamics in the peroxisomal lumen of living cells. *J. Biol. Chem.* 283, 14384–14390.

Drum C.L., Yan S.Z., Bard J., Shen Y.Q., Lu D., Soelaiman S., Grabarek Z., Bohm A. and Tang W.J. (2002). Structural basis for the activation of anthrax adenyl cyclase exotoxin by calmodulin. *Nature.* 415, 396–402.

Dupeux F., Röwer M., Seroul G., Blot D. and Márquez J.A. (2011). A thermal stability assay can help to estimate the crystallization likelihood of biological samples. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 67, 915–919.

Durand D., Vivès C., Cannella D., Pérez J., Pebay-Peyroula E., Vachette P., Fieschi F. (2010). NADPH oxidase activator p67(phox) behaves in solution as a multidomain protein with semi-flexible linkers. *J Struct Biol.* 169, 45–53.

Dyall S.D., Brown M.T. and Johnson P.J. (2004). Ancient invasions: from endosymbionts to organelles. *Science* 304, 253–257.

E

Ebel C. and Zaccai G. (2004). Crowding in extremophiles: linkage between solvation and weak protein-protein interactions, stability and dynamics, provides insight into molecular adaptation. *J. Mol. Recognit.* 17, 382–389.

Edwards K.J., Barton J.D., Rossjohn J., Thorn J.M., Taylor G.L. and Ollis D.L. (1996). Structural and sequence

REFERENCES

comparisons of quinone oxidoreductase, ζ -crystallin, and glucose and alcohol dehydrogenases. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. *328*, 173–183.

Eklund H. and Ramaswamy S. (2008). Medium- and Short-chain Dehydrogenase/Reductase gene and protein families: three-dimensional structures of MDR alcohol dehydrogenases. *Cellular and Molecular Life Sciences*. *65*, 3907–3917.

Emsley P. and Cowtan K. (2004). Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* *60*, 2126–2132.

Eschenbrenner M., Chlumsky L.J., Khanna P., Strasser F. and Jorns M.S. (2001). Organization of the multiple coenzymes and subunits and role of the covalent flavin link in the complex heterotetrameric sarcosine oxidase. *Biochemistry*. *40*, 5352–5367.

F

Fallon J.L., Quioco F.A. (2003). A closed compact structure of native Ca^{2+} -calmodulin. *Structure*. *11*, 1303–1307.

Farmer E.E., Alméras E., Krishnamurthy V. (2003). Jasmonates and related oxylipins in plant responses to pathogenesis and herbivory. *Curr. Opin. Plant Biol.* *6*, 372–378.

Farmer E.E. and Davoine C. (2007). Reactive electrophile species. *Current Opinion in Plant Biology*. *10*, 380–386.

Favia A.D., Nobeli I., Glaser F. and Thornton J.M. (2008). Molecular docking for substrate identification: the Short-Chain Dehydrogenases/Reductases. *Journal of Molecular Biology*. *375*, 855–874.

Ferro M., Salvi D., Brugière S., Miras S., Kowalski S., Louwagie M., Garin J., Joyard J. and Rolland N. (2003). Proteomics of the chloroplast envelope membranes from *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Cell Proteomics*. *2*, 325–345.

Ferro M., Brugière S., Salvi D., Seigneurin-Berny D., Court M., Moyet L., Ramus C., Miras S., Mellal M., Le Gall S., *et al.* (2010). AT_CHLORO, a comprehensive chloroplast proteome database with subplastidial localization and curated information on envelope proteins. *Mol. Cell Proteomics*. *9*, 1063–1084.

Feussner I. and Wasternack C. (2002). The lipoxygenase pathway. *Annu. Rev. Plant Biol.* *53*, 275–297.

Filling C., Nordling E., Benach J., Berndt K.D., Ladenstein R., Jörnvall H., and Oppermann U. (2001). Structural role of conserved Asn179 in the Short-Chain Dehydrogenase/Reductase scaffold. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. *289*, 712–717.

Franklin M.C., Cheung J., Rudolph M.J., Burshteyn F., Cassidy M., Gary E., Hillerich B., Yao Z.K., Carlier P.R., Totrov M., *et al.* (2015). Structural genomics for drug design against the pathogen *Coxiella burnetii*: drug design against *Coxiella burnetii*. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*.

Fridovich I. (1978a). The biology of oxygen radicals. *Science* *201*, 875–880.

Fridovich I. (1978b). Superoxide radicals, superoxide dismutases and the aerobic lifestyle. *Photochem. Photobiol.* *28*, 733–741.

Fridovich I. (1995). Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu. Rev. Biochem.* *64*, 97–112.

G

Garman EF. (2010). Radiation damage in macromolecular crystallography: what is it and why should we care? *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* *66*, 339–351.

Ghosh D., Sawicki M., Pletnev V., Erman M., Ohno S., Nakajin S. and Duax W.L. (2001). Porcine carbonyl reductase. Structural basis for a functional monomer in short chain dehydrogenases/reductases. *J. Biol. Chem.* *276*, 18457–18463.

Gifford J. L., Walsh M. P., Vogel H.J. (2007). Structures and metal-ion-binding properties of the Ca^{2+} -binding helix–loop–helix EF-hand motifs. *Biochemical Journal*. *405*, 199–221.

Gill S.S. and Tuteja N. (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*. *48*, 909–930.

REFERENCES

- Glaser S., van Dooren G.G., Agrawal S., Brooks C.F., McFadden G.I., Striepen B. and Higgins, M.K. (2012). Tic22 is an essential chaperone required for protein import into the apicoplast. *J. Biol. Chem.* *287*, 39505–39512.
- Gollan P.J., Tikkanen M. and Aro E.-M. (2015). Photosynthetic light reactions: integral to chloroplast retrograde signalling. *Curr. Opin. Plant Biol.* *27*, 180–191.
- Gong M., Chen S.N., Song Y.Q., Li Z.G. (1997). Effect of calcium and calmodulin on intrinsic heat tolerance in relation to antioxidant systems in maize seedlings. *Australian Journal of Plant Physiology.* *24*, 371–379.
- Goodsell D.S., Morris G.M. and Olson A.J. (1996). Automated docking of flexible ligands: applications of AutoDock. *J. Mol. Recognit.* *9*, 1–5.
- Goujon M., McWilliam H., Li W., Valentin F., Squizzato S., Paern J. and Lopez R. (2010). A new bioinformatics analysis tools framework at EMBL-EBI. *Nucleic Acids Res.* *38*, 695–699.
- Gralla E. B. (1997). Superoxide dismutase: studies in the yeast *Saccharomyces Cerevisiae*. In oxidative Stress and the molecular biology of antioxidant defenses, J. Scandalios, ed. (Cold Spring Harbor, NY: cold Spring Harbor Laboratory Press. 495–525
- Grøftehaug M. K., Hajizadeh N. R., Swann M. J. and Pohle E. (2015). Protein–ligand interactions investigated by thermal shift assays (TSA) and dual polarization interferometry (DPI) *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* *71*, 36–44.
- Grechkin A.N. (2002). Hydroperoxide lyase and divinyl ether synthase. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* *68-69*, 457–470.
- Grechkin A.N. and Hamberg M. (2004). The “heterolytic hydroperoxide lyase” is an isomerase producing a short-lived fatty acid hemiacetal. *Biochim. Biophys. Acta.* *1636*, 47–58.
- Grechkin A., Mukhtarova L. and Hamberg M. (2000). The lipoxygenase pathway in tulip (*Tulipa gesneriana*): detection of the ketol route. *Biochem.* *352*, 501–509.
- Gregerson R.G., Miller S.S., Petrowski M., Gantt J.S. and Vance C.P. (1994). Genomic structure, expression and evolution of the alfalfa aspartate aminotransferase genes. *Plant Mol. Biol.* *25*, 387–399.
- Greene R. (2002). Oxidative Stress and Acclimation Mechanisms in Plants. *The Arabidopsis Book.* *1*, e0036.
- Grishaev A., Wu J., Trehwella J. and Bax A. (2005). Refinement of multidomain protein structures by combination of solution small-angle X-ray scattering and NMR data. *J. Am. Chem. Soc.* *127*, 16621–16628.
- Guinier A., Fournet G. (1955). *Small-Angle Scattering of X-rays*, New York: Wiley.
- Guo P. C., Ma X. X., Bao Z. Z., Ma J. D., Chen Y. & Zhou C. Z. (2011). Structural insights into the cofactor-assisted substrate recognition of yeast quinone oxidoreductase Zta1. *J. Struct. Biol.* *176*, 112–118.
- Guptasarma P., Balasubramanian D., Matsugo S. and Saito I. (1992). Hydroxyl radical mediated damage to proteins, with special reference to the crystallins. *Biochemistry.* *31*, 4296–4303.

