



UNIVERSITE PARIS-SUD 11  
U.F.R. SCIENTIFIQUE D'ORSAY

**THESE**

présentée pour obtenir le grade de

**DOCTEUR ES SCIENCES  
DE L'UNIVERSITE PARIS-SUD 11**

Par

**Guillaume Née**

*Soutenue le 15 décembre 2011*

**Etude de fonctions non-photosynthétiques pour les  
thiorédoxines plastidiales d'*Arabidopsis thaliana***

**JURY :**

**Pr S. Nessler**

**Pr P. Geigenberger**

**Dr F. Montrichard**

**Dr J.P. Reichheld**

**Dr E. Issakidis-Bourguet**

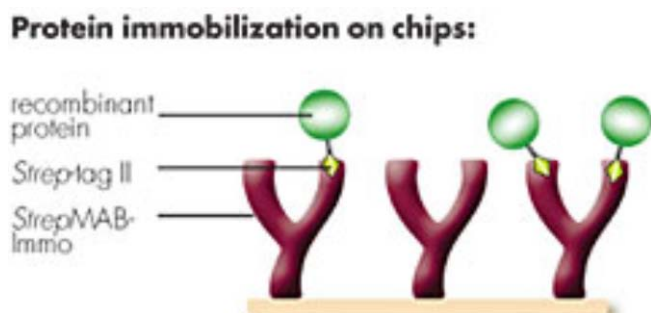
**Présidente du jury**

**Examineur**

**Rapporteur**

**Rapporteur**

**Responsable de la thèse**



**Figure 70: Principle BIAcore sensor chips building with of strep tag II fusion protein.** Strep Mab-Immo antibody can be covalently attached on CM-5 sensor chip. Then strep tagged protein can be immobilized by the recognition and the binding of strep tag II at the surface of the sensor chips for real time SPR analysis

## Remerciements.

Je tiens tout d'abord à remercier en premier lieu Didier Peltier de l'université d'Angers qui, il y a 6 ans, m'a permis de faire ma première expérience de recherche en m'accueillant dans son laboratoire. A l'époque, j'étais « jardinier » et ne savais même pas ce que signifiait PCR. Tu m'as fait confiance malgré mes très maigres connaissances en biologie cellulaire et tu m'as démontré que les jardiniers aussi pouvaient amplifier de l'ADN. La vue d'un amplicon fluorescent sur un gel d'agarose a été pour moi "la" révélation, et j'ai compris à cet instant que ma vie s'épanouirait dans un laboratoire bien plus vite que sous une serre. Ces quelques semaines de stage ont suffi pour me faire reprendre de façon déterminée les études universitaires.

Par la suite, j'ai rencontré à l'université Françoise Montrichard qui m'a donné le goût de la biochimie et surtout la passion pour cette famille de protéines que sont les thioredoxines. Merci Françoise d'avoir partagé avec moi ta passion, et de m'avoir formé à la biochimie. L'indépendance, l'autonomie, la ténacité et l'efficacité sont aujourd'hui mes principes fondamentaux et je te dois cet héritage. Merci également de m'avoir introduit au sein du laboratoire de signalisation redox où j'ai effectué mon stage de M2, puis ma thèse.

Voilà maintenant le moment de remercier tous ceux qui m'ont accompagné au cours de ces trois années de thèse et en premier lieu "ma chef", Emmanuelle Issakidiss. Merci de m'avoir donné ma chance dans ton labo il y a quatre ans, et de m'avoir formé. Tu m'as également laissé beaucoup de liberté, ce qui m'a permis de donner une direction très personnelle à ma thèse. La confiance que tu as portée en moi et en mes hypothèses (parfois farfelues) ont été un facteur déterminant de ma réussite.

Merci aussi à Stéphane Lemaire, avec qui j'ai beaucoup échangé lors de ma première année de thèse. Les discussions scientifiques avec toi ont été très stimulantes. Merci aussi à Myroslwa Miginiac-Maslow : vous représentez pour moi la quintessence du chercheur accompli, votre gentillesse, vos connaissances de la thématique et de la biologie en général m'impressionnent énormément. Approcher (même de loin) votre niveau est devenu ma quête du Graal et j'ai pleinement conscience que cet objectif est à la frontière de l'impossible, mais votre exemple est une source de motivation inépuisable.

Merci également à Hélène Vanacker. Nos discussions scientifiques ont été très stimulantes, et je n'oublierai pas que tu m'as beaucoup aidé pour mes enseignements, aussi bien d'un point de vue pédagogique qu'administratif. Tu connais toutes les ficelles du milieu, et, sans ton soutien et ton expérience d'enseignant-chercheur, j'aurais eu beaucoup plus de mal à gérer ces deux activités.

Merci également à Mariette, Anne-Sophie, Xing Huang, Mirko, Gilles et Daniel. Avoir partagé des moments avec vous au labo et en dehors font de vous des ami(e)s que je suis fier d'avoir.

Merci à Nathalie, Chantal, Françoise, Martine, Laurine et Pierre. Vous avez été des collègues formidables en qui j'ai pleine confiance, et qui m'avez énormément soutenu. Je vous dois beaucoup, et je ne serai jamais comment vous remercier à la hauteur de ce que vous m'avez donné.

Merci aussi à Mr Jean pour sa joie, son enthousiasme, et sa culture (sans limite: Mr Jean est une vraie encyclopédie vivante).

Merci à mon Thom Thom : sans ton aide, c'était foutu; je n'y serais pas arrivé, tu m'as nourri quand j'étais trop débordé ou déprimé pour penser à m'alimenter, ton sens humain m'a souvent laissé pantois! Merci aussi à Laure, ta future femme qui en plus d'être une source de bonne humeur, m'a toujours prêté son homme sans jamais se plaindre (jusqu'à parfois pas d'heure...), quand face à l'informatique capricieuse je ne suis souvent retrouvé bien démuné.



Et merci à tous ceux de l'Institut que j'aurais pu oublier et qui m'ont aidé (parfois beaucoup), je pense notamment à Maryelle, Jean Paul, Eric, Gilles Meeriam et Hoang.

Merci à mes trois brillantes stagiaires Fanny, Séverine, et Roxane. Vous êtes toutes trois très travailleuses et très intelligentes, j'ai souvent été impressionné par la pertinence de vos remarques et par votre assiduité au travail, même pour des tâches pénibles (les innombrables semis agencés de graines d'Arabidopsis...). Je suis profondément persuadé que vous irez loin. Votre présence et votre soutien sans faille à mes cotés ont été des bouffées d'oxygène sans lesquelles je me serais sûrement asphyxié.

Je tiens également à remercier toutes les personnes qui m'ont accueilli dans leur laboratoire et qui ont passé du temps à partager leur compétence pour faire avancer mes travaux.

Marielle Valerio Lepiniec, Magali Aumont, vous m'avez initié à la micro calorimétrie et vous avez toujours gardé espoir en mes manips, là où, moi-même, je perdais parfois confiance.

Sylvie Nessler, comment te remercier de m'avoir accueilli au LEBS, d'avoir passé beaucoup de temps à m'écouter, à m'aider pour faire avancer mon sujet ainsi que d'avoir investi financièrement dans mes manips. Grâce à toi j'ai découvert le monde des structuralistes, et j'ai pu aller jusqu'à l'obtention de petits cristaux, et je n'en suis pas peu fier !

Christophe Bailly et Patrice Meimoun, je vous dois une grosse partie de mon travail sur la caractérisation de la physiologie de la germination, Là aussi vous avez cru en moi et en mes convictions.

Je tiens à finir en remerciant mes amis, et surtout mes parents et ma soeur qui m'ont toujours soutenu sans faille et énormément aidé pour les corrections orthographiques de ce manuscrit. Vous avez toujours été là pour moi, malgré mon comportement parfois à la limite du manque de patience. Il est temps de rendre à César ce qui lui appartient, Maman, Papa cette thèse est aussi est la vôtre!



# TABLE DES MATIERES

<b>ABREVIATIONS .....</b>	<b>1</b>
<b>INTRODUCTION .....</b>	<b>3</b>
<b>Les thiorédoxines (TRX).....</b>	<b>4</b>
Système de réduction des TRX.....	5
Le système NADP Thiorédoxine réductase.....	5
Le système ferrédoxine thiorédoxine des organismes photosynthétiques .....	6
Réduction des thiorédoxines dans les plastes non photosynthétiques .....	7
Système d'oxydation des TRX .....	8
Les thiorédoxines et leurs homologues structuraux des plastes d' <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	9
TRX du type f.....	9
TRX du type m.....	9
TRX du type y .....	10
TRX du type x.....	10
TRX du type z.....	10
Les glutarédoxines (GRX).....	11
Expression de thiorédoxines plastidiales d' <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	11
Les cibles des thiorédoxines .....	11
Les cibles de TRX plastidiales impliquées dans le métabolisme photosynthétique .....	12
Les cibles de TRX plastidiales impliquées dans le métabolisme non photosynthétique .....	12
Spécificités des TRX pour leurs cibles .....	13
Nature de la spécificité TRX cible .....	14
Phénotype des mutants pertes de fonction pour les TRX.....	15
Les TRX dans la physiologie des semences .....	16
Germination et formes actives de l'oxygène .....	16
<b>Le cycle oxydatif des pentoses phosphate.....</b>	<b>18</b>
La glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PDH) .....	19
Localisation subcellulaire des G6PDH d' <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	19
Importance des G6PDH dans la physiologie des végétaux .....	20
Régulation enzymatique des G6PDH.....	20
Origine évolutive de la régulation redox des G6PDH.....	21
Mécanisme catalytique des G6PDH.....	22
La 6-phosphogluconate déshydrogénase (6PGDH).....	23
Localisation subcellulaire des 6PGDH d' <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	23
Mécanisme catalytique des 6PGDH.....	24
Structure tridimensionnelle et sites catalytiques de 6PGDH.....	24
Modifications post traductionnelles des 6PGDH de plantes supérieures .....	25
<b>Objectif de mon travail de thèse .....</b>	<b>26</b>
<b>RESULTATS.....</b>	<b>27</b>
<b>Première partie .....</b>	<b>28</b>
<b>Caractérisation biochimique de la régulation post traductionnelle des déshydrogénases du cycle oxydatif des pentoses phosphate .....</b>	<b>28</b>
<b>Etude biochimique des modifications post traductionnelles d'une 6-phosphogluconate déshydrogénase chloroplastique d'<i>A. thaliana</i> .....</b>	<b>29</b>
Production et purification d'une 6PGDH recombinante d' <i>Arabidopsis</i> .....	29
Les modifications post-traductionnelles de la 6PGDH1 .....	29
Mise en évidence d'une modification redox de l'enzyme .....	29
Mise en évidence de la phosphorylation de l'enzyme .....	30
Analyse des séquences primaires des 6PGDH d' <i>Arabidopsis</i> et modélisation 3D de la 6PGDH1 .....	31
Recherche de sites d'adressage aux organites .....	31
Identification de cystéines candidates pour la modification redox .....	32
Recherche de sites de phosphorylation.....	33





Etude de l'effet des modifications post traductionnelles sur l'activité de la 6PDH1 .....	33
Effet de la modification redox sur l'activité de la 6PGDH.....	33
Effet de la phosphorylation de la 6PGDH sur l'activité déshydrogénase et interconnexion entre régulation redox et phosphorylation .....	34
Conclusion préliminaire sur la caractérisation biochimique de l'enzyme .....	35
<b>Régulation redox des glucose-6-phosphate déshydrogénases plastidiales..</b>	<b>37</b>
Analyse des séquences primaires des 4 G6PDH plastidiales d'Arabidopsis .....	37
Production et purification des G6PDH de type P1 (G6PDH1) et P2 (G6PDH2 et 3).....	37
Toxicité de l'isoforme G6PDH4 d'Arabidopsis dans la bactérie <i>E. coli</i> .....	39
Quantification des thiols libres sur G6PDH1 native .....	40
Caractérisation de la régulation redox de l'activité des G6PDH plastidiales .....	40
Validation des résidus cystéine régulatrices par mutagène dirigée.....	40
Spécificités de régulation redox des G6PDH plastidiales de type P1 et P2.....	41
Régulation de G6PDH1 par d'autres rédoxines plastidiales et par les métabolites redox .....	43
<b>Déterminisme de la spécificité TRX / G6PDH.....</b>	<b>45</b>
Potentiel redox des isoformes de G6PDH de type P1 et P2.....	45
Étude par calorimétrie différentiel à balayage (DSC) de l'interaction G6PDH1 / TRX.....	46
Analyse des spécificités d'interaction TRX / G6PDH par titration en microcalorimétrie isotherme (ITC) .....	47
Etude de l'interaction TRX / G6PDH en résonance plasmonique de surface (RPS) BIAcore .....	48
<b>Etude des effets de la régulation redox sur les propriétés de la G6PDH1..</b>	<b>51</b>
Alignement des séquences primaires des G6PDH d'Arabidopsis avec les isoformes de structure connue et modélisation structurale de G6PDH1 .....	51
Effet de la régulation redox sur la structure quaternaire de la G6PDH1.....	53
Détermination de la composition en structures secondaires des formes oxydées et réduites de G6PDH1 .....	54
Détermination de constantes catalytiques pour les formes oxydées et réduites.....	54
Mesure du coefficient d'affinité (Kd) pour le NADP des formes sauvage oxydée et mutante de la G6PDH1 par Calorimétrie de Titration Isotherme (ITC).....	55
Etude de l'accessibilité des substrats au site actif.....	56
Essai de cristallisation de la G6PDH1 et perspectives d'études structurales.....	57
<b>Régulation TRX-dépendante de la G6PDH1 dans un système Fd/TRX reconstitué <i>in vitro</i>.....</b>	<b>58</b>
<b>Deuxième partie .....</b>	<b>60</b>
<b>Caractérisation de mutants perte de fonction pour les TRX du type y ....</b>	<b>60</b>
Profils d'expression des gènes des TRX plastidiales et des G6PDH dans le contexte des mutants de TRX y.....	61
Validation de la perte de fonction des gènes mutés par RT-PCR semi-quantitative et quantitative.....	61
Analyse de l'expression des autres TRX plastidiales .....	62
Expression des G6PDH chez <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	62
Expression des G6PDH chez <i>Arabidopsis thaliana</i> dans un contexte TRX y mutant.....	63
Etude <i>in situ</i> de l'activité G6PDH racinaire chez les doubles mutants TRX y .....	64
Physiologie de la germination des graines mutantes pour les TRX du type y .....	65
Caractérisation de la qualité germinative des graines sauvages et mutantes pour les TRX du type y.....	66
Caractérisation de la dormance chez <i>Arabidopsis thaliana</i> écotype Columbia.....	67
Caractérisation de la dormance des graines mutantes pour les TRX du type y .....	68
Caractérisation de la tolérance à un stress thermique des graines mutantes pour les TRX du type y .....	69
Dosage et localisation <i>in situ</i> des formes actives de l'oxygène dans les graines des mutants des TRX du type y.....	70
Production-diffusion du peroxyde d'hydrogène et levée de dormance .....	70
Dosage et localisation <i>in situ</i> de la production d'anion superoxyde dans les graines des mutants de TRX y .....	71
<b>DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>73</b>



<b>Régulation redox des déshydrogénases du cycle oxydatif des pentoses phosphate .....</b>	<b>74</b>
Mise en évidence de nouvelles fonctions pour les TRX des types f et y et pour l'isoforme m3 .....	74
Coordination des cycles réducteur (Calvin) et oxydatif des pentoses phosphate par les TRX f.....	75
Impact de la régulation redox sur les propriétés catalytiques de la G6PDH1 .....	76
Régulation post-traductionnelle d'une 6PGDH chloroplastique.....	77
Nature des spécificités TRX / cible dans la régulation redox des G6PDH plastidiales .....	79
Mécanisme d'oxydation des TRX.....	81
<b>Etude <i>in planta</i> de fonctions pour les TRX y.....</b>	<b>83</b>
Impact de la perte de fonction des TRX y sur l'activité G6PDH racinaire.....	84
Rôle des TRX y dans les processus physiologiques de la germination .....	84
Conclusion sur l'analyse fonctionnelle <i>in planta</i> des TRX plastidiales d'Arabidopsis .....	85
<b>MATERIELS ET METHODES .....</b>	<b>86</b>
<b>Matériel végétal et conditions de culture .....</b>	<b>87</b>
<i>Pisum sativum</i> var. Nain merveille de Kelvedon.....	87
<i>Arabidopsis thaliana</i> .....	87
Production des lots de graines d'Arabidopsis .....	87
Culture <i>in vitro</i> .....	88
Les souches bactériennes d' <i>Escherichia coli</i> .....	88
La souche DH5 $\alpha$ F' .....	88
La souche BL21 (DE3).....	88
Conditions de culture .....	88
<b>Les plasmides.....</b>	<b>89</b>
Le vecteur pRARE 2 (Novagen).....	89
Les vecteurs pASK-G6PDH .....	89
le vecteur pGENI .....	89
<b>Méthodes relatives aux acides nucléiques .....</b>	<b>90</b>
Méthodes générales relatives à l'ADN .....	90
Amplification de l'ADN par PCR .....	90
Dosage des acides nucléiques.....	90
Electrophorèse en gel d'agarose.....	91
Séquençage.....	91
<b>Méthodes liées à l'ARN .....</b>	<b>91</b>
Extraction d'ARN totaux d'organes végétaux .....	91
Transcription inverse.....	92
PCR semi quantitative.....	92
PCR quantitative en temps réel.....	92
<b>Techniques relatives aux clonages.....</b>	<b>93</b>
Restriction de l'ADN .....	93
Purification des produits de restriction .....	93
Ligature .....	93
Transformation d' <i>E. coli</i> par électroporation.....	94
Préparation des cellules .....	94
Electroporation.....	94
Transformation d' <i>E. coli</i> par le DMSO.....	94
Traitement de compétence des cellules .....	94
Transformation .....	95
Criblage des transformants par PCR.....	95
Extraction et purification de l'ADN plasmidique bactérien.....	95
Construction du vecteur pGENI.....	95
Préparation de l'ADNc de 6PGDH1 .....	96
Clonage de la 6PGDH1 dans pGENI.....	97
Mutagenèse dirigée .....	97



<b>Technique liée à la caractérisation phénotypique des mutants d'insertion</b>	<b>98</b>
Test de germination.....	98
Dosage de la production diffusion du peroxyde d'hydrogène sur graines.....	98
Coloration <i>in situ</i> des anions superoxydes (O <sub>2</sub> <sup>-</sup> ) par le NBT.....	99
Détection de l'activité G6PDH <i>in situ</i> .....	99
<b>Techniques liées a l'analyse des protéines</b>	<b>100</b>
Méthodes biochimiques.....	100
Dosage des protéines.....	100
Electrophorèse en conditions dénaturantes (SDS-PAGE).....	100
Transfert des protéines sur membrane.....	101
Western-blot.....	101
Production des protéines recombinantes.....	101
Extraction des protéines recombinantes.....	102
Purification des protéines recombinantes.....	102
Test de phosphorylation <i>in vitro</i> .....	103
Mesure de l'activité G6PDH.....	103
Mesure de l'activité 6PGDH.....	103
Traitement d'oxydation et de réduction des protéines recombinantes.....	104
Concentration de demi-activation de G6PDH1.....	105
Inactivation des G6PDH par la DEPC.....	105
Dérivation au DTNB.....	106
Dérivation chimique des thiols avec l'acide 4-acetamido-4'-maleimidylstilbene-2,2'-disulfonique (AMS)	
.....	106
Détermination des masses apparentes de G6PDH1 réduite et oxydée par gel filtration.....	106
Détermination du potentiel redox du pont disulfure régulateur.....	106
Système Fd/ TRX reconstitué.....	107
Méthodes Biophysiques.....	108
Calorimétrie différentiel à balayage (DSC).....	108
Calorimétrie de titration isotherme (ITC).....	108
Dichroïsme circulaire (DC).....	109
Mesure d'interaction en résonance plasmonique de surface (SPR).....	109
Cristallisation de G6PDH1.....	110
<b>PUBLICATION</b>	<b>112</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b>	<b>119</b>
<b>ANNEXES</b>	<b>131</b>





UNIVERSITE PARIS-SUD 11  
U.F.R. SCIENTIFIQUE D'ORSAY

**THESE**

présentée pour obtenir le grade de

**DOCTEUR ES SCIENCES  
DE L'UNIVERSITE PARIS-SUD 11**

Par

**Guillaume Née**

*Soutenue le 15 décembre 2011*

**Etude de fonctions non-photosynthétiques pour les  
thiorédoxines plastidiales d'*Arabidopsis thaliana***

**JURY :**

**Pr S. Nessler**

**Pr P. Geigenberger**

**Dr F. Montrichard**

**Dr J.P. Reichheld**

**Dr E. Issakidis-Bourguet**

**Présidente du jury**

**Examineur**

**Rapporteur**

**Rapporteur**

**Responsable de la thèse**





## Remerciements.

Je tiens tout d'abord à remercier en premier lieu Didier Peltier de l'université d'Angers qui, il y a 6 ans, m'a permis de faire ma première expérience de recherche en m'accueillant dans son laboratoire. A l'époque, j'étais « jardinier » et ne savais même pas ce que signifiait PCR. Tu m'as fait confiance malgré mes très maigres connaissances en biologie cellulaire et tu m'as démontré que les jardiniers aussi pouvaient amplifier de l'ADN. La vue d'un amplicon fluorescent sur un gel d'agarose a été pour moi "la" révélation, et j'ai compris à cet instant que ma vie s'épanouirait dans un laboratoire bien plus vite que sous une serre. Ces quelques semaines de stage ont suffi pour me faire reprendre de façon déterminée les études universitaires.

Par la suite, j'ai rencontré à l'université Françoise Montrichard qui m'a donné le goût de la biochimie et surtout la passion pour cette famille de protéines que sont les thioredoxines. Merci Françoise d'avoir partagé avec moi ta passion, et de m'avoir formé à la biochimie. L'indépendance, l'autonomie, la ténacité et l'efficacité sont aujourd'hui mes principes fondamentaux et je te dois cet héritage. Merci également de m'avoir introduit au sein du laboratoire de signalisation redox où j'ai effectué mon stage de M2, puis ma thèse.

Voilà maintenant le moment de remercier tous ceux qui m'ont accompagné au cours de ces trois années de thèse et en premier lieu "ma chef", Emmanuelle Issakidiss. Merci de m'avoir donné ma chance dans ton labo il y a quatre ans, et de m'avoir formé. Tu m'as également laissé beaucoup de liberté, ce qui m'a permis de donner une direction très personnelle à ma thèse. La confiance que tu as portée en moi et en mes hypothèses (parfois farfelues) ont été un facteur déterminant de ma réussite.

Merci aussi à Stéphane Lemaire, avec qui j'ai beaucoup échangé lors de ma première année de thèse. Les discussions scientifiques avec toi ont été très stimulantes. Merci aussi à Myroslwa Miginiac-Maslow : vous représentez pour moi la quintessence du chercheur accompli, votre gentillesse, vos connaissances de la thématique et de la biologie en général m'impressionnent énormément. Approcher (même de loin) votre niveau est devenu ma quête du Graal et j'ai pleinement conscience que cet objectif est à la frontière de l'impossible, mais votre exemple est une source de motivation inépuisable.

Merci également à Hélène Vanacker. Nos discussions scientifiques ont été très stimulantes, et je n'oublierai pas que tu m'as beaucoup aidé pour mes enseignements, aussi bien d'un point de vue pédagogique qu'administratif. Tu connais toutes les ficelles du milieu, et, sans ton soutien et ton expérience d'enseignant-chercheur, j'aurais eu beaucoup plus de mal à gérer ces deux activités.

Merci également à Mariette, Anne-Sophie, Xing Huang, Mirko et Daniel. Avoir partagé des moments avec vous au labo et en dehors font de vous des ami(e)s que je suis fier d'avoir.

Merci à Nathalie, Chantal, Françoise, Martine, Laurine et Pierre. Vous avez été des collègues formidables en qui j'ai pleine confiance, et qui m'avez énormément soutenu. Je vous dois beaucoup, et je ne serai jamais comment vous remercier à la hauteur de ce que vous m'avez donné.

Merci aussi à Mr Jean pour sa joie, son enthousiasme, et sa culture (sans limite: Mr Jean est une vraie encyclopédie vivante).

Merci à mon Thom Thom : sans ton aide, c'était foutu; je n'y serais pas arrivé, tu m'as nourri quand j'étais trop débordé ou déprimé pour penser à m'alimenter, ton sens humain m'a souvent laissé pantois! Merci aussi à Laure, ta future femme qui en plus d'être une source de bonne humeur, m'a toujours prêté son homme sans jamais se plaindre (jusqu'à parfois pas d'heure...), quand face à l'informatique capricieuse je ne suis souvent retrouvé bien démuni.

Et merci à tous ceux de l'Institut que j'aurais pu oublier et qui m'ont aidé (parfois beaucoup), je pense notamment à Maryelle, Jean Paul, Eric, Meeriam et Hoang.



Merci à mes trois brillantes stagiaires Fanny, Séverine, et Roxane. Vous êtes toutes trois très travailleuses et très intelligentes, j'ai souvent été impressionné par la pertinence de vos remarques et par votre assiduité au travail, même pour des tâches pénibles (les innombrables semis agencés de graines d'Arabidopsis...). Je suis profondément persuadé que vous irez loin. Votre présence et votre soutien sans faille à mes cotés ont été des bouffées d'oxygène sans lesquelles je me serais sûrement asphyxié.

Je tiens également à remercier toutes les personnes qui m'ont accueilli dans leur laboratoire et qui ont passé du temps à partager leur compétence pour faire avancer mes travaux.

Marielle Valerio Lepiniec, Magali Aumont, vous m'avez initié à la micro calorimétrie et vous avez toujours gardé espoir en mes manips, là où, moi-même, je perdais parfois confiance.

Sylvie Nessler, comment te remercier de m'avoir accueilli au LEBS, d'avoir passé beaucoup de temps à m'écouter, à m'aider pour faire avancer mon sujet ainsi que d'avoir investi financièrement dans mes manips. Grâce à toi j'ai découvert le monde des structuralistes, et j'ai pu aller jusqu'à l'obtention de petits cristaux, et je n'en suis pas peu fier !

Christophe Bailly et Patrice Meimoun, je vous dois une grosse partie de mon travail sur la caractérisation de la physiologie de la germination, Là aussi vous avez cru en moi et en mes convictions.

Je tiens à finir en remerciant mes amis, et surtout mes parents et ma soeur qui m'ont toujours soutenu sans faille et énormément aidé pour les corrections orthographiques de ce manuscrit. Vous avez toujours été là pour moi, malgré mon comportement parfois à la limite du manque de patience. Il est temps de rendre à César ce qui lui appartient, Maman, Papa cette thèse est aussi est la vôtre!



# TABLE DES MATIERES

<b>ABREVIATIONS .....</b>	<b>1</b>
<b>INTRODUCTION .....</b>	<b>3</b>
<b>Les thiorédoxines (TRX).....</b>	<b>4</b>
Système de réduction des TRX.....	5
Le système NADP Thiorédoxine réductase.....	5
Le système ferrédoxine thiorédoxine des organismes photosynthétiques .....	6
Réduction des thiorédoxines dans les plastes non photosynthétiques .....	7
Système d'oxydation des TRX .....	8
Les thiorédoxines et leurs homologues structuraux des plastes d' <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	9
TRX du type f.....	9
TRX du type m.....	9
TRX du type y .....	10
TRX du type x.....	10
TRX du type z.....	10
Les glutarédoxines (GRX).....	11
Expression de thiorédoxines plastidiales d' <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	11
Les cibles des thiorédoxines .....	11
Les cibles de TRX plastidiales impliquées dans le métabolisme photosynthétique .....	12
Les cibles de TRX plastidiales impliquées dans le métabolisme non photosynthétique .....	12
Spécificités des TRX pour leurs cibles .....	13
Nature de la spécificité TRX cible .....	14
Phénotype des mutants pertes de fonction pour les TRX.....	15
Les TRX dans la physiologie des semences .....	16
Germination et formes actives de l'oxygène .....	16
<b>Le cycle oxydatif des pentoses phosphate.....</b>	<b>18</b>
La glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PDH) .....	19
Localisation subcellulaire des G6PDH d' <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	19
Importance des G6PDH dans la physiologie des végétaux .....	20
Régulation enzymatique des G6PDH.....	20
Origine évolutive de la régulation redox des G6PDH.....	21
Mécanisme catalytique des G6PDH.....	22
La 6-phosphogluconate déshydrogénase (6PGDH).....	23
Localisation subcellulaire des 6PGDH d' <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	23
Mécanisme catalytique des 6PGDH.....	24
Structure tridimensionnelle et sites catalytiques de 6PGDH.....	24
Modifications post traductionnelles des 6PGDH de plantes supérieures .....	25
<b>Objectif de mon travail de thèse .....</b>	<b>26</b>
<b>RESULTATS.....</b>	<b>27</b>
<b>Première partie .....</b>	<b>28</b>
<b>Caractérisation biochimique de la régulation post traductionnelle des déshydrogénases du cycle oxydatif des pentoses phosphate .....</b>	<b>28</b>
<b>Etude biochimique des modifications post traductionnelles d'une 6-phosphogluconate déshydrogénase chloroplastique d'<i>A. thaliana</i> .....</b>	<b>29</b>
Production et purification d'une 6PGDH recombinante d' <i>Arabidopsis</i> .....	29
Les modifications post-traductionnelles de la 6PGDH1 .....	29
Mise en évidence d'une modification redox de l'enzyme .....	29
Mise en évidence de la phosphorylation de l'enzyme .....	30
Analyse des séquences primaires des 6PGDH d' <i>Arabidopsis</i> et modélisation 3D de la 6PGDH1 .....	31
Recherche de sites d'adressage aux organites .....	31
Identification de cystéines candidates pour la modification redox .....	32
Recherche de sites de phosphorylation.....	33



Etude de l'effet des modifications post traductionnelles sur l'activité de la 6PDH1 .....	33
Effet de la modification redox sur l'activité de la 6PGDH.....	33
Effet de la phosphorylation de la 6PGDH sur l'activité déshydrogénase et interconnexion entre régulation redox et phosphorylation .....	34
Conclusion préliminaire sur la caractérisation biochimique de l'enzyme .....	35
<b>Régulation redox des glucose-6-phosphate déshydrogénases plastidiales..</b>	<b>37</b>
Analyse des séquences primaires des 4 G6PDH plastidiales d'Arabidopsis .....	37
Production et purification des G6PDH de type P1 (G6PDH1) et P2 (G6PDH2 et 3).....	37
Toxicité de l'isoforme G6PDH4 d'Arabidopsis dans la bactérie <i>E. coli</i> .....	39
Quantification des thiols libres sur G6PDH1 native .....	40
Caractérisation de la régulation redox de l'activité des G6PDH plastidiales .....	40
Validation des résidus cystéine régulatrices par mutagène dirigée.....	40
Spécificités de régulation redox des G6PDH plastidiales de type P1 et P2.....	41
Régulation de G6PDH1 par d'autres rédoxines plastidiales et par les métabolites redox .....	43
<b>Déterminisme de la spécificité TRX / G6PDH.....</b>	<b>45</b>
Potentiel redox des isoformes de G6PDH de type P1 et P2.....	45
Étude par calorimétrie différentiel à balayage (DSC) de l'interaction G6PDH1 / TRX.....	46
Analyse des spécificités d'interaction TRX / G6PDH par titration en microcalorimétrie isotherme (ITC) .....	47
Etude de l'interaction TRX / G6PDH en résonance plasmonique de surface (RPS) BIAcore .....	48
<b>Etude des effets de la régulation redox sur les propriétés de la G6PDH1..</b>	<b>51</b>
Alignement des séquences primaires des G6PDH d'Arabidopsis avec les isoformes de structure connue et modélisation structurale de G6PDH1 .....	51
Effet de la régulation redox sur la structure quaternaire de la G6PDH1.....	53
Détermination de la composition en structures secondaires des formes oxydées et réduites de G6PDH1 .....	54
Détermination de constantes catalytiques pour les formes oxydées et réduites.....	54
Mesure du coefficient d'affinité (Kd) pour le NADP des formes sauvage oxydée et mutante de la G6PDH1 par Calorimétrie de Titration Isotherme (ITC).....	55
Etude de l'accessibilité des substrats au site actif.....	56
Essai de cristallisation de la G6PDH1 et perspectives d'études structurales.....	57
<b>Régulation TRX-dépendante de la G6PDH1 dans un système Fd/TRX reconstitué <i>in vitro</i>.....</b>	<b>58</b>
<b>Deuxième partie .....</b>	<b>60</b>
<b>Caractérisation de mutants perte de fonction pour les TRX du type y ....</b>	<b>60</b>
Profils d'expression des gènes des TRX plastidiales et des G6PDH dans le contexte des mutants de TRX y.....	61
Validation de la perte de fonction des gènes mutés par RT-PCR semi-quantitative et quantitative.....	61
Analyse de l'expression des autres TRX plastidiales .....	62
Expression des G6PDH chez <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	62
Expression des G6PDH chez <i>Arabidopsis thaliana</i> dans un contexte TRX y mutant.....	63
Etude <i>in situ</i> de l'activité G6PDH racinaire chez les doubles mutants TRX y .....	64
Physiologie de la germination des graines mutantes pour les TRX du type y .....	65
Caractérisation de la qualité germinative des graines sauvages et mutantes pour les TRX du type y.....	66
Caractérisation de la dormance chez <i>Arabidopsis thaliana</i> écotype Columbia.....	67
Caractérisation de la dormance des graines mutantes pour les TRX du type y .....	68
Caractérisation de la tolérance à un stress thermique des graines mutantes pour les TRX du type y .....	69
Dosage et localisation <i>in situ</i> des formes actives de l'oxygène dans les graines des mutants des TRX du type y.....	70
Production-diffusion du peroxyde d'hydrogène et levée de dormance .....	70
Dosage et localisation <i>in situ</i> de la production d'anion superoxyde dans les graines des mutants de TRX y .....	71
<b>DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>73</b>





<b>Régulation redox des déshydrogénases du cycle oxydatif des pentoses phosphate .....</b>	<b>74</b>
Mise en évidence de nouvelles fonctions pour les TRX des types f et y et pour l'isoforme m3 .....	74
Coordination des cycles réducteur (Calvin) et oxydatif des pentoses phosphate par les TRX f.....	75
Impact de la régulation redox sur les propriétés catalytiques de la G6PDH1 .....	76
Régulation post-traductionnelle d'une 6PGDH chloroplastique.....	77
Nature des spécificités TRX / cible dans la régulation redox des G6PDH plastidiales .....	79
Mécanisme d'oxydation des TRX.....	81
<b>Etude <i>in planta</i> de fonctions pour les TRX y.....</b>	<b>83</b>
Impact de la perte de fonction des TRX y sur l'activité G6PDH racinaire.....	84
Rôle des TRX y dans les processus physiologiques de la germination .....	84
Conclusion sur l'analyse fonctionnelle <i>in planta</i> des TRX plastidiales d'Arabidopsis .....	85
<b>MATERIELS ET METHODES .....</b>	<b>86</b>
<b>Matériel végétal et conditions de culture .....</b>	<b>87</b>
<i>Pisum sativum</i> var. Nain merveille de Kelvedon .....	87
<i>Arabidopsis thaliana</i> .....	87
Production des lots de graines d'Arabidopsis .....	87
Culture <i>in vitro</i> .....	88
Les souches bactériennes d' <i>Escherichia coli</i> .....	88
La souche DH5 $\alpha$ F' .....	88
La souche BL21 (DE3).....	88
Conditions de culture .....	88
<b>Les plasmides.....</b>	<b>89</b>
Le vecteur pRARE 2 (Novagen) .....	89
Les vecteurs pASK-G6PDH .....	89
le vecteur pGENI .....	89
<b>Méthodes relatives aux acides nucléiques .....</b>	<b>90</b>
Méthodes générales relatives à l'ADN .....	90
Amplification de l'ADN par PCR .....	90
Dosage des acides nucléiques.....	90
Electrophorèse en gel d'agarose .....	91
Séquençage.....	91
<b>Méthodes liées à l'ARN .....</b>	<b>91</b>
Extraction d'ARN totaux d'organes végétaux .....	91
Transcription inverse.....	92
PCR semi quantitative.....	92
PCR quantitative en temps réel.....	92
<b>Techniques relatives aux clonages.....</b>	<b>93</b>
Restriction de l'ADN .....	93
Purification des produits de restriction .....	93
Ligature .....	93
Transformation d' <i>E. coli</i> par électroporation.....	94
Préparation des cellules .....	94
Electroporation .....	94
Transformation d' <i>E. coli</i> par le DMSO.....	94
Traitement de compétence des cellules .....	94
Transformation .....	95
Criblage des transformants par PCR.....	95
Extraction et purification de l'ADN plasmidique bactérien.....	95
Construction du vecteur pGENI.....	95
Préparation de l'ADNc de 6PGDH1 .....	96
Clonage de la 6PGDH1 dans pGENI.....	97
Mutagenèse dirigée .....	97



<b>Technique liée à la caractérisation phénotypique des mutants d'insertion</b>	<b>98</b>
Test de germination.....	98
Dosage de la production diffusion du peroxyde d'hydrogène sur graines.....	98
Coloration <i>in situ</i> des anions superoxydes (O <sub>2</sub> <sup>-</sup> ) par le NBT.....	99
Détection de l'activité G6PDH <i>in situ</i> .....	99
<b>Techniques liées a l'analyse des protéines .....</b>	<b>100</b>
Méthodes biochimiques .....	100
Dosage des protéines.....	100
Electrophorèse en conditions dénaturantes (SDS-PAGE).....	100
Transfert des protéines sur membrane.....	101
Western-blot.....	101
Production des protéines recombinantes.....	101
Extraction des protéines recombinantes.....	102
Purification des protéines recombinantes.....	102
Test de phosphorylation <i>in vitro</i> .....	103
Mesure de l'activité G6PDH.....	103
Mesure de l'activité 6PGDH.....	103
Traitement d'oxydation et de réduction des protéines recombinantes.....	104
Concentration de demi-activation de G6PDH1.....	105
Inactivation des G6PDH par la DEPC.....	105
Dérivation au DTNB.....	106
Dérivation chimique des thiols avec l'acide 4-acetamido-4'-maleimidylstilbene-2,2'-disulfonique (AMS)	
.....	106
Détermination des masses apparentes de G6PDH1 réduite et oxydée par gel filtration.....	106
Détermination du potentiel redox du pont disulfure régulateur.....	106
Système Fd/ TRX reconstitué.....	107
Méthodes Biophysiques.....	108
Calorimétrie différentiel à balayage (DSC).....	108
Calorimétrie de titration isotherme (ITC).....	108
Dichroïsme circulaire (DC).....	109
Mesure d'interaction en résonance plasmonique de surface (SPR).....	109
Cristallisation de G6PDH1.....	110
<b>PUBLICATION .....</b>	<b>112</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....</b>	<b>119</b>
<b>ANNEXES .....</b>	<b>131</b>



## ABBREVIATIONS

### A

ADN	acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
Amp	ampicilline
APS	ammonium persulfate
ARN	acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
ATP	Adénosine TriPhosphate

### B

BCA	acide bicinchoninique
BET	bromure d'éthydiuim
BSA	albumine de sérum bovin

### D

DMSO	diméthyl sulfoxide
DO	densité optique
DTNB	acide 5,5' dithiobis-(2-nitrobenzoïque)
DTT	dithiothréitol

### E

ECL	Enhanced ChemiLuminescence
EDTA	acide éthylènediaminotétraacétique

### F

FBPase	fructose-1,6-bisphosphate phosphatase
Fd	ferrédoxine
FNR	ferrédoxine-NADP réductase
FTR	ferrédoxine-thiorédoxine réductase

### G

GAPDH	glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase
GPX	glutathion peroxydase
GR	glutathion réductase
GRX	glutarédoxine
GSH	glutathion réduit
GSSG	glutathion oxydé
GST	glutathion S-transférase

### I

IPTG	isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside
------	---

### L

LB	Luria Bertani
----	---------------

### M

MSR	Méthionine Sulfoxide Réductase
-----	--------------------------------

### N

NADP	Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate
NADP-MDH	NADP malate déshydrogénase
NTR	NADPH-Thiorédoxine Réductase
NTS	NADPH-Thiorédoxine Système

### P

p/v	poids/volume
PCD	Programmed Cell Death/mort cellulaire programmée
PCR	Polymerase Chain Reaction/réaction de polymérisation en chaîne
PDI	Protéine Disulfure Isomérase
PGM	PhosphoGluconMutase
PKA	Protéine Kinase A
PRK	phosphoribulokinase
PRX	peroxyrédoxine
PSI	photosystème I
PVDF	PolyVinylidène Fluorure

### R

RNAse	ribonucléase
RNR	ribonucléotide réductase
ROS	Reactive Oxygen Species/espèces réactives de l'oxygène
RT-PCR	Reverse Transcription - PCR
RU	Response Unit

### S

SBPase	sédoheptulose-1,7-bisphosphate phosphatase
SDS	Sodium Dodécyl Sulfate
SDS-PAGE	SDS - polyacrylamide gel electrophoresis

### T

TAE	Tris Acetate EDTA
TCA	acide trichloroacétique
TE	Tris EDTA
TEMED	N,N,N',N'-tétraméthyléthylènediamine
Tris	tris (hydroxyméthyl)-aminométhane
TRX	thiorédoxine

### V

v/v	volume /volume
-----	----------------



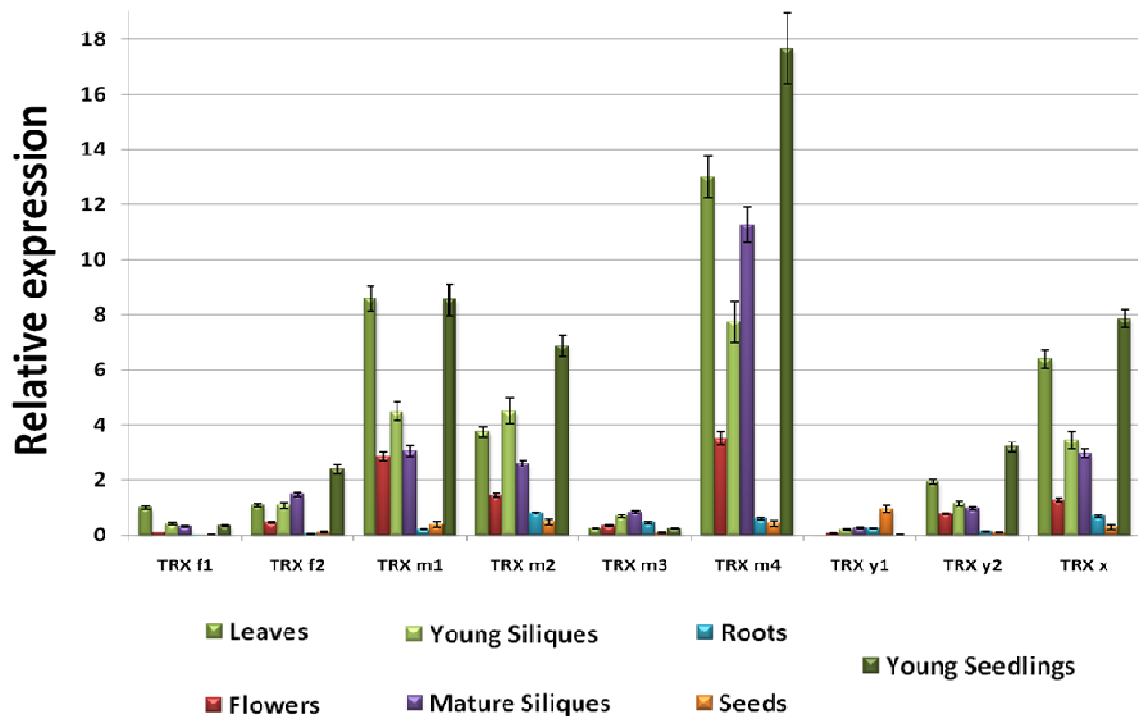
## **Note préalable à la lecture de ce manuscrit**

Pour la simplicité de lecture, les molécules : oxygène moléculaire, oxygène singulet, anion superoxyde, radical hydroxyle ainsi que les peroxydes variées (peroxyde d'hydrogène, peroxyde lipidique...) sont mentionnées dans ce manuscrit sous le terme générique de formes actives de l'oxygène en utilisant l'acronyme anglais ROS pour « Reactive Oxygen Species »





# **INTRODUCTION**



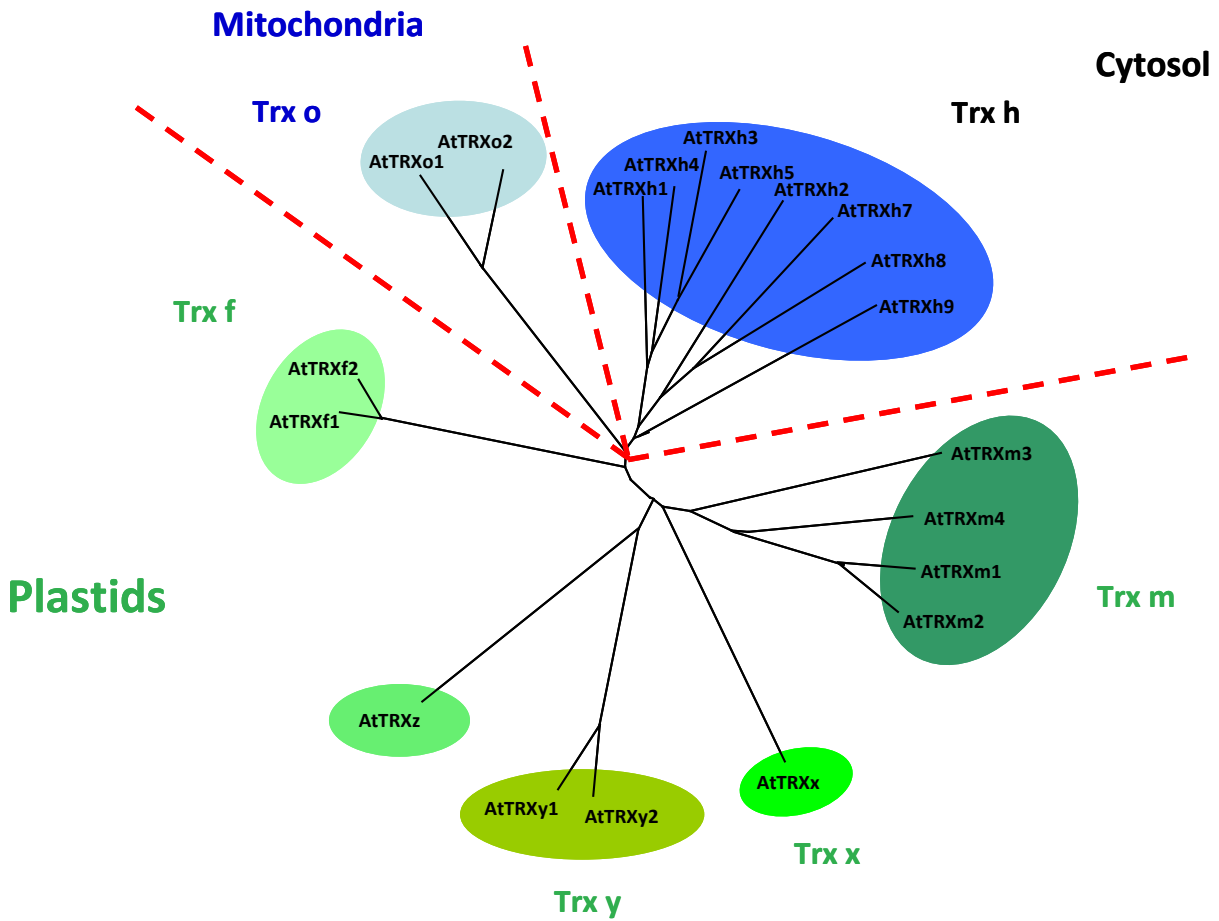
**Figure 8: Expression of plastidial TRXs in Arabidopsis tissues.** RT-qPCR analyses were performed in leaves, flowers, young and mature siliques, seedlings, roots and seeds. Data were normalized to the housekeeping protein phosphatase 2A gene (PP2A) and represented using the level of the TRX f1 transcripts in leaves as reference. Means  $\pm$  SD of triplicates experiments are shown. Reproduced from V. Massot thesis manuscript.