H

- Hagiwara-Komoda Y., Sugiyama T., Yamashita Y., Onouchi H. and Naito S. (2014). The *N*-terminal cleavable pre-sequence encoded in the first exon of cystathionine γ -synthase contains two different functional domains for chloroplast targeting and regulation of gene expression. *Plant Cell Physiol.* *55*, 1779–1792.
- Halling D.B., Aracena-Parks P. and Hamilton S.L. (2005). Regulation of voltage-gated Ca^{2+} channels by calmodulin. *Sci. STKE* *2005*, re15.
- Halliwell B. (1996). Free radicals, proteins and DNA: oxidative damage versus redox regulation. *Biochem. Soc. Trans.* *24*, 1023–1027.
- Halliwell B. (2006). Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol.* *141*, 312–322.
- Hamberg M., Sanz A. and Castresana C. (1999). Alpha-oxidation of fatty acids in higher plants. Identification of a pathogen-inducible oxygenase (piox) as an alpha-dioxygenase and biosynthesis of 2-hydroperoxylinolenic acid. *J. Biol. Chem.* *274*, 24503–24513.
- Hamberg M., Sanz A., Rodriguez M.J., Calvo A.P. and Castresana C. (2003). Activation of the fatty acid alpha-dioxygenase pathway during bacterial infection of tobacco leaves. Formation of oxylipins protecting against cell

REFERENCES

- death. *J. Biol. Chem.* *278*, 51796–51805.
- Hamberg M., Ponce de Leon I., Rodriguez M.J. and Castresana C. (2005). Alpha-dioxygenases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *338*, 169–174.
- Hao Q. (2006). Macromolecular envelope determination and envelope-based phasing. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* *62*, 909–914.
- Hedlund J., Jörnvall H. and Persson B. (2010). Subdivision of the MDR superfamily of medium-chain dehydrogenases/reductases through iterative hidden Markov model refinement. *BMC Bioinformatics.* *11*, 534.
- Hedtke B., Meixner M., Gillandt S., Richter E., Börner T. and Weihe A. (1999a). Green fluorescent protein as a marker to investigate targeting of organellar RNA polymerases of higher plants in vivo. *Plant J.* *17*, 557–561.
- Hedtke B., Wagner I., Börner T. and Hess W.R. (1999b). Inter-organellar crosstalk in higher plants: impaired chloroplast development affects mitochondrial gene and transcript levels. *Plant J.* *19*, 635–643.
- Hendrickson W.A. and Ward K.B. (1975). Atomic models for the polypeptide backbones of myohemerythrin and hemerythrin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *66*, 1349–1356.
- Hernández I., Alegre L., Van Breusegem F. and Munné-Bosch S. (2009). How relevant are flavonoids as antioxidants in plants? *Trends in Plant Science.* *14*, 125–132.
- Hernández-Torres J., Jaimes-Becerra A. and Chomilier J. (2014). *Arabidopsis thaliana* Tic110, involved in chloroplast protein translocation, contains at least fourteen highly divergent heat-like repeated motifs. *Biologia.* *69*.
- Hinnah S.C., Hill K., Wagner R., Schlicher T. and Soll J. (1997). Reconstitution of a chloroplast protein import channel. *EMBO J.* *16*, 7351–7360.
- Hirohashi T., Hase T. and Nakai M. (2001). Maize non-photosynthetic ferredoxin precursor is mis-sorted to the intermembrane space of chloroplasts in the presence of light. *Plant Physiol.* *125*, 2154–2163.
- Hirsch S., Muckel E., Heemeyer F., von Heijne G. and Soll J. (1994). A receptor component of the chloroplast protein translocation machinery. *Science* *266*, 1989–1992.
- Hochmal A.K., Schulze S., Trompelt K. and Hippler M. (2015). Calcium-dependent regulation of photosynthesis. *Biochimica and Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics.* *1847*, 993–1003.
- Hoeflich K.P. and Ikura M. (2002). Calmodulin in action: diversity in target recognition and activation mechanisms. *Cell.* *108*, 739–742.
- Hörmann F., Kuchler M., Sveshnikov D., Oppermann U., Li Y. and Soll J. (2004). Tic32, an essential component in chloroplast biogenesis. *J. Biol. Chem.* *279*, 34756–34762.
- Howe G.A. and Schillmiller A.L. (2002). Oxylin metabolism in response to stress. *Curr. Opin. Plant Biol.* *5*, 230–236.
- Hunt J.F., Weaver A.J., Landry S.J., Gierasch L. and Deisenhofer J. (1996). The crystal structure of the GroES co-chaperonin at 2.8 Å resolution. *Nature.* *379*, 37–45.

I

- Ikura M., Clore G.M., Gronenborn A.M., Zhu G., Klee C.B. and Bax A. (1992). Solution structure of a calmodulin-target peptide complex by multidimensional NMR. *Science.* *256*, 632–638.
- Inaba T., Li M., Alvarez-Huerta M., Kessler F. and Schnell D.J. (2003). atTic110 functions as a scaffold for coordinating the stromal events of protein import into chloroplasts. *J. Biol. Chem.* *278*, 38617–38627.
- Inaba T., Alvarez-Huerta M., Li M., Bauer J., Ewers C., Kessler F. and Schnell D.J. (2005). *Arabidopsis* tic110 is essential for the assembly and function of the protein import machinery of plastids. *Plant Cell.* *17*, 1482–1496.
- Inoue H., Rounds C. and Schnell D.J. (2010). The molecular basis for distinct pathways for protein import into *Arabidopsis* chloroplasts. *Plant Cell.* *22*, 1947–1960.
- Inoue H., Li M. and Schnell D.J. (2013). An essential role for chloroplast heat shock protein 90 (Hsp90C) in protein import into chloroplasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *110*, 3173–3178.
- Ishida H. and Vogel H.J. (2006). Protein-peptide interaction studies demonstrate the versatility of calmodulin target protein binding. *Protein Pept. Lett.* *13*, 455–465.

REFERENCES

J

- Jaren O.R., Kranz J.K., Sorensen B.R., Wand A.J. and Shea M.A. (2002). Calcium-induced conformational switching of Paramecium calmodulin provides evidence for domain coupling. *Biochemistry*. *41*, 14158–14166.
- Jarrett HW, Brown CJ, Black CC, Cormier MJ. (1982). Evidence that calmodulin is in the chloroplast of peas and serves a regulatory role in photosynthesis. *J. Biol. Chem.* *257*, 13795–13804.
- Jarvis P. (2008). Targeting of nucleus-encoded proteins to chloroplasts in plants. *New Phytol.* *179*, 257–285.
- Jarvis P. and Soll J. (2002). Toc, tic, and chloroplast protein import. *Biochim. Biophys. Acta.* *1590*, 177–189.
- Jörnvall H., Persson B., Krook M., Atrian S., González-Duarte R., Jeffery J., Ghosh D. (1995). Short-chain dehydrogenases/reductases (SDR). *Biochemistry*. *34*, 6003–13.
- Jörnvall H., Höög J.O. and Persson B. (1999). SDR and MDR: completed genome sequences show these protein families to be large, of old origin, and of complex nature. *FEBS Letters*. *445*, 261–264.
- Jörnvall H., Shafqat J. and Persson B. (2001). Variations and constant patterns in eukaryotic MDR enzymes: Conclusions from novel structures and characterized genomes. *Chemico-Biological Interactions*. *130*, 491–498.
- Jörnvall H., Hedlund J., Bergman T., Oppermann U. and Persson B. (2010). Superfamilies SDR and MDR: From early ancestry to present forms. Emergence of three lines, a Zn-metalloenzyme, and distinct variabilities. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. *396*, 125–130.

K

- Kabsch W. (1976). A solution for the best rotation to relate two sets of vectors *Acta Cryst.* *A32*, 922–923.
- Kabsch W. (2010a). XDS. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* *66*, 125–132.
- Kabsch W. (2010b). Integration, scaling, space-group assignment and post-refinement. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* *66*, 133–144.
- Kakiuchi S. and Yamazaki R. (1970). Calcium dependent phosphodiesterase activity and its activating factor (PAF) from brain studies on cyclic 3',5'-nucleotide phosphodiesterase (3). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *41*, 1104–1110.
- Kallberg Y., Oppermann U., Jörnvall H. and Persson B. (2002). Short-chain dehydrogenases/reductases (SDRs): Coenzyme-based functional assignments in completed genomes. *European Journal of Biochemistry*. *269*, 4409–4417.
- Kallberg Y., Oppermann U., Jörnvall H. and Persson B. (2009). Short-chain dehydrogenase/reductase (SDR) relationships: A large family with eight clusters common to human, animal, and plant genomes. *Protein Science* *11*, 636–641.
- Kallberg Y., Oppermann U. and Persson B. (2010). Classification of the short-chain dehydrogenase/reductase superfamily using hidden Markov models: SDR classification using HMM. *FEBS Journal*. *277*, 2375–2386.
- Karlin-Neumann G.A. and Tobin E.M. (1986). Transit peptides of nuclear-encoded chloroplast proteins share a common amino acid framework. *EMBO J.* *5*, 9–13.
- Kavanagh K.L., Jörnvall H., Persson B. and Oppermann U. (2008). Medium and short-chain dehydrogenase/reductase gene and protein families: the SDR superfamily: functional and structural diversity within a family of metabolic and regulatory enzymes. *Cell. Mol. Life Sci.* *65*, 3895–3906.
- Kawasaki H., Nakayama S. and Kretsinger R.H. (1998). Classification and evolution of EF-hand proteins. *Biometals*. *11*, 277–295.
- Keegstra K. (1989). Transport and routing of proteins into chloroplasts. *Cell*. *56*, 247–253.
- Keegstra K. and Cline K. (1999). Protein import and routing systems of chloroplasts. *The Plant Cell*. *11*, 557–570.
- Keegstra K. and Froehlich J.E. (1999). Protein import into chloroplasts. *Curr. Opin. Plant Biol.* *2*, 471–476.
- Kessler F. and Blobel G. (1996). Interaction of the protein import and folding machineries of the chloroplast. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *93*, 7684–7689.