Qu'ils soient procaryotes ou eucaryotes, autotrophes ou hétérotrophes, les organismes vivants sont soumis à différentes contraintes environnementales et doivent s'adapter. Au niveau cellulaire, l'adaptation du métabolisme à des stimuli environnementaux fait intervenir des cascades de signalisation, dont les mieux connues sont les cascades de phosphorylation. La signalisation redox est une autre voie de signalisation qui est basée sur l'oxydoréduction de cystéines structurales ou catalytiques de protéines ou polypeptides. Les principales protéines impliquées dans cette voie de signalisation sont les protéines disulfures isomérases, les thiorédoxines, les glutarédoxines et les glutathion-S-transférases. Parmi ces protéines, les thiorédoxines sont les plus anciennement découvertes et les mieux caractérisées.

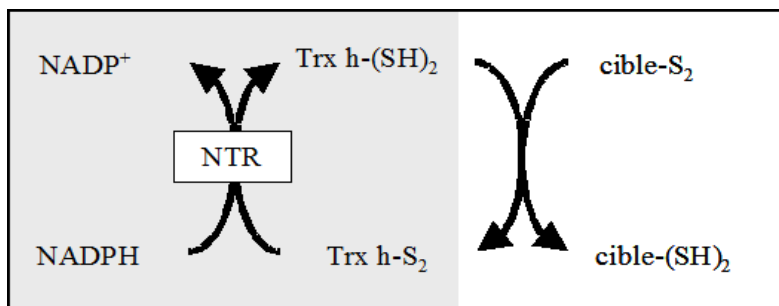
## **Les thiorédoxines (TRX)**

La première thiorédoxine (TRX) a initialement été identifiée chez la bactérie *Escherichia coli* comme étant l'enzyme responsable de la réduction de la ribonucléide réductase (Laurent et al., 1964). Depuis, la présence de ces protéines a été mise en évidence chez tous les organismes vivants libres (Holmgren, 1989).

Les thiorédoxines (TRX) sont de petites protéines d'environ 12 kDa qui possèdent une activité d'oxydoréductase de pont disulfure sur leurs protéines cibles (Cf. figure 1). Le site actif des TRX est composé de cinq résidus formant la séquence WCG/PPC. Cette séquence a été conservée au cours de l'évolution pour toutes les isoformes de TRX. Elle est considérée comme la signature des TRX. Les TRX sont capables de réduire, par une réaction séquentielle, les ponts disulfure de leurs protéines dites « cibles ». L'activité d'oxydoréductase de ces protéines est liée aux deux résidus cystéine vicinaux présents dans la séquence de leur site actif. La première cystéine de ce site actif est responsable de l'attaque nucléophile primaire du pont disulfure de la cible. Un pont disulfure intermoléculaire transitoire est formé entre la TRX et sa cible. Le complexe est ensuite dissocié grâce à l'attaque du disulfure mixte par la deuxième cystéine du site actif. Suite à cette réaction la cible est réduite et la TRX est oxydée (Cf. figure 2). Deux fonctions liées à l'activité oxydoréductase de ces protéines ont été mises en évidence. La première consiste à servir de substrat de réduction pour des peroxydases à thiols. L'autre fonction des TRX est de réguler l'activité enzymatique de leurs cibles.



**Figure 3: Phylogenetic tree of *Arabidopsis thaliana* Trx members.** Red dashes show different sub cellular compartments.



**Figure 4: The NADP dependent thioredoxin system (NTS).** The reduction of thioredoxin disulfide is achieved by the NADP thioredoxin reductase (NTR) that uses NADPH as electron donor.

Chez les organismes photosynthétiques, les TRX ont été initialement identifiées comme des activateurs à la lumière d'enzymes du cycle de Calvin (Buchanan et Wolosiuk, 1976 ; Homlgren et al., 1976).

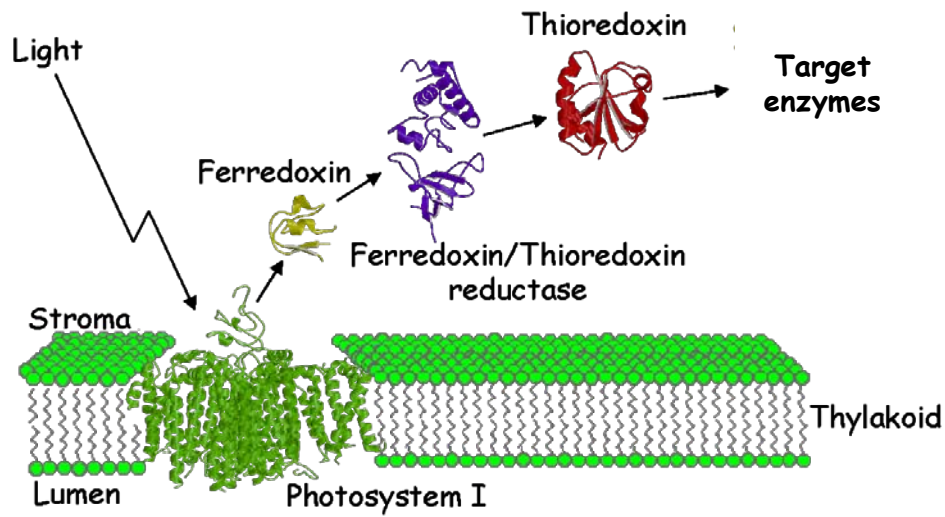
Le séquençage complet du génome *d'Arabidopsis thaliana*, a permis de mettre en évidence de nombreuses isoformes de TRX végétales, ce qui n'est pas le cas chez les mammifères où deux isoformes seulement sont présentes. Chez les végétaux, les TRX sont codées par le génome nucléaire et peuvent être regroupées en 7 types selon leur homologie de séquence et la structure des gènes qui les codent (Cf. figure 3). Deux isoformes sont localisées dans les mitochondries (TRX du type o), 8 dans le cytosol (TRX du type h) et 10 dans les plastes (TRX du type m : 4 isoformes, du type f : 2 isoformes, du type y : 2 isoformes du type x : 1 isoforme, du type z : 1 isoforme). La présence d'une multitude d'isoformes de TRX chez les végétaux supérieurs soulève la question d'une spécialisation ou d'une redondance fonctionnelle pour cette famille de protéines pour ce taxon. En plus de leur activité d'oxydoréductase, les TRX possèdent également une activité chaperon (Kern et al., 2003). Ce type d'activité a souvent été relaté pour des protéines de type disulfure isomérase (PDI) qui sont des protéines proches des TRX (Quan et al., 1995). Une activité chaperon a également été mise en évidence pour les TRX plastidiales du type f et m (Ruth Sanz-Barrio et al., 2011).

## **Système de réduction des TRX**

### **Le système NADP Thiorédoxine réductase**

Le premier système de réduction à avoir été découvert est le système NADPH/Thiorédoxine (NTS). Il s'agit du système de réduction des TRX des procaryotes, des eucaryotes non photosynthétiques et du cytoplasme (cytosol et mitochondries) des cellules végétales (Cf. figure 4). Au sein de ce système de réduction, une enzyme, la NADPH-thiorédoxine-réductase (NTR), peut transférer le pouvoir réducteur du NADPH aux TRX. La NTR est une flavoprotéine homodimérique dont chaque sous-unité a un domaine FAD, un domaine de liaison au NADPH et un domaine portant un pont disulfure redox actif. Trois types de NTR ont été distingués à ce jour.

Le premier type est une NTR dite de faible poids moléculaire avec une masse de 35kDa. Ce type de NTR est présent chez les procaryotes, les archaebactéries et les eucaryotes inférieurs. Lorsque le NADPH interagit avec son site de fixation, ce dernier effectue un



**Figure 5: The ferredoxin thioredoxin system (Fd/Trx).** Continuous electron flow provided by photosystem I allows the reduction of ferredoxin. Once reduced, ferredoxin can transfer electrons to ferredoxin thioredoxin reductase that in a final step allows the reduction of thioredoxin.

mouvement pour le rapprocher du domaine à FAD et permettre la réduction de ce cofacteur. Ce mouvement a également pour conséquence d'exposer une boucle portant le site redox actif permettant ainsi la fixation et la réduction de la TRX (Lennon et al., 2000).

Le deuxième type de NTR possède une masse moléculaire d'environ 55 kDa par sous-unité et est présent dans le cytosol et les mitochondries des eucaryotes supérieurs. En plus des trois domaines décrits ci-dessus, ce type de NTR possède un autre site redox actif contenant 2 cystéines (l'une pouvant être une sélénocystéine) vicinales. Ce deuxième site redox actif reçoit les électrons du premier, puis est extériorisé pour permettre la réduction de la TRX (Williams et al., 2000).

Enfin, il a été identifié plus récemment, un troisième type de NTR spécifique des chloroplastes de plantes supérieures, nommé NTRC. Cette NTR atypique correspond à une protéine avec un domaine NTR de haut poids moléculaire fusionné à une TRX (Serrato et al., 2002). Cette protéine correspond donc à une TRX avec un système de réduction de type NTR intégré. Il a été montré que la NTRC était un système de réduction efficace pour la peroxyrédoxine à 2 cystéines plastidiale (2Cys-PRX) et que celle-ci était impliquée dans les mécanismes de réponse au stress oxydatif (Perez-Ruiz et al., 2006 ; Moon et al., 2006 ; Spinola et al., 2008 ; Stenbaek et al., 2008).

### Le système ferrédoxine thiorédoxine des organismes photosynthétiques

Chez les organismes photosynthétiques, un autre système de réduction des TRX est présent. Il s'agit du système ferrédoxine thiorédoxine (Fd/TRX). Ce système est présent chez les cyanobactéries et les chloroplastes des végétaux. Il utilise comme source de pouvoir réducteur les électrons de la chaîne de transfert photosynthétique (Cf. figure 5). Le pouvoir réducteur de cette chaîne de transfert est transmis du photosystème I (PSI) à la ferrédoxine. Cette dernière transmet le pouvoir réducteur aux TRX grâce à la ferrédoxine TRX réductase (FTR).

#### *La ferrédoxine (Fd)*

La ferrédoxine des végétaux supérieurs est une petite protéine stromatique à centre fer-soufre 2Fe-2S. Ce centre fer-soufre est lié à la protéine par l'intermédiaire de 4 cystéines très conservées chez toutes les espèces de ce phylum. Cette protéine accepte les électrons du PSI pour réduire ensuite un grand nombre de protéines dont la ferrédoxine NADP réductase (FNR), la nitrite réductase, la glutamate synthase ferrédoxine dépendante, la sulfite réductase, et bien sûr la FTR. Cette protéine est considérée comme un carrefour de redistribution des





électrons à partir du PSI. Chez la plante modèle *Arabidopsis thaliana*, il existe 4 isoformes de Fd. Les Fd 1 et 2 sont exprimées dans les feuilles tandis que les Fd 3 et 4 sont exprimées dans les organes non photosynthétiques comme les racines.

#### La ferrédoxine thiorédoxine réductase (FTR)

La ferrédoxine thiorédoxine réductase, (FTR) est un hétérodimère en forme de disque composé d'une sous-unité catalytique (sous-unité B), de 12-13 kDa (Chow et al., 1995) et d'une sous-unité régulatrice (sous-unité A) de taille variable entre les espèces (8-13 kDa) (Iwadate et al., 1994). La sous-unité A est peu conservée, elle est indispensable pour la stabilité de la sous-unité catalytique et la bonne interaction avec la ferrédoxine (Gaymard et al 2000 ; Hishiya et al., 2008). La sous-unité catalytique porte un centre fer-soufre 4Fe 4S et un pont disulfure. Le centre fer-soufre est lié par 4 cystéines et localisé sur une des faces du disque tandis que le pont disulfure permettant la réduction des TRX est localisé sur l'autre face (Glauser et al., 2004 ; Dai et al., 2007). Cette conformation confère à la FTR la capacité de recevoir les électrons de la ferrédoxine et de les transférer immédiatement aux TRX.

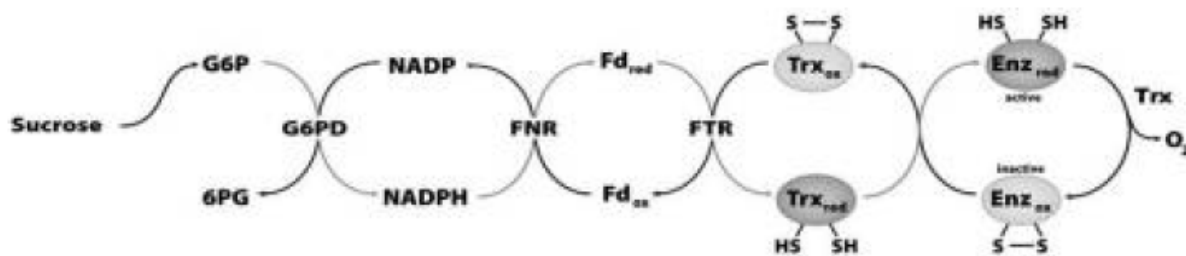
#### Importance du système ferrédoxine thiorédoxine pour la coordination lumineuse des métabolismes chez les organismes photosynthétiques

Le système Fd /TRX assure dans les chloroplastes à la lumière une réduction efficace des TRX. Cette réduction lumino-dépendante permet la régulation de l'activité des métabolismes photosynthétiques en fonction de l'intensité lumineuse via l'activation par réduction d'enzymes redox régulées comme certaines enzymes du cycle de Calvin (Buchanan et Wolosiuk, 1976 ; Holmgren et al., 1976).

Ce système permet également d'assurer la transition métabolique jour/nuit des plastes photosynthétiques. En effet, contrairement aux enzymes du cycle de Calvin, la réduction lumineuse des TRX conduit à l'inactivation de la première étape du cycle de pentoses phosphate (Scheibe et Anderson, 1981) évitant ainsi le fonctionnement concomitant d'une voie de synthèse (Cycle de Calvin) et de dégradation de squelettes carbonés (Cycle oxydatif des pentoses phosphate).

#### Réduction des thiorédoxines dans les plastes non photosynthétiques

Initialement, le système de réduction Fd/TRX était considéré comme uniquement présent dans les chloroplastes car dépendant de la fourniture en pouvoir réducteur du PSI.



**Figure 6: Reduction of plastidial thioredoxins under non-photosynthetic condition.**

Sucrose from starch degradation or import from leaves by sink tissues is broken down to glucose-6-phosphate, generating NADPH via glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) and 6 phosphogluconate dehydrogenase. The NADPH is used to reduce Trx via ferredoxin:NADP reductase (FNR), ferredoxin (Fd), and FTR, similar to the mechanism identified in cyanobacterial heterocysts. Once reduced, Trx activates target enzymes as in chloroplasts. Reproduced from Balmer et al., 2006.

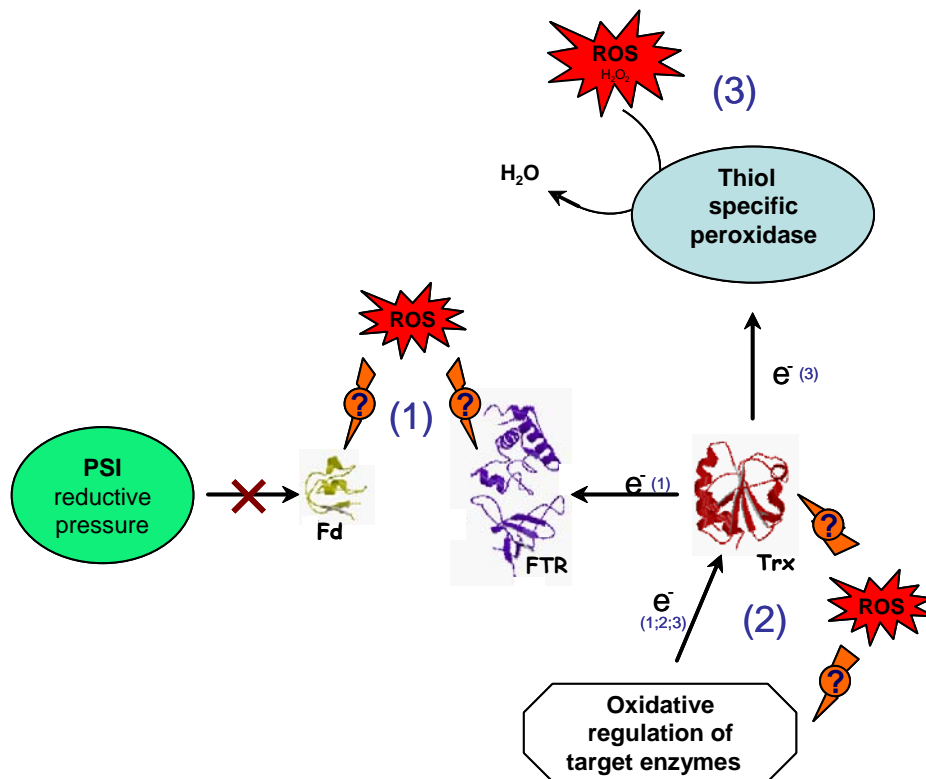
Plus récemment, des études protéomiques ont mis en évidence la présence d'isoformes de FNR, de ferrédoxine et de FTR dans des amyloplastes d'albumen de blé permettant ainsi de proposer un système de réduction des TRX de type Fd/TRX dans des plastes non photosynthétiques. Au sein de ce système, la ferrédoxine est réduite d'une façon alternative à la réduction par la lumière grâce à la production métabolique de NADPH. L'augmentation du ratio NADPH/NADP<sup>+</sup> liée à l'activité enzymatique de deux déshydrogénases du cycle des pentoses phosphate (la glucose 6-phosphate déshydrogénase et la phosphogluconate déshydrogénase) permettrait la réduction de la ferrédoxine via la FNR. Une fois réduite, la ferrédoxine permettrait le fonctionnement du système Fd/FTR comme dans les chloroplastes, aboutissant à la réduction des TRX (Cf. figure 6).

### **Système d'oxydation des TRX**

Dans les chloroplastes à l'obscurité, l'oxydation des enzymes redox régulées du métabolisme photosynthétique conduit à l'inhibition de leur activité (Schürmann et Buchanan, 2008). Cependant, les mécanismes par lesquels ces enzymes s'oxydent sont mal connus.

Des études ont montré que, même en condition anaérobie, le maintien de l'état réduit de la ferrédoxine est critique pour conserver l'activité de la FBPase (Leegood et Walker, 1980). L'ajout d'oxydant ou l'exposition du système Fd/TRX à l'oxygène ambiant conduit également à une diminution de l'activité redox dépendante de cette cible (Schürmann et Buchanan, 2008). Ces résultats suggèrent que le maintien constant à l'état réduit de l'ensemble des composants du système Fd/TRX est essentiel pour conserver l'activité redox dépendante des enzymes du cycle de Calvin. Lorsque la « pression de réduction » exercée par le PSI sur les composants du système Fd/TRX s'arrête, les constituants du système deviennent particulièrement sensibles à l'oxydation. La sensibilité élevée des enzymes à centre fer-soufre vis-à-vis des formes actives de l'oxygène a souvent été constatée. L'oxydation rapide du centre fer-soufre de la ferrédoxine pourrait conduire à un fonctionnement inversé du système Fd/TRX, conduisant ainsi à l'oxydation des TRX et de leurs cibles.

Par ailleurs, il est notoirement connu, d'après la littérature, que dans un tampon à pH physiologique et en l'absence de réducteur chimique (par exemple le DTT), les préparations de TRX recombinantes se trouvent dans un état majoritairement oxydé. Cette constatation suggère une oxydation spontanée du site catalytique par l'oxygène dissous.



**Figure 7: Schematic representation of hypothesis by which thioredoxin becomes oxidized.** (1) When the PSI electron flow is stopped, the iron sulphur cluster enzymes become highly susceptible to ROS oxidation allowing the reversion of the electron flow within the Fd/Trx system. (2) ROS directly trigger Trx and/or target reactive cysteines and allow the formation of the intra molecular disulfide bond. (3) Reduced thioredoxins are oxidized by thiol specific peroxidases for ROS and peculiarly H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> scavenging. Numbers following the electron refer to the corresponding scenario. Question marks remind that the direct action of ROS on iron sulphur cluster enzymes and on targets or Trx exposed cysteines remain uncertain *in vivo*.

Cependant, aucune donnée précise concernant une oxydation directe du site actif des TRX en pont disulfure par les formes actives de l'oxygène n'est disponible dans la littérature. Une oxydation directe par les formes actives de l'oxygène de thiols réactifs et exposés à la surface a été rapportée pour de nombreuses protéines cependant lorsque cette réaction non catalysée est possible, elle semble de faible efficacité comparée à la réactivité de thiol-peroxydases avec le peroxyde hydrogène (Flohé, 2010).

Ainsi *in vivo*, l'hypothèse la plus probable serait celle d'un mécanisme lié à l'activité de peroxydases chloroplastiques utilisant les TRX comme substrat de réduction. Ce mécanisme permettrait de catalyser rapidement l'oxydation du site actif des TRX plastidiales, et contribuerait au réajustement du métabolisme redox régulé dans les plastes. Un schéma reprenant les différentes hypothèses est proposé en figure 7.

## **Les thiorédoxines et leurs homologues structuraux des plastes d'*Arabidopsis thaliana***

### TRX du type f

Chez *A. thaliana* il existe deux isoformes de TRX f : f1 et f2. Ces thiorédoxines ont été les premières isolées chez les végétaux avec les thiorédoxines de type m. Elles possèdent dans leur partie C-terminale une troisième cystéine (Cys 60). Il a été montré que la glutathionylation (pont disulfure mixte entre une molécule de glutathion et une protéine) de cette troisième cystéine, réduisait la capacité de ces isoformes à être réduites *in vitro* par leur réductase en amont (Michelet et al., 2005 ; 2006). Ces thiorédoxines de type f sont connues pour réguler l'activité de certaines enzymes du cycle de Calvin, avec une spécificité stricte pour certaines d'entre elles (voir plus loin). Le pont disulfure du site actif de ce type de thiorédoxines du type f est d'environ -351 mV à pH 7,9 (Hirasawa et al., 1999).

### TRX du type m

Chez *A. thaliana*, il existe quatre isoformes de TRX du type m (Meyer et al., 2005). Elles ont une origine procaryote à la différence des thiorédoxines de type f. Ces thiorédoxines sont souvent considérées comme thiorédoxines de type bactérien à cause de leur forte homologie avec la thiorédoxine d'*E. coli*, ainsi que par leur possibilité de substituer cette dernière dans des tests *in vitro*. Des analyses protéomiques ont montré que ces isoformes étaient associées à la surface des thylacoïdes au contact du stroma (Pelletier et Lucy, 2002 ; Friso et al., 2004). Parmi ce type de TRX, l'isoforme m3 se distingue des autres TRX m. Elle



possède une cystéine additionnelle dans sa région N-terminale et beaucoup de charges positives à proximité de son site actif (Collin et al., 2003). Aucune cible pour cette isoforme n'a été mise en évidence avant le début de ma thèse. Le potentiel redox du pont disulfure du site actif pour les thiorédoxines du type m est compris entre -368 et -357 mV à pH 7,9 (Collin et al., 2003).

### TRX du type y

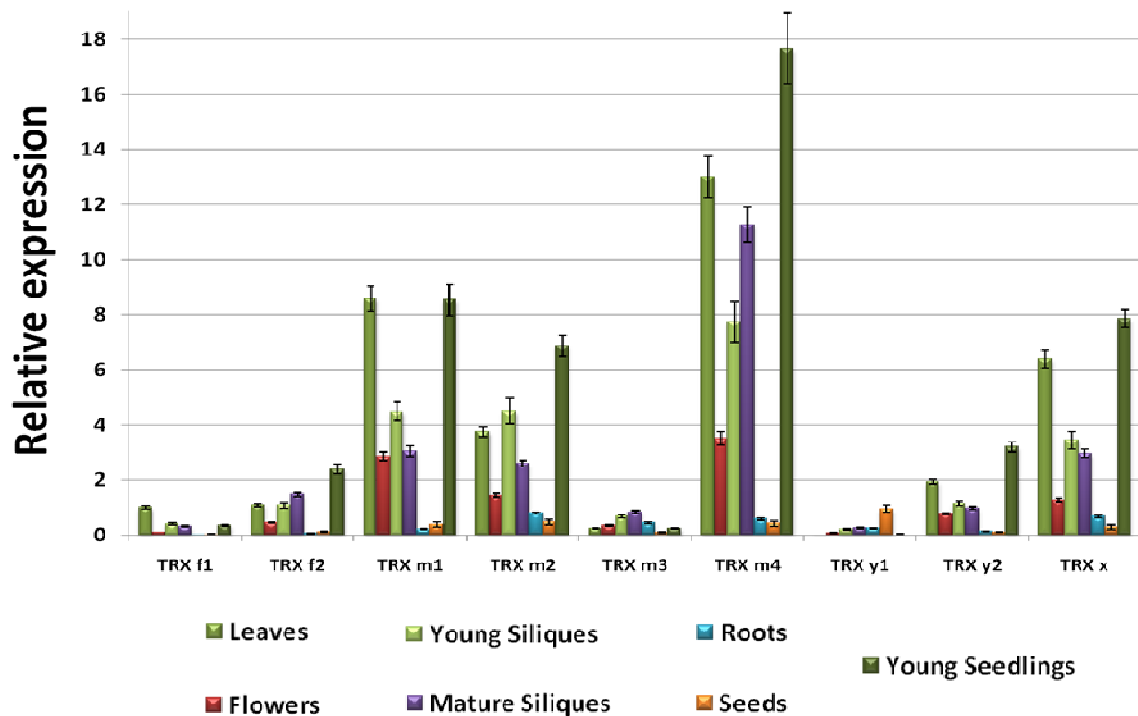
Le type y a été plus récemment identifié grâce au séquençage complet du génome d'*Arabidopsis*. Chez cette espèce, il existe deux isoformes pour ce type de thiorédoxines, nommées y1 et y2. Ces thiorédoxines semblent être plus impliquées dans la réponse au stress oxydant que dans la régulation de voies métaboliques, contrairement au type m et f. Le potentiel redox du pont disulfure du site actif pour ces thiorédoxines, d'environ -330 mV à pH 7,9, est moins négatif que celui des thiorédoxines du type m et f (Collin et al., 2004). L'isoforme y1 possède dans sa partie C-terminale une cystéine additionnelle conservée, comme la thiorédoxine f. Par homologie avec l'isoforme f1, cette cystéine additionnelle est supposée être soumise à des modifications post-traductionnelles de type glutathionylation.

### TRX du type x

Le génome d'*A. thaliana* code pour une seule isoforme de thiorédoxine de type x dont les transcrits sont accumulés dans les organes verts (Mestres-Ortega et Meyer, 1999). Comme pour le type y, cette thiorédoxine est un régulateur peu efficace d'enzymes du métabolisme carboné et semble plus impliquée dans la lutte contre les stress oxydants. A pH 7,9, le potentiel redox du pont disulfure de son site actif est de -336 mV (Collin et al., 2003).

### TRX du type z

Très récemment, un nouveau type de thiorédoxine adressé aux plastes, nommé type z, a été identifié. Peu de choses sont connues sur les fonctions de ce nouveau type de thiorédoxine. Cependant, il semble que cette thiorédoxine soit impliquée dans la réponse aux attaques pathogènes (Rivas et al., 2004) et dans la régulation d'une polymérase plastidiale, la Plastid Encoded mRNA Polymerase (Arsova et al., 2010). A pH 7,9 le pont disulfure de cette isoforme est de -310 mV (Chibani et al., 2011).



**Figure 8: Expression of plastidial TRXs in Arabidopsis tissues.** RT-qPCR analyses were performed in leaves, flowers, young and mature siliques, seedlings, roots and seeds. Data were normalized to the housekeeping protein phosphatase 2A gene (PP2A) and represented using the level of the TRX f1 transcripts in leaves as reference. Means  $\pm$  SD of triplicates experiments are shown. Reproduced from V. Massot thesis manuscript.



## Les glutarédoxines (GRX)

Les glutarédoxines sont des homologues structuraux des thiorédoxines identifiées initialement en tant que donneurs alternatifs d'électrons à la ribonucléotide réductase d'*E. coli* (Holmgren, 1976). Chez *Arabidopsis*, il existe 31 isoformes de GRX, (réparties en 3 types : CPYC ; CC et CGFS) dont 4 seraient potentiellement adressées aux plastes. Leur potentiel redox est moins négatif que celui des thiorédoxines et est généralement compris entre -250 et -280 mV à pH 7,9. Ces protéines sont impliquées dans la réduction de ponts disulfures ou dans la déglutathionylation de leurs protéines cibles. Chez les végétaux, le type CC est connu pour protéger les cellules de dégât oxydatif (Hirschi et al., 2006) tandis que le type CGFS est impliqué entre autre dans le transfert du centre fer souffre à l'apoferrédoxine (Bandyopadhyay et al 2008) et le développement floral (Li et al., 2009)

## Expression de thiorédoxines plastidiales d'*Arabidopsis thaliana*

Les informations disponibles dans les bases de données de puces ADN, ainsi que de nombreuses autres études transcriptomiques, montrent que les TRX plastidiales sont exprimées de manières différentes selon les tissus. L'expression spécifique des différentes TRX plastidiales a été étudiée en détail au laboratoire (Thèse V. Massot). Les résultats (Cf. figure 8) montrent que la présence de transcrits pour 9 isoformes plastidiales est détectée dans tous les organes de la plante. Globalement, les gènes codant les TRX du type m (à l'exception de m3) et x sont les plus abondamment exprimés dans les feuilles et les jeunes plantules. En accord avec une précédente étude (Mestres-Ortega et Meyer, 1999), l'ARN de la thiorédoxine m3 est faiblement exprimé dans tous les organes, à l'exception des boutons floraux. Ces résultats précisent également la très forte expression de l'isoforme y1 par rapport aux autres TRX plastidiales dans les graines (Collin et al., 2004).

## Les cibles des thiorédoxines

Parmi les nombreuses cibles des thiorédoxines plastidiales mises en évidence au cours des décennies passées, plusieurs sont impliquées dans le métabolisme photosynthétique. C'est d'ailleurs dans la fonction de régulateur d'enzyme du cycle de Calvin que les TRX plastidiales ont été la première fois identifiées (Buchanan et Wolosiuk, 1976 ; Holmgren et al., 1977). Aujourd'hui, grâce aux avancées en génomique et en protéomique, plus de 300 nouvelles cibles potentielles de TRX ont été identifiées (Buchanan et Balmer, 2005 ; Hisabori et al., 2005 ; Michelet et al., 2006). La découverte de ces 300 cibles potentielles indique que



les TRX jouent un rôle généralisé dans la régulation du métabolisme des organismes végétaux. Pour les TRX chloroplastiques, plus de 100 cibles potentielles ont été identifiées à ce jour (Lemaire et al., 2007 ; Marchand et al., 2010).

### Les cibles de TRX plastidiales impliquées dans le métabolisme photosynthétique

Les premières cibles de TRX plastidiales ont été découvertes par des approches biochimiques, il s'agit de la fructose-1,6-bisphosphatase (FBPase) et de la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH). Par la suite, des approches protéomiques utilisant le principe des colonnes d'affinité de thiorédoxines monocystéïniques ont permis d'identifier d'autres cibles, impliquées dans le métabolisme carboné photosynthétique, telles que la sedoheptulose-1,7-bisphosphatase (SBPase), la phosphoribulokinase (PRK) ou la rubisco activase. Ces cibles de TRX sont activées à la lumière par réduction via l'activation du système Fd/TRX.

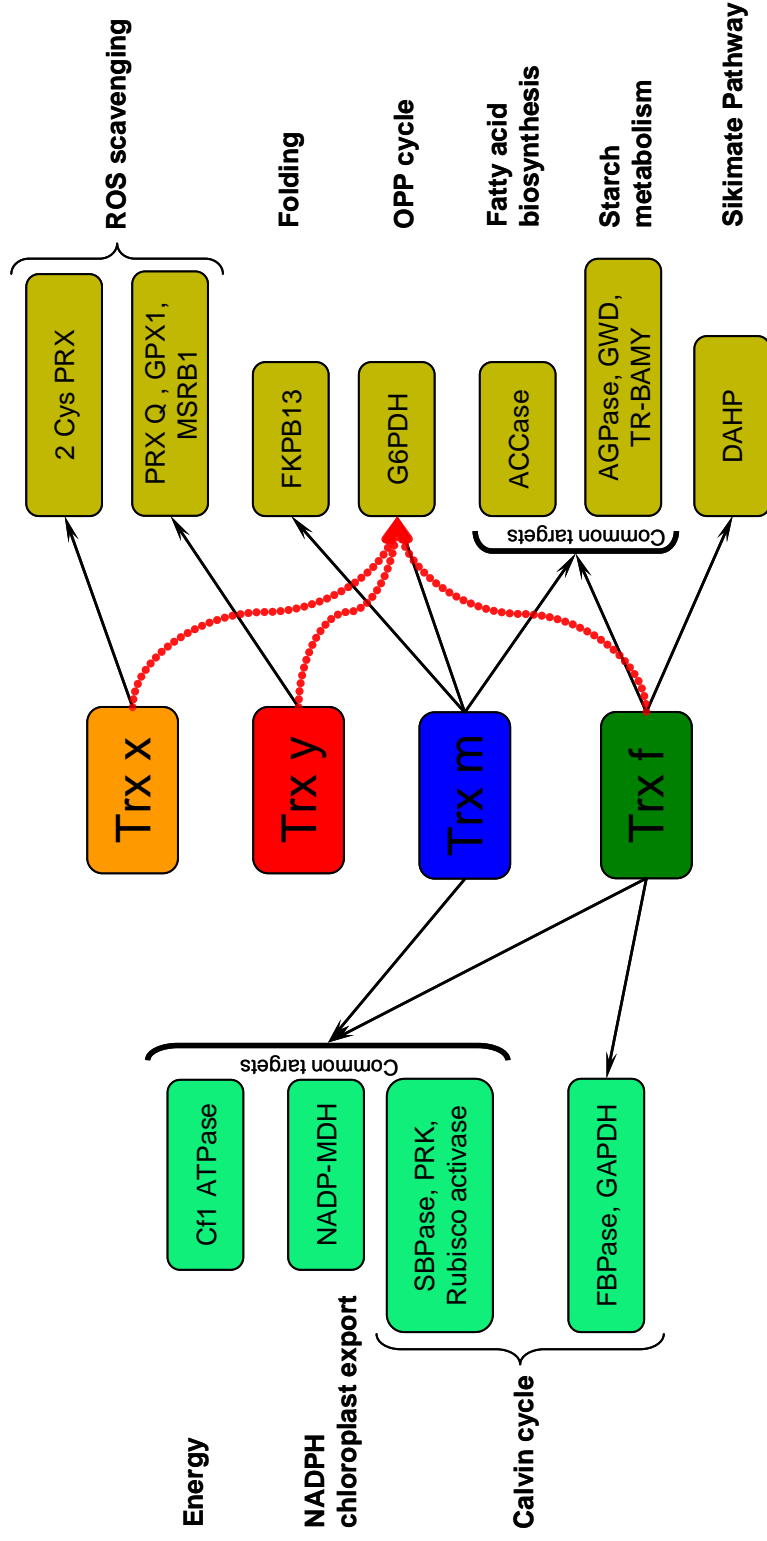
En plus de nombreuses enzymes du cycle de Calvin, d'autres cibles des TRX ont été identifiées comme la sous-unité CF1 du complexe ATPase chloroplastique, la malate déshydrogénase (MDH) à NADP qui permet l'export de pouvoir réducteur à partir du chloroplaste vers le cytosol sous forme de malate, ainsi que des protéines impliquées dans le transfert photosynthétique d'électrons comme la sous-unité de l'antenne collectrice LHCIIB (Lemaire et al., 2007).

### Les cibles de TRX plastidiales impliquées dans le métabolisme non photosynthétique

En plus des cibles de TRX impliquées dans le métabolisme photosynthétique, les approches biochimiques et protéomiques ont révélé des cibles plastidiales validées ou putatives impliquées dans des fonctions biologiques variées du métabolisme primaire et secondaire dont entre autres, le métabolisme de l'amidon, la biosynthèse des lipides, et les systèmes antioxydants, notamment des peroxydases à thiols. La fonction des TRX plastidiales en tant que substrat de réduction pour la peroxyrédoxine à 2 cystéïnes (2 Cys-Prx), la peroxyrédoxine Q (PRX Q) et la glutathion peroxydase 1 (GPX1) a été depuis confirmé par la biochimie (Colin et al., 2003 ; Colin et al., 2004 ; Navrot et al., 2006).

Il est également intéressant de noter que les études biochimiques et protéomiques ont permis d'identifier les deux déshydrogénases du cycle oxydatif des pentoses phosphate, la glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PDH) et la 6-phosphogluconate déshydrogénase (6PGDH) comme cibles non photosynthétiques des TRX plastidiales. Alors que la G6PDH est

Photosynthetic related metabolism      Non photosynthetic metabolism



**Figure 9: Currently known network of thioresdoxin specificities.** Black arrows indicate the ability of the target to be trapped on monocysteine TRX mutant or to be regulated *in vitro* by the corresponding TRX isoform. Red dashed arrows address the question of specificities answered in this work.

une cible connue des TRX chez la pomme de terre (Wenderoth et al., 1997), la 6-phosphogluconate déshydrogénase reste une cible putative (Balmer et al., 2003).

Ces deux déshydrogénases du cycle oxydatif des pentoses phosphate font l'objet du chapitre détaillé ci-après et représentent les deux principales cibles de TRX que j'ai étudiées au cours de ma thèse.

### **Spécificités des TRX pour leurs cibles**

Il est connu que la multitude d'isoformes de TRX, qui est une originalité des végétaux supérieurs, semble liée à une spécialisation fonctionnelle de ces protéines au sein de ce phylum. En effet, les différentes TRX présentent des réactivités contrastées vis-à-vis de leurs cibles (Cf. figure 9).

Parmi les cibles photosynthétiques, les thiorédoxines du type f sont des régulateurs stricts de plusieurs enzymes du cycle de Calvin, telles que la FBPase, la GAPDH, ainsi que de la 3-deoxy-7-phosphoheptulonate (DAHP) synthase. Les autres TRX plastidiales ne sont pas capables d'activer par réduction ces enzymes *in vitro*.

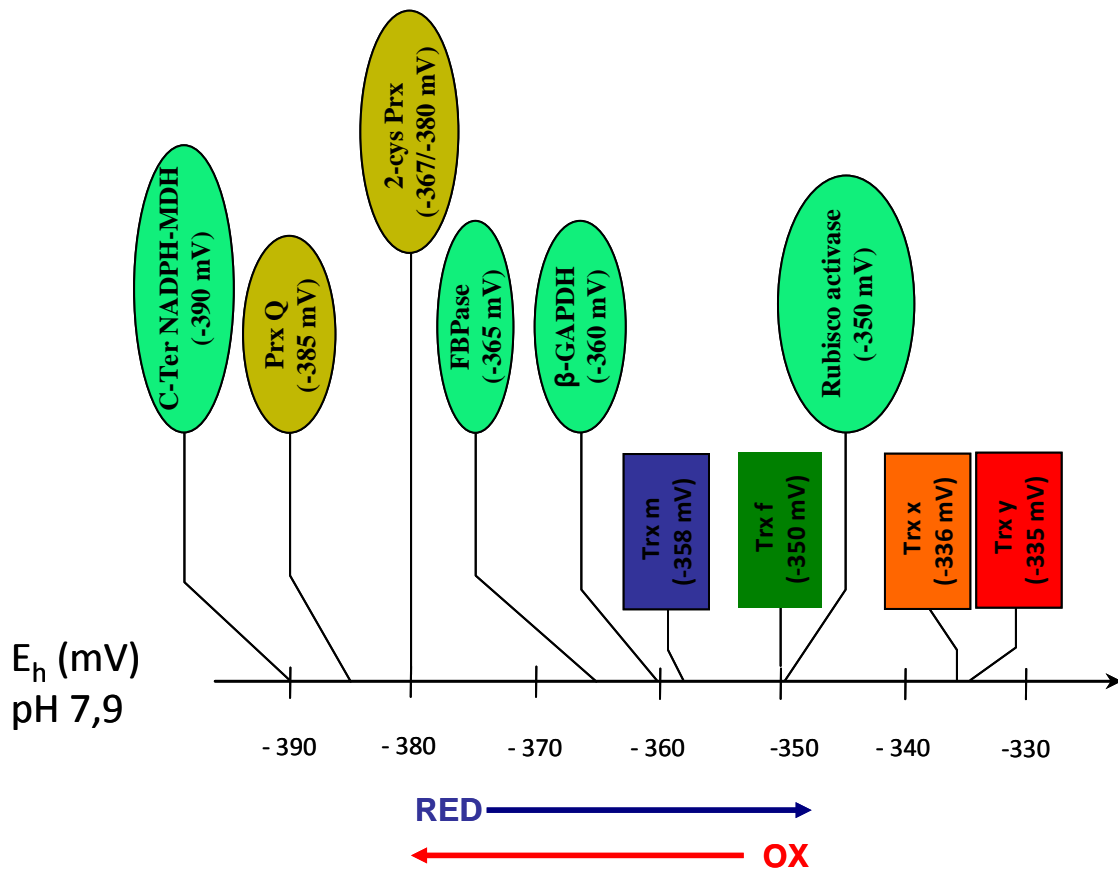
Les TRX du type f activent aussi très efficacement la MDH à NADP. Dans une moindre mesure, les thiorédoxines du type m (à l'exception de m3) sont également capables de réguler la MDH à NADP. Les deux types de TRX semblent donc redondants dans cette fonction.

Au sein des cibles non photosynthétiques, certaines spécificités ont également été observées. Ainsi, le type m régulerait spécifiquement une immunophiline localisée dans le lumen, FKBP13 (Buchanan et Luan, 2005).

Par contre, les cibles de TRX impliquées dans les systèmes antioxydants sont préférentiellement réduites par les types x et y. La peroxyrédoxine à 2 cystéines est préférentiellement réduite par la TRX du type x (Collin et al., 2003) tandis que d'autres peroxydases plastidiales, comme la peroxyrédoxine Q et la glutathion peroxydase 1, sont préférentiellement réduites par les TRX du type y (Collin et al., 2004 ; Navrot et al., 2006). Ce dernier type de TRX est également très efficace dans la réduction d'un type de méthionine sulfoxyde réductase B : la MSR B1 (Viera Dos Santos et al., 2007).

En revanche, les types de TRX x et y semblent incapables de réguler les enzymes du métabolisme carboné.

La spécificité de régulation des G6PDH plastidiales, initialement attribuée au type m pour les isoformes chloroplastiques (Wenderoth et al., 1997) et aux types m et f pour les



**Figure 10: Redox scale of plastidial thioredoxins and of several of their targets.** The redox potentials value are extracted from references given in the text and have been normalized at pH 7.9 assuming a slope of  $E_m$  vs. pH of  $-59$  mV/pH unit

isoformes présentes dans les plastes non photosynthétiques (Wendt et al., 2000) était mal établie au début de ma thèse. Ceci était dû au fait que les études de régulation par les TRX sur cette enzyme (initialement entreprises sur une isoforme recombinante de pomme de terre non purifiée) avaient été réalisées dans des systèmes hétérologues, avant la découverte des isoformes du type x et y.

### **Nature de la spécificité TRX cible**

La réactivité particulière de certaines TRX vis-à-vis de leur cible et la spécificité de régulation stricte de certaines enzymes du cycle de Calvin par le type f soulève la question des déterminants moléculaires conduisant à des régulations spécifiques.

Des données disponibles dans la littérature concernant le potentiel redox des ponts disulfure régulateurs des cibles de TRX expliquent, dans certains cas, une partie des spécificités observées (Cf. figure 10). Par exemple le potentiel redox très négatif (-390 mV à pH 7,9) du pont disulfure régulateur C-terminal de la MDH NADP (Hirasawa et al., 2000) peut expliquer l'incapacité des TRX les moins négatives (type x et y) à activer par réduction cette cible, tandis que le potentiel redox des TRX du type m et f est thermodynamiquement plus favorable au transfert d'électrons. La même conclusion peut être formulée quant à la très faible capacité des TRX des types x et y à réduire le pont disulfure régulateur de enzymes du cycle de Calvin dont le potentiel redox est compris entre -365 et -350 mV à pH 7,9. En revanche, la faible différence entre le potentiel redox des TRX du type m et f ne peut pas expliquer la spécificité des régulations des enzymes du cycle de Calvin par le type f.

Etonnamment, les potentiels redox du site catalytique des peroxyrédoxines chloroplastiques (PRX Q et 2 Cys PRX) sont très négatifs : respectivement -385 et -375 mV à pH 7,9 pour la PRX Q et la PRX à 2 -Cys (Rouhier et al., 2004 ; Horling et al., 2003). Pourtant ces cibles sont préférentiellement réduites par les types de TRX les moins négatifs. Contrairement aux cibles du métabolisme carboné pour lesquelles les TRX servent de régulateur post traductionnel, la régénération des cibles antioxydantes implique une nouvelle interaction avec les TRX réduites après chaque cycle catalytique. Une étude sur un système TRX-PRX similaire localisé dans la mitochondrie a mis en évidence, par titration microcalorimétrique ITC, la formation d'un complexe de très forte affinité ( $K_d = 126 \text{ pM}$ ) entre la Peroxyrédoxine II F et son substrat de réduction, la TRX o (Barranco-Medina et al., 2008). La formation de ce complexe est dépendante d'un état redox antagoniste entre les 2 partenaires, et de la présence des cystéines catalytiques de la PRX.





Les TRX plastidiales du type x et y ne sont pas capables d'interagir avec cette cible mitochondriale.

Ainsi, dans ce contexte précis où les TRX servent de substrat de réduction, l'interaction (affinité et/ou bonne orientation pour la réduction du pont disulfure cible) TRX-Cible apparaît comme le facteur déterminant de la spécificité. *A contrario*, dans le contexte où la TRX agit comme régulateur, le déterminant moléculaire de l'interaction protéine-protéine avec la cible reste à élucider malgré la présence, dans la littérature, d'études d'interaction utilisant des formes mutées de TRX (Brandes et al., 1993 ; Geck et al., 1996)

### **Phénotype des mutants pertes de fonction pour les TRX**

Au cours des dernières décennies, le développement et l'enrichissement de banques de mutants d'insertion T-DNA (SALK) ont permis d'isoler chez *Arabidopsis* plusieurs lignées mutantes pour les TRX. En condition de culture normale, aucun des mutants TRX ne montre de phénotype apparent. Ceci est probablement dû au caractère multi-génique de cette famille de protéines permettant *in vivo* la compensation des isoformes mutées (Meyer et al., 2005). Une seule exception a été récemment décrite dans la littérature. En effet, le mutant d'insertion pour la TRX z présente un fort phénotype albinos et un développement des chloroplastes perturbé (Arsova et al., 2010).

Des études plus approfondies de mutants d'insertion pour les TRX ont également révélé que le mutant pour l'isoforme de thiorédoxine m3 est perturbé dans des aspects développementaux dans le trafic intercellulaire de protéines au niveau des méristèmes (Benitez-Alfonso et al., 2009).

Des lignées ARNi d'autres espèces (orthologue de m4 chez le riz) présentent des chloroplastes anormaux et une inhibition de la croissance (Chi et al., 2008).

Ainsi l'étude approfondie de mutants d'insertion dans des voies métaboliques précises permet de révéler *in planta* des fonctions physiologiques pour les TRX.

La forte expression presque exclusive de l'isoforme y1 parmi les TRX plastidiales dans les graines d'*Arabidopsis* suggérée par des études précédentes, laisse penser que cette isoforme pourrait jouer un rôle important dans la physiologie de cet organe (Collin et al., 2004 ; thèse V Massot). Des lignées mutantes pour ce type de TRX sont disponibles, et la caractérisation de la germination pour ces géotypes fait l'objet d'une partie de ce travail.



## **Les TRX dans la physiologie des semences**

La graine est dans le cycle biologique des spermaphytes le stade vital qui assure la pérennité de l'espèce et favorise la dissémination. Elle se caractérise dans la plupart des cas (semences orthodoxes) par un état déshydraté et quiescent et a besoin de conditions favorables pour pouvoir germer.

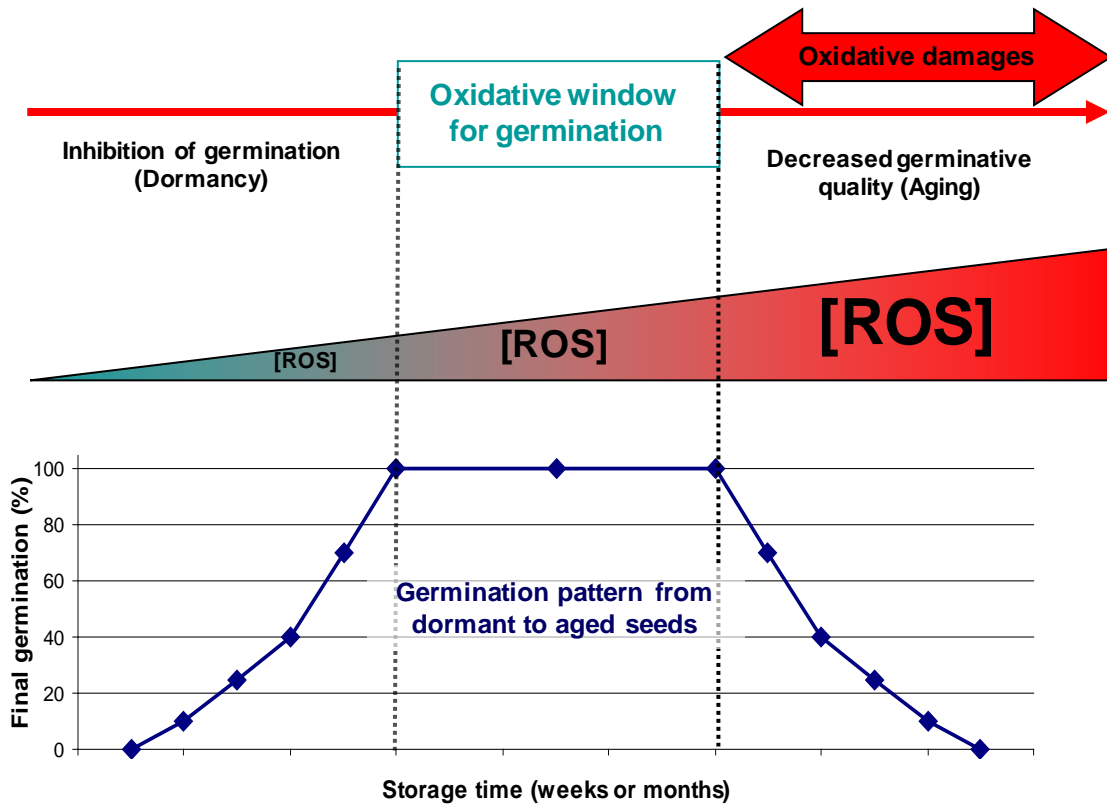
La germination, au sens strict, correspond à l'ensemble des processus qui vont de la prise d'eau par la graine, jusqu'à la percée des téguments par la radicule. Elle peut être décrite en deux phases :

- une hydratation dite passive qui a aussi lieu dans les graines mortes suivie par une reprise de l'activité respiratoire et du métabolisme de base.
- lorsque débute quand le niveau d'hydratation est supérieur à 60% de la masse fraîche, la prise en eau ralentit et de nouveaux mécanismes physiologiques sont activés, tels que l'accumulation de solutés osmotiques et l'activation des ATPases. Ces modifications permettent de préparer l'élongation de la radicule ainsi que l'ouverture des téguments et la fragilisation de l'albumen. Les TRX h sont abondantes dans les graines de beaucoup d'espèces et celles-ci sont impliquées dans plusieurs événements associés à la germination, notamment l'activation de protéase et la réduction des protéines de réserve permettant leur remobilisation et (Kobrehel et al., 1992 ; Yano et al., 2001 ; Marx et al., 2003).

La percée de la radicule signe la fin de la germination. Elle est alors suivie d'une phase de croissance permettant à la plantule de s'installer dans son substrat. La germination est dépendante des facteurs environnementaux (température, taux d'humidité, composition du milieu...) et de facteurs intrinsèques comme la dormance et la qualité germinative. La dormance des graines correspond à l'inaptitude des graines à germer lorsqu'elles sont placées dans des conditions idéales de germination. Chez les semences, certaines hormones végétales sont connues pour contrôler la dormance. L'acide absicique maintient la dormance, tandis que les gibbérellines promeuvent la germination. Chez *A. thaliana*, certains écotypes comme Cap vert Island (Cvi), possèdent une dormance particulièrement marquée (plusieurs mois). *A contrario* l'écotype Columbia (Col-0) est très peu dormant.

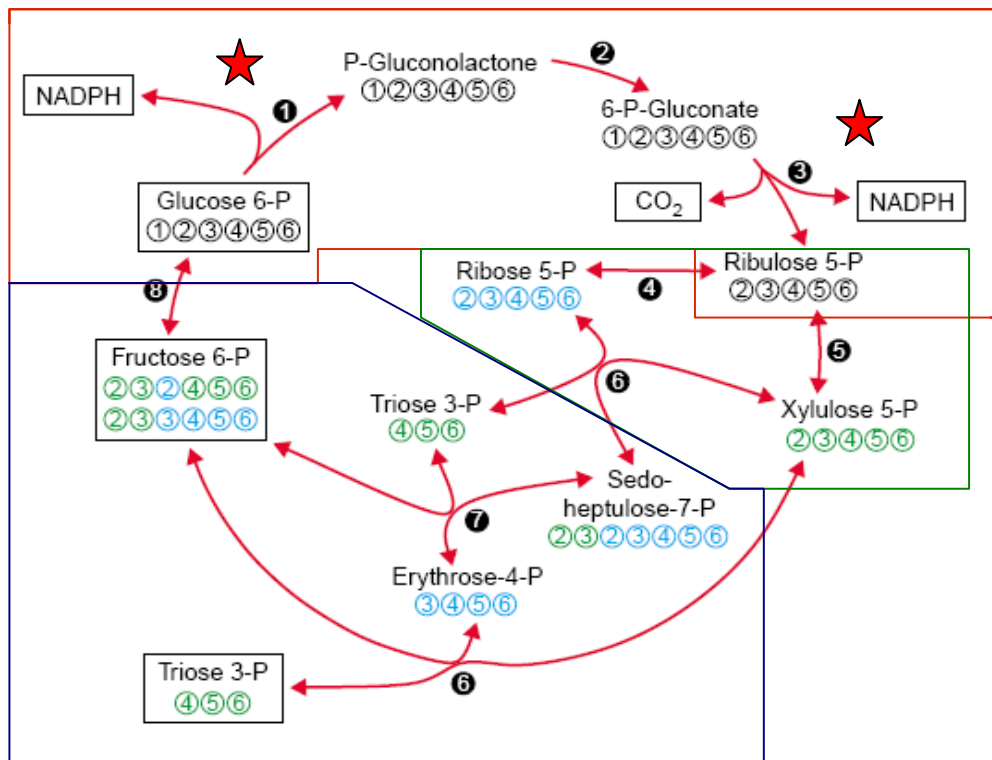
## **Germination et formes actives de l'oxygène**

Dans les graines, les ROS sont continuellement produites de l'embryogenèse à la germination (notamment de façon massive lors des phases de dessiccation et d'imbibition), mais également lors du stockage à sec. L'oxydation des macromolécules au cours de la dessiccation sur la plante mère, du stockage à long terme ou lors d'un stockage défectueux



**Figure 11: The oxidative window for germination.** The upper panel links schematically the germination associate events with ROS content as described in Oracz et al., 2005. The lower panel shows the typical final germination pattern along the oxidative window.

(variation de température et de condition d'hygrométrie) conduit au vieillissement des semences, c'est-à-dire une diminution de la qualité germinative et de la viabilité des graines. Cependant, des études récentes ont montré que, lorsque ces ROS sont finement régulées, elles peuvent être bénéfiques pour la germination en servant de molécule signal pour la levée de dormance (Oracz et al., 2007). Ce nouveau concept, nommé « fenêtre oxydative pour la germination » (Cf. figure 11), lie la réalisation d'événements cellulaires associés à la germination à des niveaux critiques de ROS compris entre une limite basse et une limite haute (Bailly et al., 2008). Ainsi, des niveaux trop faibles ou trop élevés de ROS ne permettent pas une germination optimale. L'importance des ROS dans les processus de levée de dormance a très récemment été confirmée pour *A. thaliana* écotype Col-0 (Liu et al., 2010 ; Leymarie et al., 2011).



**Figure 12: The oxidative pentose phosphate pathway.** Red, green and blue boxes correspond to the oxidative, epimerisation and carbon group transfer branch respectively. The second and third branches contain reversible steps common to Calvin cycle. (1) Glucose-6-phosphate dehydrogenase (2) 6-phosphogluconolactonase (3) 6-phosphogluconate dehydrogenase (4) Ribose-5-phosphate isomerase (5) Ribulose-5-phosphate 3-epimerase (6) Transketolase (7) Transaldolase (8) Glucose-6-phosphate isomerase. Red stars correspond to steps studied in this manuscript. Adapted from Kruger and von Schaewen, 2003.

## **Le cycle oxydatif des pentoses phosphate**

Chez tous les organismes vivants, un grand nombre de réactions enzymatiques des métabolismes primaire et secondaire utilisent le Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate réduit (NADPH) comme cofacteur. Par exemple chez les plantes, des voies métaboliques essentielles telles que la fixation du carbone, l'assimilation du nitrate, la synthèse des acides gras, et d'autres encore ont besoin de NADPH pour fonctionner.

Dans les chloroplastes à la lumière, la source principale de pouvoir réducteur provient de la chaîne photosynthétique de transfert d'électrons qui permet via la ferrédoxine et la ferrédoxine NADP réductase (FNR) de générer du NADPH. Cependant dans les plastes des tissus non-photosynthétiques ainsi que dans les chloroplastes à l'obscurité, le NADPH est généré par le cycle des pentoses phosphate (Cf. figure 12) qui assure une fourniture catabolique de pouvoir réducteur à partir du glucose-6-phosphate.

En plus d'être la principale source de NADPH dans les plastes non-photosynthétiques ainsi que dans les chloroplastes à l'obscurité, le cycle des pentoses phosphate est aussi une source majeure de squelettes carbonés pour la biosynthèse de nucléotides, d'acides aminés aromatiques, de phénylpropanoïdes et de leurs dérivés, tels que la lignine ou le shikimate.

Dans les plastes, le substrat initial de ce cycle, le glucose-6-phosphate (G6P), provient principalement de la dégradation de l'amidon et de l'isomérisation du glucose-1-phosphate en glucose-6-phosphate par la Phosphoglucomutase (PGM).

La voie des pentoses phosphate peut être divisée en deux branches et trois phases :

- une branche oxydative (phase 1) qui conduit à l'oxydation du G6P, à la réduction du NADP<sup>+</sup> en NADPH et à la production de pentoses phosphate. Au cours de cette phase oxydative, deux enzymes, la glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PDH, EC 1.1.1.49) et la 6-phosphogluconate déshydrogénase (6PGDH, EC 1.1.1.44) utilisent le NADP<sup>+</sup> comme cofacteur pour générer du NADPH.
- une branche non oxydative elle-même divisée en deux phases (phases 2 et 3) : une phase d'isomérisation et une phase de réorganisation des molécules par transfert de groupes carbonés. Cette branche non oxydative est composée d'une série de réactions réversibles communes avec le cycle de Calvin qui aboutit à la formation d'hexoses et de trioses à partir des pentoses.





## **La glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PDH)**

La première réaction du cycle des pentoses phosphate est catalysée par la glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PDH, EC 1.1.1.49). La G6PDH catalyse l'oxydation du glucose 6 phosphate (G6P) en Phosphogluconolactone et permet ainsi la réduction du cofacteur NADP<sup>+</sup> en NADPH. Cette réaction a un  $\Delta G$  très négatif, elle est donc irréversible et constitue le principal point de régulation du cycle des pentoses phosphate (via l'activation ou l'inactivation de la G6PDH).

La glucose-6-phosphate déshydrogénase a fait l'objet de nombreuses études biochimiques et structurales chez plusieurs organismes allant de la bactérie à l'homme. Pour la plupart des espèces, la sous-unité des G6PDH est composée d'environ 500 acides aminés et possède une masse moléculaire de 50 à 60 kDa (Rowland et al., 1994). L'état d'oligomérisation est variable suivant les organismes : la G6PDH de *Leuconostoc mesenteroides* est un homodimère tandis que l'isoforme humaine obéit à un équilibre dimère-tétramère (Rowland et al., 1994). Les deux formes oligomériques des G6PDH humaines présentent les mêmes caractéristiques enzymatiques, et la signification physiologique de cet équilibre reste à résoudre (Rowland et al., 1994). La dimérisation ou un état supérieur d'oligomérisation est nécessaire pour l'activité chez toutes les espèces (Rowland et al., 1994).

### **Localisation subcellulaire des G6PDH d'*Arabidopsis thaliana***

Le génome d'*A. thaliana* code six G6PDH putatives. Les différentes isoformes plastidiales de G6PDH sont exprimées différemment en fonction des tissus. Quatre isoformes seraient localisées dans les plastes, comme le suggère la présence d'un peptide de transit en N-terminal de leur séquence primaire. Ces isoformes plastidiales sont subdivisées en 3 groupes (P0, P1 et P2) en fonction de leur profil d'expression.

L'isoforme AtG6PDH1 de type P1 est exprimée dans les feuilles, dans les tiges, dans les bourgeons ainsi que dans les fleurs. Les isoformes du groupe P2 (AtG6PD2, AtG6PD3) sont préférentiellement exprimées dans les racines. L'isoforme AtG6PD4 est très peu exprimée (Wakao et Benning, 2005). Curieusement, AtG6PD4 n'a pas d'activité déshydrogénase, ce qui en plus de sa faible expression laisse penser qu'AtG6PD4 coderait une protéine non fonctionnelle (Wakao et Benning, 2005). Une publication parue au cours de ma dernière année de thèse, a mis en évidence une nouvelle fonction pour cette isoforme en tant que régulateur de l'adressage alternatif de G6PDH1 aux peroxysomes (Meyer et al., 2011).



En effet, des expériences de en double hybride chez la levure ont montré que la G6PDH4 pouvait interagir avec G6PDH1. *In planta*, l'interaction a pour conséquence de masquer le peptide d'adressage aux plastes de G6PDH1 qui est alors adressée aux peroxysomes grâce à la présence de la séquence SKY à son extrémité C-terminale. Les deux autres isoformes (AtG6PD5 et AtG6PD6) seraient localisées dans le cytosol (Wakao et Benning, 2005).

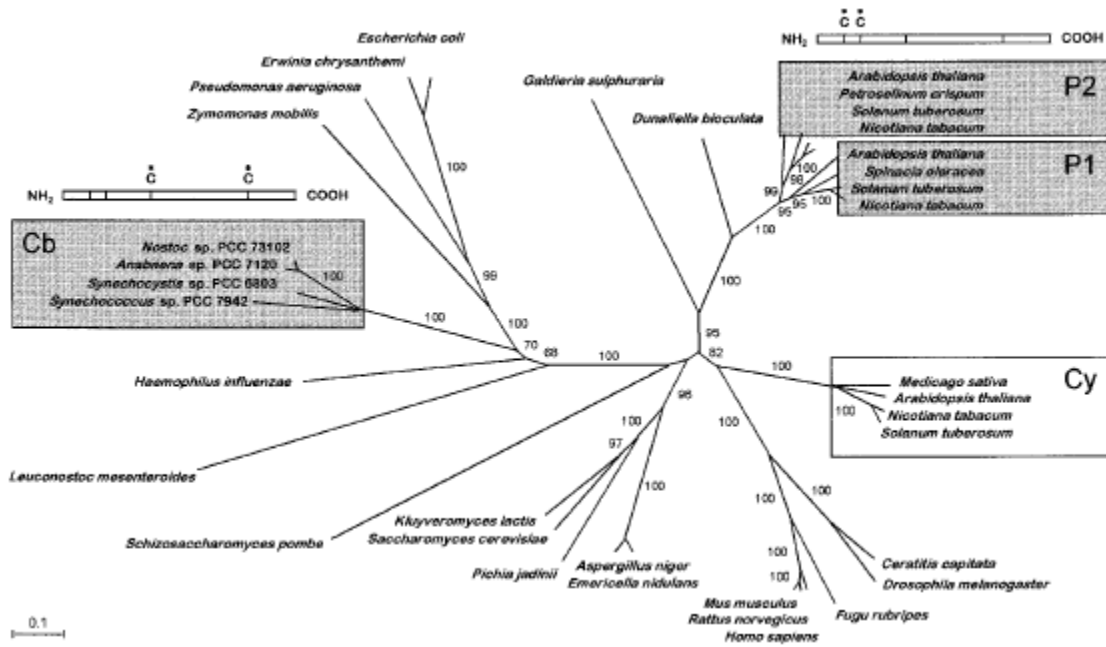
### Importance des G6PDH dans la physiologie des végétaux

De par sa capacité à générer du NADPH, composé essentiel pour lutter contre les dégâts des stress pro-oxydants, il a été montré que la G6PDH était impliquée dans la réponse aux stress biotiques et abiotiques (Valderrama et al., 2006 ; Esposito et al., 1998 ; Batz et al., 1998). L'implication de la G6PDH dans ces réponses au stress est probablement liée à sa capacité à recycler le NADPH qui est une molécule indispensable pour lutter contre les oxydations produites par les formes actives de l'oxygène lors des stress (en maintenant par exemple le pool de glutathion réduit *via* l'activité de la glutathion réductase (GR) qui utilise le NADPH comme substrat réducteur).

### Régulation enzymatique des G6PDH

L'activité des G6PDH bactériennes et eucaryotes est régulée par la concentration en substrat et par le rapport  $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ . En effet, toutes les G6PDH caractérisées à ce jour sont soumises à une forte retro-inhibition compétitive du NADPH (Schroeder et al., 1984 ; Wakao et Bennig 2005).

Initialement, la caractérisation du contrôle de l'activité des G6PDH plastidiales chez les végétaux supérieurs a été entreprise chez la pomme de terre. Chez cette espèce, les deux isoformes localisées dans les plastes (une de type P1 et une de type P2) sont régulées par le rapport  $\text{NADP}/\text{NADPH}$  ainsi que par leur état redox (Wenderoth et al., 1997 ; Wendt et al., 2000). La régulation redox de l'activité avait déjà été mise en évidence pour les G6PDH de cyanobactéries (Cossar et al., 1984). Cette régulation post-traductionnelle de type redox semble spécifique des isoformes plastidiales ou des procaryotes photosynthétiques. Ce mécanisme n'a jamais été observée chez les organismes procaryotes non-photosynthétiques, ni pour les isoformes cytosoliques des cellules eucaryotes. Il a aussi été montré que l'isoforme P1 pouvait s'inactiver en présence d'une concentration élevée non physiologique en glutathion réduit (GSH) et que cette inactivation était réversible par le glutathion oxydé



**Figure 13: Consensus tree of G6PDH isozymes based on alignment of 36 mature sequences.** Plant and cyanobacterial sequences are boxed. Plastidic and cyanobacterial isoform groups are highlighted in grey with schematic representation of the redox regulatory cysteines on the polypeptide sequences. Abbreviations: Cb, cyanobacterial; Cy, cytosolic; P1/P2, plastidic G6PDH isoform groups. Reproduced from Wendt et al., 1999.

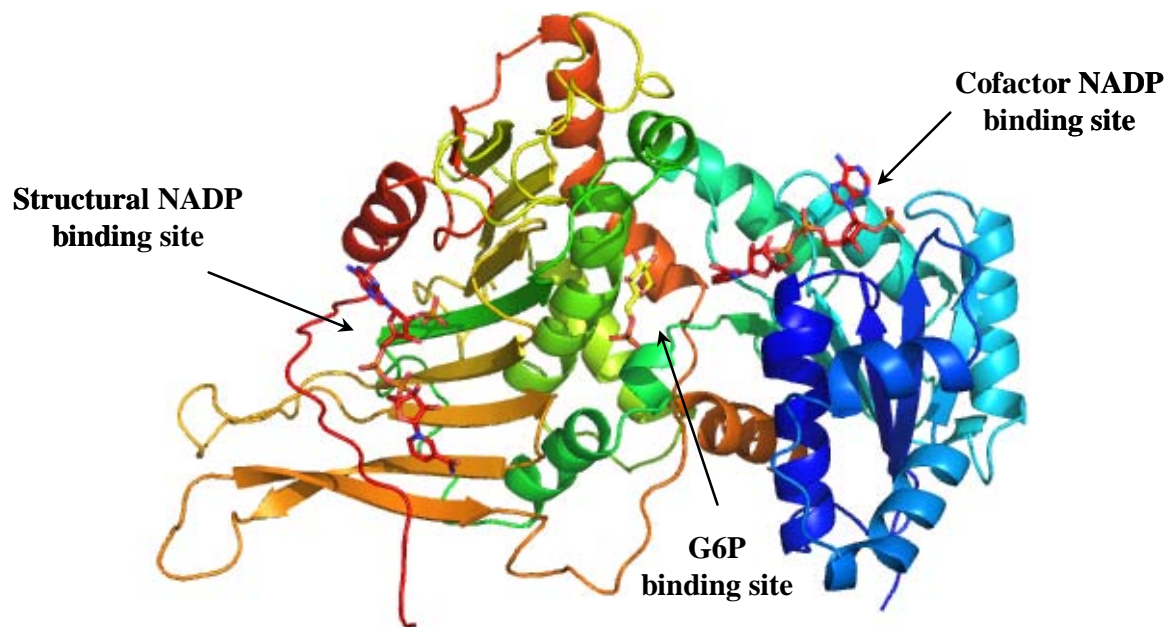
(GSSG) (Wenderoth et al., 1997). En revanche, le GSSG n'a pas d'effet sur l'isoforme P2 (Wendt et al., 2000). Des expériences consistant à incuber les G6PDH de pomme de terre en présence de TRX recombinante d'épinard ont montré que ces enzymes seraient réduites par des TRX m pour les isoformes P1 et P2 mais également les TRX f pour l'isoforme de type P2.

Les deux résidus cystéine (Cys 149 et Cys 157) responsables de cette régulation redox ont été identifiés sur l'isoforme de type P1 de pomme de terre. Par la suite, il a également été montré chez *A. thaliana* que les 3 isoformes actives de G6PDH plastidiales (G6PDH1, 2, et 3) sont régulées par leur état redox, et les deux résidus cystéine impliqués dans cette régulation sont conservés (Wakao et Benning, 2005).

Plus récemment, des travaux, encore non publiés, réalisés et présentés au congrès « Plant ROS » à Budapest (Hongrie) en 2011 par l'équipe autrichienne de Claudia Jonak évoquent l'existence d'une régulation de l'activité par phosphorylation. La phosphorylation du résidu thréonine 77 sur l'isoforme G6PDH5 a pour conséquence d'augmenter d'un facteur deux l'activité déshydrogénase de l'enzyme.

### Origine évolutive de la régulation redox des G6PDH

La modulation de l'activité des G6PDH via leur état redox chez les cyanobactéries ainsi que des G6PDH plastidiales chez les plantes supérieures a soulevé la question d'une possible conservation de ce système de régulation au cours de l'évolution ou d'une convergence fonctionnelle chez ces deux types d'organismes. Depuis ces dernières années, l'accumulation de séquences en acides nucléiques dans les bases de données a permis de réaliser des études comparatives entre des G6PDH putatives de nombreux organismes photo-autotrophes. Les séquences protéiques des G6PDH de plantes supérieures et d'algues avec celles des cyanobactéries ont été comparées. Les alignements obtenus montrent que les isoformes de procaryotes photo-autotrophes et les isoformes plastidiales des eucaryotes photosynthétiques étaient relativement éloignées comparativement à l'éloignement entre les isoformes cytosoliques et plastidiales des plantes supérieures (Wendt et al., 1999) (Cf. figure 13). Ces résultats laissent présager une convergence fonctionnelle, les formes régulées par leur état redox ayant été sélectionnées pour leur adéquation avec le métabolisme des organismes photo-autotrophes qui obéit à un rythme jour/nuit (Wendt et al., 1999).



**Figure 14:** Cartoon representation of human G6PDH structure coloured from blue to red according to N to C termini. Illustration was made using PyMol and the PDB template 2BH9.

## Mécanisme catalytique des G6PDH

Les cinétiques enzymatiques de G6PDH de plusieurs organismes eucaryotes ou procaryotes ont été étudiées en détail. Le mécanisme catalytique G6DPH de foie de porc (Kanji et al., 1976), de rat (Thompson et al., 1976) et de plaquettes humaines (Kosow, 1974) est un mécanisme séquentiel ordonné dans lequel le NADP<sup>+</sup> est lié à l'enzyme en premier et le G6P en second. Les G6PDH d'érythrocytes de lapin ou de levure *Saccharomyces carlsbergensis* ont un mécanisme catalytique aléatoire (Schroeder et al., 1984). Plus récemment, il a été montré qu'une isoforme recombinante de G6PDH humaine avait également un mécanisme catalytique aléatoire (Wang et al., 2002). La variété inter et intra spécifique des mécanismes catalytiques des G6PDH reflète la diversité d'exigence physiologique pour le métabolisme NADP dépendant de différents types cellulaires spécialisés.

L'isoforme de la bactérie *Leuconostoc mesenteroides*, contrairement aux G6PDH eucaryotes, peut également utiliser le NAD comme cofacteur. La réaction avec le NADP obéit à un mécanisme séquentiel ordonné (toujours avec le NADP fixé en premier) tandis que la réaction utilisant le NAD suit un mécanisme aléatoire. Cependant, il n'existe pas de données sur le mécanisme catalytique des isoformes plastidiales de plantes supérieures ni sur l'impact que pourrait avoir la régulation redox de ces enzymes sur celui-ci.

Des alignements multiples réalisés avec l'ensemble des séquences de G6PDH connues ont révélé 3 régions très conservées : le motif de liaison au cofacteur NADP (GxxGx(x)A), une région de 9 résidus (RIDHYLGKE), correspondant au site actif et signature consensus des G6DPH, et un motif EKPxG (Kotaka et al., 2005).

Des structures (Cf. figure 14) de G6PDH de 2 organismes (*Leuconostoc mesenteroides*, *Homo sapiens*) sont disponibles mais aucune structure d'organismes photosynthétiques eucaryote ou procaryote n'est résolue à ce jour.

Les structures connues de G6PDH présentent dans leur région N-terminale un domaine avec un repliement typique ( $\beta$ - $\alpha$ - $\beta$ ) de liaison aux dinucléotides pyrimidiques de type « Rossmann fold » permettant la liaison du cofacteur NADP<sup>+</sup>.

En plus de ce site de liaison « NADP cofacteur », la G6PDH humaine a la particularité de pouvoir fixer une deuxième molécule de NADP<sup>+</sup> distincte de celle qui intervient dans la catalyse. Ce site structural se situe à proximité de la zone d'interaction entre les sous-unités du dimère (Au et al., 2000). La fixation d'une molécule de NADP<sup>+</sup> à ce site a été montrée

Residue <i>HsG6PDH</i>	Role
Lys238	Hydrogen bond with NADP 2' phosphate
Arg357	Hydrogen bond with NADP 2' phosphate
lys366	Hydrogen bond with NADP 2' phosphate
Arg 370	Interaction with NADP bisphosphate
Arg393	Interaction with amine function of nicotinamide ring
Tyr 401	Interaction with nicotinamide ring
Asp421	Interaction with amine function of nicotinamide ring
Arg487	hydrogen bond with NADP 2' phosphate / interaction with adenine ring
Tyr503	interaction with adenine ring
Trp509	Interaction with nicotinamide ring

**Table 1: Key residues in the G6PDH human structural NADP binding site and functions.** (Kotaka et al., 2005)

Residue on <i>HsG6PDH</i>	Role
★ Arg 72	Coordination of NADP in cofactor binding domain
Pro172 ( <i>cis</i> conformation)	Essential for G6P positioning
Asp 200	Stabilization of positive His 260 charge during transition state of catalysis
His 201	G6P binding
Lys 205	G6P binding
His 260	Base that abstract proton from G6P

**Table 2: Conserved residues shown to be essential for G6PDH activity.** Positions correspond to the human enzyme ( Kotaka et al., 2005 ; Shannon et al., 2000 ; Cosgrove et al.,1998). Red star indicates the residue discussed later in this work.



comme importante pour la stabilité de l'enzyme et la formation du dimère (Kotaka et al., 2005). Un récapitulatif des résidus impliqués dans la liaison du cofacteur structural est présente dans la table 1. Ce site structural est considéré comme conservé chez les organismes supérieurs mais n'est pas présent dans la structure de l'isoforme bactérienne de *Leuconostoc* (Kotaka et al., 2005). Par contre aucune donnée bibliographique ne documente la présence d'un tel site sur les isoformes redox régulées de cyanobactéries ou de plantes.

Le mécanisme catalytique a été largement étudié au niveau moléculaire, ce qui a permis de mettre en évidence des résidus conservés essentiels pour l'activité G6PDH (Cosogrove et al., 2002 ; Bautista et al., 1995 ; Kotaka et al., 2005). Un récapitulatif de ces résidus et de leur fonction est présente dans la table 2.

### **La 6-phosphogluconate déshydrogénase (6PGDH)**

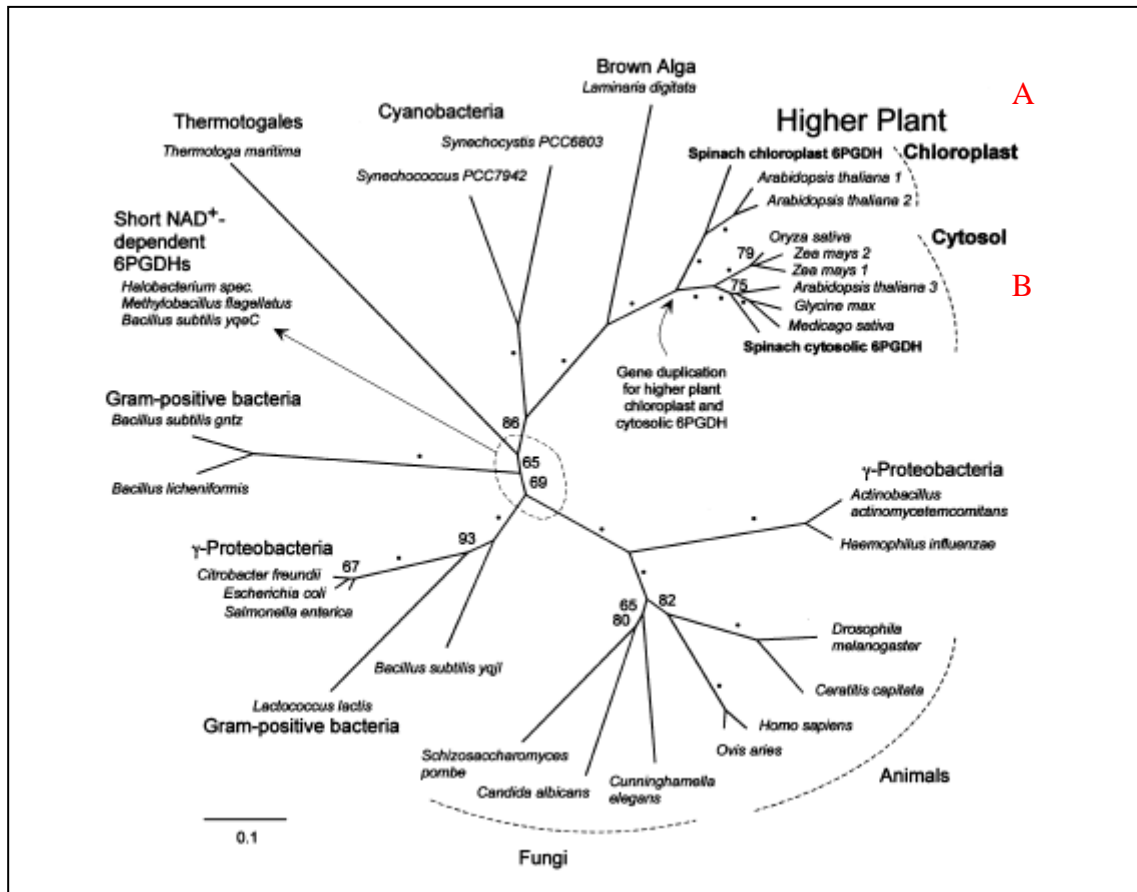
La 6-phosphogluconate déshydrogénase (EC. 1.1.1.44) est la troisième enzyme du cycle des pentoses phosphate et la dernière enzyme de la branche oxydative de ce cycle. Elle constitue donc le point d'entrée de la phase d'épimérisation dont les étapes réactionnelles sont communes au cycle de Calvin. La 6PGDH catalyse l'oxydation et la décarboxylation du 6-phosphogluconate pour produire du ribulose-5-phosphate (Ru5P), du CO<sub>2</sub> et du pouvoir réducteur sous forme de NADPH en réduisant le cofacteur NADP<sup>+</sup>.