REFERENCES

- Kessler F. and Schnell D. (2009). Chloroplast biogenesis: diversity and regulation of the protein import apparatus. *Current Opinion in Cell Biology*. *21*, 494–500.
- Kessler F., Blobel G., Patel H.A. and Schnell D.J. (1994). Identification of two GTP-binding proteins in the chloroplast protein import machinery. *Science*. *266*, 1035–1039.
- Kikuchi S., Oishi M., Hirabayashi Y., Lee D.W., Hwang I. and Nakai M. (2009). A 1-megadalton translocation complex containing Tic20 and Tic21 mediates chloroplast protein import at the inner envelope membrane. *Plant Cell*. *21*, 1781–1797.
- Kim S.J., Dumont C. and Gruebele M. (2008). Simulation-based fitting of protein-protein interaction potentials to SAXS experiments. *Biophys. J.* *94*, 4924–4931.
- Klee C.B., Crouch T.H. and Richman P.G. (1980). Calmodulin. *Annu. Rev. Biochem.* *49*, 489–515.
- Klein D., Fink B., Arold B., Eisenreich W. and Schwab W. (2007). Functional Characterization of Enone Oxidoreductases from Strawberry and Tomato Fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. *55*, 6705–6711.
- Kleywegt GJ, Brünger AT. (1996). Checking your imagination: applications of the free R value. *Structure*. *4*, 897-904.
- Knight C.A. and Ackerly D.D. (2001). Correlated evolution of chloroplast heat shock protein expression in closely related plant species. *Am. J. Bot.* *88*, 411–418.
- Knoll M. and Pleiss J. (2008). The Medium-Chain Dehydrogenase/reductase Engineering Database: a systematic analysis of a diverse protein family to understand sequence-structure-function relationship. *Protein Sci.* *17*, 1689-1697
- Ko K., Budd D., Wu C., Seibert F., Kourtz L. and Ko Z.W. (1995). Isolation and characterization of a cDNA clone encoding a member of the Com44/Cim44 envelope components of the chloroplast protein import apparatus. *J. Biol. Chem.* *270*, 28601–28608.
- Koenig P., Oreb M., Höfle A., Kaltofen S., Rippe K., Sinning I., Schleiff E. and Tews I. (2008a). The GTPase cycle of the chloroplast import receptors Toc33/Toc34: implications from monomeric and dimeric structures. *Structure*. *16*, 585–596.
- Koenig P., Oreb M., Rippe K., Muhle-Goll C., Sinning I., Schleiff E. and Tews I. (2008b). On the significance of Toc-GTPase homodimers. *J. Biol. Chem.* *283*, 23104–23112.
- Konarev P.V, Volkov V., Sokolova A. V., Koch M. HJ. and Svergun D. (2003). PRIMUS : a Windows PC-based system for small-angle scattering data analysis. *J. Appl. Cryst.* *36*, 1277–1282.
- Kozakov D., Schueler-Furman O., Vajda S. (2008). Discrimination of near-native structures in protein–protein docking by testing the stability of local minima. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*. *73*, 993-1004
- Koshland D.E., Ray W.J. and Erwin M.J. (1958). Protein structure and enzyme action. *Fed. Proc.* *17*, 1145–1150.
- Kotchoni S.O., Kuhns C., Ditzer A., Kirch H.H. and Bartels D. (2006). Over-expression of different aldehyde dehydrogenase genes in *Arabidopsis thaliana* confers tolerance to abiotic stress and protects plants against lipid peroxidation and oxidative stress. *Plant, Cell and Environment*. *29*, 1033–1048.
- Kouranov A. and Schnell D.J. (1997). Analysis of the interactions of preproteins with the import machinery over the course of protein import into chloroplasts. *J. Cell Biol.* *139*, 1677–1685.
- Kouranov A., Chen X., Fuks B. and Schnell D.J. (1998). Tic20 and Tic22 are new components of the protein import apparatus at the chloroplast inner envelope membrane. *The Journal of Cell Biology*. *143*, 991–1002.
- Kovács-Bogdán E., Nyitrai P. and Keresztes A. (2010a). How does a little stress stimulate a plant? *Plant Signal Behav.* *5*, 354–358.
- Kovács-Bogdán E., Soll J. and Bölter B. (2010b). Protein import into chloroplasts: the Tic complex and its regulation. *Biochim. Biophys. Acta.* *1803*, 740–747.
- Kozakov D., Schueler-Furman O. and Vajda, S. (2008). Discrimination of near-native structures in protein-protein docking by testing the stability of local minima. *Proteins*. *72*, 993–1004.
- Kramm A., Kisiela M., Schulz R. and Maser E. (2012). Short-chain dehydrogenases/reductases in cyanobacteria: SDRs in cyanobacteria. *FEBS Journal*. *279*, 1030–1043.
- Kranz J.K., Flynn P.F., Fuentes E.J. and Wand A.J. (2002a). Dissection of the pathway of molecular recognition

REFERENCES

- by calmodulin. *Biochemistry*. *41*, 2599–2608.
- Kranz J.K., Lee E.K., Nairn A.C. and Wand A.J. (2002b). A direct test of the reductionist approach to structural studies of calmodulin activity: relevance of peptide models of target proteins. *J. Biol. Chem.* *277*, 16351–16354.
- Kratky O. and Porod G. (1949). Diffuse small-angle scattering of X-ray in colloid system. *J. Colloid Sci.* *1*, 35–70.
- Kretsinger R.H. and Nelson D.J. (1976). Calcium in biological systems. *Coordination Chemistry Reviews*. 1829–124.
- Krimm I., Gans P., Hernandez J.F., Arlaud G.J. and Lancelin J.M. (1999). A coil-helix instead of a helix-coil motif can be induced in a chloroplast transit peptide from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eur. J. Biochem.* *265*, 171–180.
- Krissinel E. (2007). On the relationship between sequence and structure similarities in proteomics. *Bioinformatics*. *23*, 717–723.
- Krook M., Ghosh D., Duax W. and Jörnvall H. (1993). Three-dimensional model of NAD⁽⁺⁾-dependent 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase and relationships to the NADP⁽⁺⁾-dependent enzyme (carbonyl reductase). *FEBS Lett.* *322*, 139–142.
- Küchler M., Decker S., Hörmann F., Soll J. and Heins L. (2002). Protein import into chloroplasts involves redox-regulated proteins. *EMBO J.* *21*, 6136–6145.
- Kunkel T.A. (1985). The mutational specificity of DNA polymerases-alpha and -gamma during in vitro DNA synthesis. *J. Biol. Chem.* *260*, 12866–12874.

L

- Lamberti G., Drurey C., Soll J. and Schwenkert S. (2011). The phosphorylation state of chloroplast transit peptides regulates preprotein import. *Plant Signal Behav.* *6*, 1918–1920.
- Larkin M.A., Blackshields G., Brown N.P., Chenna R., McGettigan P.A., McWilliam H., Valentin F., Wallace I.M., Wilm A., Lopez R., *et al.* (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*. *23*, 2947–2948.
- Laskowski R.A., Moss D.S. and Thornton J.M. (1993). Main-chain bond lengths and bond angles in protein structures. *J. Mol. Biol.* *231*, 1049–1067.
- Lasorsa F.M., Pinton P., Palmieri L., Scarcia P., Rottensteiner H., Rizzuto R. and Palmieri F. (2008). Peroxisomes as novel players in cell calcium homeostasis. *J. Biol. Chem.* *283*, 15300–15308.
- Leba L.J., Perochon A., Cheval C., Ranty B., Galaud J.P. and Aldon D. (2012). CML9, a multifunctional *Arabidopsis thaliana* calmodulin-like protein involved in stress responses and plant growth? *Plant Signaling & Behavior*. *7*, 1121–1124.
- Lee D.W., Kim J.K., Lee S., Choi S., Kim S. and Hwang I. (2008). *Arabidopsis* nuclear-encoded plastid transit peptides contain multiple sequence subgroups with distinctive chloroplast-targeting sequence motifs. *Plant Cell*. *20*, 1603–1622.
- Lee D.W., Lee S., Oh Y.J. and Hwang I. (2009a). Multiple sequence motifs in the rubisco small subunit transit peptide independently contribute to Toc159-dependent import of proteins into chloroplasts. *Plant Physiol.* *151*, 129–141.
- Lee J., Wang F. and Schnell D.J. (2009b). Toc receptor dimerization participates in the initiation of membrane translocation during protein import into chloroplasts. *J. Biol. Chem.* *284*, 31130–31141.
- Lee K.H., Kim D.H., Lee S.W., Kim Z.H. and Hwang I. (2002). In vivo import experiments in protoplasts reveal the importance of the overall context but not specific amino acid residues of the transit peptide during import into chloroplasts. *Mol. Cells*. *14*, 388–397.
- Leister D. and Schneider A. (2003). From genes to photosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Int. Rev. Cytol.* *228*, 31–83.
- Le Roy A., Nury H., Wiseman B., Sarwan J., Jault J.M. and Ebel C. (2013). Sedimentation velocity analytical ultracentrifugation in hydrogenated and deuterated solvents for the characterization of membrane proteins. *Methods Mol. Biol.* *1033*, 219–251.
- Li H. and Teng Y.S. (2013). Transit peptide design and plastid import regulation. *Trends in Plant Science*. *18*, 360–366.

REFERENCES

- Lidén M., Tryggvason K. and Eriksson U. (2003). Structure and function of retinol dehydrogenases of the short chain dehydrogenase/reductase family. *Molecular Aspects of Medicine*. *24*, 403–409.
- Linderström-Lang K., Schellman J.A. (1959). Protein structure and enzyme activity. In: Boyer PD, Lardy H, Myrback K, eds. *The Enzymes*. 2nd ed. New York: Academic Press. 443-510.
- Lipfert J. and Doniach S. (2007). Small-angle X-ray scattering from RNA, proteins, and protein complexes. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* *36*, 307–327.
- Logan D.C. and Knight M.R. (2003). Mitochondrial and cytosolic calcium dynamics are differentially regulated in plants. *Plant Physiol*. *133*, 21–24.
- Lovell S.C., Davis I.W., Arendall W.B., de Bakker P.I.W., Word J.M., Prisant M.G., Richardson J.S. and Richardson D.C. (2003). Structure validation by C_{α} geometry: phi, psi and C_{β} deviation. *Proteins* *50*, 437–450.
- Lübeck J., Soll J., Akita, M., Nielsen E. and Keegstra K. (1996). Topology of IEP110, a component of the chloroplastic protein import machinery present in the inner envelope membrane. *EMBO J*. *15*, 4230–4238.
- Lumme C., Altan-Martin H., Dastvan R., Sommer M.S., Oreb M., Schuetz D., Hellenkamp B., Mirus O., Kretschmer J., Lyubenova S., *et al.* (2014). Nucleotides and substrates trigger the dynamics of the Toc34 GTPase homodimer involved in chloroplast preprotein translocation. *Structure* *22*, 526–538.
- M**
- Ma Y., Kouranov A., LaSala S.E. and Schnell D.J. (1996). Two components of the chloroplast protein import apparatus, IAP86 and IAP75, interact with the transit sequence during the recognition and translocation of precursor proteins at the outer envelope. *J. Cell Biol*. *134*, 315–327.
- Madeira A., Öhman E., Nilsson A., Sjögren B., Andrén P.E. and Svenningsson P. (2009). Coupling surface plasmon resonance to mass spectrometry to discover novel protein–protein interactions. *Nature Protocols*. *4*, 1023–1037.
- Mande S.C., Mehra V., Bloom B.R. and Hol W.G. (1996). Structure of the heat shock protein chaperonin-10 of *Mycobacterium leprae*. *Science* *271*, 203–207.
- Mano J., Babiychuk E., Belles-Boix E., Hiratake J., Kimura A., Inzé D., Kushnir S. and Asada K. (2000a). A novel NADPH: diamide oxidoreductase activity in *Arabidopsis thaliana* P1 ζ -crystallin. *European Journal of Biochemistry* *267*, 3661–3671.
- Mano J., Yoon H.J., Asada K., Babiychuk E., Inzé D. and Mikami B. (2000b). Crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of NADPH: azodicarbonyl/quinone oxidoreductase, a plant ζ -crystallin. *Biochimica and Biophysica Acta. (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*. *1480*, 374–376.
- Mano J., Ichi, Belles-Boix E., Babiychuk E., Inzé D., Torii Y., Hiraoka E., Takimoto K., Slooten L., Asada K., and Kushnir S. (2005). Protection against photooxidative injury of tobacco leaves by 2-alkenal reductase. Detoxication of lipid peroxide-derived reactive carbonyls. *Plant Physiol*. *139*, 1773–1783.
- Martin and Herrmann (1998). Gene transfer from organelles to the nucleus: how much, what happens, and Why? *Plant Physiol*. *118*, 9–17.
- Martinez P., Martin W. and Cerff R. (1989). Structure, evolution and anaerobic regulation of a nuclear gene encoding cytosolic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from maize. *J. Mol. Biol*. *208*, 551–565.
- Matringe M., Ksas B., Rey P. and Havaux M. (2008). Tocotrienols, the unsaturated forms of vitamin E, can function as antioxidants and lipid protectors in tobacco leaves. *Plant Physiol*. *147*, 764–778.
- May T., Soll J. (2000). 14-3-3 proteins form a guidance complex with chloroplast precursor proteins in plants. *Plant Cell*. *12*, 53–63
- McCormack E., Tsai Y.C. and Braam J. (2005). Handling calcium signaling: *Arabidopsis* CaMs and CMLs. *Trends Plant Sci*. *10*, 383–389.
- McCoy A.J., Grosse-Kunstleve R.W., Adams P.D., Winn M.D., Storoni L.C. and Read R.J. (2007). *Phaser* crystallographic software. *Journal of Applied Crystallography*. *40*, 658–674.
- McPherson A., Malkin A.J, Kuznetsov Y.G. (1995). The science of macromolecular crystallization. *Structure*. *3*, 759–768.

REFERENCES

- McWilliam H., Li W., Uludag M., Squizzato S., Park Y.M., Buso N., Cowley A.P., Lopez R. (2013). Analysis Tool Web Services from EMBL-EBI. *Nucleic Acids Res.* *41*, 597–600.
- Meador W.E., Means A.R., and Quioco F.A. (1992). Target enzyme recognition by calmodulin: 2.4 Å structure of a calmodulin-peptide complex. *Science*. *257*, 1251–1255.
- Meador W.E., Means A.R. and Quioco F.A. (1993). Modulation of calmodulin plasticity in molecular recognition on the basis of x-ray structures. *Science* *262*, 1718–1721.
- Mène-Saffrané L., Esquerré-Tugayé M.T., Fournier J. (2003). Constitutive expression of an inducible lipoxygenase in transgenic tobacco decreases susceptibility to *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*. *Mol Breed* *12*, 271–282.
- Milvia Luisa Racchi, (2013). Antioxidant Defenses in Plants with Attention to *Prunus* and *Citrus* spp. *Antioxidants*. *2*, 340-369.
- Miras S., Salvi D., Ferro M., Grunwald D., Garin J., Joyard J., and Rolland N. (2002). Non-canonical Transit Peptide for Import into the Chloroplast. *Journal of Biological Chemistry*. *277*, 47770–47778.
- Miras S., Salvi D., Piette L., Seigneurin-Berny D., Grunwald D., Reinbothe C., Joyard J., Reinbothe S. and Rolland N. (2007). Toc159- and Toc75-independent import of a transit sequence-less precursor into the inner envelope of chloroplasts. *J. Biol. Chem.* *282*, 29482–29492.
- Missihoun T.D., Schmitz J., Klug R., Kirch H.H. and Bartels D. (2011). Betaine aldehyde dehydrogenase genes from *Arabidopsis* with different sub-cellular localization affect stress responses. *Planta*. *233*, 369–382.
- Mittler R., Vanderauwera S., Gollery M. and Van Breusegem F. (2004). Reactive oxygen gene network of plants. *Trends Plant Sci.* *9*, 490–498.
- Mittler R., Vanderauwera S., Suzuki N., Miller G., Tognetti V.B., Vandepoele K., Gollery M., Shulaev V. and Van Breusegem F. (2011). ROS signaling: the new wave? *Trends Plant Sci.* *16*, 300–309.
- Møller I.M., Jensen P.E. and Hansson A. (2007). Oxidative Modifications to Cellular Components in Plants. *Annual Review of Plant Biology*. *58*, 459–481.
- Mori M.X., Vander Kooi C.W., Leahy D.J. and Yue D.T. (2008). Crystal structure of the CaV2 IQ domain in complex with Ca²⁺/calmodulin: high-resolution mechanistic implications for channel regulation by Ca²⁺. *Structure*. *16*, 607–620.
- Moummou H., Kallberg Y., Tonfack L.B., Persson B., and Van der Rest B. (2012). The Plant Short-Chain Dehydrogenase (SDR) superfamily: genome-wide inventory and diversification patterns. *BMC Plant Biology*. *12*, 219.
- Mruk K., Farley B.M., Ritacco A.W. and Kobertz W.R. (2014). Calmodulation meta-analysis: predicting calmodulin binding via canonical motif clustering. *J. Gen. Physiol.* *144*, 105–114.
- Muckel E. and Soll J. (1996). A protein import receptor of chloroplasts is inserted into the outer envelope membrane by a novel pathway. *J. Biol. Chem.* *271*, 23846–23852.
- Mueller M.J. and Berger S. (2009). Reactive electrophilic oxylipins: Pattern recognition and signalling. *Phytochemistry* *70*, 1511–1521.
- Mullineaux P.M. and Baker N.R. (2010). Oxidative Stress: Antagonistic Signaling for Acclimation or Cell Death? *Plant physiology*. *154*, 521–525.
- Murzin A.G. (1996). Structural classification of proteins: new superfamilies. *Curr. Opin. Struct. Biol.* *6*, 386–394.
- Murshudov G.N., Vagin A.A., Dodson E.J. (1997). Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta Crystallogr. D Biol Crystallogr.* *53*, 240–255.
- N**
- Nada A. and Soll J. (2004). Inner envelope protein 32 is imported into chloroplasts by a novel pathway. *J. Cell. Sci.* *117*, 3975–3982.
- Nagem R.A., Polikarpov I., Dauter Z. (2003). Phasing on rapidly soaked ions. *Methods Enzymol.* *374*, 120-37.
- Nakai M. (2015). The TIC complex uncovered: the alternative view on the molecular mechanism of protein translocation across the inner envelope membrane of chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta.* *1847*, 957–967.

REFERENCES

- Navaza J. (1994). AMoRe: an automated package for molecular replacement. *Acta Cryst. A*, *50*, 157–163.
- Niesen F.H., Berglund H. and Vedadi M. (2007). The use of differential scanning fluorimetry to detect ligand interactions that promote protein stability. *Nature Protocols*, *2*, 2212–2221.
- Noctor G. (2006). Metabolic signalling in defence and stress: the central roles of soluble redox couples. *Plant Cell Environ.* *29*, 409–425.
- Noctor G., Queval G. and Gakière B. (2006). NAD(P) synthesis and pyridine nucleotide cycling in plants and their potential importance in stress conditions. *J. Exp. Bot.* *57*, 1603–1620.
- Noctor G., Mhamdi A., Chaouch S., Han Y., Neukermans J., Marquez-Garcia B., Queval G. and Foyer C.H. (2012). Glutathione in plants: an integrated overview. *Plant Cell Environ.* *35*, 454–484.
- Noctor G., Lelarge-Trouverie C. and Mhamdi A. (2015). The metabolomics of oxidative stress. *Phytochemistry*, *112*, 33–53.
- Nordling E., Jörnvall H. and Persson B. (2002). Medium-chain dehydrogenases/reductases (MDR). Family characterizations including genome comparisons and active site modeling. *Eur. J. Biochem.* *269*, 4267–4276.