Chez la plante modèle *A. thaliana*, le séquençage complet du génome a permis de mettre en évidence la présence de 3 isoformes de 6PGDH.

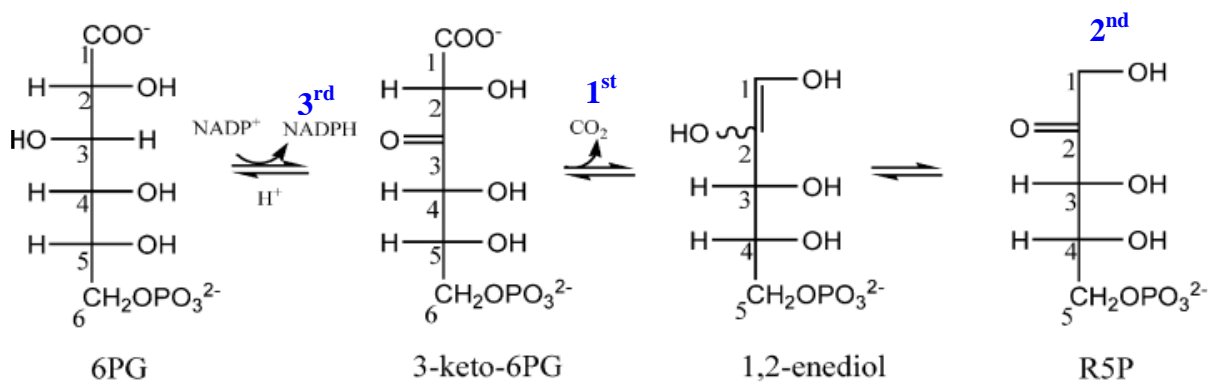
### **Localisation subcellulaire des 6PGDH d'*Arabidopsis thaliana***

Des expériences d'analyse protéomique sur organites purifiés ont permis de déterminer la localisation subcellulaire de cette famille de protéines *in vivo* chez *Arabidopsis*. Les 3 isoformes de 6PGDH d'*Arabidopsis* ont été identifiées par spectrométrie de masse comme étant présentes dans le stroma des chloroplastes (Ferro et al., 2010). Cependant, l'isoforme 6PGDH3 a également été identifiée dans les peroxysomes et le cytosol (Reumann et al., 2007). De même, l'isoforme 6PGDH2 serait aussi présente dans les mitochondries (Heazlewood et al., 2004).

La figure 15 présente un arbre phylogénique des 6PGDH de différents organismes. Sur cet arbre, deux groupes (A et B) se distinguent au sein des plantes supérieures. Le groupe A comprenant la 6PGDH1 plastidiale d'épinard et 2 6PGDH d'*Arabidopsis* potentiellement plastidiales, sur la base d'homologie de séquence avec l'isoforme d'épinard qui possède un



**Figure 15: 6PGDH phylogeny of several organisms.** In the higher plants branch, 6PGDH are divided in 2 groups A and B. Group A contains plastidial isoforms based on the sequence homology with the spinach isoform that contains a chloroplastic targeting sequence in its N-terminal part. Group B contains cytosolic isoforms. Reproduced from Krepinsky et al., 2003.



**Figure 16: Catalytic reaction of 6PGDH and the two intermediate states.** Releasing order of products is marked in blue.

peptide d'adressage. Le groupe B comprenant la 6PGDH3 d'Arabidopsis serait composé d'isoformes localisées essentiellement dans le cytosol.

### Mécanisme catalytique des 6PGDH

Le mécanisme catalytique des 6PGDH de plusieurs organismes procaryotes et eucaryotes a été étudié en détail (Villet et Dalziel, 1972 ; Berdis et Cook, 1993). La conversion du 6PG en Ru5P est considérée comme un mécanisme en trois étapes avec 2 intermédiaires catalytiques (Cf. figure 16). La première étape consiste en l'oxydation de la 6PG en 3 céto-6PG en réduisant le cofacteur NADP<sup>+</sup>. La deuxième étape correspond à la décarboxylation du 3 céto-6PG pour produire du 1,2 enediol, et enfin la troisième étape aboutit à la tautomérisation de ce composé pour produire le Ru5P (Sundaramoorthy et al., 2006). Des études de cinétique enzymatique de la 6PGDH de mouton ont montré que la réaction de décarboxylation oxydative du 6PG était asymétrique en termes de produits relargués : le CO<sub>2</sub> en premier, puis le Ru5P et enfin le NADPH (He et al., 2007). L'ordre avec lequel les substrats sont liés à l'enzyme semble être un mécanisme séquentiel non-ordonné (Bridges et al., 1975).

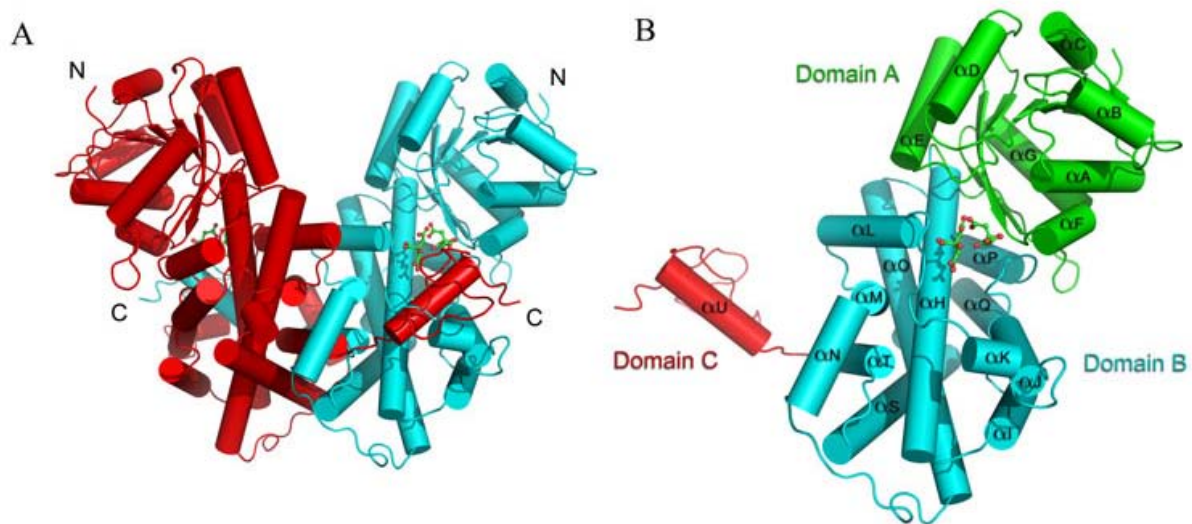
La réaction catalysée par la 6PGDH est bi-directionnelle *in vitro* (Villet et Dalziel, 1972), mais est considérée comme unidirectionnelle *in vivo* compte tenu de la très faible efficacité de carboxylation : le *K<sub>m</sub>* pour le CO<sub>2</sub> de l'enzyme de mouton est de 34 mM (Silverberg et Dalziel, 1975). Cette valeur est supérieure au seuil de solubilité du CO<sub>2</sub> à 20°C et ne correspond pas à des concentrations physiologiques. En effet, la 6PGDH utilise exclusivement le CO<sub>2</sub> et non les ions bicarbonate (Villet et Dalziel, 1972). A titre de comparaison, une enzyme efficace pour carboxyler *in vivo*, telle que la Rubisco de tabac, possède un *K<sub>m</sub>* pour le CO<sub>2</sub> de 5,1 μM (Whitney et al., 1999).

### Structure tridimensionnelle et sites catalytiques de 6PGDH

Aucune structure de 6PGDH végétale n'est connue à ce jour ; cependant, des structures de 6PGDH eucaryotes (mouton, levure) et bactériennes (*Lactococcus*) ont été élucidées.

En général, les 6PDGH procaryotes comme eucaryotes sont des homodimères (Cf. figure 16 A) avec une masse du monomère voisine de 52 kDa (He et al., 2007). Chaque sous-unité contient trois domaines (Cf. figure 17).

Le domaine A correspond au site de fixation du cofacteur (« Rossmann fold ») avec dans sa partie N-terminale, la signature GxAGxA.



**Figure 17: The overall structure and organization of *Saccharomyces cerevisiae* 6PGDH (Gnd I)** A homodimer; B monomer. A domain is coloured in green, B in blue and C in red. Two citrate molecules occupying the 6PG binding pocket are shown in sticks. Reproduced from

Le domaine B correspond à un grand domaine hélical impliqué dans la catalyse, la fixation du 6PG et l'assemblage en structure quaternaire.

Le domaine C correspond à une petite extension en C-terminal qui n'est pas nécessaire pour la dimérisation, mais qui est indispensable pour la catalyse et permet de stabiliser le dimère (He et al., 2007). Cette partie C terminale d'une sous-unité rentre à l'intérieur de la seconde et forme un couvercle mobile sur la zone de fixation du 6PG de la deuxième sous-unité.

Des alignements de plusieurs séquences disponibles dans les bases de données de différents organismes ont permis de mettre en évidence des résidus très conservés. Des études structurales et enzymatiques ont permis d'identifier certains de ces résidus comme essentiels pour la fixation du substrat et la catalyse. Par exemple, le domaine C-terminal de l'enzyme porte deux résidus (Arg 446 et His 452 sur la protéine de mouton) essentiels à la fixation du 6PG sur l'autre sous-unité (Adams et al., 1991).

Tout comme les structures de G6PDH, les structures de 6PGDH présentent dans leur région N-terminale un domaine avec un repliement typique ( $\beta$ - $\alpha$ - $\beta$ ) de liaison aux dinucléotides pyrimidiques (« Rossmann fold ») permettant la liaison du cofacteur NADP<sup>+</sup>.

### Modifications post traductionnelles des 6PDGH de plantes supérieures

Une étude récente de recherche de nouvelles cibles de TRX végétales par des approches protéomiques a proposé la 6PGDH comme cible potentielle des TRX (Balmer et al., 2003). En effet chez l'épinard, l'enzyme orthologue de la 6PGDH1 a été immobilisée sur colonne d'affinité de TRX m monocystéinique. Par ailleurs les 3 isoformes de 6PGDH d'Arabidopsis ont été identifiées comme phosphorylées (Meimoun et al., 2007). Cette enzyme semble donc être sujette à des modifications post-traductionnelles de type phosphorylation et redox. Cependant rien dans la littérature ne documente les conséquences fonctionnelles de ces modifications.



## Objectif de mon travail de thèse

La régulation redox par les TRX d'enzymes impliquées dans les processus photosynthétiques a fait l'objet de nombreuses études biochimiques depuis 30 ans. La régulation de ces enzymes est désormais bien caractérisée et par exemple, le mécanisme de régulation redox de l'activité de la MDH-NADP a été totalement résolu au niveau moléculaire.

En revanche, les fonctions non photosynthétiques des TRX plastidiales sont beaucoup moins connues. Egalement, les effets au niveau moléculaire conduisant à l'inhibition par réduction des G6PDH plastidiales reste à élucider.

Mon travail de thèse se décline en deux volets correspondant aux deux approches expérimentales mises en œuvre.

Le premier volet a consisté à étudier, à l'aide de méthodes *in vitro*, la régulation redox de la 3ème étape du cycle oxydatif des pentoses phosphate, catalysée par la 6PDGH, cible putative des TRX.

En parallèle, la régulation redox des G6PDH plastidiales par les TRX du même compartiment subcellulaire a été réexaminée en utilisant des protéines recombinantes homologues. Les spécificités mises en évidence ont été ensuite analysées par des études d'interactions protéine-protéine. L'impact de la régulation redox sur les propriétés catalytiques d'une G6PDH chloroplastique, notamment la relation avec ses substrats a été abordée par des approches biochimiques et biophysiques.

Une partie des résultats obtenus a été confirmée dans le contexte plus physiologique d'un système Fd/TRX reconstitué.

Le deuxième volet a consisté à retransposer *in planta* des résultats connus ou mis en évidence au cours de mes travaux. Une récente étude (Leymarie et al., 2011) ayant mis en évidence un rôle primordial d'enzymes anti-oxydantes dans les processus physiologiques conduisant à la levée de dormance des graines (notamment celle d'*Arabidopsis*), la contribution des TRX du type y dans les systèmes antioxydants a été examinée en analysant plusieurs caractéristiques de la physiologie de la germination de graines sauvages et mutantes *Trx y*. Afin de compléter l'étude de la régulation redox des G6PDH plastidiales par les TRX, des mesures d'activité G6PDH *in situ* ont également été réalisées dans les racines de ces plantes.





# **RESULTATS**

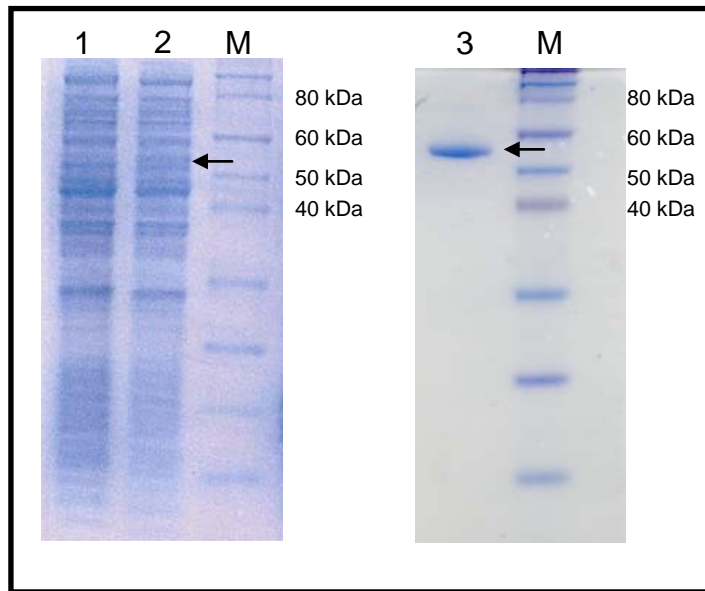


## Première partie

### **Caractérisation biochimique de la régulation post traductionnelle des déshydrogénases du cycle oxydatif des pentoses phosphate**

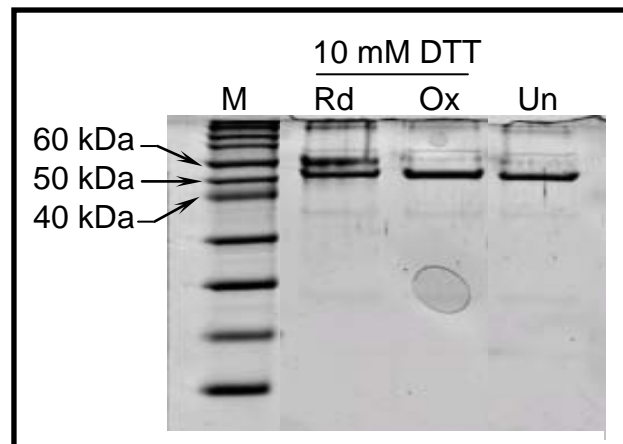
Cette première partie reprend l'ensemble des résultats obtenus *in vitro* par des approches biochimiques et biophysiques. Elle se décline en 5 chapitres.

Le premier chapitre présente la mise en évidence expérimentale de modifications post-traductionnelles de type redox et phosphorylation sur la troisième enzyme du cycle oxydatif des pentoses phosphate, la 6-phosphogluconate déshydrogénase (6PGDH) qui catalyse la dernière étape en amont des étapes communes au cycle de Calvin. Le second chapitre dédié à l'étude de la régulation redox de l'ensemble des isoformes plastidiales de glucose-6-phosphate déshydrogénases (G6PDH) d'*Arabidopsis* par les rédoxines et métabolites redox révèle une régulation stricte de ces enzymes par certains types de TRX. Les déterminants des spécificités observées abordés par des techniques biophysiques réalisées en collaboration avec Marielle V. Lepiniec (IBBMC) et Sylvie Nessler (LEBS) font l'objet du troisième chapitre. Les effets de la modification redox sur le mécanisme catalytique des G6PDH plastidiales sont étudiés dans le chapitre 4. Le dernier chapitre de cette partie est consacré à l'étude de la régulation redox de la G6PDH par la lumière dans un système Fd/TRX reconstitué et aborde le rôle des ROS dans la régulation TRX-dépendante des enzymes chloroplastiques.



**Figure 18: 6PGDH1 production and purification analyzed by SDS-PAGE**

(1) Protein crude soluble extract, 25  $\mu$ g (2) Passed through strep tag affinity column, 25  $\mu$ g. (3) Purified 6PGDH1, 2  $\mu$ g. (M) Molecular weight marker (Novex sharp protein standard).



**Figure 19: Effect of redox treatments on 6PGDH1 by gel shift analysis (SDS-PAGE)**

6PGDH1 was first treated by 10 mM DTT, either reduced or oxidized, then desalted, and alkylated with AMS before analysis of its mass by SDS-PAGE. (M) Molecular weight marker. (Red) reduced 6PGDH1. (Ox) oxidized 6PGDH1. (Un) Un-treated 6PGDH1 (no redox treatment).

# **Etude biochimique des modifications post traductionnelles d'une 6-phosphogluconate déshydrogénase chloroplastique d'*Arabidopsis thaliana***

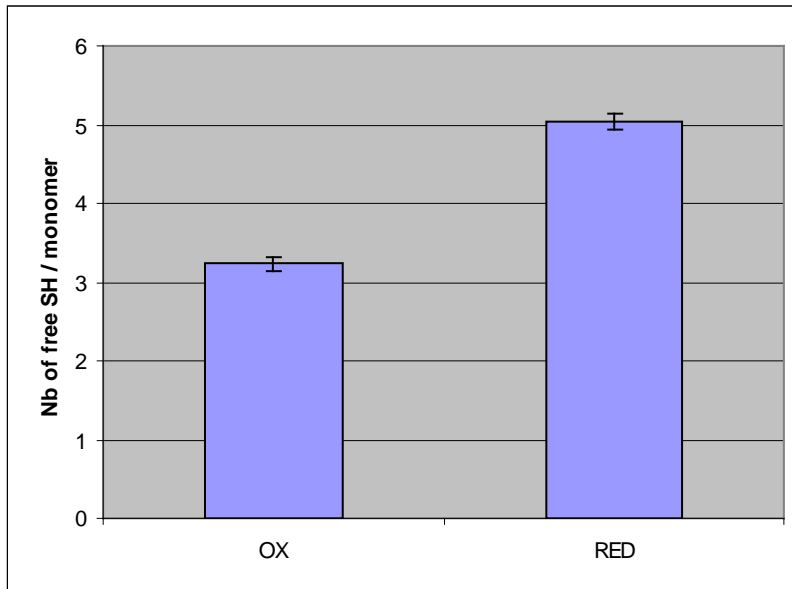
## **Production et purification d'une 6PGDH recombinante d'*Arabidopsis***

L'isoforme n°1 de la 6-phosphogluconate déshydrogénase (6PGDH1) d'*A. thaliana* (At1g64190) a été produite sous la forme d'une protéine recombinante dans *E. coli*. L'ADNc pleine longueur de la 6PGDH1 a été exprimé dans le vecteur pGENI. Ce vecteur d'expression a été construit au cours de ma thèse, à partir du vecteur commercial pET16b permet de combiner l'efficacité de production du système pET utilisant l'ARN polymérase du bactériophage T7 avec la facilité et l'efficacité de purification de la protéine recombinante par colonne d'affinité par l'ajout soit d'une étiquette poly-Histidine à l'extrémité N-terminale soit d'une étiquette Strep Tag II en C-terminal (Cf. Matériels et Méthodes). Pour obtenir la 6PGDH1 recombinante, les conditions de culture bactérienne utilisées sont similaires à celles utilisées par He et al., (2007) pour produire une 6PGDH de levure (4 h d'induction à 37°C). Le rendement protéique obtenu est de 2 mg par litre de culture. La pureté de la préparation a été analysée en SDS-PAGE (Cf. figure 18). Un seul polypeptide de 54,5 kDa (enzyme + Strep tag) a été observé après coloration au bleu de Coomassie, indiquant que la préparation est pure. L'activité de la protéine a été calculée en suivant au spectrophotomètre l'apparition du NADPH à 340 nm en présence de 6-phosphogluconate (6PG). Son activité spécifique a été mesurée à  $96,4 \pm 13,3 \text{ U.mg}^{-1}$ . Cette valeur est proche de l'activité spécifique de l'isoforme chloroplastique d'épinard évaluée à 60 U.mg (Krepinsky et al., 2001).

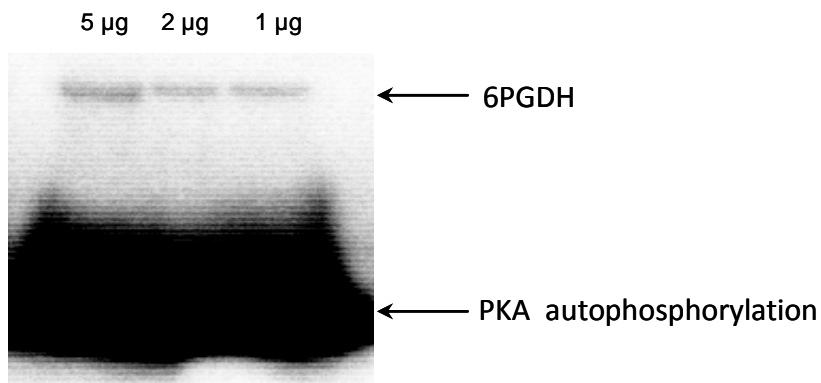
## **Les modifications post-traductionnelles de la 6PGDH1**

### **Mise en évidence d'une modification redox de l'enzyme**

Une 6PGDH d'épinard a été identifiée par des analyses protéomiques comme cible potentielle des TRX. Cette enzyme possède une ou plusieurs cystéines accessibles et réactives (accrochage sur une colonne d'affinité de TRX monocystéinique) potentiellement sujettes à une modification post traductionnelle de nature redox. Cette modification a été testée sur l'isoforme recombinante d'*Arabidopsis* 6PGDH1 en réalisant des expériences de retard sur gel après alkylation des thiols accessibles avec de l'AMS (ajout de 0,5 kDa par thiol alkylé). Après réduction ou oxydation de l'enzyme la protéine est dessalée et immédiatement



**Figure 20: Free SH group titration on 6PGDH1 using DTNB.** Protein was first treated by 20 mM reduced DTT or 5 mM diamide. After a desalting step, protein was incubated with 1mM DTNB, and TNB<sup>-</sup> appearance was monitored spectrophotometrically at 412 nm.



**Figure 21: Phosphorylation assays of recombinant 6PGDH1 using PKA.** Phosphorylation of 5, 2 and 1 µg of recombinant 6PGDH1 in a reaction volume of 50 µl for 1 h at 25°C in the presence of 2 units of commercial Protein Kinase A (PKA) and radiolabeled ATP. Half of the reaction mixture was submitted to SDS-PAGE. The autoradiogram of the gel after migration is shown.

placée en présence de 25 mM final d'AMS. Après incubation (1 heure, à l'obscurité et à température ambiante), la masse apparente est analysée en SDS-PAGE (Cf. figure 19).

Une seule bande d'une masse apparente d'environ 52-53 kDa est visible sur la piste de la protéine oxydée. En revanche la piste de la protéine réduite présente une seconde bande d'environ 58-60 kDa qui pourrait correspondre à la 6PGDH1 alkylée. L'apparition d'une bande supplémentaire, lorsque l'enzyme a été préalablement réduite avant alkylation, indique que le traitement réducteur a fait apparaître des thiols

accessibles probablement suite à la réduction d'un ou plusieurs pont(s) disulfure. Cette évidence expérimentale indique que la 6PGDH1 d'Arabidopsis présente dans les chloroplastes est sujette à une modification post-traductionnelle de nature redox. La piste contenant la protéine non traitée par le DTT présente uniquement la bande de faible masse moléculaire, la préparation de 6PGDH1 recombinante serait donc très majoritairement à l'état oxydé.

Pour caractériser plus finement cette modification post traductionnelle, une titration de thiols libres et accessibles par la méthode DTNB a été effectuée sur protéine native après un traitement réducteur ou oxydant (Cf. figure 20). Après un traitement oxydant (diamide 5 mM pendant 10 minutes) à température ambiante, une valeur de  $3,023 \pm 0,093$  thiols libres par monomère (soit 3 thiols) a été déterminée. Après traitement réducteur en présence de DTT 20mM pendant 1h à température ambiante, une valeur de  $5,03 \pm 0,1$  thiols libres par monomère (soit 5 thiols) a été calculée. Ce différentiel de deux thiols libres sur l'enzyme entre les traitements oxydant ou réducteur pourrait correspondre à la réduction d'un pont disulfure par monomère.

### Mise en évidence de la phosphorylation de l'enzyme

La phosphorylation de l'enzyme 6PGDH1 suggérée par les analyses protéomiques (Meimoun et al., 2007) a été testée *in vitro* avec la PKA commerciale de bœuf en présence d'ATP radiomarqué. La figure 21 montre 2 bandes correspondant à des signaux radioactifs. La bande de plus faible masse moléculaire correspond au signal d'autophosphorylation de la PKA alors que celle de masse moléculaire d'environ 53-54 kDa correspond à la 6PGDH recombinante. Ce résultat confirme expérimentalement *in vitro* la phosphorylation de la 6PGDH1 d'Arabidopsis.





## Analyse des séquences primaires des 6PGDH d'Arabidopsis et modélisation 3D de la 6PGDH1

Pour identifier des résidus candidats susceptibles de subir des modifications post-traductionnelles, un alignement des séquences primaires des trois 6PGDH d'Arabidopsis et d'une 6PGDH chloroplastique d'épinard a été réalisé (Cf. figure 22).

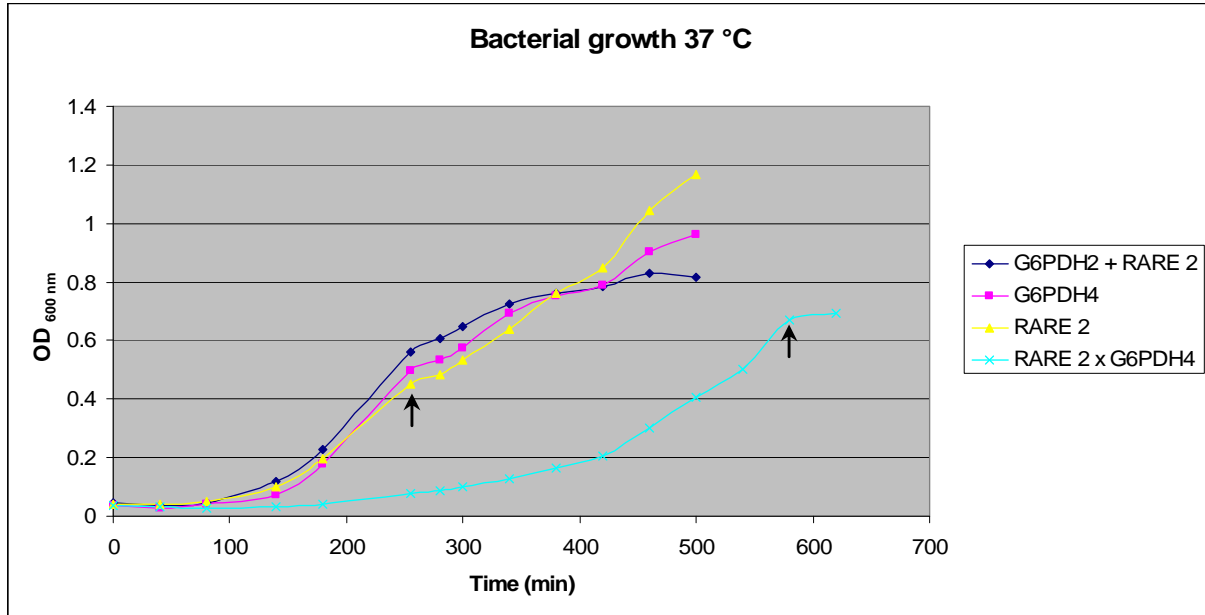
Un modèle structural de la 6PGDH1 d'Arabidopsis a également été construit grâce au logiciel SWISS MODEL (<http://swissmodel.expasy.org/>) sur la base d'une structure connue de 6PGDH de mouton (accession PDB : 1PGN) cristallisée en présence de nicotimide 8-bromo-adenine-dinucléotide phosphate (NBP), qui présente 49,37% d'identité avec la 6PGDH1 d'Arabidopsis. Les fichiers PDB, 1PGN et 1PGP (6PGDH de mouton cristallisée en présence de 6PG) ont été superposés au modèle grâce au logiciel SSM (<http://www.ebi.ac.uk/msd-srv/ssm/>) pour permettre de positionner les substrats au sein de la 6PGDH1 d'Arabidopsis. Une représentation globale du modèle structural obtenu de l'enzyme sous forme dimérique (A) et monomérique (B) est présentée en figure 23.

## Recherche de sites d'adressage aux organites

Le logiciel Predotar (<http://urgi.versailles.inra.fr/predotar/predotar.html>) n'a pas permis de prédire un adressage à un organite pour aucune des 3 isoformes de 6PGDH d'Arabidopsis.

L'analyse avec le logiciel Mitoprot (<http://ihg.gsf.de/ihg/mitoprot.html>) n'a pas non plus permis de prédire un adressage à la mitochondrie. Pourtant, la localisation mitochondriale de la 6PGDH2 a été mise en évidence expérimentalement malgré l'absence d'un peptide d'adressage (Heazlewood et al., 2004).

L'isoforme 6PGDH3 possède dans sa partie C-terminale un motif d'adressage au peroxyosome : SKI (Cf. figure 22, cadre violet) et sa localisation peroxyosomale a été confirmée expérimentalement (Reumann et al., 2007). Ce motif est absent dans les autres isoformes de 6PGDH d'Arabidopsis et une analyse avec le logiciel de prédiction PTS1 (<http://mendel.imp.ac.at/mendeljsp/sat/pts1/PTS1predictor.jsp>) n'a pas permis de prédire un adressage au peroxyosome pour les deux isoformes 6PGDH1 et 2 d'Arabidopsis. Ceci laisse penser que la 6PGDH3 est la seule isoforme présente dans ce compartiment cellulaire.



**Figure 29: Effect of recombinant Arabidopsis G6PDH production on bacterial growth.** The growth rate of clones expressing the cDNA of either G6PDH2 or G6PDH4 was followed before and after induction of recombinant protein production. The effect of pRARE2 plasmid compensating for Arg rare codons in *E. coli* on growth rates was examined. The arrows indicate the time of induction by the addition of 2 mg.ml<sup>-1</sup> anhydrotetracycline when the bacterial culture had reached an OD<sub>600nm</sub> 0.5-0.6.

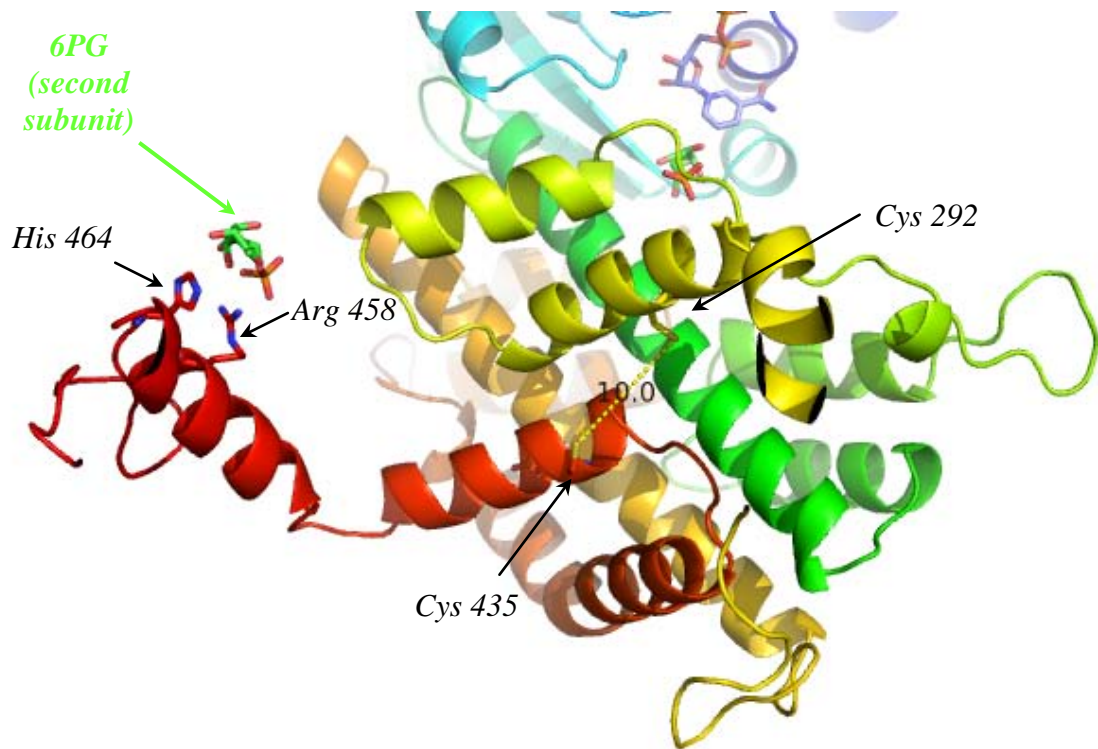
Le logiciel ChlorP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/ChloroP/>) identifie un peptide d'adressage de 45 AA correspondant à l'extension N-terminale de la séquence d'épinard absente dans les isoformes d'Arabidopsis (Cf. figure 22, cadre vert).

L'analyse des séquences primaires indique que la présence d'un peptide d'adressage clivable dans la partie N-terminale est très peu probable. En effet, le site de fixation du cofacteur (empreinte GxxGxA ; Cf. figure 22, cadre jaune), qui est conservé entre les 4 isoformes analysées, se trouve dès le début des séquences protéiques. De ce fait le clivage de la partie N-terminale lors de l'import aux organites conduirait à une enzyme non fonctionnelle. En accord avec cette contrainte, l'isoforme 6PGDH2 est adressée à la mitochondrie et ne comporte pas de peptide d'adressage N-terminal tandis que l'isoforme 6PGDH3 est adressée au peroxyosome et comporte un motif d'adressage dans sa partie C-terminale. La comparaison des séquences des 3 isoformes de 6PGDH d'Arabidopsis avec celle de la 6PGDH chloroplastique d'épinard révèle que les 6PGDH1 et 2 en sont très proches, partageant respectivement 85% et 84% d'identité avec l'enzyme chloroplastique contre 75 % pour 6PGDH3. En considérant également les données bibliographiques qui ont mis en évidence la présence des 3 isoformes de 6PGDH d'Arabidopsis dans le stroma des chloroplastes (Ferro et al., 2010), la 6PGDH1 apparait exclusivement chloroplastique et donc pourrait jouer un rôle fonctionnel essentiel dans les plastes.

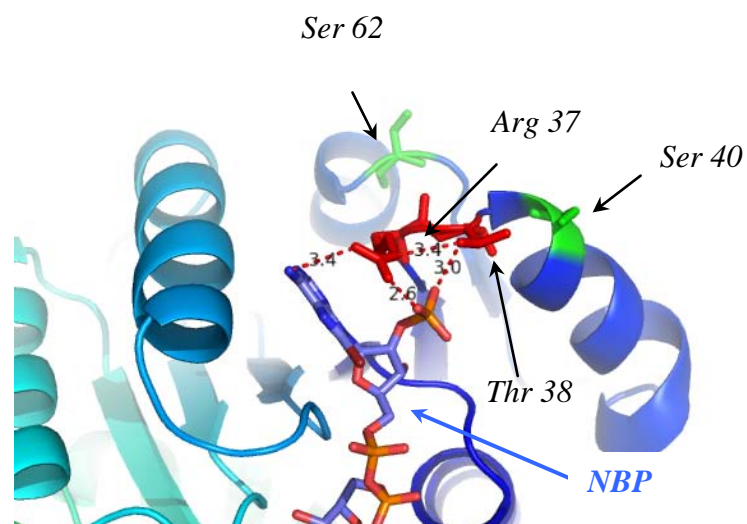
### Identification de cystéines candidates pour la modification redox

Au sein des séquences primaires des 6PGDH d'Arabidopsis, il existe plusieurs résidus cystéine dont 2 seulement (Cf. figure 22, flèche rouge) sont exclusivement conservés entre l'isoforme chloroplastique d'épinard et les isoformes 1 et 2 d'Arabidopsis (Cf. figure 15). Il s'agit des résidus 292 et 435 dans les isoformes d'Arabidopsis (correspondant aux résidus 334 et 477 de la séquence d'épinard). Ces deux résidus pourraient être le siège de la régulation redox sur la base des expériences réalisées sur 6PGDH1. Sur le modèle du monomère, ces deux cystéines sont localisées au sein des hélices  $\alpha 14$  (C292) et  $\alpha 19$  (C433) (Cf. figure 23 B et 24 A) et sont situées à la surface du monomère. Sur le modèle, la distance évaluée entre ces deux résidus est de 10 Å; elle est proche de la distance compatible avec la formation d'un pont disulfure (4-5 Å). Ces deux cystéines ne semblent pas être directement impliquées dans la fixation du 6PG ou du NADP<sup>+</sup>. Cependant, la formation d'un pont disulfure entre ces deux résidus pourrait avoir pour conséquence de rapprocher les hélices  $\alpha 14$  et  $\alpha 19$ . Le positionnement de ces hélices pourrait influencer la position du domaine fonctionnel C (He et al., 2007) qui comporte les résidus Arg458 et His464 critiques pour la

**A**



**B**



**Figure 24:** Structural details of Arabidopsis 6PGDH1 at the level of putative regulatory Cys and of the active site. Details from figure 22 are shown with a 90° rotation. (A) Details of the B (coloured from green to yellow) and C domains (coloured in red); yellow dots correspond to distance between C292 and C435. (B) Details of the A domain. Experimentally phosphorylated residues according to PhosphAT 3.0 are shown in sticks and coloured in green while the residues involved in the NADP binding domain are coloured in red.

fixation du 6PG par l'autre sous-unité (Cf. figure 24 A). Nous pouvons émettre l'hypothèse que la modification redox jouerait indirectement sur l'activité catalytique de l'enzyme.

### Recherche de sites de phosphorylation

Les trois isoformes de 6PGDH d'Arabidopsis ayant été identifiées comme phosphorylées (Meimoun et al., 2007), une recherche des sites de phosphorylation (Cf. figure 22, flèches bleues) a été menée grâce à la base de données phosphAT 3.0 (<http://phosphat.mpimp-golm.mpg.de/>). Dans l'isoforme 6PGDH3 la serine 39 (équivalent de la Ser40 dans les isoformes 1 et 2) a été identifiée expérimentalement par analyse en spectrométrie de masse comme étant phosphorylée. Ce site de phosphorylation est également retrouvé dans l'isoforme plastidiale d'épinard. De même la Ser62 de l'isoforme 6PGDH1 a été identifiée comme phosphorylée. Il est à noter que cette Serine est présente dans l'isoforme 6PGDH2 et absente de l'isoforme 6PDH3 (Cf. figure 22).

En utilisant le logiciel NetPhosK (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhosK/>), une recherche de sites de phosphorylation kinase spécifiques a été réalisée. Elle a permis d'identifier 6 sites de phosphorylation potentiels par la PKA, kinase utilisée dans le test expérimental de phosphorylation de 6PGDH1 (Table 3).

Parmi les 2 sites de phosphorylation expérimentalement identifiés dans les 6PGDH (Ser 40 et Ser 62), seule la Serine 40 est une cible prédite de la PKA. En effet, sur le modèle de la structure 3D de 6PGDH1 d'Arabidopsis, la Ser40 est localisée sur l'hélice $\alpha$ 1 à proximité du site de liaison du cofacteur (Cf. Figure 24 B). Le modèle suggère que cette Serine est en interaction directe avec la Thr38, et indirecte avec l'Arg37 via la Thr38. Or ces deux résidus étant fortement impliqués dans la fixation du cofacteur (Cf. Introduction), la phosphorylation de la Ser40 devrait avoir un effet sur la fixation du cofacteur et donc sur la catalyse.