O

- Oblong J.E. and Lamppa G.K. (1992). Identification of two structurally related proteins involved in proteolytic processing of precursors targeted to the chloroplast. *EMBO J.* *11*, 4401–4409.
- Ohlsson I., Nordström B. and Brändén C.I. (1974). Structural and functional similarities within the coenzyme binding domains of dehydrogenases. *J. Mol. Biol.* *89*, 339–354.
- Oppermann U.C., Persson B. and Jörnvall H. (1997). Function, gene organization and protein structures of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase isoforms. *Eur. J. Biochem.* *249*, 355–360.
- Oppermann U.C., Filling C. and Jörnvall H. (2001). Forms and functions of human SDR enzymes. *Chemico-Biological Interactions*, *130*, 699–705.
- Oreb M., Tews I. and Schleiff E. (2008). Policing Tic “n” Toc, the doorway to chloroplasts. *Trends in Cell Biology*, *18*, 19–27.

P

- Paila, Y.D., Richardson L.G.L. and Schnell D.J. (2015). New insights into the mechanism of chloroplast protein import and its integration with protein quality control, organelle biogenesis and development. *J. Mol. Biol.* *427*, 1038–1060.
- Palenik B. (2002). The genomics of symbiosis: Hosts keep the baby and the bath water. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *99*, 11996–11997.
- Pan X., Zhang H., Gao Y., Li M. and Chang W. (2009). Crystal structures of *Pseudomonas syringae* pv. *Tomato DC3000* quinone oxidoreductase and its complex with NADPH. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *390*, 597–602.
- Panigrahi R., Adina-Zada A., Whelan J. and Vrielink A. (2013). Ligand recognition by the TPR domain of the import factor Toc64 from *Arabidopsis thaliana*. *PLoS ONE* *8*, e83461.
- Partelli F.L., Batista-Santos P., Scotti-Campos P., Pais I.P., Quartin V.L., Vieira H.D. and Ramalho J.C. (2011). Characterization of the main lipid components of chloroplast membranes and cold induced changes in *Coffea* spp. *Environmental and Experimental Botany*, *74*, 194–204.
- Peersen O.B., Madsen T.S. and Falke J.J. (1997). Intermolecular tuning of calmodulin by target peptides and proteins: differential effects on Ca²⁺ binding and implications for kinase activation. *Protein Sci.* *6*, 794–807.
- Pellegrini E., Piano D. and Bowler M.W. (2011). Direct cryocooling of naked crystals: are cryoprotection agents always necessary? *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography* *67*, 902–906.
- Penning T.M. (2015). The aldo-keto reductases (AKRs): Overview. *Chemico-Biological Interactions* *234*, 236–246.
- Perochon A., Aldon D., Galaud J.P. and Ranty B. (2011). Calmodulin and calmodulin-like proteins in plant calcium signaling. *Biochimie*, *93*, 2048–2053.

REFERENCES

- Perry S.E., Buvinger W.E., Bennett J. and Keegstra K. (1991). Synthetic analogues of a transit peptide inhibit binding or translocation of chloroplastic precursor proteins. *J. Biol. Chem.* *266*, 11882–11889.
- Persson B. and Kallberg Y. (2013). Classification and nomenclature of the superfamily of short-chain dehydrogenases/reductases (SDRs). *Chemico-Biological Interactions.* *202*, 111–115.
- Persson B., Kallberg Y., Oppermann U. and Jörnvall H. (2003). Coenzyme-based functional assignments of short-chain dehydrogenases/reductases (SDRs). *Chem. Biol. Interact.* *143-144*, 271–278.
- Persson B., Hedlund J. and Jörnvall H. (2008). Medium- and short-chain dehydrogenase/reductase gene and protein families: The MDR superfamily. *Cellular and Molecular Life Sciences.* *65*, 3879–3894.
- Persson B., Kallberg Y., Bray J.E., Bruford E., Dellaporta S.L., Favia A.D., Duarte R.G., Jörnvall H., Kavanagh K.L., Kedishvili N., et al. (2009). The SDR (short-chain dehydrogenase/reductase and related enzymes) nomenclature initiative. *Chemico-Biological Interactions.* *178*, 94–98.
- Phillips and Hernandez de la Pena. (2011). The Combined Use of the ThermoFluor Assay and ThermoQ Analytical Software for the Determination of Protein Stability and Buffer Optimization as an Aid in Protein Crystallization. *Current Protocols in Mol. Biol.* 10.28.1-10.28.15.
- Pierce BG, Hourai Y, Weng Z. (2011) Accelerating Protein Docking in ZDOCK Using an Advanced 3D Convolution Library. *PLoS One* 6(9): e24657.
- Porté S., Crosas E., Yakovtseva E., Biosca J.A., Farrés J., Fernández M.R. and Parés X. (2009). MDR quinone oxidoreductases: The human and yeast ζ -crystallins. *Chemico-Biological Interactions.* *178*, 288–294.
- Prasad S., Mitra S. (2002). Role of protein and substrate dynamics in catalysis by *Pseudomonas putida* cytochrome P450cam. *Biochemistry.* *41*, 14499–508.
- Pujol C., Maréchal-Drouard L. and Duchêne A.M. (2007). How Can Organellar Protein N-terminal Sequences Be Dual Targeting Signals? In silico Analysis and Mutagenesis Approach. *Journal of Molecular Biology.* *369*, 356–367.
- Putnam C.D., Hammel M., Hura G.L. and Tainer J.A. (2007). X-ray solution scattering (SAXS) combined with crystallography and computation: defining accurate macromolecular structures, conformations and assemblies in solution. *Q. Rev. Biophys.* *40*, 191–285.
- ### Q
- Quigley F., Martin W.F. and Cerff R. (1988). Intron conservation across the prokaryote-eukaryote boundary: structure of the nuclear gene for chloroplast glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from maize. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *85*, 2672–2676.
- ### R
- Ramakrishnan C., Ramachandran G.N. (1965). Stereochemical criteria for polypeptide and protein chain conformations. II. Allowed conformations for a pair of peptide units. *Biophys J.* *5*, 909–33.
- Rambo R.P., Tainer J.A. (2013). Accurate assessment of mass, models and resolution by small-angle scattering. *Nature.* *496*, 477–81.
- Rao M.V., Lee H., Creelman R.A., Mullet J.E. and Davis K.R. (2000). Jasmonic acid signaling modulates ozone-induced hypersensitive cell death. *The Plant Cell.* *12*, 1633–1646.
- Receveur-Brechot V., Durand D. (2012). How random are intrinsically disordered proteins? A small angle scattering perspective. *Curr. Protein Pept Sci.* *13*, 55–75.
- Reddick L.E., Chotewutmontri P., Crenshaw W., Dave A., Vaughn M. and Bruce B.D. (2008). Chapter 16 Nano-scale Characterization of the Dynamics of the Chloroplast Toc Translocon. In *Methods in Cell Biology*, (Elsevier). 365–398.
- Reddy V.S., Ali G.S. and Reddy A.S.N. (2002). Genes Encoding Calmodulin-binding Proteins in the Arabidopsis Genome. *Journal of Biological Chemistry.* *277*, 9840–9852.
- Reinbothe C., Pollmann S., Phetsarath-Faure P., Quigley F., Weisbeek P. and Reinbothe S. (2008). A Pentapeptide Motif Related to a Pigment Binding Site in the Major Light-Harvesting Protein of Photosystem II, LHCII, Governs Substrate-Dependent Plastid Import of NADPH: Protochlorophyllide Oxidoreductase A. *PLANT PHYSIOLOGY.* *148*, 694–703.