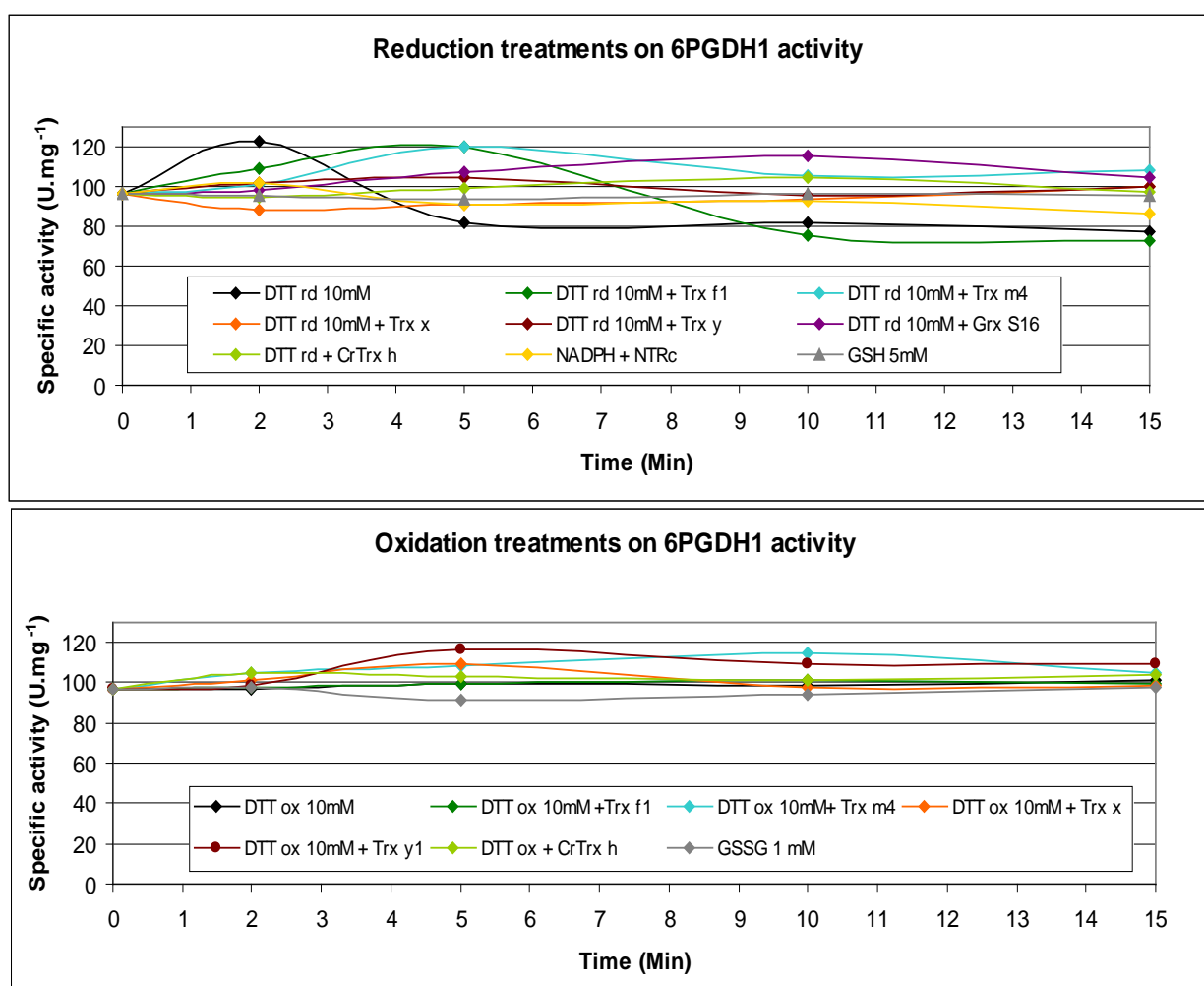
## **Etude de l'effet des modifications post traductionnelles sur l'activité de la 6PDH1**

### Effet de la modification redox sur l'activité de la 6PGDH

L'effet de la modification redox de la 6PGDH1 d'Arabidopsis sur son activité déshydrogénase a été testé en mesurant l'activité de l'enzyme (apparition du NADPH en présence de 6PG) après un traitement réducteur ou oxydant. L'incubation de l'enzyme en présence de 10 mM de DTT réduit ou oxydé n'a conduit à aucune modification significative

Site	Score	Conserved residue on the three Arabidopsis 6PGDH
Ser 33	0.67	Yes
★ Ser 40	0.55	Yes
Ser 75	0.69	No
Ser 119	0.85	No
Ser 357	0.51	Yes
Ser 437	0.68	Yes

**Table 3:** Predicted PKA phosphorylation sites on Arabidopsis 6PGDH according to NetPhosK (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhosK/>). The red star indicates an experimental phosphorylation site according to PhosphAT 3.0 (<http://phosphat.mpimp-golm.mpg.de/>).



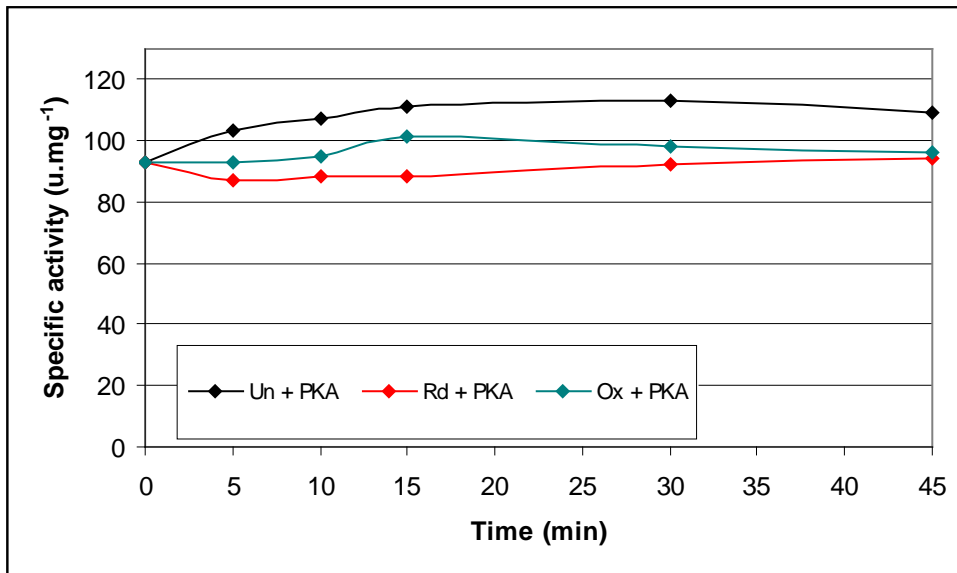
**Figure 25:** Effect of redox treatments on 6PGDH1 activity. Reduction was performed at room temperature in 100 mM Tris-HCl pH 7.9 using 10  $\mu$ M of recombinant TRX or GRX and 10 mM reduced DTT (DTT rd), or 5 mM reduced Glutathione (GSH), or 2  $\mu$ M NTRC with 200  $\mu$ M NADPH. Oxidation was performed at room temperature in 100 mM Tris-HCl pH 6.9 using 10  $\mu$ M of recombinant TRX and 10 mM oxidized DTT (DTT ox) or 1 mM oxidized Glutathione (GSSG). Aliquots were withdrawn upon time of treatment and 6PGDH activity was measured spectrophotometrically by following the 6PG-dependent appearance of NADPH at 340nm.

de l'activité déshydrogénase de l'enzyme (Cf. Figure 25). Des tests de régulation de l'enzyme avec des rédoxines qui peuvent avoir des effets structurants importants pour l'activation ou la désactivation ont également été menés (Stumpp et al., 1999). Après incubation de la 6PDGH1 recombinante d'Arabidopsis avec 10 mM de DTT réduit ou oxydé en présence de 10  $\mu$ M de TRX f1, m4, y, ou x, aucun effet significatif sur l'activité déshydrogénase n'a été observé au après 15 min. De même, la régulation de l'enzyme par des concentrations physiologiques de glutathion (5 mM GSH ou 1 mM GSSG) a été testée sans effet sur l'activité. De plus, ni la glutaredoxine S16 d'Arabidopsis ni la NTRC réduites n'ont montré d'effet sur l'activité de la 6PGDH1 d'Arabidopsis.

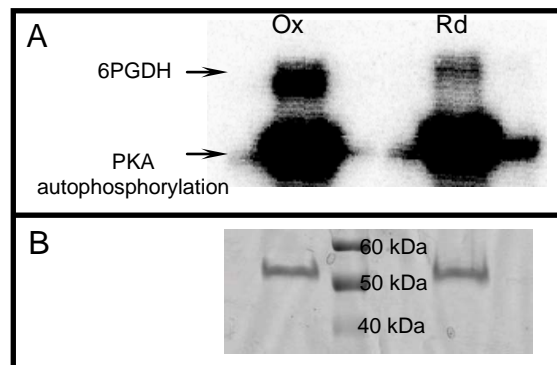
Il semble donc que le changement d'état redox n'ait pas d'influence sur la capacité de l'enzyme recombinante à produire du NADPH. La réaction catalysée par la 6PGDH étant réversible, tout du moins *in vitro*, nous nous sommes demandé si la modification redox ne pourrait pas jouer sur la réaction qui consomme du NADPH. Des expériences visant à étudier l'influence de la modification redox de l'enzyme sur la réaction inverse (production de 6PG à partir de Ru5P, NADPH et CO<sub>2</sub>) ont donc été mises en œuvre. Des études sur des 6PGDH d'autres organismes ont montré que cette enzyme utilise exclusivement le CO<sub>2</sub>, et non les ions bicarbonate, et que le  $K_m$  pour ce substrat varie de 34 à 50 mM (Silverberg et Dalziel, 1975 ; Berdis et Cook, 1993). Malgré la mise en œuvre de plusieurs stratégies : utilisation d'eau gazeuse commerciale, d'une solution saturée en bicarbonate ou encore d'une solution enrichie en CO<sub>2</sub>, l'activité de l'enzyme dans le sens de la production de 6PG n'a pas pu être mesurée avec fiabilité. La difficulté rencontrée est liée à l'obtention à un pH proche de la neutralité d'une concentration en CO<sub>2</sub> solubilisé suffisamment élevée (proche du  $K_m$ ). L'hypothèse de la régulation redox de l'enzyme sur la réaction consommant le Ru5P n'a donc pas pu être testée.

#### Effet de la phosphorylation de la 6PGDH sur l'activité déshydrogénase et interconnexion entre régulation redox et phosphorylation

L'impact de la phosphorylation de la 6PGDH1 sur son activité déshydrogénase a été évalué en réalisant des mesures d'activité déshydrogénase au cours d'une cinétique de phosphorylation dans les mêmes conditions que celles décrites précédemment en présence d'ATP froid. Les résultats présentés en figure 26 indiquent que la phosphorylation de l'enzyme n'a pas d'impact sur sa capacité à produire du NADPH et ce, quel que soit l'état redox de l'enzyme (traitement de réduction ou d'oxydation préalable).



**Figure 26:** Effect of phosphorylation treatments on 6PGDH activity. Untreated (Un), reduced (Rd) or oxidized (Ox) purified 6PGDH1 was incubated in presence of 50  $\mu$ M ATP and 2 units of commercial PKA at 25°C. Aliquots were withdrawn upon time of treatment and 6PGDH activity was measured spectrophotometrically by following the 6PG-dependent appearance of NADPH at 340nm.



**Figure 27:** Redox effect on 6PGDH1 phosphorylation by PKA. Preliminary redox treatments and phosphorylation assays were performed as described in legends of fig. 19 and fig. 20, respectively.

Autoradiogram is shown in (A), and loading control (Coomassie staining) in (B).



Comme pour la modification redox, un impact de la phosphorylation sur la réaction consommant du Ru5P n'est pas à exclure.

L'impact de l'état redox de l'enzyme sur sa capacité à être phosphorylée a également été étudié. Pour cela, des tests de phosphorylation sur protéine après traitement réducteur (DTT red 10 mM) ou oxydant (DTT ox 10 mM) pendant 1 heure ont été réalisés. L'autoradiogramme présenté en figure 27 A montre 2 bandes correspondant à un signal radioactif. La bande la plus intense et de plus faible masse moléculaire correspond au signal d'autophosphorylation de la PKA (bande non visible en Coomassie), tandis que la bande de masse moléculaire plus élevée correspond à la 6PGDH1 recombinante. La coloration Coomassie (Cf. figure 27B) indique que des quantités équivalentes de protéine réduite ou oxydée ont été analysées. Pourtant, le signal radioactif correspondant à la 6PGDH est nettement plus intense pour l'enzyme oxydée que pour l'enzyme réduite. L'état redox semble donc avoir un impact sur la capacité de la 6PGDH1 à être phosphorylée, mais nous n'avons pas pu mettre en évidence d'effet de la phosphorylation sur la capacité de l'enzyme à réduire le NADP.

Pour finaliser l'étude de l'interconnexion entre les deux modifications post-traductionnelles mises en évidence sur la 6PGDH1 d'Arabidopsis au cours de ce travail, il serait intéressant d'examiner l'impact de la régulation redox sur l'activité déshydrogénase de l'enzyme après phosphorylation ou déphosphorylation complète.

### **Conclusion préliminaire sur la caractérisation biochimique de l'enzyme**

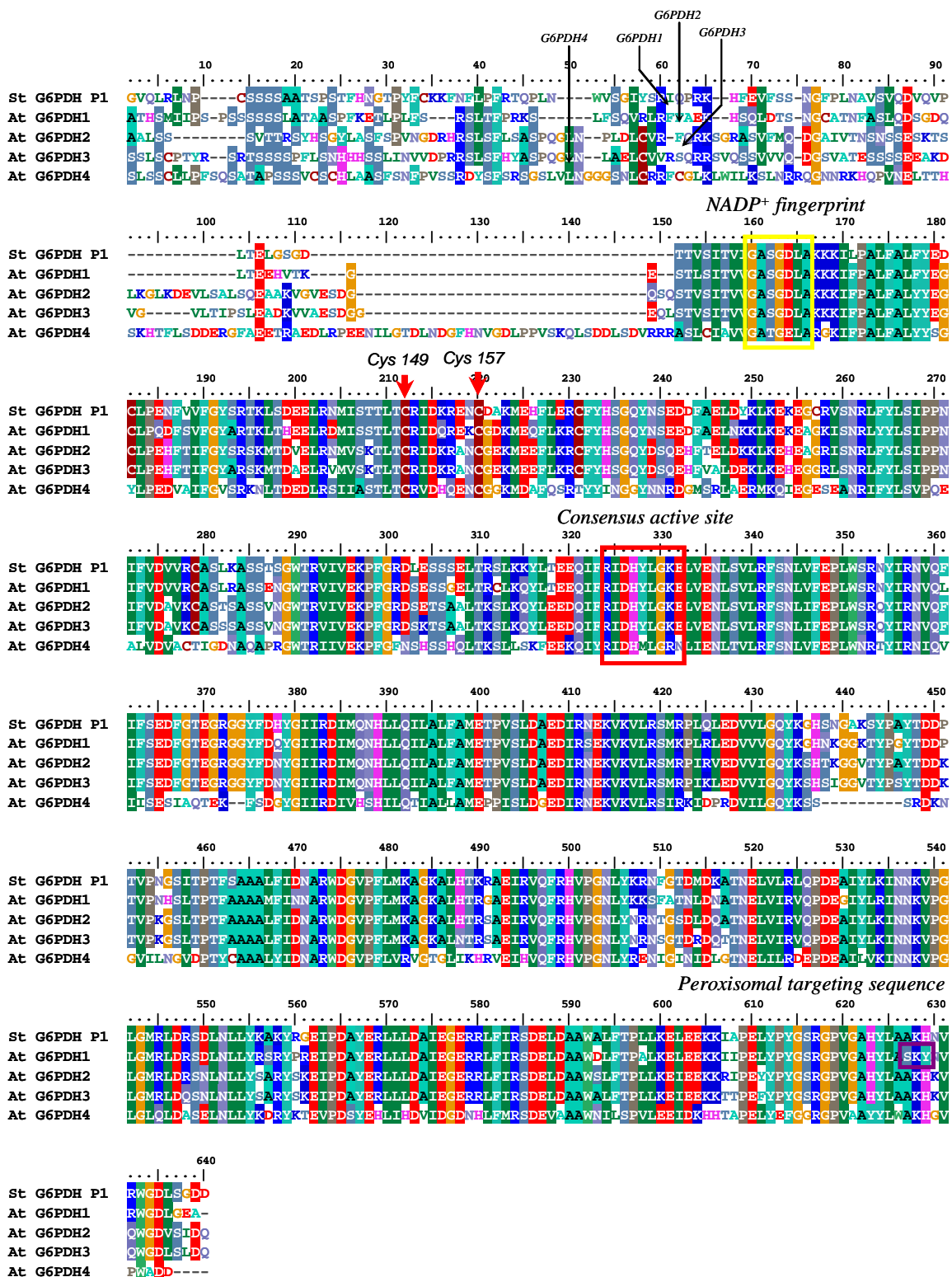
Au cours de ce travail, nous avons mis en évidence l'existence de modifications post-traductionnelles sur la 6PGDH1 d'Arabidopsis mais elles ne semblent pas avoir d'effet sur la capacité catalytique de l'enzyme, contrairement à ce que suggèrent les hypothèses structurales qui révèlent que les résidus potentiellement impliqués pourraient avoir une influence directe ou indirecte sur la catalyse.

Ces observations laissent penser que, soit le signal de phosphorylation observé par radiomarquage ne concerne pas la serine 40 de la 6PGDH1, soit les traitements de phosphorylation qui ont précédé les mesures d'activité n'ont pas été efficaces. La présence de deux sites de phosphorylation très proches mais distincts (Ser40 et Ser62) chez les différentes isoformes de 6PGDH suggère une possible spécificité kinase-6PGDH liée à leurs localisations subcellulaires. Cependant, compte-tenu de la proximité spatiale de ces deux sites, les conséquences de la phosphorylation pourraient avoir sensiblement les mêmes effets fonctionnels sur les différentes enzymes. Une analyse en spectrométrie de masse de la



6PGDH1 recombinante après phosphorylation permettrait, d'une part, de valider les expériences de phosphorylation en présence de PKA et, d'autre part, d'identifier le peptide et donc probablement la serine expérimentalement phosphorylée *in vitro* et de vérifier qu'elle correspond bien à l'une des deux Serines identifiées comme phosphorylées *in vivo*. On ne peut pas exclure que l'absence d'effet des traitements redox sur l'activité déshydrogénase de la 6PGDH1 soit liée à la présence du Strep tag II en C-terminal de la protéine mais cette hypothèse paraît peu probable compte-tenu du positionnement de l'extrémité C-terminale (Cf. figure 24 A).

Il faut noter qu'une étude récente sur la G6PDH1 catalysant la première réaction du cycle oxydatif de pentoses phosphate a montré une régulation de nature redox de son adressage soit au peroxysome, soit au chloroplaste (Meryer et al., 2011). Par analogie, on peut donc envisager que l'effet d'une modification redox de la 6PGDH1 ne joue pas sur son activité mais détermine plutôt sa localisation sub-cellulaire. On pourrait tester cette hypothèse *in vivo* grâce à des constructions dans lesquelles la protéine, dans des versions sauvage ou mutante pour les Cys 292 et Cys 435 candidates à la régulation redox, serait fusionnée à la « Green Fluorescent Protein ».



**Figure 28: Primary sequence alignment of plastidial G6PDH isoforms from Arabidopsis.** The primary sequences of the 4 plastidial G6PDH isoforms from Arabidopsis (At) were aligned together with the P1-type G6PDH from potato (St). Black arrows indicate the first residue on mature form as predicted in references: Wakao and Benning, 2005 and Wenderoth et al., 1997. Red box: active site signature / G6P binding site. Yellow box: cofactor binding fingerprint sequence. Purple box: Peroxisomal targeting sequence of AtG6PDH1. Regulatory Cys initially identified in potato G6PDH are indicated by red arrows and numbered according to AtG6PDH1. Alignment was made using Clustal W. Accession number: At G6PDH1 (AED94018); At G6PDH2 (AED91851); At G6PDH3 (AEE 30511); At G6PDH4 (AEE28440); St G6PDH P1 (X83923).

## **Régulation redox des glucose-6-phosphate déshydrogénases plastidiales**

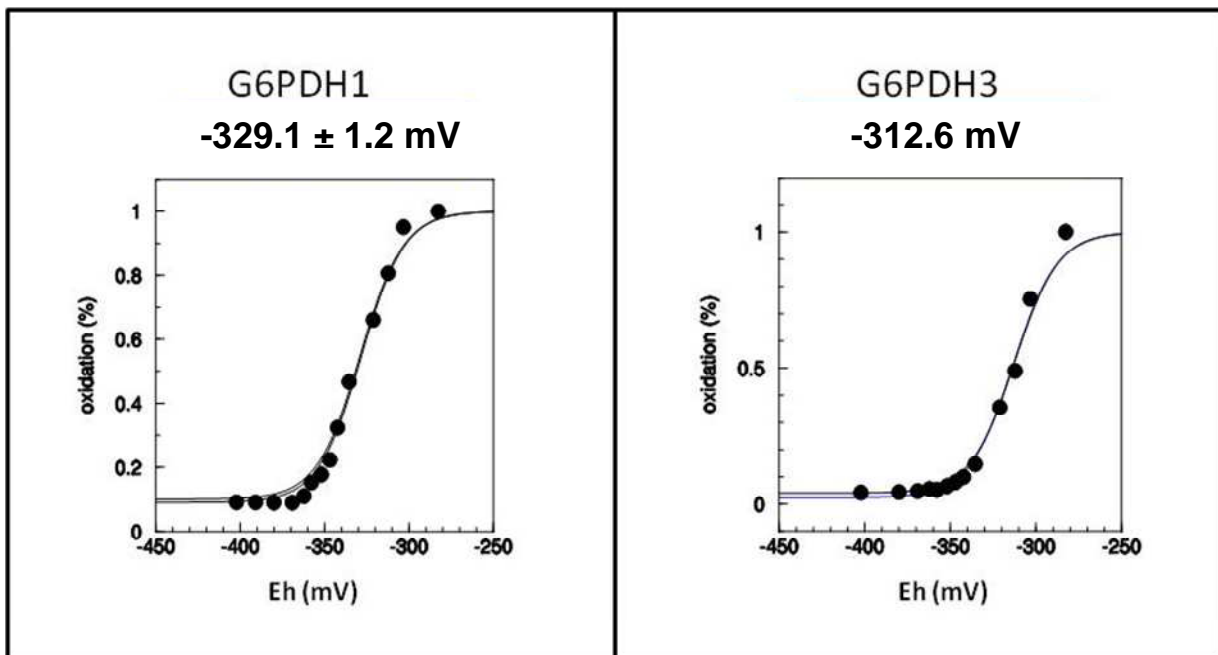
### **Analyse des séquences primaires des 4 G6PDH plastidiales d'Arabidopsis**

L'alignement des séquences en acides aminés des 4 isoformes plastidiales disponibles dans les bases de données a mis en évidence la conservation du site actif consensus des G6PDH (DHVYGKE) au sein de ces protéines à l'exception de l'isoforme G6PDH4 dont le site actif diffère sur 3 des 7 résidus de ce domaine (Cf. figure 28, cadre rouge). De même, le site de liaison du cofacteur NADP<sup>+</sup> (GASGDLA, Séquence consensus GxxGxxA) est conservé entre les différentes isoformes plastidiales à l'exception de la G6PDH4 qui diffère sur 2 des 7 résidus de ce domaine (Cf. figure 28, cadre jaune). Au sein des 4 isoformes de G6PDH d'Arabidopsis, les deux résidus cystéine responsables de la régulation redox (mis en évidence chez la pomme de terre) sont conservés. La G6PDH4, en plus de présenter des divergences ponctuelles dans sa séquence primaire par rapport aux autres isoformes de G6PDH plastidiales, possède également une extension dans sa partie N-terminale.

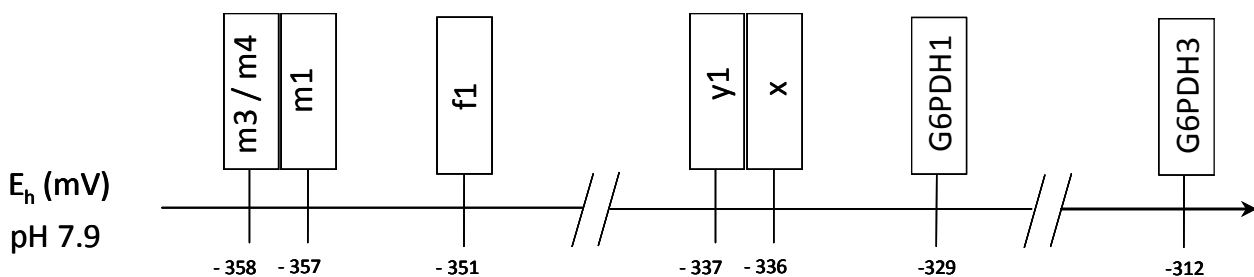
### **Production et purification des G6PDH de type P1 (G6PDH1) et P2 (G6PDH2 et 3)**

Au cours de ce travail de thèse, trois des quatre isoformes de G6PDH plastidiales d'Arabidopsis ont été produites, purifiées et étudiées sous forme de protéines recombinantes obtenues dans la bactérie *E. coli*. Pour cela, des constructions plasmidiques, ont été gracieusement mises à notre disposition par l'équipe du Professeur C. Benning (East Lansing, Michigan State University, USA). Les ADN complémentaires des séquences matures (sans le peptide de transit) des G6PDH ont été exprimés dans le vecteur « pASK-IBA3 plus » qui permet de rajouter en C-terminal de la protéine recombinante une étiquette Strep-tag II. Cette étiquette imite la structure de la biotine, ce qui permet de purifier les protéines recombinantes en 1 seule étape à partir de l'extrait brut de protéines solubles bactériennes, en les immobilisant sur une colonne d'affinité streptavidine (Cf. Matériels et Méthodes).

Les conditions de culture optimales pour la production de l'isoforme G6PDH1 (isoforme de type P1), ont été préalablement déterminées par l'équipe de C. Benning (induction 16 heures à 28°C). Par contre, les conditions de production pour les isoformes de type P2 ont dû être optimisées. Trois conditions de température de culture des bactéries



**Figure 35: Redox titration of chloroplastic Arabidopsis G6PDH1 and G6PDH3.** The percentage of oxidation was determined by measuring G6PDH activity (black circles) after 3 h incubation at 25°C with 20 mM DTT in various dithiol-disulfide ratios (DTTrd/DTTox) at pH 7.9. Interpolation curve (full line) was obtained by non-linear regression of the data using a Nernst equation for 2-electrons exchanged ( $n = 2$ ) and one redox component.



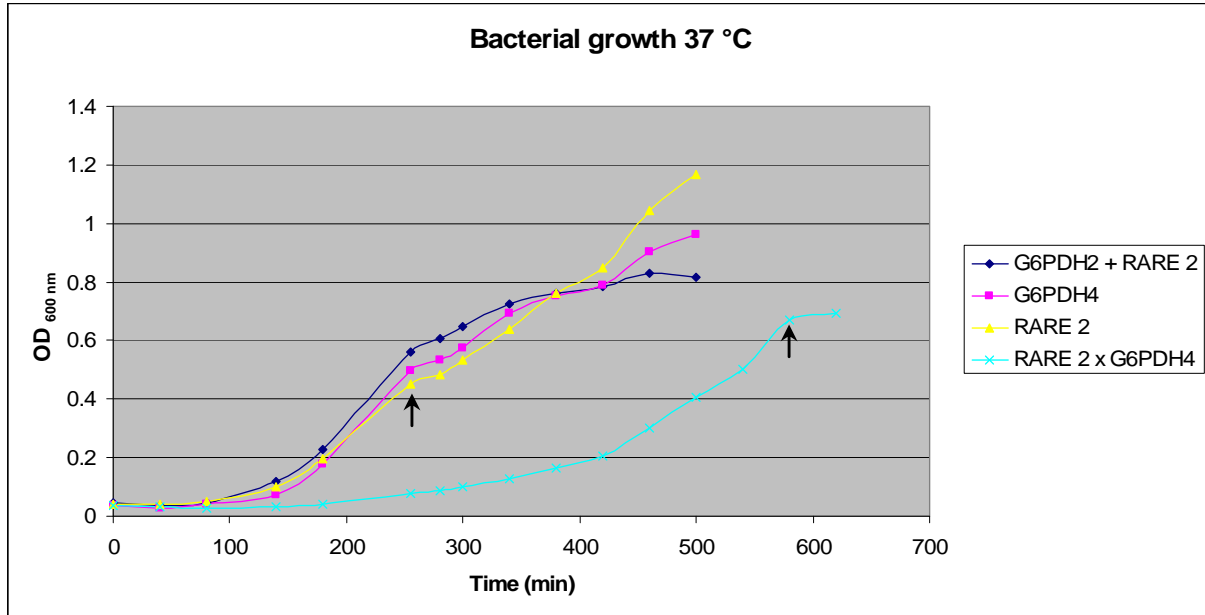
**Figure 36: Redox potentials of Arabidopsis plastidial TRX and G6PDH isoforms.** The redox potentials of one representative for each type of plastidial TRX together with those of G6PDH1 (P1 isoform) and G6PDH3 (P2 isoform) were placed along a scale. Values are given for pH 7.9 corresponding to the pH value of the stroma of chloroplasts in the light.

transformées avec le vecteur d'expression ont été testées après induction (ajout d'anhydrotétracycline à la culture en phase exponentielle de croissance): 23°C, 28°C, 37°C. L'activité de la G6PDH d'*E. coli* n'étant pas redox régulée (Wendt et al., 1999), la détermination de l'effet d'un traitement redox sur l'activité G6PDH extractible dans l'extrait protéique brut a permis de faire une évaluation relative du rendement de production de la protéine recombinante pour les 3 conditions testées. Parmi les 3 conditions de température testées, 23°C semble être la condition la plus favorable pour l'expression des isoformes de type P2 sous une forme soluble et a donc été choisie pour produire les G6PDH2 et 3.

Les rendements protéiques obtenus varient de 6,5 à 0,325 mg par litre de culture bactérienne en fonction des différentes isoformes (Cf. Table 4). Une nette différence de stabilité entre les isoformes a été observée. L'isoforme du type P1 a été bien produite et est relativement stable au stockage à -20°C ainsi qu'après décongélation et dilution. G6PDH2 s'est montrée moins stable. En effet, une diminution de l'activité catalytique a été observée au cours du stockage à -20°C et une totale perte d'activité au bout de 4 à 6 heures après décongélation et dilution d'un échantillon. L'isoforme G6PDH3 présentant les mêmes problèmes de stabilité que G6PDH2 (Wakao et Benning, 2005), le cofacteur oxydé (NADP<sup>+</sup>) a été ajouté lors de l'extraction de la protéine recombinante. Dans ces conditions, cette isoforme a présenté une bonne stabilité au stockage à -20°C ainsi qu'après décongélation et dilution. Cependant cette isoforme est moins stable que G6PDH1.

Après purification, l'homogénéité des préparations protéiques a été évaluée par SDS-PAGE et coloration au bleu de Coomassie. Pour les isoformes G6PDH1 et G6PDH3, un seul polypeptide ayant la taille attendue pour les G6PDH (environ 60 kDa) a été observé indiquant que ces préparations protéiques sont pures. Par contre, pour la préparation de G6PDH2, la proportion de protéine recombinante a été estimée à 50% des protéines dans la préparation finale.

Les 3 isoformes G6PDH1, G6PDH2 et G6PDH3 se sont avérées actives après purification. En sortie de colonne de purification leur activité spécifique a été mesurée à 20,5 ; 29,1 et 6,8 U/mg pour G6PDH 1, 2 et 3, respectivement.

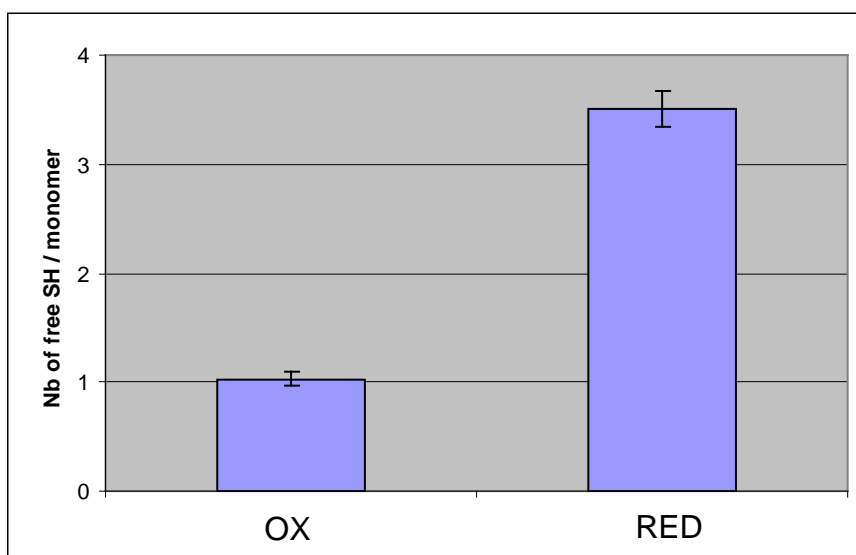


**Figure 29: Effect of recombinant Arabidopsis G6PDH production on bacterial growth.** The growth rate of clones expressing the cDNA of either G6PDH2 or G6PDH4 was followed before and after induction of recombinant protein production. The effect of pRARE2 plasmid compensating for Arg rare codons in *E. coli* on growth rates was examined. The arrows indicate the time of induction by the addition of 2 mg.ml<sup>-1</sup> anhydrotetracycline when the bacterial culture had reached an OD<sub>600nm</sub> 0.5-0.6.



## **Toxicité de l'isoforme G6PDH4 d'Arabidopsis dans la bactérie *E. coli***

Au cours de ce travail, nous avons tenté d'obtenir en système bactérien une quatrième isoforme de G6PDH localisée dans les plastides, nommée G6PDH4. Cette isoforme diffère des autres isoformes plastidiales au niveau des sites de liaison du cofacteur et de fixation du G6P (Cf. ci-dessus), et possède de nombreuses insertions de séquences (Cf. Figure 28). Les rendements de production pour cette isoforme se sont révélés extrêmement faibles, quelle que soit la température de production testée. A 28°C, un rendement de 0,045 mg de protéine recombinante par litre de culture bactérienne a pu être obtenu (Cf. Tableau 4). Une analyse de l'ADNc de G6PDH4 a révélé la présence de nombreux codons rares chez *E. coli*. Une optimisation du rendement de production a donc été tentée par co-transformation des bactéries avec le vecteur d'expression pASK-G6PDH4 et pRARE2 qui code pour plusieurs ARNt rares chez *E. coli* (Cf. Matériels et Méthodes). Contrairement à nos attentes, la co-transformation avec pRARE 2 n'a pas amélioré la production de la G6PDH4 recombinante, et les clones testés ont présenté un net retard de croissance (Cf. figure 29). Ce résultat a suggéré une toxicité de G6PDH4 en système bactérien. En comparant la croissance bactérienne d'un clone co-transformé par pASK-G6PDH 4 + pRARE2 avec celle de clones transformés avec pASK-G6PDH4 ou pRARE2 seul ou encore co-transformé par pASK-G6PDH2 + pRARE2, nous avons pu mettre en évidence que la toxicité apparente de G6PDH4 était spécifique de cette isoforme (Cf. figure 29). On remarque que l'effet de retard de croissance bactérienne est observé pour le clone co-transformé par pASK-G6PDH4 + pRARE2 avant même l'induction de la production de la protéine recombinante et pourrait être dû à la fuite du promoteur qui gouverne l'expression de l'ADNc cloné dans le vecteur pASK (Cf. figure 29). Après induction en présence d'anhydrotétracycline, la croissance bactérienne semble stoppée net. Clairement, ces effets de ralentissement, et probablement d'arrêt de croissance des bactéries, ne sont pas observés pour les autres clones recombinants testés (Cf. figure 29).



**Figure 30: Free SH group titration on G6PDH1 using DTNB.** Protein was first treated by 20 mM reduced DTT or 5 mM diamide. After a desalting step, it was incubated with 1 mM DTNB, and TNB<sup>-</sup> appearance was monitored spectrophotometrically at 412 nm.

	<b>G6PDH1</b>	<b>G6PDH2</b>	<b>G6PDH3</b>
<b>Maximum activity (U.mg<sup>-1</sup>) Oxidized</b>	139.5	39.64	46.9
<b>Initial activity (U.mg<sup>-1</sup>) After purification</b>	20.5 (14.7 % Vmax)	29.65 (74.3 % Vmax)	6.8 (11.7 % Vmax)
<b>Minimum activity (U.mg<sup>-1</sup>) Reduced</b>	11.23 (8.05 % Vmax)	6.63 (6.4% Vmax)	1.7 (3.62 % Vmax)

**Table 5: Effect of redox treatments on the activity of P1 and P2 plastidial G6PDH.** Upper panel shows activity before and after a reducing (20 mM DTT red) or oxidizing (20 mM DTT ox) treatment. Lower panel summarizes G6PDH activities expressed as a percentage of the maximal activity (Vmax) reached after the oxidizing treatment

## **Quantification des thiols libres sur G6PDH1 native**

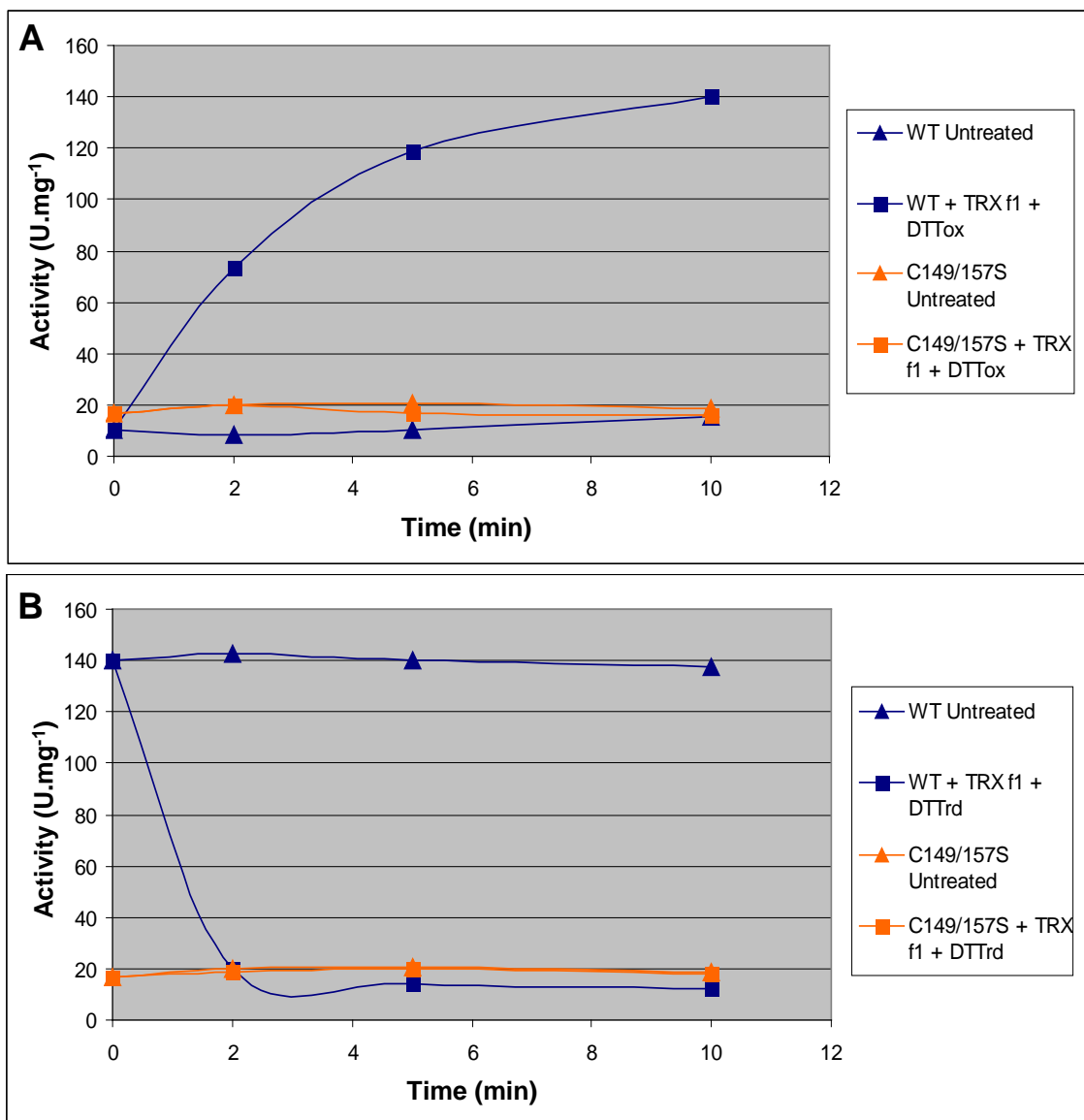
L'accessibilité des résidus cystéine de l'isoforme G6PDH1 a été confirmée par une quantification des thiols sur la protéine native (Cf. figure 30). Une dérivaison chimique des groupements thiols au DTNB a permis de titrer 1 thiol accessible sur la protéine à l'état oxydé, tandis que 3,5 thiols sont dérivés sur la protéine réduite. La réduction faisant apparaître 2,5 thiols par monomère de G6PDH1, cela pourrait correspondre à la réduction du pont disulfure régulateur et possiblement (compte-tenu de la variabilité expérimentale) à la dérivaison d'un autre thiol devenu partiellement accessible. L'apparition de ce thiol partiellement accessible indiquerait un changement de conformation de la protéine entre l'état oxydé et l'état réduit.

## **Caractérisation de la régulation redox de l'activité des G6PDH plastidiales**

L'activité des 3 isoformes G6PDH1, G6PDH2 et G6PDH3 s'est avérée sensible aux traitements redox. Leur activité catalytique maximum (protéine oxydée) et minimum (protéine réduite) a été déterminée après un traitement réducteur ou oxydant en présence de concentrations élevées de DTTred ou DTTox (Cf. figure 31). Les résultats indiquent qu'à l'état réduit l'activité catalytique de ces enzymes ( $V_{min}$ ) représente 8% de l'activité maximale ( $V_{max}$ ) pour l'isoforme G6PDH1 et 6,4% et 3,6% du  $V_{max}$  pour les isoformes G6PDH2 et 3, respectivement. La forte inhibition de l'activité catalytique à l'état réduit indique que la régulation redox post-traductionnelle joue un rôle prépondérant dans le contrôle de l'activité des G6PDH plastidiales d'*Arabidopsis*. De plus, la faible efficacité catalytique en sortie de colonne ( $V_{init}$ ) pour les isoformes G6PDH1 et 3 (14,7% et 14,5% du  $V_{max}$ ) suggère que ces protéines sont produites sous une forme essentiellement réduite dans *E. coli* et ne se ré-oxydent pas spontanément au cours de la purification. En revanche, l'activité de G6PDH2 en sortie de colonne correspond à 74,3% du  $V_{max}$  ce qui suggère que cette isoforme serait plus sensible à l'oxydation que les deux autres isoformes obtenues au cours de ce travail.

## **Validation des résidus cystéine régulatrices par mutagène dirigée**

L'alignement des séquences primaires des 4 isoformes de G6PDH plastidiales d'*Arabidopsis* avec une isoforme de G6PDH plastidiale de pomme de terre (Cf. figure 28) montre que les cystéines régulatrices identifiées chez cette dernière (Wenderoth et al., 1997)

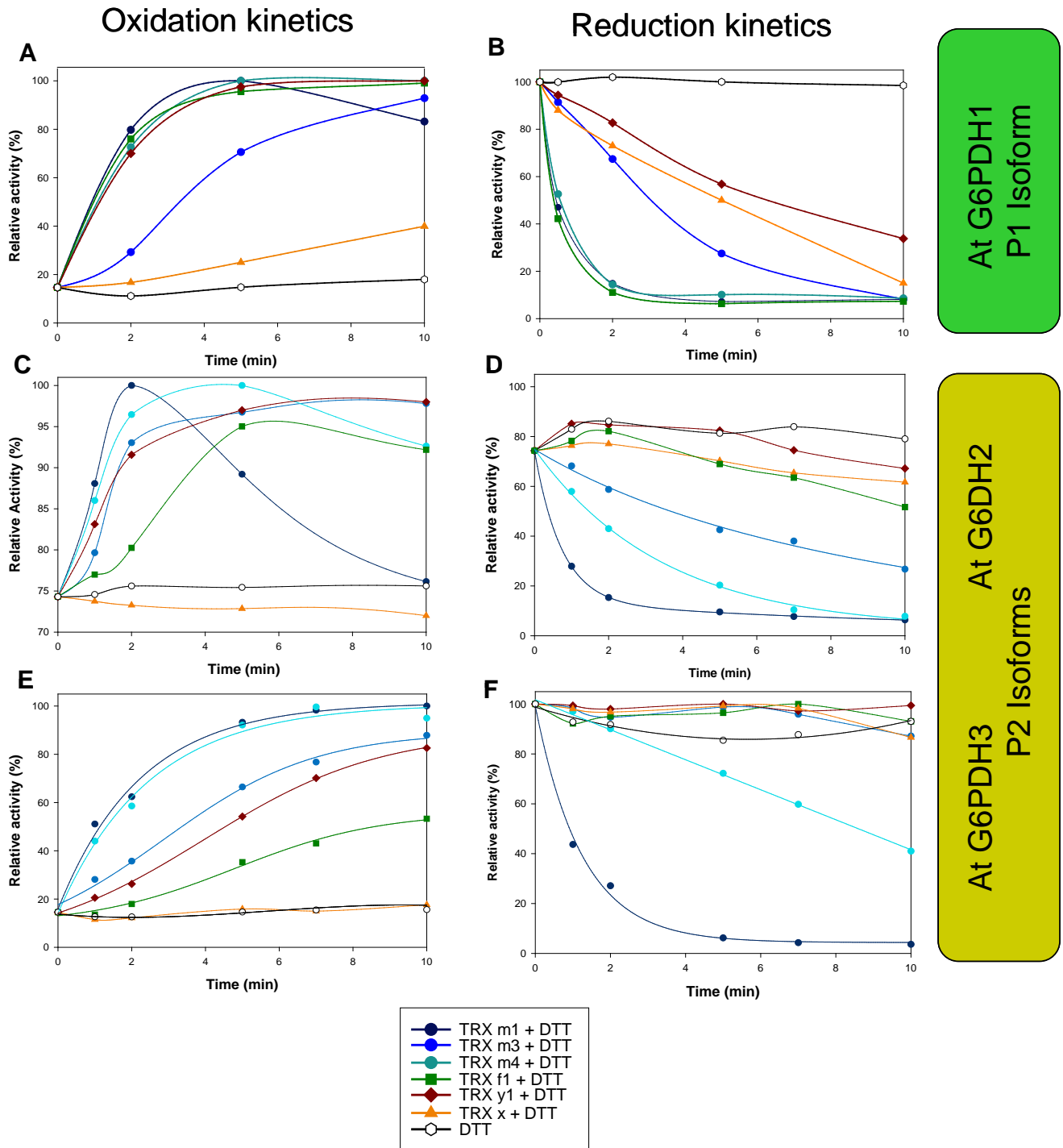


**Figure 31: Effect of the mutation of Cys149 and Cys157 on redox regulation of G6PDH1 activity.** The effect of redox treatments on the activities of wild-type G6PDH1 (WT) and mutant G6PDH1 (C149/157S), where the 2 putative regulatory Cys were replaced by Ser, were compared. (A) effect of reducing treatment. (B) effect of oxidizing treatment.

par mutagenèse dirigée sont conservées chez les quatre isoformes de G6PDH d'Arabidopsis. Pour vérifier que ces résidus sont également le siège de la régulation redox chez les isoformes d'Arabidopsis, une version mutante Cys/Ser 149 et 157 de l'isoforme G6PDH1 a été obtenue par mutagenèse dirigée directement sur le vecteur pASK-G6PDH1 (Cf. Matériels et Méthodes). La protéine mutante a été produite dans les mêmes conditions que la version sauvage de G6PDH1 avec un rendement de production comparable (7,3 mg de protéines par litre de culture bactérienne). Après purification, la pureté de la préparation a été estimée à 100% en SDS-PAGE. En sortie de colonne, l'activité spécifique de la protéine mutante G6PDH1 C149/157S a été estimée à 16 U.mg<sup>-1</sup>, c'est-à-dire très proche de celle de la G6PDH1 sauvage réduite. Des traitements redox (oxydants et réducteurs) modulant l'activité de la G6PDH1 sauvage n'affectent pas l'activité de la version mutante (Cf. figure 31). Ces résultats indiquent que les cystéines régulatrices identifiées chez la pomme de terre et qui sont conservées chez les G6PDH plastidiales, sont le siège de la régulation redox de la G6PDH1 d'Arabidopsis. Leur mutation conduit à une protéine dont l'activité est équivalente à celle de la protéine sauvage réduite, montrant que les Cys 149 et 157 de la G6PDH1 d'Arabidopsis ne sont donc pas impliquées dans la catalyse.

### **Spécificités de régulation redox des G6PDH plastidiales de type P1 et P2**

L'existence de 9 isoformes de TRX et de 4 isoformes de G6PDH localisées dans les plastes suggère des possibilités d'interactions spécifiques. Dans le but de caractériser ces interactions, des cinétiques d'activation (oxydation) et d'inhibition (réduction) pour les 3 isoformes actives après purification ont été réalisées. Chaque isoforme de G6PDH plastidiale a été traitée avec les différentes TRX plastidiales à une concentration constante (10 µM dans le sens de l'oxydation et 1 µM dans le sens de la réduction) en présence d'un oxydant chimique (DTTox 10 mM) ou d'un réducteur chimique (DTTred 1 mM). Ces traitements ont été réalisés à pH 7,9 dans le sens de la réduction et à pH 6,9 dans le sens de l'oxydation pour se placer au pH d'un chloroplaste à la lumière et à l'obscurité respectivement. Chaque cinétique a été répétée un minimum de 2 fois. Parmi les 9 TRX plastidiales d'Arabidopsis, 6 ont été testées : m1, m3, m4, f1, y1, et x. Les TRX f2, m2 et y2 n'ont pas été testées, compte-tenu de leur très forte homologie de séquence avec les TRX f1, m1 et y1, respectivement. Il faut noter que les études précédentes dans le laboratoire n'avaient pas mis en évidence de différences fonctionnelle entre les isoformes très proches en séquence (près de 90% d'identité, voire plus) dans les tests de régulation d'autres cibles des TRX plastidiales (Collin et al., 2003 ; 2004).



**Figure 32: Redox regulation of plastidial G6PDH from Arabidopsis by homologous TRX.** Activities were compared to maximum activity reached after full activation. Oxidation kinetics of G6PDH1 (A), G6PDH2 (C) and G6PDH3 (E) are shown on the left and reduction kinetics of G6PDH1 (B) G6PDH2 (D) and G6PDH3 (F) are shown on the right. For inhibition tests, G6PDH2 preparation was directly used in reduction treatments (D) while G6PDH1 and 3 needed to be oxidized first (B and F).

Les G6PDH recombinantes étant dans un état essentiellement réduit après purification (à l'exception de G6PDH2), les cinétiques en oxydation n'ont pas nécessité de traitement réducteur préalable des cibles. Cependant, pour réaliser les cinétiques dans le sens de la réduction, des protéines préalablement oxydées ont été utilisées pour les isoformes 1 et 3 (Cf. Matériels et Méthodes). L'isoforme G6PDH2, ayant atteint son niveau d'oxydation maximum après quelques jours de stockage à -20°C, n'a pas nécessité de traitement préalable pour réaliser les expériences de réduction.

Après vérification que l'agent oxydant (DTTox) ou réducteur (DTTred) n'était pas capable (aux concentrations utilisées dans nos tests) de réguler l'activité de la cible, l'analyse des cinétiques de réduction et d'oxydation en présence des différentes TRX a montré que les différentes isoformes de G6PDH sont différenciellement régulées par les TRX (Cf. figure 32).

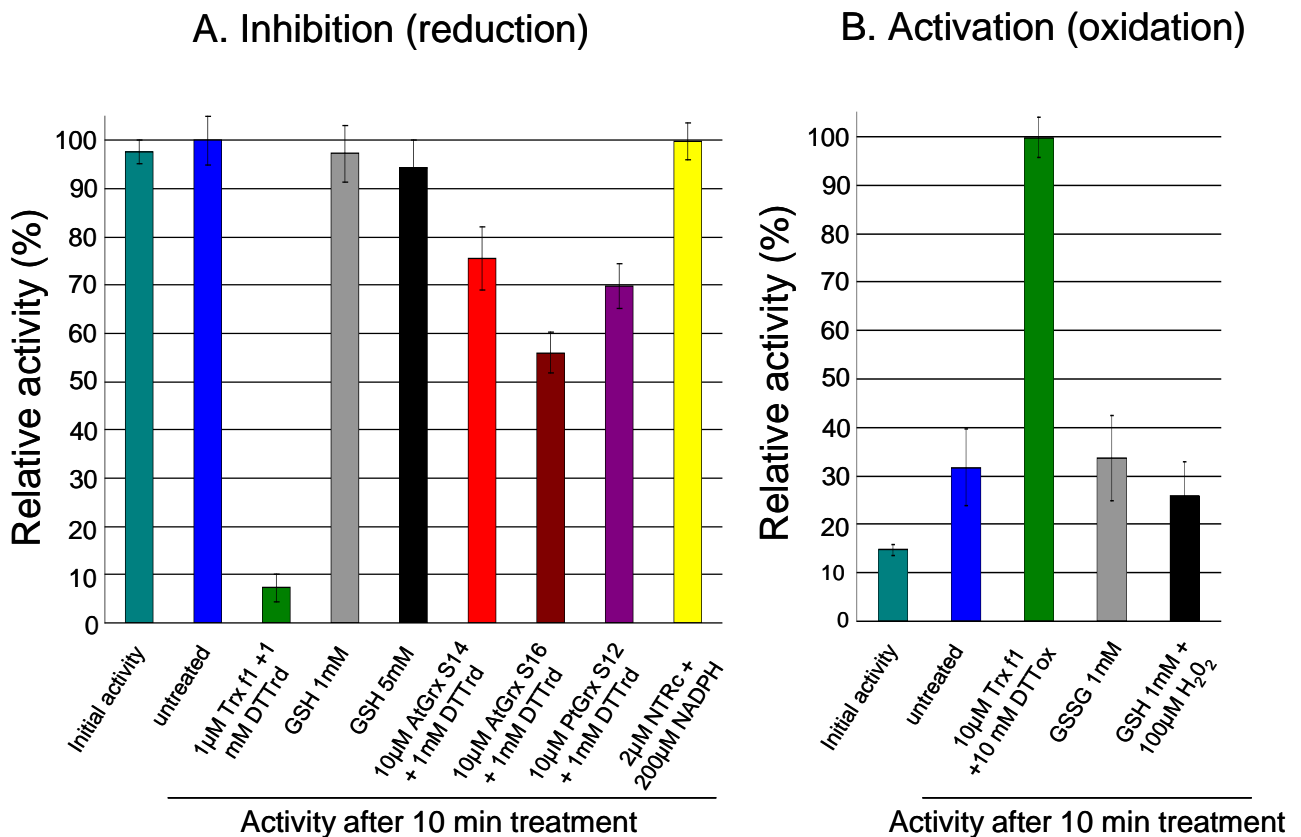
Ainsi, dans le sens de l'activation, les TRX m1, m4, f1, et y1 paraissent les plus efficaces pour oxyder G6PDH1; les isoformes de TRX m3 et x activant moins efficacement l'enzyme (Cf. figure 32 A). Dans le sens de l'inhibition, ce sont les TRX m1, m4, et f1 qui réduisent le plus efficacement la G6PDH1, les isoformes de TRX m3, x et y1 inhibant moins efficacement l'enzyme (Cf. figure 32 B). Nous avons ainsi établi que la TRX m3, dont aucune cible n'était connue à ce jour, est capable d'oxyder et de réduire G6PDH1, mais avec une moindre efficacité que les TRX m1 et m4.

Pour confirmer et préciser les spécificités TRX/G6PDH1 mises en évidence par les analyses d'activation et d'inhibition à concentration constante, les valeurs de demi-saturation ( $S_{0.5}$ ) ont été déterminées. Cette valeur correspond à la concentration en TRX nécessaire pour obtenir 50% de la vitesse initiale d'activation maximum de la cible. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 6 et ont confirmé les spécificités suggérées par les cinétiques à concentration constante. En effet, les TRX les plus efficaces montrent des  $S_{0.5}$  bien plus faibles que les TRX qui se sont montrées les moins efficaces dans les analyses préliminaires. En oxydation par exemple, le  $S_{0.5}$  de la TRX m4, qui active très efficacement G6PDH1, est de 1,1  $\mu\text{M}$ , alors que celui de la TRX x, très peu efficace, est de 29,3  $\mu\text{M}$ . Les mêmes corrélations entre efficacité d'activation et valeur de  $S_{0.5}$  ont été faites dans le sens de la réduction. Ces résultats montrent que les cinétiques d'activation et d'inhibition qui ont été réalisées reflètent bien les efficacités des différentes TRX vis-à-vis de la cible.

Pour les analyses de la régulation redox des G6PDH de type P2, nous avons testé l'efficacité des différentes TRX plastidiales et considéré les résultats obtenus en cinétique à concentration constante comme fiables. Nous avons trouvé que les isoformes de type P2 sont

TRX isoforms	S <sub>0,5</sub> Inhibition (μM)	S <sub>0,5</sub> Activation (μM)
At TRX f1	0.61 ± 0.06	2.67 ± 0.19
At TRX m1	0.64 ± 0.03	1.48 ± 0.16
At TRX m3	1.58 ± 0.01	4.30 ± 0.61
At TRX m4	0.75 ± 0.03	1.10 ± 0.11
At TRX y1	7.27 ± 0.38	2.87 ± 0.06
At TRX x	10.53 ± 0.15	29.25 ± 2.17
Cr TRX h	40.00 ± 2.00	n.d

**Table 6: Half-saturation concentrations of plastidial TRX for G6PDH1 inhibition or activation.** Determinations were done at a constant concentration of AtG6PDH1 (3 μM) incubated with a range of Arabidopsis (At) plastidial or Chlamydomonas (Cr) cytosolic TRX concentrations (from 1 to 600 μM) in the presence of 1 mM DTTred or 10 mM DTTox.



**Figure 33: G6PDH1 redox regulation by redoxins and redox metabolites.** Different redox regulators were tested for inhibition at pH 7.9 (A) or for activation at pH 6.9 (B). G6PDH activity was measured after a 10 min treatment at room temperature. A pre-oxidized preparation of G6PDH1 was used to test inhibition treatments.



préférentiellement régulées par les TRX de type m (Cf. figure 32 C à F). G6PDH2 est rapidement activée par les TRX m1, m3 et m4 (Cf. figure 32 C). Dans le sens de l'inhibition, ce sont les TRX m1 et m4 qui se sont révélées les plus efficaces, m3 étant également capable d'inhiber cette isoforme (Cf. figure 32 D). G6PDH3 est efficacement activée par les TRX m1 et m4 (Cf. figure 32 E). La TRX m3 peut aussi activer cette enzyme avec une efficacité plus faible que les deux autres TRX du type m testées. Seule la TRX m1 est capable de réduire efficacement cette isoforme (Cf. figure 32 F). La TRX m4 peut également réduire G6PDH3, cependant son efficacité est très modérée comparée à celle de l'isoforme m1.

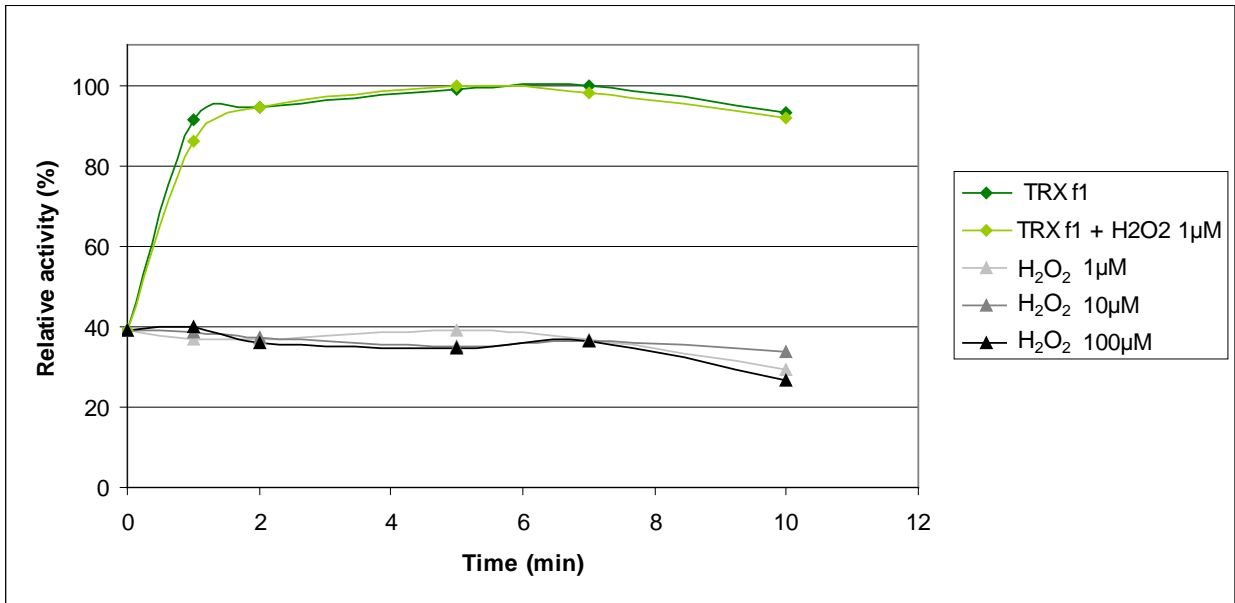
Comme pour l'isoforme du type P1, on note que la TRX x ne régule pas l'activité des G6PDH de type P2 (Cf. figure 32 C à F) et que la TRX y1 est inefficace en réduction alors qu'elle active les trois isoformes (Cf. figure 32). Une différence notable entre isoformes de type P1 et P2 concerne l'efficacité de la TRX f. En effet, alors qu'elle est très efficace pour réguler l'activité de G6PDH1, elle s'est montrée globalement peu ou pas efficace vis-à-vis des isoformes G6PDH2 et G6PDH3.

### **Régulation de G6PDH1 par d'autres rédoxines plastidiales et par les métabolites redox**

La régulation de l'activité G6PDH plastidiale par des métabolites redox, tels que le glutathion réduit (GSH) ou oxydé (GSSG), ou d'autres rédoxines plastidiales telles que les glutarédoxines (GRX) qui sont des homologues structuraux des TRX, ou la NADP thiorédoxine réductase C (NTRc) qui possède un domaine TRX, a été testée en mesurant l'activité de la protéine réduite ou oxydée (Cf. figure 33). Dans le sens de l'inhibition, ni le GSH, ni la NTRc en présence de NADPH, ni les GRX plastidiales S14, S16 d'Arabidopsis (AtGRXS14 ; AtGRXS16) et S12 de peuplier (PtGrxS12) ne sont capables, aux concentrations physiologiques utilisées (1 ou 5 mM de GSH, 2 $\mu$ M NTRc et 10  $\mu$ M GRX), de diminuer l'activité de l'enzyme oxydée.

Dans le sens de l'activation, ni le GSSG, ni le GSH en présence d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ne conduisent à une modification de l'activité de l'enzyme réduite après 10 minutes d'incubation et aux concentrations testées (5 mM GSSG, 1 mM GSH + 100  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

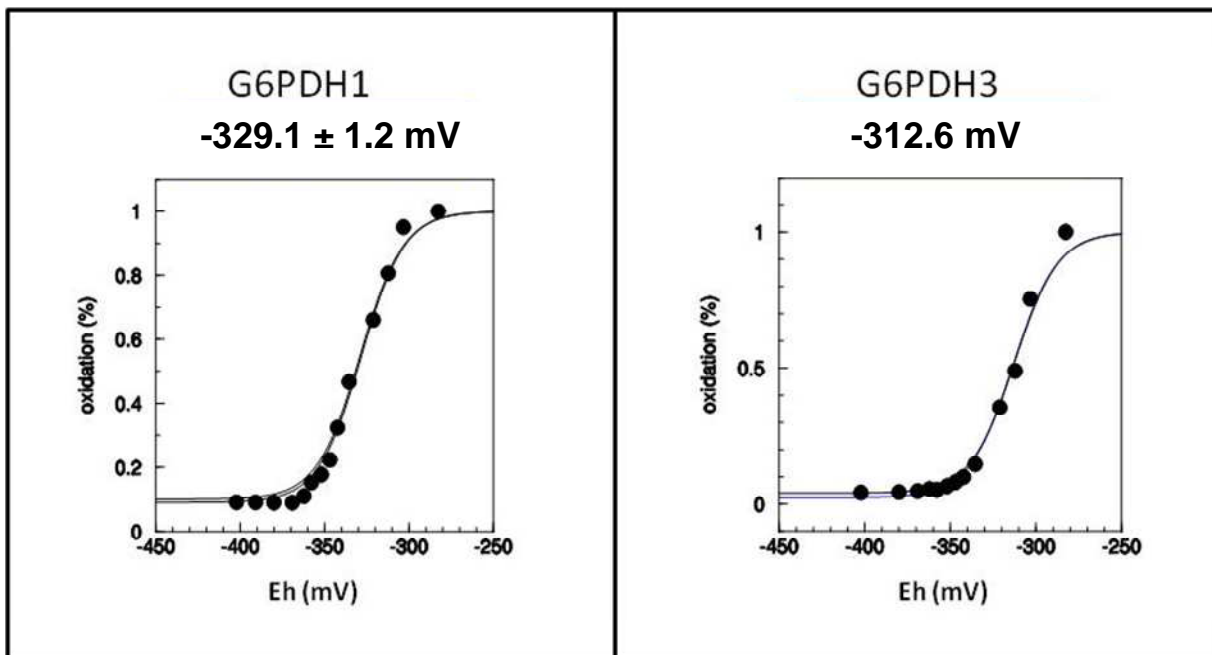
La possibilité d'une activation oxydative des G6PDH plastidiales directement par les formes actives de l'oxygène a été étudiée en mesurant l'activité de la G6PDH1 partiellement



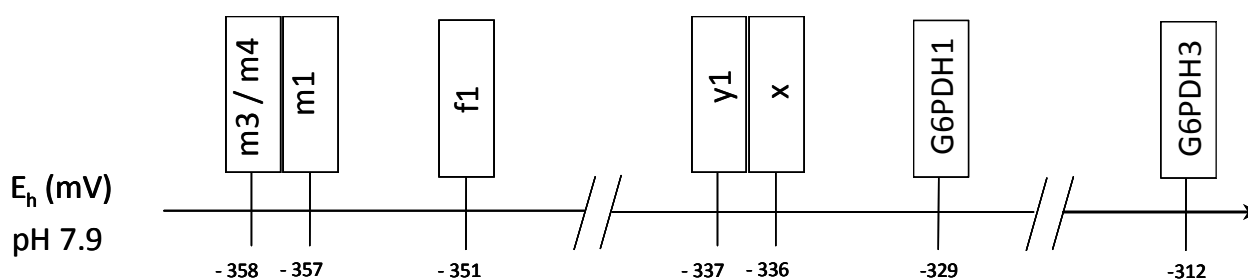
**Figure 34: Effect of hydrogen peroxide on the activity of plastidial G6PDH1.** Activities were compared to maximum activity reached after full activation in presence of oxidized TRX f1.

réduite au cours d'une incubation en présence de différentes concentrations en peroxyde d'hydrogène additionnées ou non de TRX. Les résultats présentés en figure 34 montrent que, même aux concentrations les plus fortes, il n'y a pas d'effet direct de l' $\text{H}_2\text{O}_2$  sur l'activité de l'enzyme. Ce résultat indique que le peroxyde d'hydrogène ne modifie pas l'activité la G6PDH1 et donc n'est pas capable de refermer le pont disulfure régulateur. Par contre, avec 10  $\mu\text{M}$  de TRX f1, en présence ou en absence de 1  $\mu\text{M}$  d' $\text{H}_2\text{O}_2$ , une augmentation de l'activité de G6PDH1 a été mesurée. L'augmentation d'activité est indépendante de la présence d' $\text{H}_2\text{O}_2$  ce qui indique que la préparation de TRX utilisée est essentiellement à l'état oxydé.

Dans leur ensemble, ces résultats indiquent que la régulation redox de l'activité G6PDH chloroplastique est strictement dépendante des TRX.



**Figure 35: Redox titration of chloroplastic Arabidopsis G6PDH1 and G6PDH3.** The percentage of oxidation was determined by measuring G6PDH activity (black circles) after 3 h incubation at 25°C with 20 mM DTT in various dithiol-disulfide ratios (DTTrd/DTTox) at pH 7.9. Interpolation curve (full line) was obtained by non-linear regression of the data using a Nernst equation for 2-electrons exchanged ( $n = 2$ ) and one redox component.

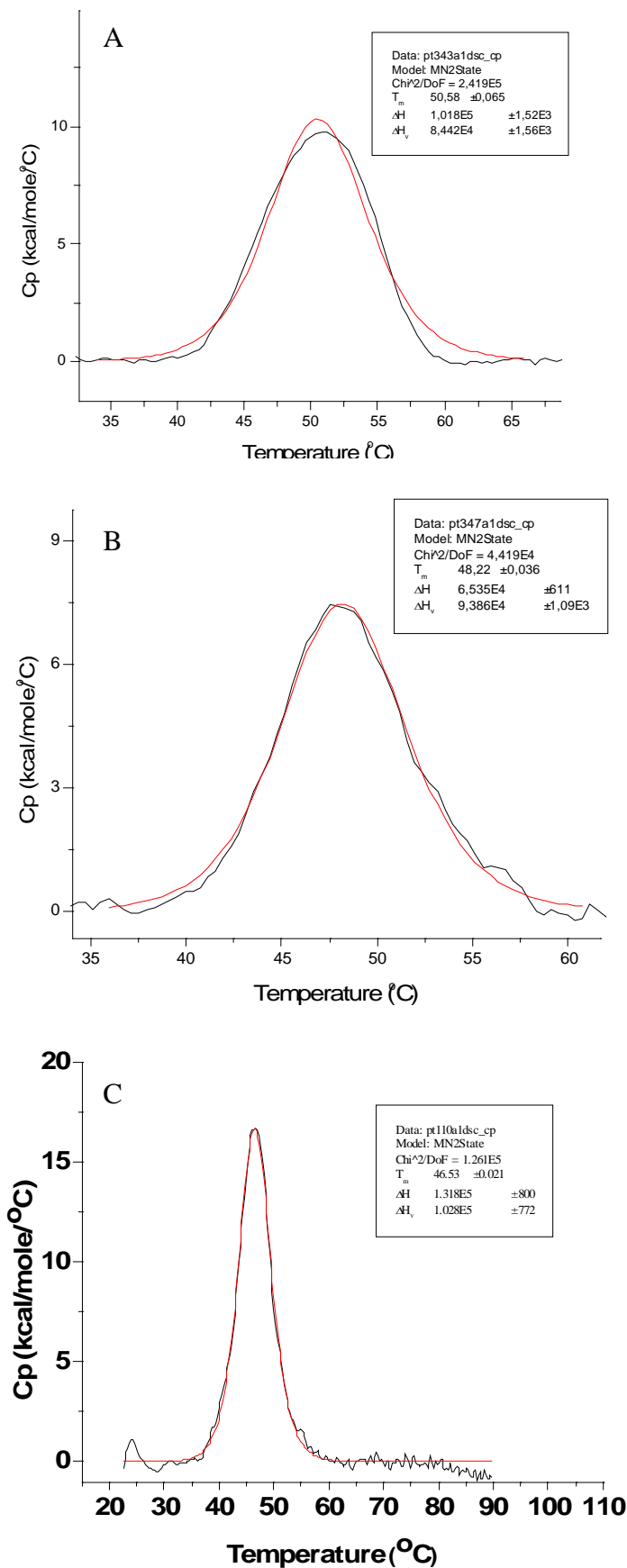


**Figure 36: Redox potentials of Arabidopsis plastidial TRX and G6PDH isoforms.** The redox potentials of one representative for each type of plastidial TRX together with those of G6PDH1 (P1 isoform) and G6PDH3 (P2 isoform) were placed along a scale. Values are given for pH 7.9 corresponding to the pH value of the stroma of chloroplasts in the light.

Au sein de ce site, au moins 10 acides aminés sont importants pour la liaison du NADP<sup>+</sup> parmi lesquels 9 (7 de manière stricte) et 5 (4 de manière stricte) sont conservés pour les isoformes de G6PDH cytosoliques et plastidiales d'Arabidopsis, respectivement (Cf. tableau 8). La G6PDH de *Leuconostoc* ne possède pas ce site structural, et un seul résidu (équivalent à l'Arg357 de l'isoforme humaine) est retrouvé sur l'isoforme de cette bactérie. L'existence de ce site est une question ouverte pour les isoformes de G6PDH plastidiales qui, d'un point de vue phylogénique, semblent plus proches des formes cytosoliques que bactériennes (Wendt et al., 1999). Il a été montré que l'Arg487 de la G6PDH humaine joue un rôle essentiel dans la liaison du cofacteur au site structural. Ce résidu est conservé chez la G6PDH1 d'Arabidopsis (Arg544).

La dyade catalytique faisant intervenir l'His260 et l'Asp200 sur la protéine humaine (résidu His326 et Asp263 sur G6PDH1) est conservée chez toutes les isoformes d'Arabidopsis, de même que l'histidine 201 (His264 sur G6PDH1) et la proline 172 (Pro235 sur G6PDH) dont la conformation *cis* est importante pour la fixation du G6P et le bon positionnement du domaine de fixation du cofacteur catalytique (Kotaka et al., 2005).

Sur le modèle structural de la G6PDH1, les deux cystéines régulatrices confirmées par mutagenèse dirigée (Cys149 et Cys157) sont localisées dans la partie N-terminale à proximité du site de liaison enzymatique du NADP<sup>+</sup> cofacteur (Cf. figure 44). La Cys149 est localisée au sein d'une boucle non structurée présente chez toutes les G6PDH, mais plus longue chez les isoformes de plantes supérieures (insertion de 4 acides aminés pour G6PDH1). La Cys157 se trouve à la jonction avec l'hélice  $\alpha$ 3 qui fait suite à la boucle. La distance entre les deux fonctions thiols de ces deux résidus Cys est estimée à 9 Å. Cette distance est compatible avec la formation d'un pont disulfure si l'on considère, comme suggéré par le modèle, que les deux résidus Cys se trouvent dans une partie non structurée. La TRX pourrait apporter une contrainte structurale favorable au rapprochement des deux thiols, permettant la formation du pont disulfure et donc l'activation. Cet effet n'a pas lieu en présence de peroxyde d'hydrogène ou de DTTox qui ne conduisent pas à l'activation oxydative de la G6PDH1. Un exemple connu d'action locale structurante des TRX sur leur cible est celui de la régulation redox de la sous-unité  $\gamma$  du CF1, l'ATPase chloroplastique. Dans ce cas, l'enzyme s'active suite à la réduction du pont disulfure régulateur qui est facilitée par une action structurante des TRX (Stumpp et al., 1999). Il semble donc que l'action régulatrice des TRX intègre à la fois leur fonction d'oxydo-réductase de pont disulfure et leurs effets structuraux locaux et ce, quel que soit le sens du transfert d'électrons entre les deux partenaires.



**Figure 37: Thermal stability of G6PDH1 measured by Differential Scanning Calorimetry (DSC).** Thermograms of wild-type G6PDH1 either reduced (A), or oxidized G6PDH (B), and mutant G6PDH1 C149S/C157S (C) are shown. Baseline-corrected DSC thermograms of proteins were recorded in the same buffer with a heating rate of 1 K min<sup>-1</sup>. Red lines correspond to the fitting of the experimental data to a single transition.

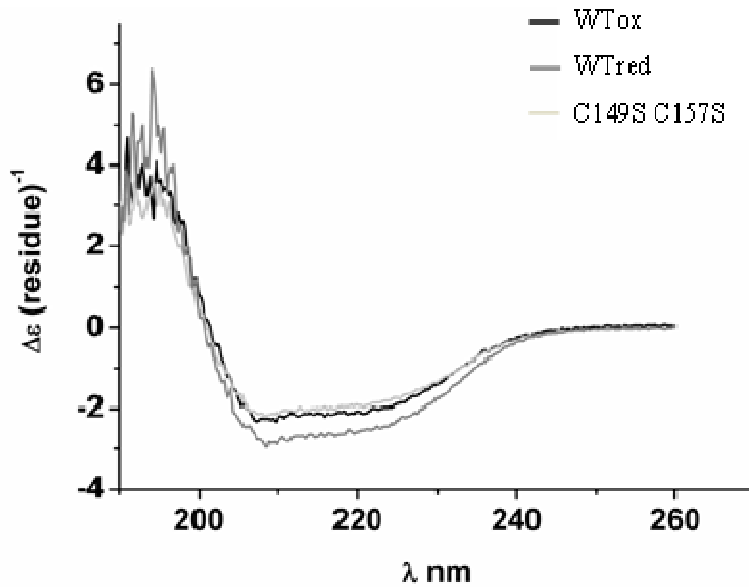
Le modèle suggère que la formation d'un pont disulfure entre les 2 cystéines régulatrices pourrait avoir un effet sur la fixation du cofacteur. L'Arg72 de la G6PDH humaine qui est essentielle pour coordonner le cofacteur NADP<sup>+</sup> enzymatique est conservée chez la G6PDH1 comme chez toutes les isoformes d'Arabidopsis (Arg 131 pour G6PDH1). En effet, l'Arg131 de G6PDH1 est localisée en amont des 2 cystéines régulatrices au sein d'une partie non structurée entre le feuillet  $\beta$ 2 et l'hélice  $\alpha$ 3 (Cf. figure 44). La formation du pont disulfure entre les Cys149 et 157 nécessite leur rapprochement dans l'espace, ce qui implique un mouvement de l'hélice  $\alpha$ 2 et/ou de l'hélice  $\alpha$ 3. L'hélice  $\alpha$ 2 étant de petite taille et se situant entre deux parties non structurées, elle est potentiellement plus mobile que l'hélice  $\alpha$ 3 « fixée » par le feuillet  $\beta$ 3 qui la suit immédiatement. Un mouvement de cette hélice  $\alpha$ 2 aurait pour conséquence directe de déplacer l'Arg131 et donc de modifier les propriétés du site de fixation du coenzyme. Ainsi, la régulation redox de l'activité de la G6PDH1 pourrait passer par un effet indirect sur sa capacité à lier le NADP<sup>+</sup>.

D'autres effets structuraux à distance du pont disulfure influençant le positionnement d'acides aminés importants pour la catalyse ne sont pas à exclure. Par exemple, il est connu que pour la MDH à NADP redox régulée, la réduction du pont disulfure situé en N-terminal conduit à un réarrangement à distance de son site catalytique (Issakidis et al., 1994). Par analogie, dans la G6PDH1, la régulation redox pourrait avoir un effet sur des résidus importants pour la catalyse, tels que His326, Asp263 et His264 impliqués dans le relai de protons ou encore la Pro235 dont la conformation *cis/trans* influence directement la fixation du G6P.

### **Effet de la régulation redox sur la structure quaternaire de la G6PDH1**

Pour étudier l'impact du redox sur la structure quaternaire de la G6PDH1, la masse apparente de la forme réduite et oxydée a été déterminée par chromatographie en tamis moléculaire sur une colonne Superdex 200.

La protéine réduite présente une masse apparente de  $268,79 \pm 15,08$  kDa tandis que la forme oxydée a une masse apparente de  $208,25 \pm 9,60$  kDa. Pour les 2 formes, la masse apparente déterminée correspond à un état d'oligomérisation tetramérique (masse théorique du monomère de la protéine recombinante : 63 kDa). Ce résultat indique qu'aucun changement dans l'état d'oligomérisation n'a lieu suite au changement d'état redox de la protéine. Cependant, un décalage significatif de 60 kDa (15 kDa par monomère) entre les



**Figure 45: Structural analysis of G6PDH1 by circular dichroism spectroscopy.** Wild-type G6PDH1 either oxidized (black) or reduced (gray) as well as mutant C149S/C157S form (light grey) were analyzed. The far-UV spectra shown were measured using a Jasco J-810 spectrometer. G6PDH1 protein samples ( $5 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) were prepared in buffer containing 25 mM  $\text{NaPO}_4$  (pH 7.5) with 2 mM DTT for the reduced sample. Profiles correspond to the mean of 3 measurements corrected for the buffer solution.

	$S_{0.5} \text{ G6P}$ (mM)	Apparent $K_m$ $\text{NADP}^+$ ( $\mu\text{M}$ )	$K_{cat}$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$K_{cat}/K_m \text{ NADP}^+$ ( $\text{min}^{-1}\cdot\mu\text{M}^{-1}$ )
<b>At G6PDH1ox (active)</b>	$3 \pm 0.1$	$32.5 \pm 2.5$	8788.5	270.4
<b>At G6PDH1 red (inhibited)</b>	$15 \pm 0.2$	$61.5 \pm 3.6$	707.5	11.5

**Table 9: Kinetic parameters of G6PDH1 in its reduced and oxidized state.** Kinetic constants correspond to the mean of 3 measurements  $\pm$  SE.

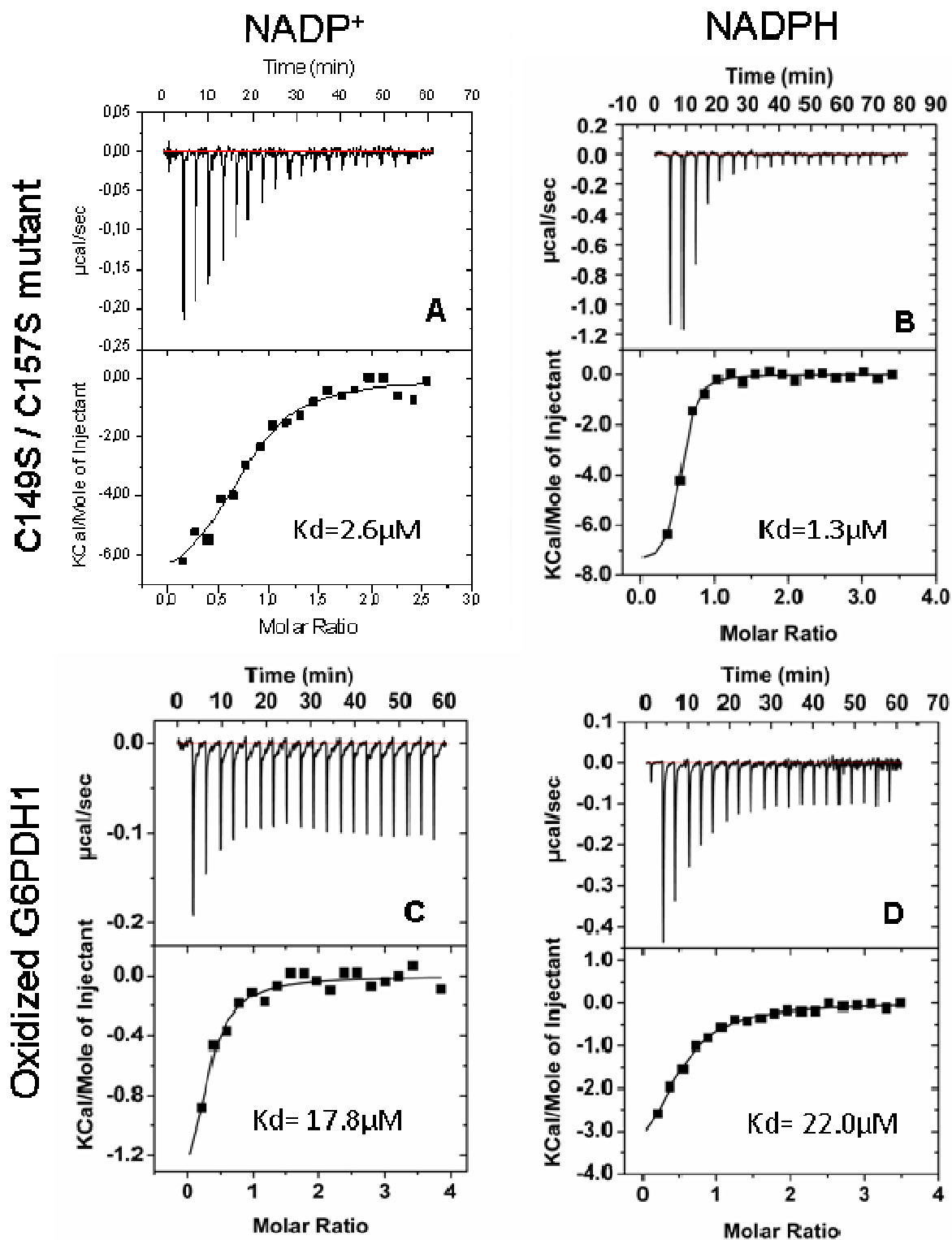


spécificités de régulation observées (TRX f1 très efficace et TRX x inefficace dans la régulation de G6PDH1).

Il est possible que la forte concentration en TRX utilisée au cours de ces expériences, en comparaison aux  $s_{0.5}$  calculés (Cf. Tableau 7), ait « forcé » l'interaction TRX / cible, ne permettant pas de révéler des différences entre les TRX testées.