REFERENCES

- Rescigno M. and Perham R.N. (1994). Structure of the NADPH-binding motif of glutathione reductase: efficiency determined by evolution. *Biochemistry*. *33*, 5721–5727.
- Rhoads A.R. and Friedberg F. (1997). Sequence motifs for calmodulin recognition. *The FASEB Journal*. *11*, 331–340.
- Rial D.V., Arakaki A.K. and Ceccarelli E.A. (2000). Interaction of the targeting sequence of chloroplast precursors with Hsp70 molecular chaperones. *Eur. J. Biochem*. *267*, 6239–6248.
- Richardson L.G.L., Paila Y.D., Siman S.R., Chen Y., Smith M.D. and Schnell D.J. (2014). Targeting and assembly of components of the TOC protein import complex at the chloroplast outer envelope membrane. *Front Plant Sci*. *5*, 269.
- Richly E. and Leister D. (2004). An improved prediction of chloroplast proteins reveals diversities and commonalities in the chloroplast proteomes of *Arabidopsis* and rice. *Gene*. *329*, 11–16.
- Richter S. and Lamppa G.K. (2003). Structural Properties of the Chloroplast Stromal Processing Peptidase Required for Its Function in Transit Peptide Removal. *Journal of Biological Chemistry*. *278*, 39497–39502.
- Richter C., Ghafourifar P., Schweizer M. and Laffranchi R. (1997). Nitric oxide and mitochondrial Ca²⁺. *Biochem. Soc. Trans.* *25*, 914–918.
- Rigden D.J., Woodhead D.D., Wong P.W.H. and Galperin M.Y. (2011). New structural and functional contexts of the Dx[DN]xDG linear motif: insights into evolution of calcium-binding proteins. *PLoS ONE* *6*, e21507.
- Riveros-Rosas H., Julian-Sanchez A., Villalobos-Molina R., Pardo J.P. and Pina E. (2003). Diversity, taxonomy and evolution of medium-chain dehydrogenase/reductase superfamily. *European Journal of Biochemistry*. *270*, 3309–3334.
- Roberts X. and Gouet P. (2014). Deciphering key features in protein structures with the new ENDscript server. *Nucleic Acids Research*. *42*, 320–324.
- Roberts D.M., Zielinski R.E., Schleicher M., Watterson D.M., (1983). Analysis of suborganellar fractions from spinach and pea chloroplasts for calmodulin-binding proteins. *J Cell Biol*. *97*, 644–7.
- Rocha A.G. and Vothknecht U.C. (2012). The role of calcium in chloroplasts—an intriguing and unresolved puzzle. *Protoplasma*. *249*, 957–966.
- Rochaix J.D. (1996). Post-transcriptional regulation of chloroplast gene expression in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Mol. Biol*. *32*, 327–341.
- Rodermel S. (2001). Pathways of plastid-to-nucleus signaling. *Trends Plant Sci*. *6*, 471–478.
- Rodríguez-Concepción M., Yalovsky S., Zik M., Fromm H. and Gruissem W. (1999). The prenylation status of a novel plant calmodulin directs plasma membrane or nuclear localization of the protein. *EMBO J*. *18*, 1996–2007.
- Rodríguez-Concepción M., Toledo-Ortiz G., Yalovsky S., Caldelari D. and Gruissem W. (2000). Carboxyl-methylation of prenylated calmodulin CaM53 is required for efficient plasma membrane targeting of the protein. *Plant J*. *24*, 775–784.
- Rolland N., Job D. and Douce R. (1993). Common sequence motifs coding for higher-plant and prokaryotic O-acetylserine (thiol)-lyases: bacterial origin of a chloroplast transit peptide? *Biochem. J*. *293*, 829–833.
- Rossig C., Reinbothe C., Gray J., Valdes O., von Wettstein D. and Reinbothe S. (2013). Three proteins mediate import of transit sequence-less precursors into the inner envelope of chloroplasts in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *110*, 19962–19967.
- Rossmann M.G., Moras D. and Olsen K.W. (1974). Chemical and biological evolution of nucleotide-binding protein. *Nature*. *250*, 194–199.
- Rossmann M.G. (1972). The locked rotation function. *J Mol Biol*. *64*, 246–249.
- Rossmann M.G., Adams M.J., Buehner M., Ford G.C., Hackert M.L., Lentz P.J. Jr, McPherson A. Jr, Schevitz RW, Smiley I.E. (1972). Structural constraints of possible mechanisms of lactate dehydrogenase as shown by high resolution studies of the apoenzyme and a variety of enzyme complexes. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. *36*, 179-91.
- Rowland E., Kim J., Bhuiyan N.H. and van Wijk K.J. (2015). The *Arabidopsis* chloroplast stromal N-terminome; complexities of N-terminal protein maturation and stability. *Plant Physiol*. *169*, 1881–96.

REFERENCES

Royant A., Carpentier P., Ohana J., McGeehan J., Paetzold B., Noireclerc-Savoie M., Vernède X., Adam V. & Bourgeois D. (2007). *J. Appl. Cryst.* *40*, 1105–1112.

Rudolf M., Machettira A.B., Groß L.E., Weber K.L., Bolte K., Bionda T., Sommer M.S., Maier U.G., Weber A.P.M., Schleiff E., *et al.* (2013). In vivo function of Tic22, a protein import component of the intermembrane space of chloroplasts. *Mol Plant.* *6*, 817–829.

Rustérucci C., Montillet J.L., Agnel J.P., Battesti C., Alonso B., Knoll A., Bessoule J.J., Etienne P., Suty L., Blein J.P., *et al.* (1999). Involvement of lipoxygenase-dependent production of fatty acid hydroperoxides in the development of the hypersensitive cell death induced by cryptogein on tobacco leaves. *J. Biol. Chem.* *274*, 36446–36455.

S

Sakamoto W., Miyagishima S.Y. and Jarvis P. (2008). Chloroplast biogenesis: control of plastid development, protein import, division and inheritance. *Arabidopsis Book.* *6*, e0110.

Sander T., Schölz L., Janz D., Eppelen J.T. and Riess O. (1999). Length variation of a polyglutamine array in the gene encoding a small-conductance, calcium-activated potassium channel (hKCa3) and susceptibility to idiopathic generalized epilepsy. *Epilepsy Res.* *33*, 227–233.

Satoh M., Tokaji Y., Nagano A.J., Hara-Nishimura I., Hayashi M., Nishimura M., Ohta H. and Masuda S. (2014). *Arabidopsis* mutants affecting oxylipin signaling in photo-oxidative stress responses. *Plant Physiol. Biochem.* *81*, 90–95.

Schaller A. and Stintzi A. (2009). Enzymes in jasmonate biosynthesis – Structure, function, regulation. *Phytochemistry* *70*, 1532–1538.

Schiefner A., Sinz Q., Neumaier I., Schwab W. and Skerra A. (2013). Structural basis for the enzymatic formation of the key strawberry flavor compound 4-hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanone. *J. Biol. Chem.* *288*, 16815–16826.

Schleiff E. (2003a). Prediction of the plant beta-barrel proteome: a case study of the chloroplast outer envelope. *Protein Science* *12*, 748–759.

Schleiff E., Jelic, M. and Soll, J. (2003b). A GTP-driven motor moves proteins across the outer envelope of chloroplasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *100*, 4604–4609.

Schnell D.J., Kessler F. and Blobel G. (1994). Isolation of components of the chloroplast protein import machinery. *Science.* *266*, 1007–1012.

Schnell D.J., Blobel G., Keegstra K., Kessler F., Ko K. and Soll J. (1997a). A consensus nomenclature for the protein-import components of the chloroplast envelope. *Trends Cell Biol.* *7*, 303–304.

Schumacher M.A., Crum M. and Miller M.C. (2004). Crystal structures of apocalmodulin and an apocalmodulin/SK potassium channel gating domain complex. *Structure.* *12*, 849–860.

Schwartz S.H., Léon-Kloosterziel K.M., Koornneef M. and Zeevaart J.A. (1997). Biochemical characterization of the *aba2* and *aba3* mutants in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* *114*, 161–166.

Schwenkert S., Soll J. and Bölter B. (2011). Protein import into chloroplasts—How chaperones feature into the game. *Biochimica and Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes.* *1808*, 901–911.

Seaton B.A., Head J.F., Engelman D.M. and Richards F.M. (1985). Calcium-induced increase in the radius of gyration and maximum dimension of calmodulin measured by small-angle X-ray scattering. *Biochemistry.* *24*, 6740–6743.

Seedorf M., Waagemann K. and Soll J. (1995). A constituent of the chloroplast import complex represents a new type of GTP-binding protein. *Plant J.* *7*, 401–411.

Sengupta D., Naik D. and Reddy A.R. (2015). Plant aldo-keto reductases (AKRs) as multi-tasking soldiers involved in diverse plant metabolic processes and stress defense: A structure-function update. *Journal of Plant Physiology.* *179*, 40–55.

Seo H.S., Song J.T., Cheong J.J., Lee Y.H., Lee Y.W., Hwang I., Lee J.S. and Choi Y.D. (2001). Jasmonic acid carboxyl methyltransferase: A key enzyme for jasmonate-regulated plant responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* *98*, 4788–4793.