### **Analyse des spécificités d'interaction TRX / G6PDH par titration en microcalorimétrie isotherme (ITC)**

Pour caractériser plus finement la spécificité d'interaction TRX / cible, nous avons cherché à mesurer en ITC le coefficient d'affinité ( $K_d$ ) de la G6PDH1 pour les 2 TRX utilisées précédemment. Cette technique a permis sur un autre exemple d'interaction TRX/cible, de mettre en évidence la formation d'un complexe de très forte affinité ( $k_d = 126$  pM) entre la TRX de type o et la PRX II F, toutes deux localisées dans les mitochondries (Barranco-Medina et al., 2008). Dans le cas présent de l'étude de l'interaction TRX / G6PDH1 aucun signal d'interaction interprétable n'a pu être enregistré en ITC. L'injection de TRX x ou f oxydée dans la cuve contenant la G6PDH réduite a conduit à une très forte variation d'énergie exothermique dès la première injection, ne correspondant pas à un signal d'interaction (attendu comme endothermique), mais probablement à un signal de transfert d'électrons entre les deux protéines. Ce signal calorimétrique attribué à l'échange dithiol-pont disulfure entre G6PDH et TRX étant de grande amplitude, il est probable qu'il ait masqué le signal de l'interaction protéine-protéine. Pour palier cet artefact expérimental, nous avons utilisé la forme mutante C149S/C157S (Cf. figure 39) pour s'affranchir du signal calorimétrique lié au transfert d'électrons. Cependant, l'utilisation de la forme mutante n'a pas permis de déterminer le  $K_d$  entre la G6PDH et une TRX du type m (m4) ou f (f1), bien que ces deux TRX soient efficaces pour réguler l'activité de l'enzyme (Cf. figure 32 A et B). Ainsi, il semble que, lorsque la TRX joue un rôle de régulateur et non de substrat de réduction (comme c'est le cas pour la TRX o vis-à-vis de la PRX II F), l'interaction TRX / cible soit trop faible pour être analysée en ITC, en tout cas aux concentrations protéiques utilisées, qui sont très supérieures à celles qui permettent de mettre en évidence *in vitro* la régulation redox. Une autre possibilité est que les deux cystéines régulatrices de la cible remplacées par des serines sur la version mutante soient des déterminants majeurs de l'interaction.



**Figure 46: Interaction analysis of G6PDH1 with NADP<sup>+</sup> or NADPH by Isothermal Titration Calorimetry (ITC).** Wild-type (WT) oxidized G6PDH1 or C149S/157S mutant were analyzed. Titrations for the binding of NADP<sup>+</sup> to WT and mutant G6PDH1 are shown in A and C, respectively. Titrations for the binding of NADPH to WT and mutant G6PDH1 are shown in B and D, respectively. The reaction cell was loaded with a solution containing 55 to 88 µM G6PDH1 protein. Twenty injections of 2 µL of 1.25 mM NADP(H) were done every 180 s from a 40 µl syringe. Upper panel: ITC raw data for the repeated injections. Lower panel: Integrated peak areas of the raw data.

Au regard des résultats obtenus en ITC, les décalages de  $T_m$  mesurés en DSC sont probablement liés à l'activité chaperon, déjà connue pour les TRX plastidiales (Sanz-Barrio et al., 2011), qui entre en jeu au cours de la dénaturation thermique. Les analyses en ITC étant menées à 25°C, elles ne révèlent pas l'activité chaperon des TRX.

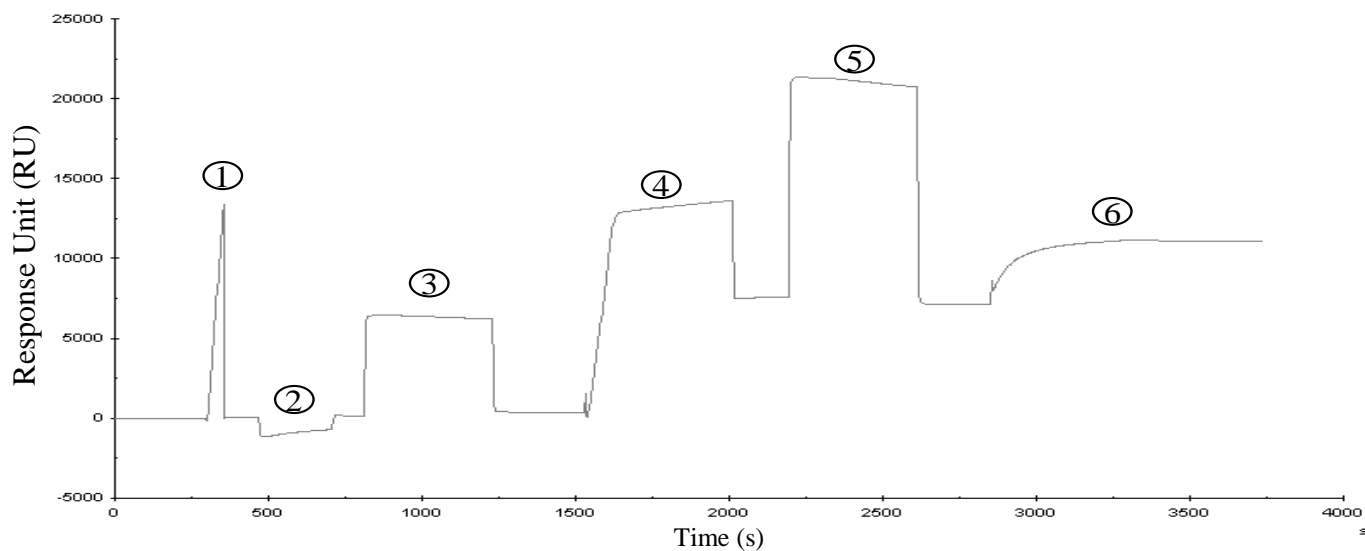
L'étude par microcalorimétrie des interactions TRX / cible ne semble pas adaptée lorsque la TRX est un régulateur et non un substrat de la cible pour des raisons de trop faible affinité, ou de signal parasite lié au transfert d'électrons.

### **Etude de l'interaction TRX / G6PDH en résonance plasmonique de surface (RPS) BIAcore**

L'interaction TRX / cible a également été étudiée en BIAcore au cours de ma thèse. Une puce sur laquelle l'anticorps commercial Strep-Mab Immo a été fixé de façon covalente a été construite. La G6PDH1 a ensuite été fixée et orientée comme ligand sur la puce par l'intermédiaire de l'interaction de l'étiquette Strep tag II, avec l'anticorps. Différentes versions de TRX (sauvages f1, m4 et x ou mutantes monocystéinique y2 et *Chlamydomonas reinhardtii* Crh1) ont été utilisées comme analytes. La figure 40 présente le sensorgramme obtenu pour le chargement de la cellule de flux 1 avec la G6PDH1 sauvage recombinante. Un apport de masse équivalent à une réponse de 3940 RU a été obtenu après injection de 35  $\mu$ L de G6PDH1 à 100  $\mu$ g.ml<sup>-1</sup>. Un apport de masse très similaire (3794 RU) a été obtenu sur la cellule de flux 2 après chargement de la G6PDH1 C149S/C157S en suivant la même procédure. La cellule de flux 3 a été chargée uniquement avec l'anticorps Strep MAB-immo pour mesurer l'apport de masse aspécifique.

Après réduction de l'enzyme sauvage par injection de DTT 10 mM, l'injection de TRX f ou x oxydée n'a pas permis de détecter un apport de masse à la surface de la puce aux concentrations en TRX utilisées (de 50 à 500 $\mu$ M, résultats non montrés). Ce résultat indique que l'interaction TRX / cible est, soit très faible, soit extrêmement labile, et n'a lieu qu'au tout début de l'injection (avant l'oxydation complète de la cible à la surface de la puce). Une autre possibilité est que, dans notre expérience, l'orientation de la G6PDH sur la puce imposée par l'utilisation du Strep tag II, ne permette pas à la zone d'interaction TRX / cible d'être exposée au régulateur.

Pour tester l'hypothèse d'une dissociation liée au changement d'état redox de la cible, les mêmes gammes de TRX f et x ont été injectées sur une cellule de flux chargée en G6PDH

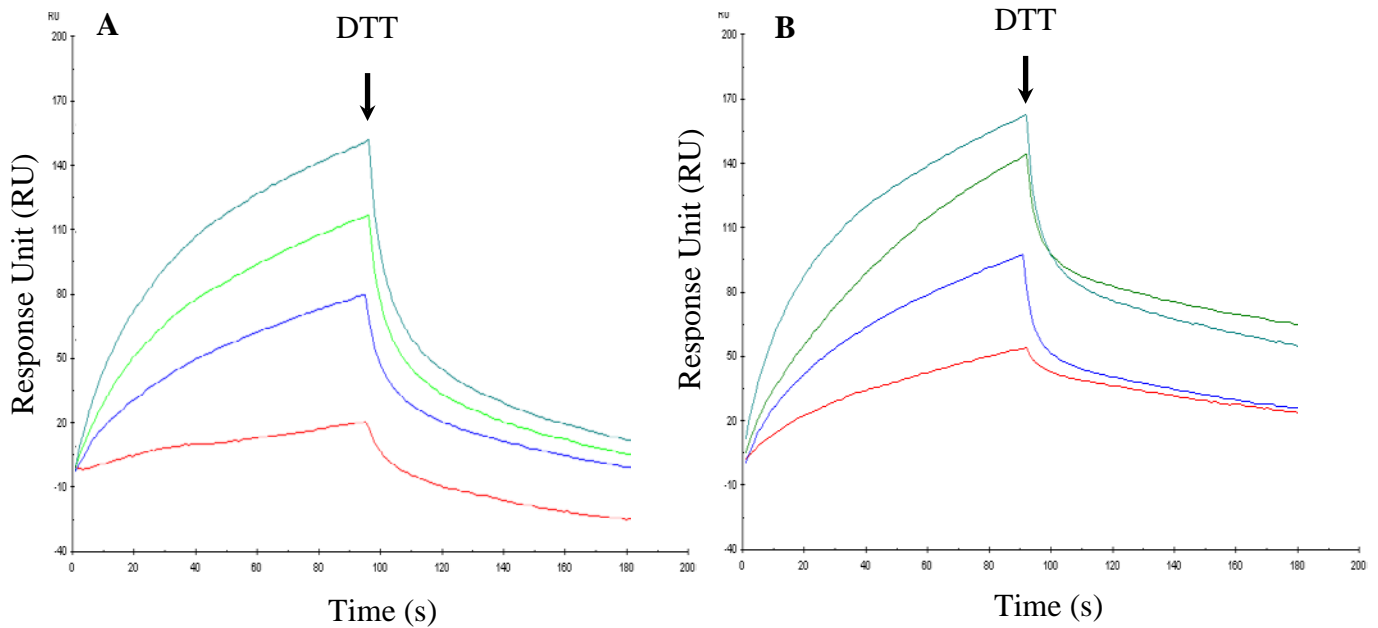


**Figure 40: Sensorgram of the sensorchip building with wild-type or mutant C149S/C157S G6PDH1.** A CM5 type sensorship was used. All injections were performed at a flow rate of  $5 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$  (1) Injection of  $5 \mu\text{L}$  of StrepMAB-Immo diluted to  $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  in 10 mM sodium acetate pH 5. (2) Washing of the CM5 surface by injection of  $35 \mu\text{L}$  of 10mM Glycine at pH 2. (3) Activation of the CM5 surface by  $35 \mu\text{L}$  of EDC : NHS. (4) Immobilisation of 7157 RU of StrepMAB-Immo by a  $35\mu\text{L}$  injection of the solution at  $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  in 10 mM sodium acetate pH 5. (5) Deactivation of excessive reactive groups by injection of  $35 \mu\text{L}$  of ethanolamine. (6) Immobilization of 3940 RU of wild-type G6PDH1 by injection of  $35 \mu\text{L}$  at  $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  (Flow cell 1). A similar sensorgram was obtained for immobilization of 3794 RU of mutant C149S/C157S G6PDH1 (Flow cell 2) (not shown). Reference flow cell 3 free was prepared as Fc1 and 2 except that no G6PDH1 protein was loaded (not shown).

mutante. Dans ce cas également, aucun apport de masse révélateur d'une interaction n'a pu être enregistré (résultat non montré). ceci indique que les deux partenaires ont une interaction très faible ou, comme précédemment évoqué pour les résultats obtenus en ITC, que les cystéines régulatrices sont des déterminants majeurs de l'interaction.

Pour tester l'hypothèse d'une orientation défavorable de la G6PDH à la surface de la puce pour l'interaction avec une TRX, deux TRX monocystéiniques ont été testées (TRX y2 C33S d'*Arabidopsis* et TRX h1 C39S de *Chlamydomonas*). La mutation de la deuxième Cys du site actif des TRX n'empêche pas l'attaque nucléophile primaire du pont disulfure régulateur de la cible par la première Cys. Cette mutation permet de stabiliser l'interaction TRX / cible par le pont disulfure mixte. Une gamme de concentrations de TRX monocystéinique a été injectée à la surface de la puce chargée en G6DPH sauvage préalablement traitée par 0,5 mM de DTNB. Les résultats présentés en figure 41 montrent un apport de masse proportionnel à la concentration de TRX injectée indiquant une interaction stable entre la cible oxydée et la TRX monocystéinique. Une interaction entre les deux protéines est donc possible. L'orientation de la G6PDH à la surface de la puce est donc telle que ses sites d'interaction avec une TRX sont accessibles. La dissociation de la G6PDH et de la TRX monocystéinique est obtenue après injection de 2 mM de DTT réduit, indiquant que l'interaction fait intervenir un pont disulfure intermoléculaire entre les deux protéines, comme attendu. L'injection de TRX y2 C33S à la surface de la cellule 2 chargée en G6PDH1 C149S/C157S n'a pas permis de détecter un apport de masse, révélateur d'une interaction (résultat non montré).

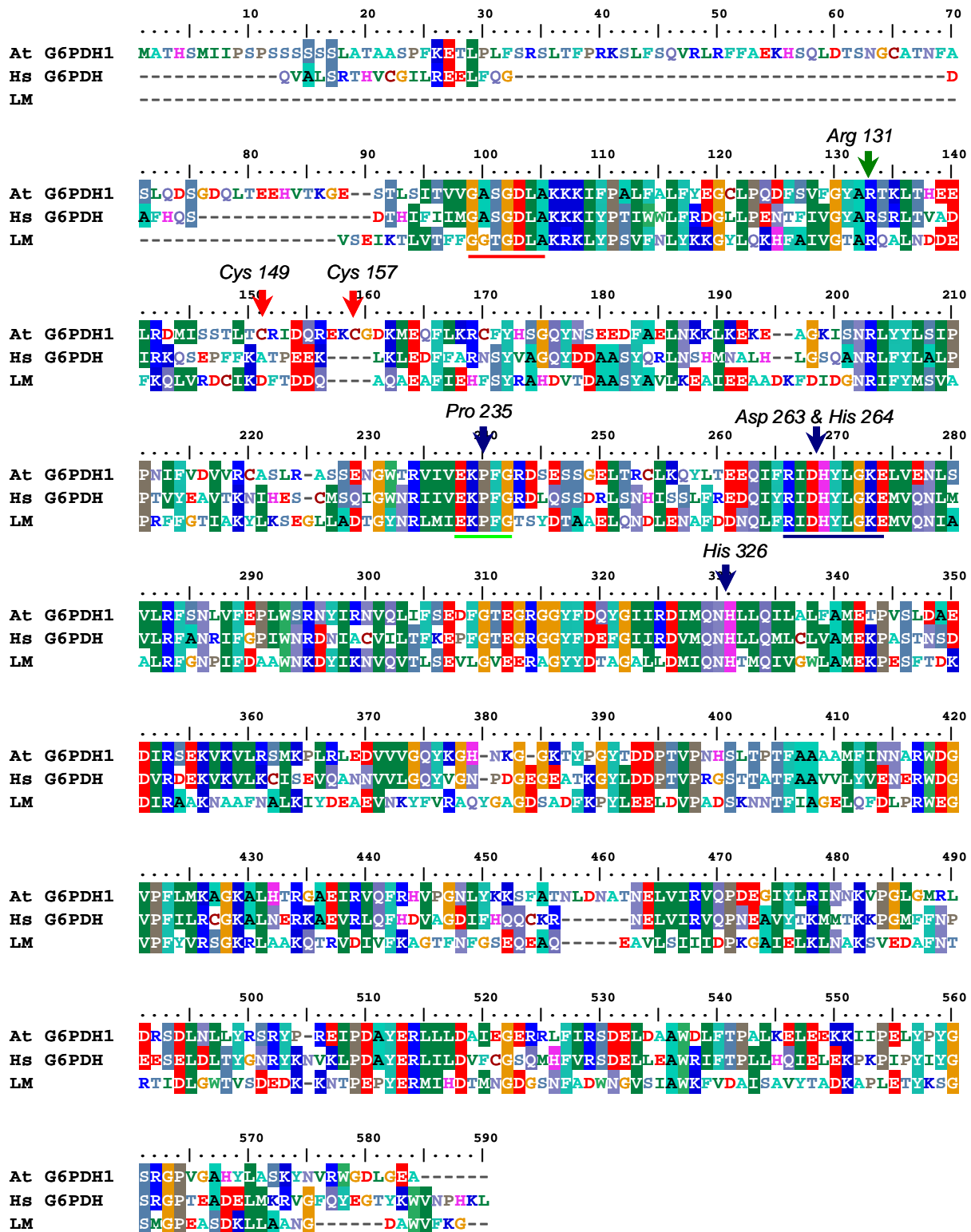
Pour savoir si l'utilisation de mutants monocystéiniques de TRX dans nos mesures de RPS avec la G6PDH pouvait révéler des spécificités d'interaction TRX /cible, une autre TRX monocystéinique disponible au laboratoire, la TRX h1 C39S de *Chlamydomonas reinhardtii* a été utilisée. Cette TRX est un très mauvais réducteur de la G6PDH1 puisque son  $s_{0,5}$  en réduction a été estimé à 40  $\mu$ M, celui d'une TRX y étant d'environ 7  $\mu$ M. La TRX h1 C39S a été injectée à la surface de la puce chargée en G6PDH1 sauvage pré-oxydée par le DTNB (Cf. figure 41 B). Les cinétiques d'association obtenues sont très comparables à celles observées pour la TRX y2 C33S. Par contre, il est intéressant de noter que pour la TRX h1 l'injection de 2 mM de DTT réduit ne permet pas de revenir à la ligne de base du signal de RPS et donc de dissocier complètement le complexe TRX / cible, ce qui est pourtant le cas pour la TRX y. Cette différence pourrait indiquer que le pont disulfure mixte entre la G6PDH et la TRX h1 C39S est plus difficile à réduire que dans le cas de la TRX y2 C33S.



**Figure 41: Interaction analysis of G6PDH1 with TRX using SPR. Binding of wild-type G6PDH1 with monocysteine TRX.** Binding analysis of wild-type G6PDH1 with monocysteine mutant forms of Arabidopsis TRX y2 (C33S) (A) and Chlamydomonas TRX h1 (C39S) (B). All injections were performed at a flow rate of  $50 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ . G6PDH1 immobilized on the sensor surface was oxidized with  $30 \mu\text{L}$  of  $0.5 \text{ mM}$  DTNB (not shown). Then,  $75 \mu\text{L}$  of the analyte (TRX at various concentrations:  $20 \mu\text{M}$  in red;  $40 \mu\text{M}$  in blue;  $60 \mu\text{M}$  in green; and  $80 \mu\text{M}$  in turquoise blue) in running buffer were injected and immediately followed by injection of  $75 \mu\text{L}$  of a  $2 \text{ mM}$  DTT (reduced) solution as indicated by the arrow. The sensorgrams show the response difference between the flow cell with G6PDH1 loaded and the reference flow cell (Fc1-Fc3).

Dans leur ensemble, les analyses en RPS révèlent que la présence des cystéines régulatrices sur la cible est essentielle pour l'interaction avec une TRX.

La spécificité TRX / cible ne semble pas pouvoir être étudiée par cette technique en utilisant des protéines sauvages, de par l'impossibilité de mesurer la formation du complexe qui fait intervenir un pont disulfure intermoléculaire de nature labile.



**Figure 42: Sequence alignment of chloroplastic *Arabidopsis*, human and *Leuconostoc* G6PDH.** Fingerprint sequence of catalytic NADP<sup>+</sup> binding site is underlined in red. The consensus active site sequence in underlined in blue. EKPxG sequence conserved in all G6PDH is underlined in green. Red arrows indicate the 2 Cys residues specifically involved in the redox regulation of plastidial isoforms. Blue arrows show strictly conserved residues directly involved in catalysis according to Kotaka et al., 2005 and Cosgrove et al., 1997. The green arrow shows Arg131 residue that coordinates NADP in the cofactor binding domain. Accession numbers are: AAA63175 for human variant (Hs), AAA25265 for *Leuconostoc mesentroides* (Lm), AED94018 for *A. thaliana* (At) G6PDH1.



## **Etude des effets de la régulation redox sur les propriétés de la G6PDH1**

L'étude de l'impact de la régulation redox des G6PDH sur la catalyse a également été abordée au cours de ce travail de thèse. Pour des raisons pratiques, la G6PDH1 a été choisie comme isoforme modèle, de par son rendement élevé de production et sa bonne stabilité à la conservation et à la dilution.

### **Alignement des séquences primaires des G6PDH d'Arabidopsis avec les isoformes de structure connue et modélisation structurale de G6PDH1**

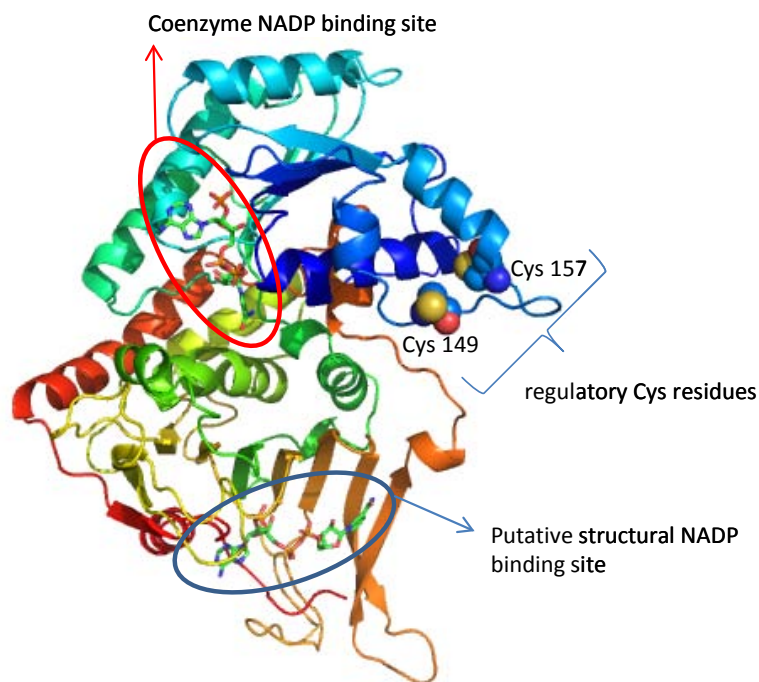
Dans les banques de données structurales, plusieurs structures sont disponibles, correspondant soit à l'isoforme bactérienne de *Leuconostoc* soit à des variants d'une isoforme humaine. L'isoforme plastidiale redox régulée G6PDH1 d'Arabidopsis présente une identité de séquence de 28% et 47%, respectivement avec ces isoformes. Un alignement des acides aminés des trois protéines est présenté en figure 42.

Un modèle structural de l'isoforme G6PDH1 d'Arabidopsis a été construit grâce au logiciel SWISS MODEL (<http://swissmodel.expasy.org/>) sur la base de la structure de la G6PDH humaine cristallisée en présence de NADP<sup>+</sup> (accession PDB : 2BH9). Grâce au logiciel SSM (<http://www.ebi.ac.uk/msd-srv/ssm/>) une autre structure obtenue en présence de G6P (accession PDB : 2BHL) a permis de positionner le substrat au sein du modèle de la G6PDH1 d'Arabidopsis. Une représentation globale du monomère de l'enzyme est présentée en figure 43.

L'alignement de séquences montre que les 3 motifs très conservés chez les G6PDH : (i) le motif de fixation du NADP<sup>+</sup> catalytique : GxxGxxA (résidu 97 à 104 sur G6PDH1), (ii) la séquence consensus : RIDHYLGKE (résidu 264 à 272 sur G6PDH1) et (iii) le motif EKPxG (résidu 236 à 240 sur G6PDH1), sont également très conservés chez G6PDH1. Ces motifs sont également présents dans les autres isoformes plastidiales de G6PDH d'Arabidopsis, à l'exception de l'isoforme G6PDH4 dont la séquence consensus et le motif de fixation du cofacteur diffèrent sur 3 des 7, et 2 des 5 résidus de ces domaines, respectivement (Cf. figure 22). Ces différences peuvent expliquer l'absence d'activité G6PDH constatée pour G6PDH4 (Meyer et al., 2011). Il a été montré que la G6PDH humaine possède un deuxième site de liaison du NADP<sup>+</sup> où le cofacteur joue un rôle structural (Au et al., 2000).

Residue on Hs G6PDH	Conserved on At G6PDH1	Conserved on At cytosolic G6PDH	Conserved on Lm G6PDH
Lys238	no K>S	no (similar) K>R	no
Arg357	no (similar) R>K	no (similar) R>K	yes
Lys366	no R>G	yes	no
Arg 370	yes	yes	no
Arg393	yes	yes	no
Tyr 401	yes	yes	no
Asp421	no D>N	yes	no
Arg487	yes	yes	no
Tyr503	no Y>W	no	no
Trp509	no W>A	yes	no

**Table 8: Conservation of residues constituting the structural NADP binding site found in eukaryotic type G6PDH in Arabidopsis G6PDH isoforms.** Analysis was based on the alignment of all six G6PDH from *A. thaliana* (At), with human (Hs) G6PDH and *Leucosostoc Mesentroides* (Lm) G6PDH. Accession numbers for Hs, Lm and At plastidial G6PDH are given in legends of figures 27 and 43. Accession numbers for At cytosolic G6PDH are: AEE77291 for G6PDH5 and AED94591 for G6PDH6

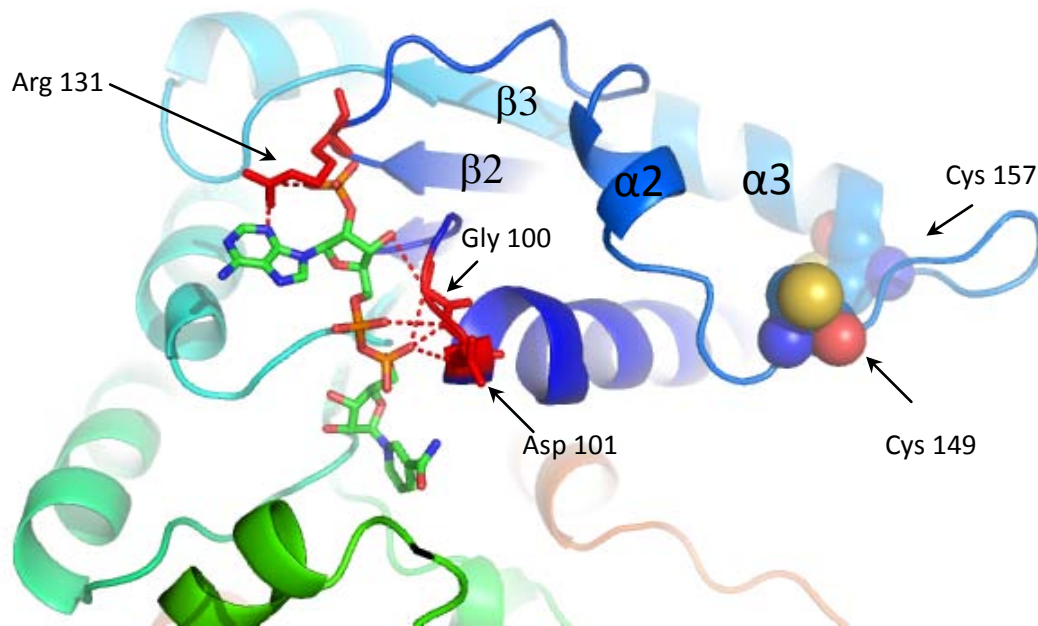


**Figure 43: Cartoon representation of the modelled Arabidopsis G6PDH1 monomer.** The model was built using online available software swiss model (<http://swissmodel.expasy.org/>) based on the known structure of human G6PDH, crystallized in the presence of 2 molecules of NADP (PDB entry 2BH9), sharing 47% identity with Arabidopsis G6PDH1. Regulatory Cys residues are labelled and shown as spheres.

Au sein de ce site, au moins 10 acides aminés sont importants pour la liaison du NADP<sup>+</sup> parmi lesquels 9 (7 de manière stricte) et 5 (4 de manière stricte) sont conservés pour les isoformes de G6PDH cytosoliques et plastidiales d'Arabidopsis, respectivement (Cf. tableau 8). La G6PDH de *Leuconostoc* ne possède pas ce site structural, et un seul résidu (équivalent à l'Arg357 de l'isoforme humaine) est retrouvé sur l'isoforme de cette bactérie. L'existence de ce site est une question ouverte pour les isoformes de G6PDH plastidiales qui, d'un point de vue phylogénique, semblent plus proches des formes cytosoliques que bactériennes (Wendt et al., 1999). Il a été montré que l'Arg487 de la G6PDH humaine joue un rôle essentiel dans la liaison du cofacteur au site structural. Ce résidu est conservé chez la G6PDH1 d'Arabidopsis (Arg544).

La dyade catalytique faisant intervenir l'His260 et l'Asp200 sur la protéine humaine (résidu His326 et Asp263 sur G6PDH1) est conservée chez toutes les isoformes d'Arabidopsis, de même que l'histidine 201 (His264 sur G6PDH1) et la proline 172 (Pro235 sur G6PDH) dont la conformation *cis* est importante pour la fixation du G6P et le bon positionnement du domaine de fixation du cofacteur catalytique (Kotaka et al., 2005).

Sur le modèle structural de la G6PDH1, les deux cystéines régulatrices confirmées par mutagenèse dirigée (Cys149 et Cys157) sont localisées dans la partie N-terminale à proximité du site de liaison enzymatique du NADP<sup>+</sup> cofacteur (Cf. figure 44). La Cys149 est localisée au sein d'une boucle non structurée présente chez toutes les G6PDH, mais plus longue chez les isoformes de plantes supérieures (insertion de 4 acides aminés pour G6PDH1). La Cys157 se trouve à la jonction avec l'hélice  $\alpha 3$  qui fait suite à la boucle. La distance entre les deux fonctions thiols de ces deux résidus Cys est estimée à 9 Å. Cette distance est compatible avec la formation d'un pont disulfure si l'on considère, comme suggéré par le modèle, que les deux résidus Cys se trouvent dans une partie non structurée. La TRX pourrait apporter une contrainte structurale favorable au rapprochement des deux thiols, permettant la formation du pont disulfure et donc l'activation. Cet effet n'a pas lieu en présence de peroxyde d'hydrogène ou de DTTox qui ne conduisent pas à l'activation oxydative de la G6PDH1. Un exemple connu d'action locale structurante des TRX sur leur cible est celui de la régulation redox de la sous-unité  $\gamma$  du CF1, l'ATPase chloroplastique. Dans ce cas, l'enzyme s'active suite à la réduction du pont disulfure régulateur qui est facilitée par une action structurante des TRX (Stumpp et al., 1999). Il semble donc que l'action régulatrice des TRX intègre à la fois leur fonction d'oxydo-réductase de pont disulfure et leurs effets structuraux locaux et ce, quel que soit le sens du transfert d'électrons entre les deux partenaires.



**Figure 44: Detail of the cofactor binding site in modelled G6PDH1 structure.** Details about building of the model are given in legend of figure 44. Regulatory Cys residues are labelled and shown as spheres. Secondary structures ( $\alpha$  helices and  $\beta$ -sheets) mentioned in the text are labelled. Residues involved in NADP coordination in the cofactor binding site (including Arg131) are shown as red sticks and interactions are shown by dashed lines.

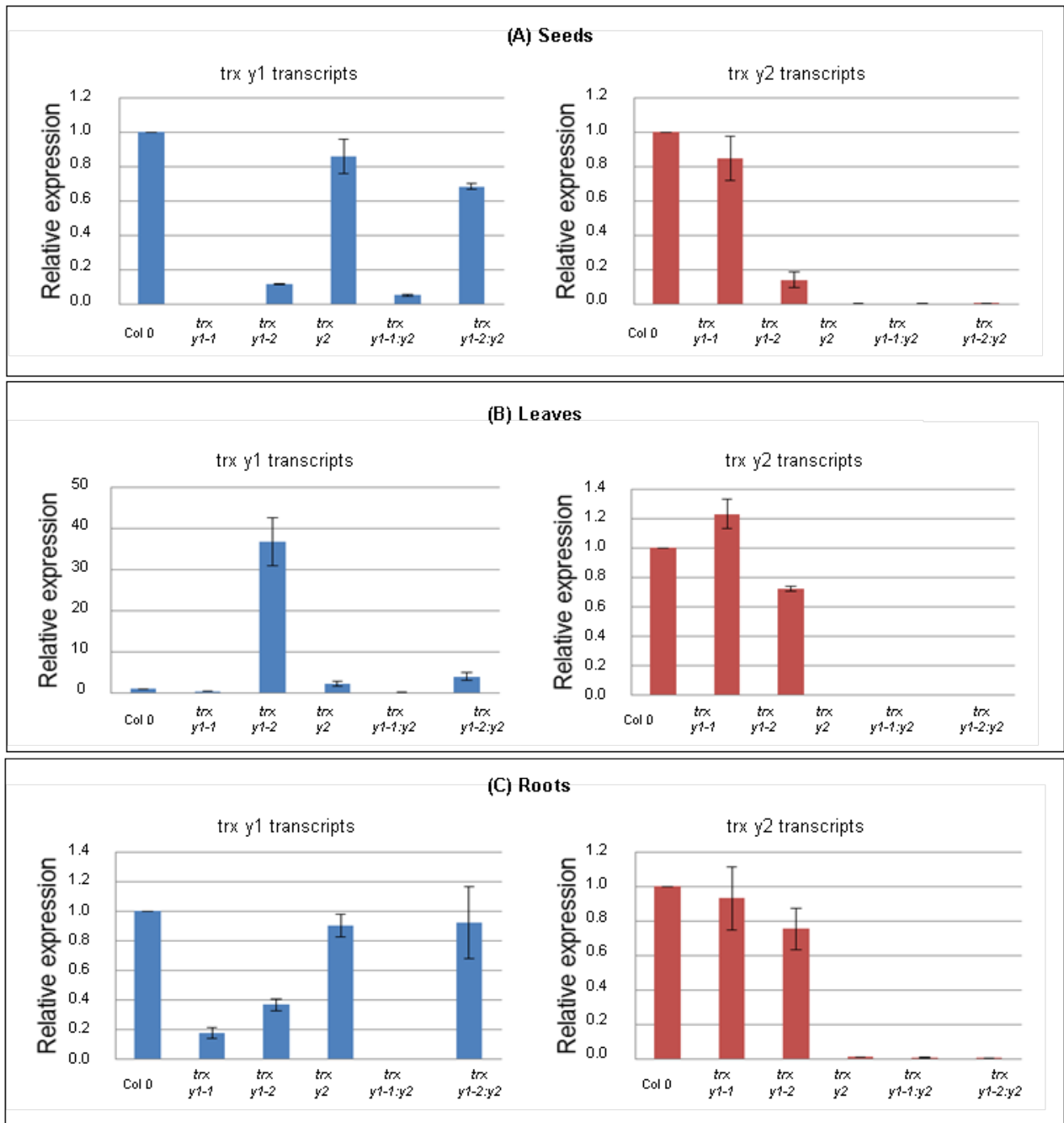
Le modèle suggère que la formation d'un pont disulfure entre les 2 cystéines régulatrices pourrait avoir un effet sur la fixation du cofacteur. L'Arg72 de la G6PDH humaine qui est essentielle pour coordonner le cofacteur NADP<sup>+</sup> enzymatique est conservée chez la G6PDH1 comme chez toutes les isoformes d'Arabidopsis (Arg 131 pour G6PDH1). En effet, l'Arg131 de G6PDH1 est localisée en amont des 2 cystéines régulatrices au sein d'une partie non structurée entre le feuillet  $\beta$ 2 et l'hélice  $\alpha$ 3 (Cf. figure 44). La formation du pont disulfure entre les Cys149 et 157 nécessite leur rapprochement dans l'espace, ce qui implique un mouvement de l'hélice  $\alpha$ 2 et/ou de l'hélice  $\alpha$ 3. L'hélice  $\alpha$ 2 étant de petite taille et se situant entre deux parties non structurées, elle est potentiellement plus mobile que l'hélice  $\alpha$ 3 « fixée » par le feuillet  $\beta$ 3 qui la suit immédiatement. Un mouvement de cette hélice  $\alpha$ 2 aurait pour conséquence directe de déplacer l'Arg131 et donc de modifier les propriétés du site de fixation du coenzyme. Ainsi, la régulation redox de l'activité de la G6PDH1 pourrait passer par un effet indirect sur sa capacité à lier le NADP<sup>+</sup>.

D'autres effets structuraux à distance du pont disulfure influençant le positionnement d'acides aminés importants pour la catalyse ne sont pas à exclure. Par exemple, il est connu que pour la MDH à NADP redox régulée, la réduction du pont disulfure situé en N-terminal conduit à un réarrangement à distance de son site catalytique (Issakidis et al., 1994). Par analogie, dans la G6PDH1, la régulation redox pourrait avoir un effet sur des résidus importants pour la catalyse, tels que His326, Asp263 et His264 impliqués dans le relai de protons ou encore la Pro235 dont la conformation *cis/trans* influence directement la fixation du G6P.

### **Effet de la régulation redox sur la structure quaternaire de la G6PDH1**

Pour étudier l'impact du redox sur la structure quaternaire de la G6PDH1, la masse apparente de la forme réduite et oxydée a été déterminée par chromatographie en tamis moléculaire sur une colonne Superdex 200.

La protéine réduite présente une masse apparente de  $268,79 \pm 15,08$  kDa tandis que la forme oxydée a une masse apparente de  $208,25 \pm 9,60$  kDa. Pour les 2 formes, la masse apparente déterminée correspond à un état d'oligomérisation tetramérique (masse théorique du monomère de la protéine recombinante : 63 kDa). Ce résultat indique qu'aucun changement dans l'état d'oligomérisation n'a lieu suite au changement d'état redox de la protéine. Cependant, un décalage significatif de 60 kDa (15 kDa par monomère) entre les



**Figure 53: Transcript abundance of *trx y1* and *y2* genes in wild-type and *trx y* mutant plants analyzed by real time RT-PCR.** Transcript levels were analyzed in seeds (A), leaves (B), and roots (C). Data were normalized to protein phosphatase 2A gene (PP2A) and calibrated with the transcript level in wild-type (Col 0). Means  $\pm$  SD of triplicate experiments are shown.

formes oxydée et réduite suggère que la structure de la protéine subit des modifications en lien avec l'état redox. La forme oxydée ayant une masse apparente plus faible aurait une structure plus compacte que la forme réduite.

### **Détermination de la composition en structures secondaires des formes oxydées et réduites de G6PDH1**

L'impact de la régulation redox de la G6PDH1 sur sa composition en hélices  $\alpha$  et en feuillet  $\beta$  a été étudié en dichroïsme circulaire. Les résultats obtenus présentés en figure 45 montrent que les spectres des 3 formes analysées (oxydée, réduite, ou mutante) sont parfaitement superposables. La régulation redox n'a donc aucun impact sur la structure secondaire de l'enzyme. Le décalage important de masse apparente mis en évidence par chromatographie (15 kDa par monomère) ne correspond donc pas à la (dé)-structuration de domaines protéiques, mais à un réarrangement de ces domaines les uns par rapport aux autres.

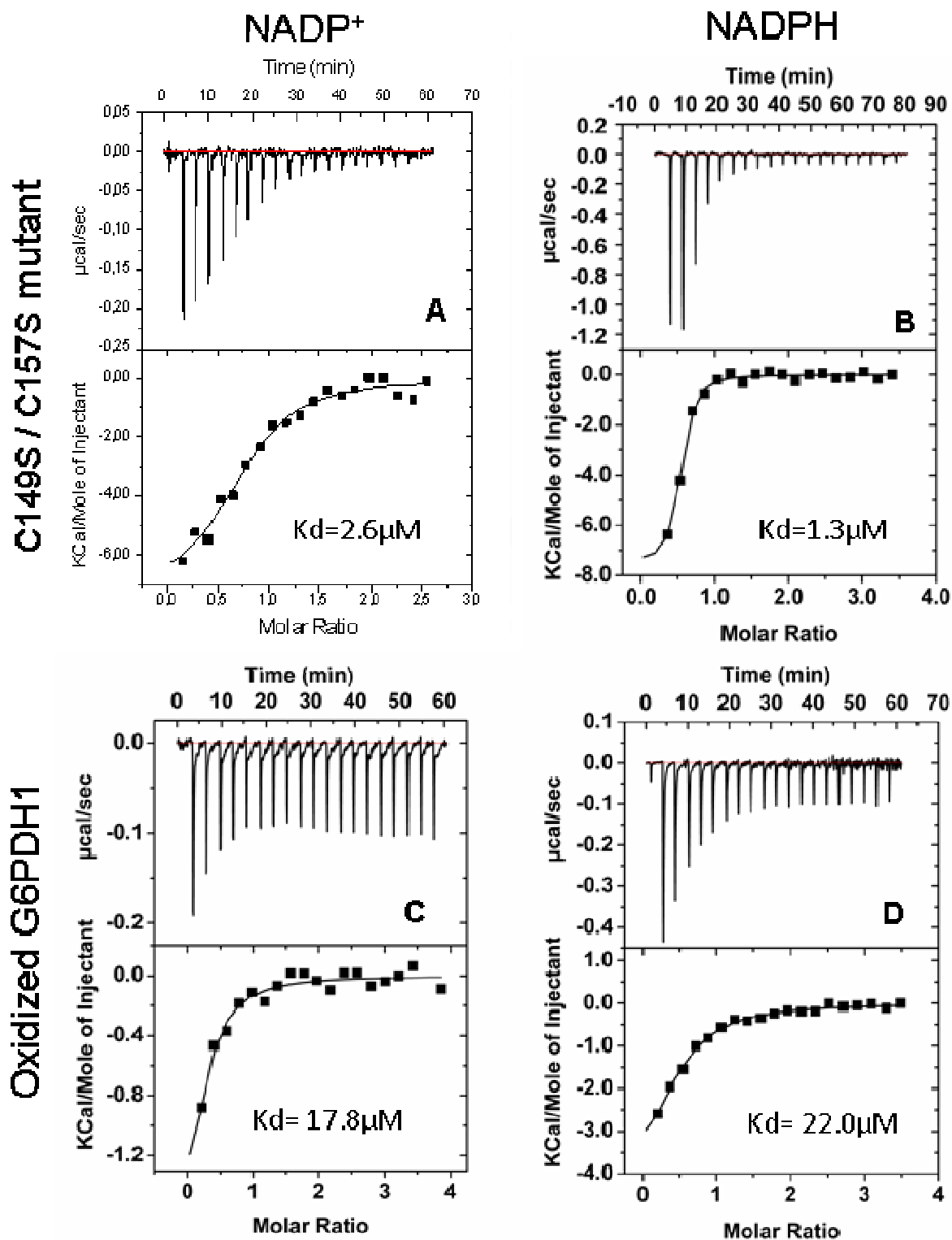
### **Détermination de constantes catalytiques pour les formes oxydées et réduites**

Les  $K_m$  apparents pour les 2 substrats ont été mesurés pour la G6PDH1 à l'état réduit ou oxydé. Les courbes de saturation obtenues pour le G6P étant d'allure sigmoïdale (non Michaelienne) la valeur déterminée pour ce substrat correspond à la concentration de demi-saturation ( $V_{max}/2$ ). Pour le  $NADP^+$ , des  $K_m$  apparents ont été mesurés. Les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau 9.