REFERENCES

- Shakeel S.N., Ul Haq N., Heckathorn S. and Luthe D.S. (2012). Analysis of gene sequences indicates that quantity not quality of chloroplast small HSPs improves thermotolerance in C4 and CAM plants. *Plant Cell Rep.* *31*, 1943–1957.
- Shimomura Y., Kakuta Y. and Fukuyama K. (2003). Crystal Structures of the Quinone Oxidoreductase from *Thermus thermophilus* HB8 and Its Complex with NADPH: Implication for NADPH and Substrate Recognition. *Journal of Bacteriology.* *185*, 4211–4218.
- Sies H. (1991). Role of reactive oxygen species in biological processes. *Klin. Wochenschr.* *69*, 965–968.
- Silva-Filho M.C. (2003). One ticket for multiple destinations: dual targeting of proteins to distinct subcellular locations. *Current Opinion in Plant Biology.* *6*, 589–595.
- Simpson P.J., Tantitadapitak C., Reed A.M., Mather O.C., Bunce C.M., White S.A. and Ride J.P. (2009). Characterization of two novel aldo–keto reductases from *Arabidopsis*: expression patterns, broad substrate specificity, and an open active-site structure suggest a role in toxicant metabolism following stress. *Journal of Molecular Biology.* *392*, 465–480.
- Sindhu R.K. and Walton D.C. (1987). Conversion of xanthoxin to abscisic Acid by cell-free preparations from bean leaves. *Plant Physiol.* *85*, 916–921.
- Skou S., Gillilan R.E. and Ando N. (2014). Synchrotron-based small-angle X-ray scattering of proteins in solution. *Nat. Protoc.* *9*, 1727–1739.
- Smeekens S., Macdonald F.D. and Buchanan B.B. (1989). Studies on the entry of fructose-2,6-bisphosphate into chloroplasts. *Plant Physiol.* *89*, 1270–1274.
- Smith M.D. (2002). The targeting of the atToc159 preprotein receptor to the chloroplast outer membrane is mediated by its GTPase domain and is regulated by GTP. *The Journal of Cell Biology.* *159*, 833–843.
- Smith M.D., Rounds C.M., Wang F., Chen K., Afithile M. and Schnell D.J. (2004). AtToc159 is a selective transit peptide receptor for the import of nucleus-encoded chloroplast proteins. *J. Cell Biol.* *165*, 323–334.
- Sohrt K. and Soll J. (2000). Toc64, a new component of the protein translocon of chloroplasts. *J. Cell Biol.* *148*, 1213–1221.
- Soll J. (2002). Protein import into chloroplasts. *Curr. Opin. Plant Biol.* *5*, 529–535.
- Sommer M.S. and Schleiff E. (2009). Molecular interactions within the plant TOC complex. *Biol. Chem.* *390*, 739–744.
- Sommer M., Rudolf M., Tillmann B., Tripp J., Sommer M.S. and Schleiff E. (2013). Toc33 and Toc64-III cooperate in precursor protein import into the chloroplasts of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Environ.* *36*, 970–983.
- Stahl T., Glockmann C., Soll J. and Heins L. (1999). Tic40, a new “old” subunit of the chloroplast protein import translocon. *J. Biol. Chem.* *274*, 37467–37472.
- Stefano G.B. (2015). Mitochondria and Chloroplasts Shared in Animal and Plant Tissues: Significance of Communication. *Medical Science Monitor.* *21*, 1507–1511.
- Stiti N., Missihoun T.D., Kotchoni S.O., Kirch H.H. and Bartels D. (2011). Aldehyde Dehydrogenases in *Arabidopsis thaliana*: biochemical requirements, metabolic pathways, and functional analysis. *Front Plant Sci.* *2*, 65.
- Stiti N., Podgórska K. and Bartels D. (2014). Aldehyde dehydrogenase enzyme ALDH3H1 from *Arabidopsis thaliana*: Identification of amino acid residues critical for cofactor specificity. *Biochim. Biophys. Acta.* *1844*, 681–693.
- Strand A., Asami T., Alonso J., Ecker J.R. and Chory J. (2003). Chloroplast to nucleus communication triggered by accumulation of Mg-protoporphyrinIX. *Nature.* *421*, 79–83.
- Sugimoto M., Esaki N., Tanaka H. and Soda K. (1989). A simple and efficient method for the oligonucleotide-directed mutagenesis using plasmid DNA template and phosphorothioate-modified nucleotide. *Anal. Biochem.* *179*, 309–311.
- Sun Y.J., Forouhar F., Li Hm H., Tu S.L., Yeh Y.H., Kao S., Shr H.L., Chou C.C., Chen C. and Hsiao C.D. (2002b). Crystal structure of pea Toc34, a novel GTPase of the chloroplast protein translocon. *Nat. Struct. Biol.* *9*, 95–100.

REFERENCES

- Sunkar R., Bartels D. and Kirch H.H. (2003). Overexpression of a stress-inducible aldehyde dehydrogenase gene from *Arabidopsis thaliana* in transgenic plants improves stress tolerance. *Plant J.* *35*, 452–464.
- Suzuki N., Koussevitzky S., Mittler R. and Miller G. (2012). ROS and redox signalling in the response of plants to abiotic stress. *Plant Cell Environ.* *35*, 259–270.
- Dmitri I Svergun and Michel H J Koch. (2003). Small-angle scattering studies of biological macromolecules in solution. *Rep. Prog. Phys.* *66*, 1735–1782.
- Swindells M.B. and Ikura M. (1996). Pre-formation of the semi-open conformation by the apo-calmodulin C-terminal domain and implications binding IQ-motifs. *Nat. Struct. Biol.* *3*, 501–504.
- T**
- Taneja B. and Mande S.C. (1999). Conserved structural features and sequence patterns in the GroES fold family. *Protein Eng.* *12*, 815–818.
- Teng Y.S., Su Y., Chen L.J., Lee Y.J., Hwang I. and Li H. (2006). Tic21 is an essential translocon component for protein translocation across the chloroplast inner envelope membrane. *Plant Cell* *18*, 2247–2257.
- Theg S.M., Bauerle, C., Olsen L.J., Selman B.R. and Keegstra K. (1989). Internal ATP is the only energy requirement for the translocation of precursor proteins across chloroplastic membranes. *J. Biol. Chem.* *264*, 6730–6736.
- Thorn J.M., Barton J.D., Dixon N.E., Ollis D.L. and Edwards K.J. (1995). Crystal Structure of Escherichia coli QOR Quinone Oxidoreductase Complexed with NADPH. *Journal of Molecular Biology.* *249*, 785–799.
- Tickle I.J., Laskowski R.A., Moss D.S. (1998). Rfree and the rfree ratio. I. Derivation of expected values of cross-validation residuals used in macromolecular least-squares refinement. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* *54*, 547–57.
- Tickle I.J. (2007). Experimental determination of optimal root-mean-square deviations of macromolecular bond lengths and angles from their restrained ideal values. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* *63*, 1274–81.
- Tidow H. and Nissen P. (2013). Special issue--signalling. Introduction Ca²⁺ signalling and transport in health and disease. *FEBS J.* *280*, 5384.
- Tidow H., Poulsen L.R., Andreeva A., Knudsen M., Hein K.L., Wiuf C., Palmgren M.G. and Nissen P. (2012). A bimodular mechanism of calcium control in eukaryotes. *Nature.* *491*, 468–472.
- Tijet N. and Brash A.R. (2002). Allene oxide synthases and allene oxides. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* *68-69*, 423–431.
- Timmis J.N., Ayliffe M.A., Huang C.Y. and Martin W. (2004). Endosymbiotic gene transfer: organelle genomes forge eukaryotic chromosomes. *Nat. Rev. Genet.* *5*, 123–135.
- Tranel P.J., Froehlich J., Goyal A. and Keegstra K. (1995). A component of the chloroplastic protein import apparatus is targeted to the outer envelope membrane via a novel pathway. *The EMBO Journal.* *14*, 2436.
- Tranel P.J. and Keegstra K. (1996). A novel, bipartite transit peptide targets OEP75 to the outer membrane of the chloroplastic envelope. *The Plant Cell* *11*, 2093–2104.
- Triantaphylidès C. and Havaux M. (2009). Singlet oxygen in plants: production, detoxification and signaling. *Trends in Plant Science.* *14*, 219–228.
- Tripp J., Inoue K., Keegstra K. and Froehlich J.E. (2007). A novel serine/proline-rich domain in combination with a transmembrane domain is required for the insertion of AtTic40 into the inner envelope membrane of chloroplasts. *Plant J.* *52*, 824–838.
- Truman W., Sreekanta S., Lu Y., Bethke G., Tsuda K., Katagiri F., and Glazebrook J. (2013). The calmodulin-binding protein60 family includes both negative and positive regulators of plant immunity. *Plant physiology.* *163*, 1741–1751.
- Tsai J.Y., Chu C.C., Yeh Y.H., Chen L.J., Li H. and Hsiao C.D. (2013). Structural characterizations of the chloroplast translocon protein Tic110. *The Plant Journal.* *75*, 847–857.
- Tsutakawa S.E., Hura G.L., Frankel K.A., Cooper P.K. and Tainer J.A. (2007). Structural analysis of flexible proteins in solution by small angle X-ray scattering combined with crystallography. *J. Struct. Biol.* *158*, 214–223.

REFERENCES

U

Urbauer J.L., Short J.H., Dow L.K. and Wand A.J. (1995). Structural analysis of a novel interaction by calmodulin: high-affinity binding of a peptide in the absence of calcium. *Biochemistry* *34*, 8099–8109.

Urzhumtsev A., Afonine P.V. and Adams P.D. (2013). *TLS* from fundamentals to practice. *Crystallography Reviews*. *19*, 230–270.

V

Vandeyar M.A., Weiner M.P., Hutton C.J. and Batt C.A. (1988). A simple and rapid method for the selection of oligodeoxynucleotide-directed mutants. *Gene*. *65*, 129–133.

Van Der Luit A.H., Olivari C., Haley A., Knight M.R. and Trewavas A.J. (1999). Distinct calcium signaling pathways regulate calmodulin gene expression in tobacco. *Plant Physiol.* *121*, 705–714.

Van der Spoel D., de Groot B.L., Hayward S., Berendsen H.J. and Vogel H.J. (1996). Bending of the calmodulin central helix: a theoretical study. *Protein Sci.* *5*, 2044–2053.

Van Petegem F., Chatelain F.C. and Minor D.L. (2005). Insights into voltage-gated calcium channel regulation from the structure of the CaV1.2 IQ domain-Ca²⁺/calmodulin complex. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *12*, 1108–1115.

Vick B.A. and Zimmerman D.C. (1983). The biosynthesis of jasmonic acid: a physiological role for plant lipoxygenase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *111*, 470–477.

Vinogradova M.V., Malanina G.G., Waitzman J.S., Rice S.E. and Fletterick R.J. (2013). Plant Kinesin-Like Calmodulin Binding Protein Employs Its Regulatory Domain for Dimerization. *PLoS ONE* *8*, e66669.

Vojta A., Alavi M., Becker T., Hörmann F., Kuchler M., Soll J., Thomson R. and Schleiff E. (2004). The protein translocon of the plastid envelopes. *J. Biol. Chem.* *279*, 21401–21405.

Vollenweider S., Weber H., Stolz S., Chételat A. and Farmer E.E. (2000). Fatty acid ketodienes and fatty acid ketotrienes: Michael addition acceptors that accumulate in wounded and diseased Arabidopsis leaves. *The Plant Journal*. *24*, 467–476.

Von Heijne G. (1990). The signal peptide. *J. Membr. Biol.* *115*, 195–201.

Von Heijne G. and Nishikawa K. (1991). Chloroplast transit peptides. The perfect random coil? *FEBS Lett.* *278*, 1–3.

Von Stetten D., Giraud T., Carpentier P., Sever F., Terrien M., Dobias F., Juers D.H., Flot D., Mueller-Dieckmann C., Leonard G.A., et al. (2015). In crystallo optical spectroscopy (icOS) as a complementary tool on the macromolecular crystallography beamLines of the ESRF. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* *71*, 15–26.

W

Waegemann K. and Soll J. (1996). Phosphorylation of the transit sequence of chloroplast precursor proteins. *J. Biol. Chem.* *271*, 6545–6554.

Waley S.G. (1993). The kinetics of slow-binding and slow, tight-binding inhibition: the effects of substrate depletion. *Biochem. J* *294*, 195–200.

Wang P., Ye J., Shen Y. and Mi H. (2006). The role of chloroplast NAD(P)H dehydrogenase in protection of tobacco plant against heat stress. *Sci. China. C. Life Sci.* *49*, 311–321.

Wasilewska A., Vlad F., Sirichandra C., Redko Y., Jammes F., Valon C., Frei dit Frey N. and Leung, J. (2008). An update on abscisic acid signaling in plants and more. *Mol Plant.* *1*, 198–217.

Wasternack C. (2007). Jasmonates: an update on biosynthesis, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. *Ann. Bot.* *100*, 681–697.

Wayman G.A., Lee Y.S., Tokumitsu H., Silva A.J., Silva A. and Soderling T.R. (2008). Calmodulin-kinases: modulators of neuronal development and plasticity. *Neuron* *59*, 914–931.

Weibel P., Hiltbrunner A., Brand L. and Kessler F. (2003). Dimerization of Toc-GTPases at the chloroplast protein import machinery. *J. Biol. Chem.* *278*, 37321–37329.

REFERENCES

- Weichert H., Stenzel I., Berndt E., Wasternack C., and Feussner I. (1999). Metabolic profiling of oxylipins upon salicylate treatment in barley leaves--preferential induction of the reductase pathway by salicylate (1). *FEBS Lett.* *464*, 133–137.
- Welsch R., Wüst F., Bär C., Al-Babili S. and Beyer P. (2008). A third phytoene synthase is devoted to abiotic stress-induced abscisic acid formation in rice and defines functional diversification of phytoene synthase genes. *Plant Physiol.* *147*, 367–380.
- Wienk H.L., Wechselberger R.W., Czisch M. and de Kruijff B. (2000). Structure, dynamics, and insertion of a chloroplast targeting peptide in mixed micelles. *Biochemistry* *39*, 8219–8227.
- Wilson T.D., Steck W.F. (2000). A modified HET-CAM assay approach to the assessment of anti-irritant properties of plant extracts. *Food Chem Toxicol.* *38*, 867–72.
- Wriggers W., Mehler E., Pitici F., Weinstein H. and Schulten K. (1998). Structure and dynamics of calmodulin in solution. *Biophys. J.* *74*, 1622–1639.
- Wlodawer A., Hodgson K.O. (1975). Crystallization and crystal data of monellin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* *72*, 398-9.
- Wu C. and Ko K. (1993). Identification of an uncleavable targeting signal in the 70-kilodalton spinach chloroplast outer envelope membrane protein. *J. Biol. Chem.* *268*, 19384–19391.
- Wu J.T., Wu L.H. and Knight J.A. (1986). Stability of NADPH: effect of various factors on the kinetics of degradation. *Clinical Chemistry.* *32*, 314–319.
- Wylie D.C. and Vanaman T.C. (1988) Structure and evolution of the calmodulin family of calcium regulatory proteins. P. Cohen, K.B. Klee (Eds.), *Calmodulin*, Elsevier, Amsterdam. 1–15

X

- Xia X.M., Fakler B., Rivard A., Wayman G., Johnson-Pais T., Keen J. E., Ishii T., Hirschberg B., Bond C. T., Lutsenko S., Maylie J. & Adelman J. P., Mechanism of calcium gating in small-conductance calcium-activated potassium channels. *Nature.* *395*, 503-507.
- Xiong T.C., Bourque S., Lecourieux D., Amelot N., Grat S., Brière C., Mazars C., Pugin A. and Ranjeva R. (2006). Calcium signaling in plant cell organelles delimited by a double membrane. *Biochimica and Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research.* *1763*, 1209–1215.

Y

- Yaffe M.B., Rittinger K., Volinia S., Caron P.R., Aitken A., Leffers H., Gamblin S.J., Smerdon S.J., and Cantley L.C. (1997a). The structural basis for 14-3-3: phosphopeptide binding specificity. *Cell.* *91*, 961–971.
- Yaffe M.B., Schutkowski M., Shen M., Zhou X.Z., Stukenberg P.T., Rahfeld J.U., Xu J., Kuang J., Kirschner M.W., Fischer G., *et al.* (1997b). Sequence-specific and phosphorylation-dependent proline isomerization: a potential mitotic regulatory mechanism. *Science.* *278*, 1957–1960.
- Yamaguchi N., Xu L., Pasek D.A., Evans K.E., Chen S.R.W. and Meissner, G. (2005). Calmodulin regulation and identification of calmodulin binding region of type-3 ryanodine receptor calcium release channel. *Biochemistry.* *44*, 15074–15081.
- Yamauchi Y., Hasegawa A., Taninaka A., Mizutani M. and Sugimoto, Y. (2011). NADPH-dependent reductases involved in the detoxification of reactive carbonyls in plants. *Journal of Biological Chemistry.* *286*, 6999–7009.
- Yamauchi Y., Hasegawa A., Mizutani M. and Sugimoto Y. (2012). Chloroplastic NADPH-dependent alkenal/one oxidoreductase contributes to the detoxification of reactive carbonyls produced under oxidative stress. *FEBS Letters.* *586*, 1208–1213.
- Yan J., Campbell J.H., Glick B.R., Smith M.D. and Liang Y. (2014). Molecular characterization and expression analysis of chloroplast protein import components in tomato (*Solanum lycopersicum*). *PLoS ONE.* *9*, e95088.
- Yang S. (2014). Methods for SAXS-based structure determination of biomolecular complexes. *Adv. Mater. Weinheim.* *26*, 7902–7910.
- Yap K.L., Kim J., Truong K., Sherman M., Yuan T. and Ikura M. (2000). Calmodulin target database. *J. Struct. Funct. Genomics.* *1*, 8–14.

REFERENCES

Yeh Y.H., Kesavulu M.M., Li H.M., Wu S.Z., Sun Y.J., Konozy E.H.E. and Hsiao, C.D. (2007). Dimerization is important for the GTPase activity of chloroplast translocon components at Toc33 and psToc159. *J. Biol. Chem.* *282*, 13845–13853.

Yin L., Mano J. 'ichi, Wang S., Tsuji W. and Tanaka K. (2010). The involvement of lipid peroxide-derived aldehydes in aluminum toxicity of tobacco roots. *Plant Physiol.* *152*, 1406–1417.

Youn B., Kim S.J., Moinuddin S.G.A., Lee C., Bedgar D.L., Harper A.R., Davin L.B., Lewis N.G. and Kang C. (2006). Mechanistic and structural studies of apoform, binary, and ternary complexes of the *Arabidopsis* Alkenal Double Bond Reductase At5g16970. *Journal of Biological Chemistry.* *281*, 40076–40088.

Yun C.H., Bai J., Sun D.Y., Cui D.F., Chang W.R. and Liang D.C. (2004). Structure of potato calmodulin PCM6: the first report of the three-dimensional structure of a plant calmodulin. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* *60*, 1214–1219.

Z

Závodszy P. and Hajdú I. (2013). Evolution of the concept of conformational dynamics of enzyme functions over half of a century: A personal view. *Biopolymers.* *99*, 263–269.

Zhang X.P. and Glaser E. (2002). Interaction of plant mitochondrial and chloroplast signal peptides with the Hsp70 molecular chaperone. *Trends in Plant Science.* *7*, 14–21.

Zhang F., Skoda M.W.A., Jacobs R.M.J., Martin R.A., Martin C.M. and Schreiber F. (2007). Protein interactions studied by SAXS: effect of ionic strength and protein concentration for BSA in aqueous solutions. *J. Phys. Chem. B.* *111*, 251–259.

Zhang H., Wang J. and Goodman H.M. (1994). Expression of the *Arabidopsis* gene AKR coincides with chloroplast development. *Plant Physiology.* *106*, 1261–1267.

Zhang M., Abrams C., Wang L., Gizzi A., He L., Lin R., Chen Y., Loll P.J., Pascal J.M. and Zhang J. (2012). Structural Basis for Calmodulin as a Dynamic Calcium Sensor. *Structure.* *20*, 911–923.

Zhao Q., Zhang C., Jia Z., Huang Y., Li H. and Song S. (2015). Involvement of calmodulin in regulation of primary root elongation by N-3-oxo-hexanoyl homoserine lactone in *Arabidopsis thaliana*. *Frontiers in Plant Science.* *5*.

Zheng Q., Song Y., Zhang W., Shaw N., Zhou W. and Rao Z. (2015). Structural views of quinone oxidoreductase from *Mycobacterium tuberculosis* reveal large conformational changes induced by the co-factor. *FEBS Journal.* *282*, 2697–2707.

Zhu X., Dunand C., Snedden W. and Galaud J.P. (2015). CaM and CML emergence in the green lineage. *Trends in Plant Science.*

Zühlke R.D., Pitt G.S., Deisseroth K., Tsien R.W. and Reuter H. (1999). Calmodulin supports both inactivation and facilitation of L-type calcium channels. *Nature.* *399*, 159–162.