L'activité catalytique ( $k_{cat}$ ) de l'enzyme est 12 fois plus élevée pour la forme oxydée que la forme réduite. En condition saturante pour les deux substrats, la présence du pont disulfure régulateur conduit donc à une meilleure efficacité de conversion des substrats en produits.

Des valeurs de  $S_{0.5}$  pour le G6P et de  $K_m$  apparent pour le  $NADP^+$  plus élevées ont été mesurées pour la forme réduite, ce qui suggère que l'affinité de l'enzyme pour ses substrats, et/ou l'utilisation de ceux-ci, est meilleure lorsque l'enzyme est oxydée.

De meilleurs  $S_{0.5}$  pour le G6P et le  $K_m$  apparent pour le  $NADP^+$  pourraient correspondre à un site actif plus accessible dans la forme oxydée en comparaison à la forme réduite. Le changement structural faisant suite à l'oxydation pourrait conférer à l'enzyme une



**Figure 46: Interaction analysis of G6PDH1 with NADP<sup>+</sup> or NADPH by Isothermal Titration Calorimetry (ITC).** Wild-type (WT) oxidized G6PDH1 or C149S/157S mutant were analyzed. Titrations for the binding of NADP<sup>+</sup> to WT and mutant G6PDH1 are shown in A and C, respectively. Titrations for the binding of NADPH to WT and mutant G6PDH1 are shown in B and D, respectively. The reaction cell was loaded with a solution containing 55 to 88 µM G6PDH1 protein. Twenty injections of 2 µL of 1.25 mM NADP(H) were done every 180 s from a 40 µl syringe. Upper panel: ITC raw data for the repeated injections. Lower panel: Integrated peak areas of the raw data.



conformation plus efficace pour l'utilisation des substrats indépendamment de leurs affinités respectives.

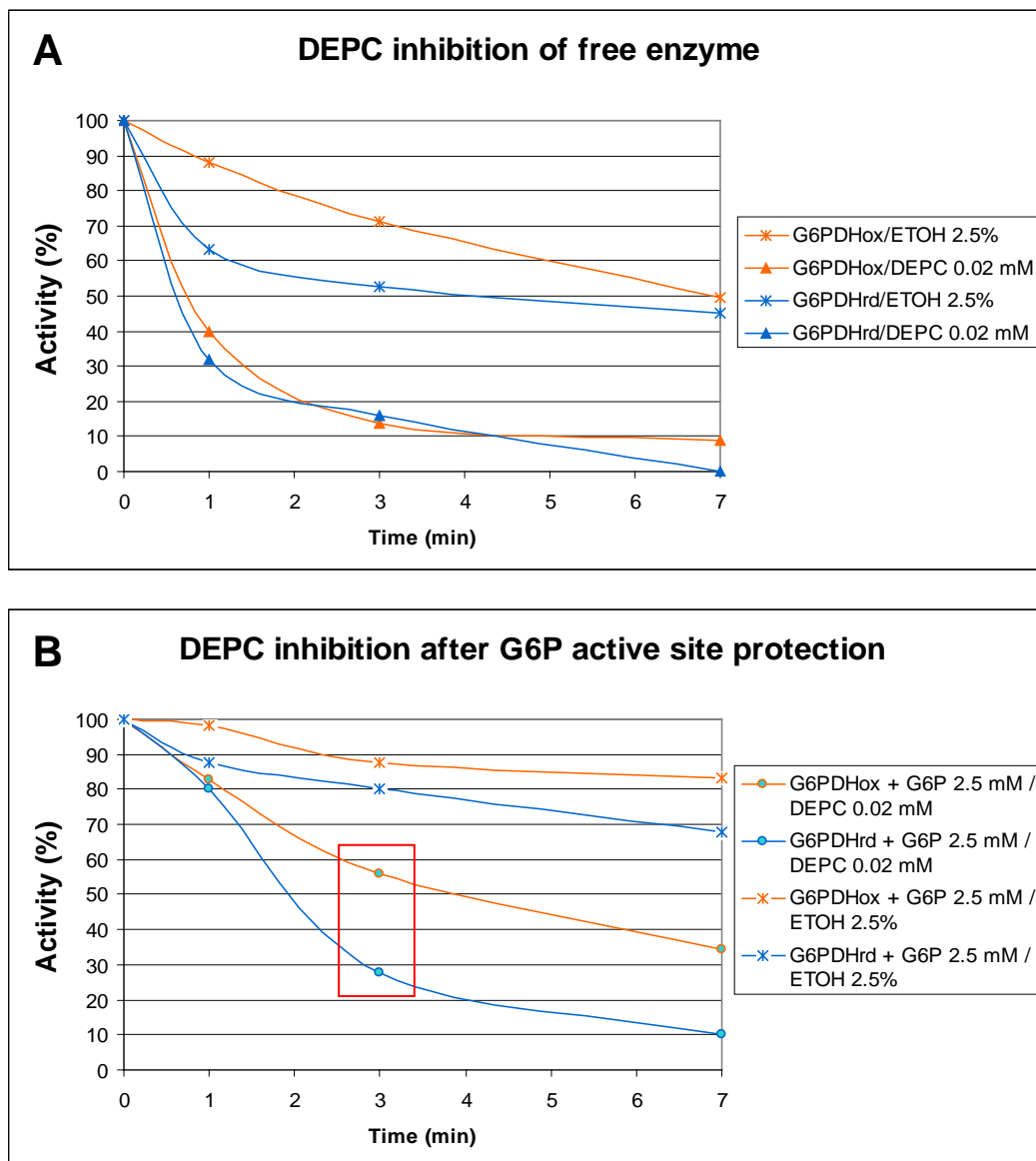
Le rapport  $k_{cat}/K_m$  apparent  $NADP^+$  est environ vingt fois plus élevé pour la forme oxydée que pour la forme réduite. Ce résultat indique que l'enzyme oxydée utilise le  $NADP^+$  bien plus efficacement.

### **Mesure du coefficient d'affinité (Kd) pour le NADP des formes sauvage oxydée et mutante de la G6PDH1 par Calorimétrie de Titration Isotherme (ITC)**

La différence de  $K_m$  apparent pour le cofacteur entre les formes réduite et oxydée de l'enzyme suggère un effet de la régulation redox sur l'affinité pour le NADP. L'affinité pour le  $NADP^+$  ou le NADPH a été déterminée par titration ITC des formes sauvage oxydée et mutante de G6PDH1. Les thermogrammes obtenus et les constantes d'affinité calculées sont présentés en figure 46.

Toutes les titrations ont montré une seule transition thermique indiquant qu'un seul site de liaison du cofacteur a été étudié. Une transition monophasique suggère que, soit le deuxième site de fixation du NADP (présumé présent chez toutes les isoformes des organismes supérieurs) est absent des isoformes plastidiales (conservation partielle des résidus de ce site), soit ce deuxième site est déjà saturé dans la G6PDH1 recombinante. Ainsi, nous avons considéré que les mesures d'affinité du NADP mesurée par ITC concernent la liaison du NADP au site catalytique.

De manière surprenante, la forme mutante mimant l'état réduit, présente des Kd 10 fois plus faibles que la forme oxydée (activée). Les résultats indiquent que l'enzyme a plus d'affinité pour le cofacteur lorsque son activité catalytique est la plus faible. Les Kd pour les formes réduite ou oxydée du cofacteur sont très proches quel que soit l'état redox de l'enzyme. Il semble donc que le site de fixation catalytique du cofacteur ne discrimine pas le  $NADP^+$  et le NADPH. Les différences de  $K_m$  apparent et d'efficacité catalytique mises en évidence précédemment n'étant pas corrélées à une augmentation de l'affinité de l'enzyme oxydée pour le  $NADP^+$ , elles sont très probablement liées à un changement structural au site actif. Il serait donc intéressant de tester le rôle proposé pour l'Arg131, en réalisant les mêmes expériences de titration avec des formes mutantes de G6PDH1 où l'Arg131 aura été substitué soit dans la protéine sauvage soit dans la protéine mutante pour les cystéines régulatrices.



**Figure 47: Accessibility of the substrate to the active site of G6PDH1.** Accessibility to the active site of G6PDH1 was estimated on the basis of the inhibitory effect of DEPC (catalytic His derivatization) on its activity. Reduced or oxidized G6PDH1 was incubated with 0.02 mM DEPC prepared in EtOH (A). Protection from the inhibitory effect by G6P was tested by a five-minute preliminary treatment in presence of 2.5 mM G6P (B). Aliquots were withdrawn to measure G6PDH activity along DEPC treatment. The effect of EtOH on the protein activity was also tested.

La forte affinité de l'enzyme réduite pour le cofacteur pourrait avoir un rôle dans la retro-inhibition de son activité. La G6PDH1 est réduite à la lumière, condition physiologique dans laquelle le NADPH est beaucoup plus abondant que le NADP<sup>+</sup> dans les chloroplastes. Ainsi, *in vivo* une rétro-inhibition de l'activité de l'enzyme par le cofacteur constituerait un mode d'ajustement du fonctionnement du cycle oxydatif des pentoses phosphate en fonction de l'état redox du pool de NADP. Ce processus pourrait s'opérer de façon concomitante à la régulation redox de l'enzyme par les TRX, en lien direct avec le transfert d'électrons photosynthétique.

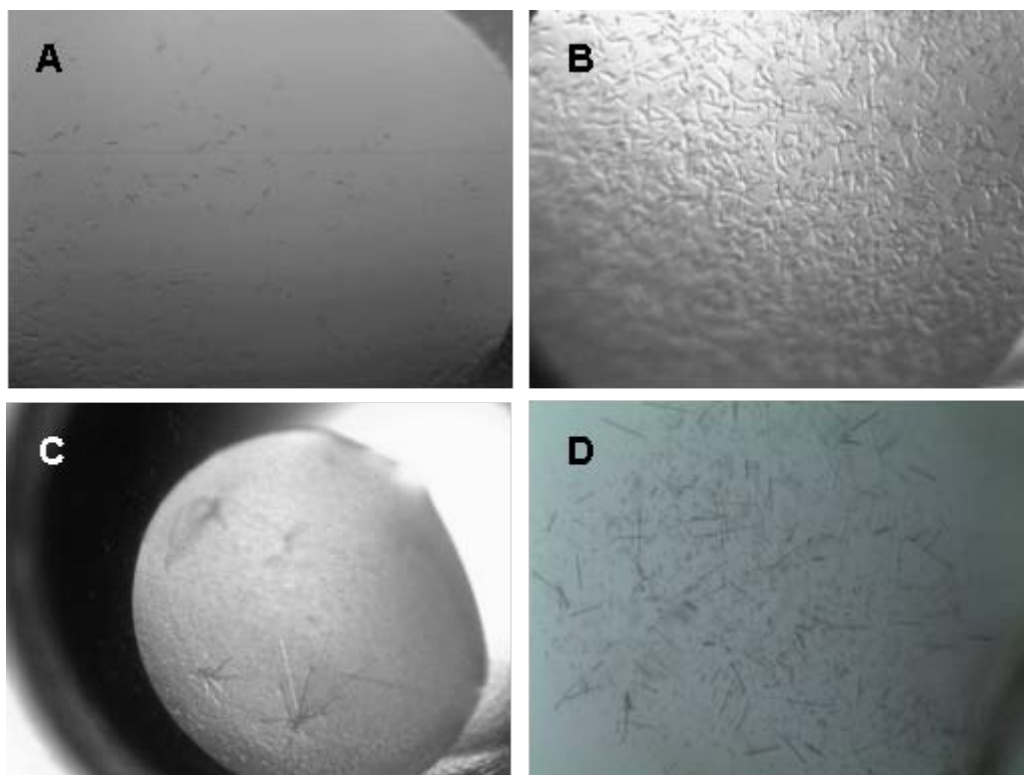
### **Etude de l'accessibilité des substrats au site actif**

Le DEPC est un composé qui permet de dériver les résidus histidine. Les G6PDH possédant deux histidines conservées impliquées dans leur mécanisme catalytique (His264 et His326 pour la G6PDH1). Nous avons utilisé le DEPC pour étudier l'accessibilité du G6P au site actif de l'enzyme. Des cinétiques d'inactivation de l'enzyme par le DEPC ont été réalisées sur la G6PDH1 réduite ou oxydée. Les résultats obtenus sont présentés en figure 47.

Les protéines préalablement réduites ou oxydées sont incubées en présence de DEPC, puis l'activité est mesurée après un temps variable d'incubation. Le DEPC à 0,02 mM inhibe l'activité des formes oxydée et réduite avec des efficacités comparables (Cf. figure 47 A). Cette petite molécule (162 g.mol<sup>-1</sup>) semble donc accéder au site actif de la G6PDH1 avec la même efficacité quel que soit l'état redox de l'enzyme.

Par la suite, des expériences de protection de l'effet du DEPC par les substrats de la G6PDH ont été réalisées. L'enzyme, réduite ou oxydée, a été pré-incubée en présence de 2,5 mM de G6P, puis les mêmes cinétiques d'inactivation par le DEPC ont été réalisées. En présence de G6P, une protection a été observée sur les formes réduite et oxydée (Cf. figure 47 B). La forme oxydée est mieux protégée que la forme réduite, au bout de 3 min de traitement par le DEPC son activité étant diminuée d'environ 30% alors que celle de la protéine réduite l'est à un niveau supérieur à 60%. Ainsi, ces résultats suggèrent que le G6P accède plus facilement et / ou est mieux fixé au site actif de la forme oxydée en comparaison à la forme réduite.

Les résultats obtenus suggèrent donc que l'oxydation de la G6PDH1 conduit à une amélioration de l'accessibilité et / ou de la fixation du G6P au site actif. Ce mécanisme peut expliquer, au moins partiellement, le différentiel d'un facteur 5 mesuré pour le S<sub>0.5</sub> G6P entre les formes oxydée et réduite de l'enzyme.



**Figure 48: Crystallisation attempts of Arabidopsis G6PDH1.** Pictures of drops (0.2  $\mu\text{l}$ ) of the screening assays containing G6PDH1 crystals. Hit conditions were: (A) Oxidized WT G6PDH1 (20  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) in 0.1 M HEPES pH 7.5 70% MDP. (B) Mutant C149S/C157S G6PDH1 (20  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) in 100 mM HEPES pH 7.5, 0.1 M ammonium sulphate, 18% PEG 400. (C) Mutant C149S/C157S G6PDH1 (20  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) in 0.05 M sodium MES pH 6.5, 0.1 M NaCl 5% PEG 4000 + 10% anhydrous glycerol. (D) Mutant C149S/C157S G6PDH1 (20  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) with 5 mM  $\text{NADP}^+$  and 5mM Glm6P in 0.1 M HEPES pH 7.5, 10 % PEG 8000. Pictures were taken using a binocular.



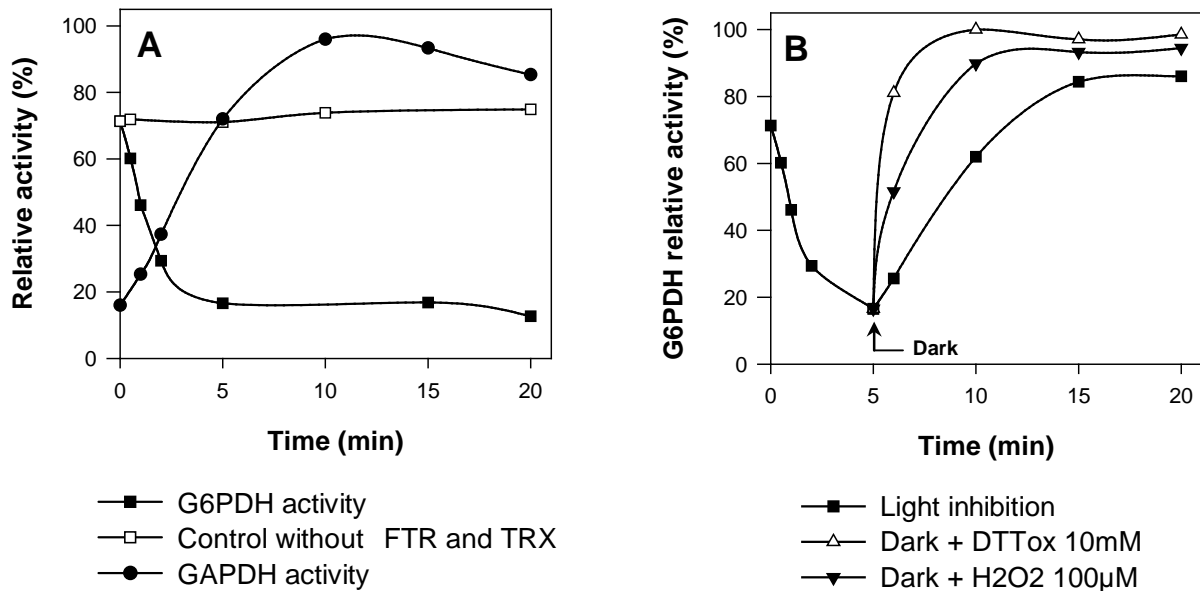
**Figure 49: Optimization of crystallization conditions of mutant C149S/C157S.** Picture of a 2  $\mu\text{L}$  drop of the screening assay of mutant C149S/C157S G6PDH1 (2  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) crystallized in presence of 2.5 mM  $\text{NADP}^+$  in 200 mM HEPES pH 7.7 10% PEG 8000. The picture was taken using a binocular.

## **Essai de cristallisation de la G6PDH1 et perspectives d'études structurales**

Afin d'étudier précisément l'impact de la régulation redox sur la structure de G6PDH1 et de mieux comprendre son effet sur la catalyse, des études cristallographiques ont été initiées sur la fin de ma thèse. De plus cette approche permettra également de mettre en évidence si les isoformes plastidiales possèdent ou non un site structural de liaison du NADP

Un criblage en kit de plusieurs conditions de cristallisation par la méthode de diffusion de vapeur en goutte assise a été mis en œuvre à l'aide un système automatisé. Plusieurs criblages de cristallisation de la forme sauvage oxydée ou de la forme mutante C149S/C157S ont été réalisés, en présence ou absence de NADP<sup>+</sup>, avec l'addition éventuelle de glucosamine-6-phosphate (Glm6P) qui est un inhibiteur compétitif du G6P couramment utilisé pour étudier les G6PDH (Kanji et al., 1976).

Après 10 jours d'équilibration à 18°C, l'observation des gouttes a révélé une condition favorable de cristallisation pour la forme sauvage oxydée, et trois conditions favorables de cristallisation pour la forme mutante. Ces 4 conditions de cristallisation nommées A à D sont précisées dans la légende de la figure 48. Les cristaux obtenus se présentent sous la forme de petites aiguilles isolées ou disposées en oursin. La condition D a pu être optimisée en boîte manuelle par la technique de diffusion de vapeur en goutte suspendue. Cette optimisation a permis l'obtention de cristaux de plus grande taille pour la G6PDH1 mutante en présence de NADP<sup>+</sup> additionnée ou non de Glm6P (Cf. figure 49). L'obtention de cristaux de plus grande taille est en cours et devrait aboutir prochainement à l'obtention d'un matériel adapté aux analyses de diffraction des rayons X.



**Figure 50: Redox regulation of G6PDH1 in a light reconstituted system.** Redox regulation of G6PDH1 was studied and compared to that of GAPDH (B4) in a reconstituted Fd/TRX light system. This system comprises freshly prepared pea thylakoids and purified Fd, FTR and TRX f1 proteins (see section “Materials and Methods” for details). (A) Reductive inactivation of G6PDH1 and activation of GAPDH B4 in the light. Control experiment was made by omitting FTR and TRX. (B) After 5 min of illumination, the assay mixture was transferred to the dark, in absence, or in presence of oxidants: 100 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> or 10 mM DTTox. The maximal (100%) enzyme activity in the light reconstituted system corresponds to 140 U.mg<sup>-1</sup> for G6PDH and 130 U.mg<sup>-1</sup> for GAPDH.

## Régulation TRX-dépendante de la G6PDH1 dans un système Fd/TRX reconstitué *in vitro*

La régulation redox de l'activité G6PDH1 a été examinée dans un système Fd/TRX reconstitué. Ce système comporte des thylacoïdes fraîchement préparés ainsi que les constituants solubles purifiés du système (Fd/FTR/TRX) et la TRX f1 recombinante d'*Arabidopsis* a été utilisée.

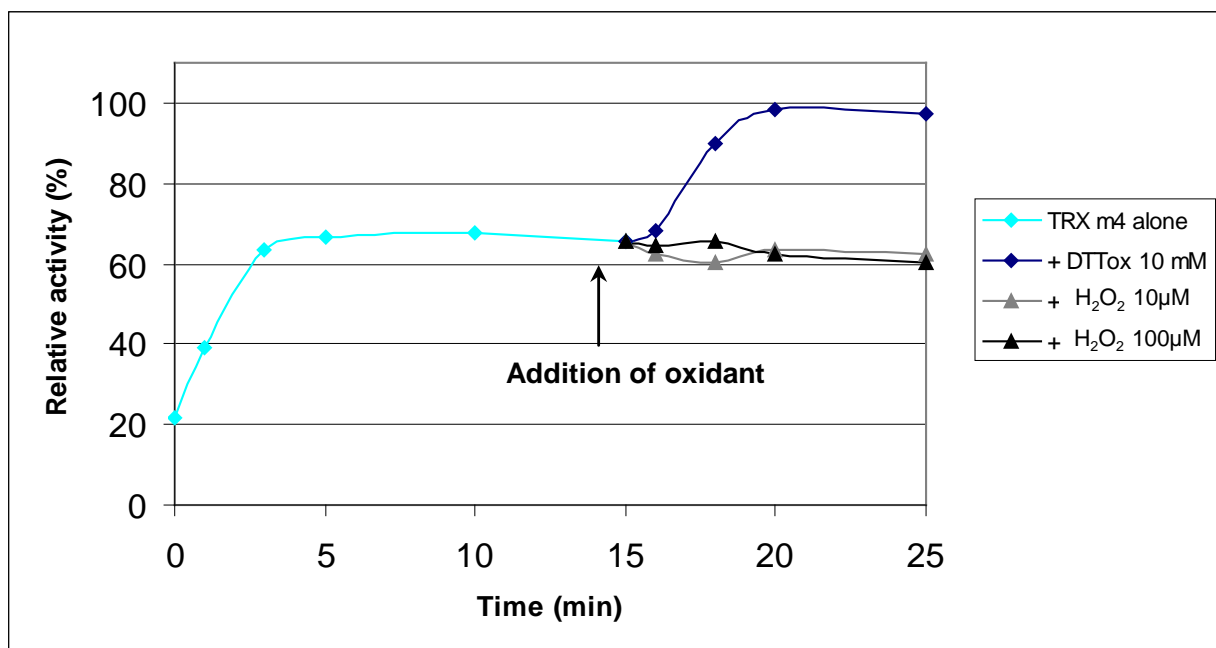
A la lumière, une baisse très nette de l'activité de G6PDH1 est observée en quelques minutes. Cet effet est dépendant de l'ajout de tous les constituants du système FTR reconstitué (Cf. figure 50 A).

Dans ce même système, la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH), enzyme du cycle de Calvin strictement régulée par les TRX f, est activée avec une cinétique comparable à celle de l'inhibition de la G6PDH1. Cette expérience illustre la régulation antagoniste des cycles oxydatif et réductif (cycle de Calvin) des pentoses phosphate par les TRX du type f. La fonction et l'importance physiologique de cette double régulation sont discutées dans la partie discussion.

Dans le système Fd/TRX reconstitué, l'arrêt de l'illumination permet de récupérer l'activité G6PDH. La réversibilité de l'inactivation montre qu'il s'agit bien d'une signalisation redox et non d'une perte d'activité de l'enzyme au cours de l'incubation dans le système, à la lumière (Cf. figure 50 B).

A l'obscurité, la réactivation de l'enzyme est accélérée par l'ajout d'un oxydant chimique de dithiols (DTTox) mais aussi en présence d'eau oxygénée. L' $H_2O_2$  n'étant pas capable seule d'activer la G6PDH1 son effet est attribuable à l'oxydation d'un ou plusieurs constituants de système Fd/TRX. A l'obscurité, l'oxydation de ces constituants se produit par l'action de ROS très probablement apportés avec les membranes thylacoïdiennes ou même générés par le système à la lumière. La production de ROS aurait lieu au niveau des photosystèmes et serait compensée par le transfert d'électrons pour donner une balance redox réductrice.

La possibilité d'une action directe du peroxyde d'hydrogène sur la formation du pont disulfure de la TRX a été testée *in vitro*. Pour cela, l'effet de l'ajout de peroxyde d'hydrogène ou de DTT oxydé sur la capacité de la TRX m4 à réguler l'activité de la G6PDH1 a été étudié. Les résultats sont présentés en figure 51. Au cours de la pré-incubation de la TRX avec la cible, une augmentation de l'activité G6PDH est observée au bout de quelques minutes. Cette

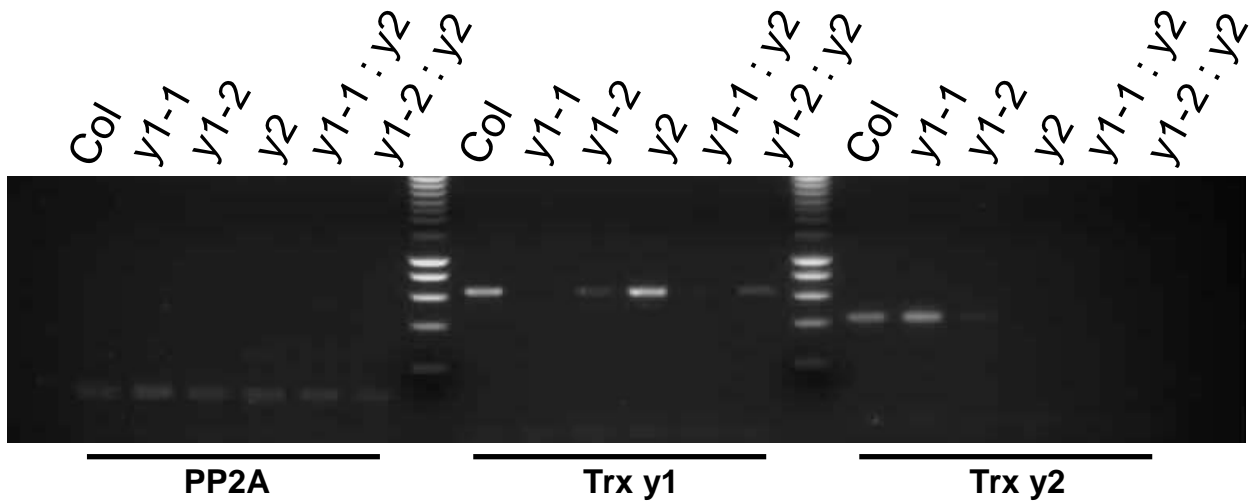


**Figure 51: Oxidation of TRX and GAPDH1 by hydrogen peroxide.** Activation of G6PDH1 by TRX in the presence of various oxidants. G6PDH1 was incubated for 15 minutes with 10 µM TRX m4 (pre-reduced with DTT and desalted) before addition of oxidants : H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> or DTTox.



activation est dépendante de la présence de TRX et atteint un plateau intermédiaire (environ 68 % de l'activité maximale de l'enzyme). Ce résultat indique que dans la préparation utilisée, une partie de la TRX m4 est oxydée, malgré un traitement préalable de réduction. Une fois le plateau atteint, l'ajout d' $\text{H}_2\text{O}_2$ , n'a pas d'effet significatif sur l'activité G6PDH1 même à des concentrations élevées (100 $\mu\text{M}$ ). En revanche, l'ajout de DTT oxydé conduit à une activation complète de la cible qui atteint son activité maximale en quelques minutes. Ces résultats montrent que  $\text{H}_2\text{O}_2$  n'est pas capable de refermer directement le pont disulfure des TRX.

Nous avons conclu que, l' $\text{H}_2\text{O}_2$  stimule l'activation de la G6PDH1 à l'obscurité dans le système Fd/TRX reconstitué. Cet effet ne se fait donc pas par régulation directe de l'enzyme, ni par oxydation de la TRX. L'oxydant agirait à un autre niveau du système, soit au niveau des complexes membranaires qui peuvent subir des dégâts oxydatifs, soit en oxydant la Fd et /ou la FTR.



**Figure 52: y-type *trx* gene expression levels analyzed using semi-quantitative RT-PCR.** The presence of transcripts was checked in seeds of single (*y1-1*, *y1-2* and *y2*) and double (*y1-1:y2* and *y1-2:y2*) *trx* mutants and compared to wild-type (*Col*). Protein phosphatase 2A gene (*PP2A*) was used as loading control.

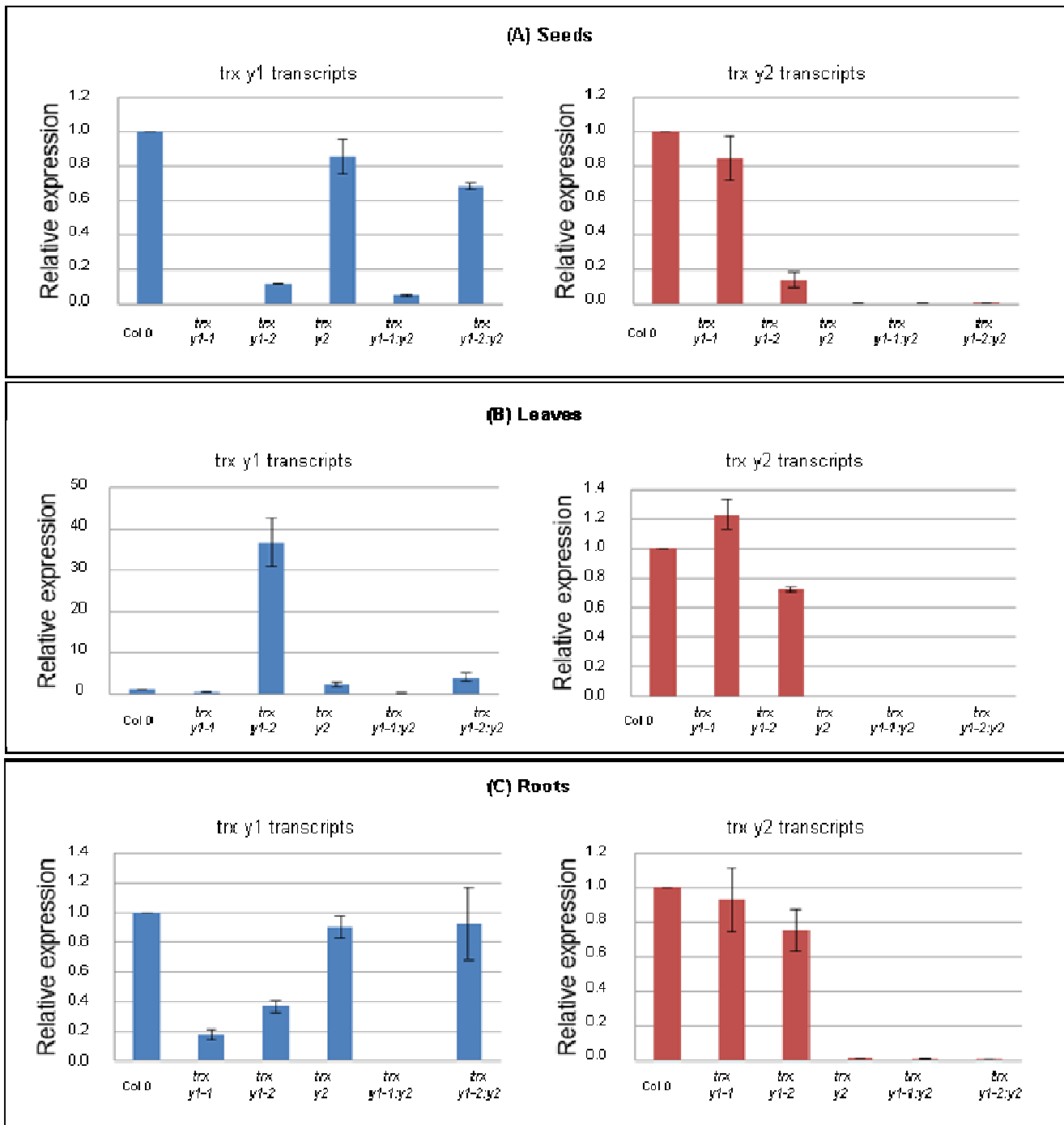
## Deuxième partie

### Caractérisation de mutants perte de fonction pour les TRX du type y

Cette deuxième partie est consacrée à l'étude fonctionnelle *in planta* de fonctions suggérées par les approches biochimiques *in vitro* pour les TRX du type y. Les analyses sont basées sur une approche génétique mettant en jeu l'utilisation de lignées d'*Arabidopsis* mutantes (insertion d'ADN-T) dans les gènes des TRX y1 et y2.

Avant mon arrivée au laboratoire, 2 lignées homozygotes simples mutantes (*trx y1-1* et *trx y1-2*) pour le gène de la TRX y1, une lignée simple mutante (*trx y2*) pour le gène de la TRX y2 et une lignée double mutante cumulant les mutations *trx y1-2* et *trx y2* étaient disponibles. Une deuxième lignée double mutante (*trx y1-1:y2*) a été obtenue à la fin de ma deuxième année de thèse. Toutes les lignées mutantes utilisées proviennent de la collection du Salk Institute (San Diego, USA) et sont dans le fond génétique Columbia (Col 0).

Ces lignées mutantes ont été utilisées avec pour objectif de valider *in vivo* les spécificités de régulation des G6PDH plastidiales de type P2 par les TRX, mises en évidence par les études biochimiques. Les lignées mutantes pour les TRX du type y ont également été utilisées pour tester leur rôle dans la physiologie de la germination de la graine chez *Arabidopsis*, le gène de la TRX y1 présentant un profil d'expression qui la distingue des autres isoformes de TRX plastidiales puisqu'il s'exprime majoritairement dans les organes non photosynthétiques, et en particulier dans la graine. Pour ce volet concernant la physiologie de la graine, domaine dans lequel l'équipe où j'ai réalisé ma thèse n'avait pas de compétence particulière, j'ai interagi avec le professeur C. Bailly de l'UPMC qui dirige le laboratoire « Germination et Dormance des Semences » au sein duquel j'ai acquis les techniques et les savoirs-faire nécessaires aux analyses qui ont été réalisées.



**Figure 53: Transcript abundance of *trx y1* and *y2* genes in wild-type and *trx y* mutant plants analyzed by real time RT-PCR.** Transcript levels were analyzed in seeds (A), leaves (B), and roots (C). Data were normalized to protein phosphatase 2A gene (PP2A) and calibrated with the transcript level in wild-type (Col 0). Means  $\pm$  SD of triplicate experiments are shown.

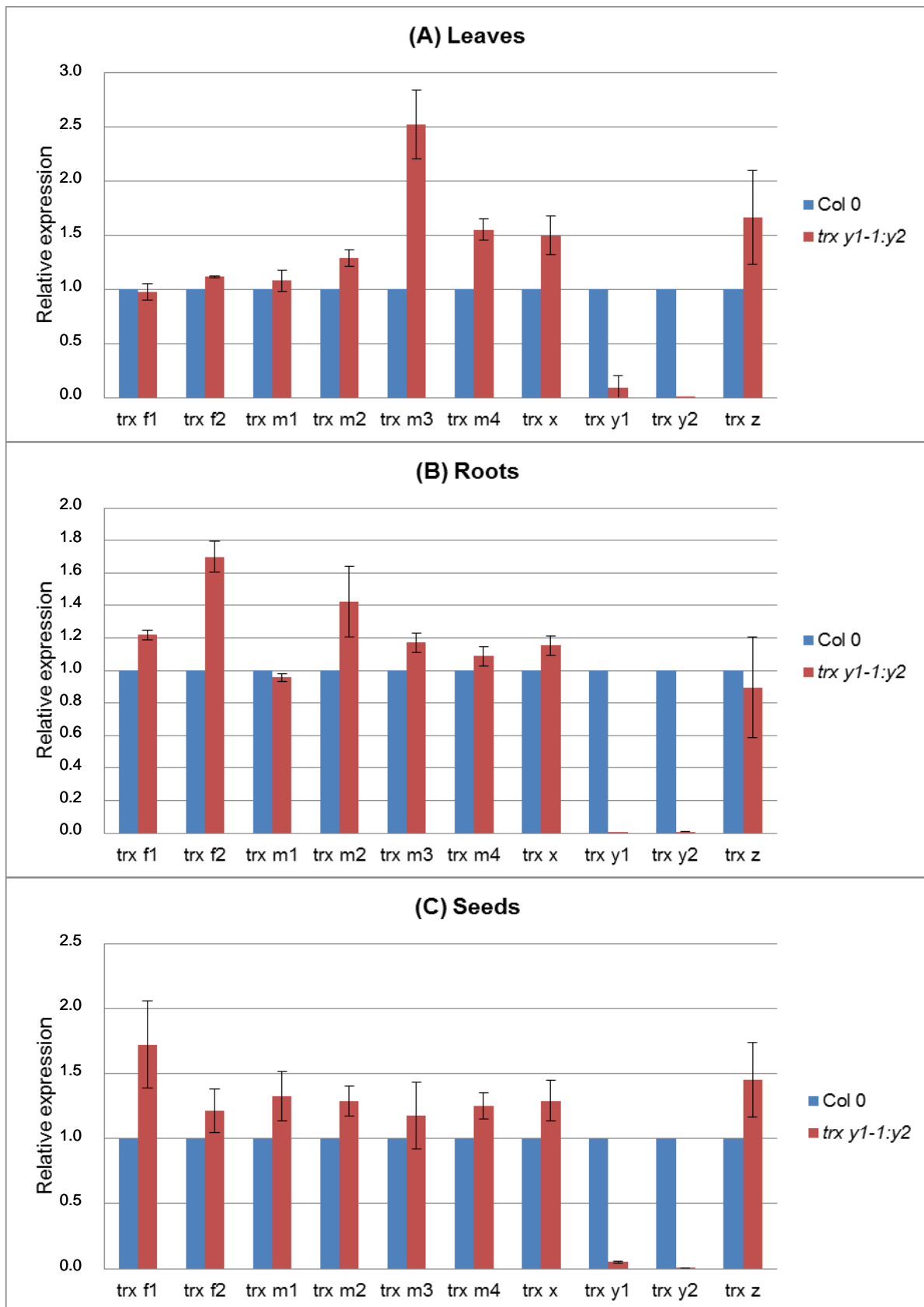
## **Profils d'expression des gènes des TRX plastidiales et des G6PDH dans le contexte des mutants de TRX y**

### **Validation de la perte de fonction des gènes mutés par RT-PCR semi-quantitative et quantitative**

L'abondance des ARNm des TRX y1 et y2 dans les feuilles, les racines et les graines des génotypes sauvage et mutants, a été analysée par RT PCR semi-quantitative et quantitative (Cf. figures 52 et 53). Le gène PP2A codant une sous-unité de la phosphatase 2A (At1g13320) a été utilisé comme gène constitutif de référence. En effet, il est connu comme étant exprimé de manière constante dans l'ensemble des organes d'Arabidopsis, ainsi que dans des conditions environnementales variées (Czechowski et al., 2005).

Les analyses des niveaux de transcrits des graines des mutants des TRX du type y par RT-PCR semi-quantitative sont présentées en figure 52. Les résultats montrent une absence totale d'expression du gène de la TRX y1 dans les simple et double mutants y1-1. Aucune expression du gène de la TRX y2 n'est détectable dans les simple et doubles mutants y2. En comparaison à la plante sauvage (Col 0), l'expression du gène de la TRX y1 est diminuée dans les simple et double mutants y1-2. Les lignées *trx y1-1* et *trx y2* sont donc bien des lignées « perte de fonction » pour les gènes de TRX y1 et y2 alors que dans la lignée *trx y1-2* l'expression du gène *trx y1* est diminuée dans la graine.

Ces résultats ont été validés par RT-PCR quantitative (Cf. figure 53). Dans les graines, aucun transcrit des gènes *trx y1* et *trx y2* n'est détecté dans les lignées *trx y1-1* et *trx y2*, respectivement. La lignée *trx y1-1* est une lignée perte de fonction dans les feuilles et dans les graines, mais dans les racines une expression résiduelle 5 fois moins importante que dans la plante sauvage est détectée (Cf. figure 53 C). La lignée *trx y2* et les lignées doubles mutantes correspondantes sont des lignées perte de fonction pour le gène de la TRX y2, quel que soit l'organe considéré. La lignée *trx y1-2* possède une expression réduite par rapport au génotype sauvage d'un facteur 3 et 5 dans les racines et les graines, respectivement (Cf. figure 53). Curieusement, une très forte surexpression d'un facteur 36 du gène de la TRX y1 dans les feuilles du mutant *trx y1-2* a été mesurée. Le même effet est également observable dans le double mutant *trx y1-2:y2* mais de manière moins importante. Etonnement, chez ce mutant, l'expression du gène *trx y1* semble moins affectée dans les racines et dans les graines que dans le simple mutant *trx y1-2*.



**Figure 54: Effect of the mutation of *Trx y* genes on transcript levels of plastidial TRX.** Transcript abundance of plastidial TRX was analyzed by real time RT-PCR in leaves (A), roots (B), and seeds (C). Data were normalized to the protein phosphatase 2A gene (PP2A) and calibrated to the level of transcripts found in wild-type plant (Col 0). Means  $\pm$  SD of experiments made in triplicate are shown.

Les niveaux de transcrits de la TRX y1 pour les lignées mutantes *trx y1-2* peuvent s'expliquer par le positionnement de l'insertion dans la région promotrice du gène (Cf. section Matériels et Méthodes). L'insertion n'inhibe que partiellement l'expression du gène qui s'exprime dans les racines et dans les graines. Sa surexpression observée dans les feuilles pourrait être due à une expression sous le contrôle du promoteur 35S contenu dans l'ADN-T qui est connu comme étant très efficace chez les plantes dans les organes verts.

Sur la base des résultats obtenus sur les niveaux de transcrits des gènes des TRX du type y dans les lignées mutantes correspondantes disponibles au laboratoire, la suite des analyses d'expression de gènes s'est focalisée sur le double mutant *trx y1-1:y2* validé comme un mutant « perte de fonction ».

### Analyse de l'expression des autres TRX plastidiales

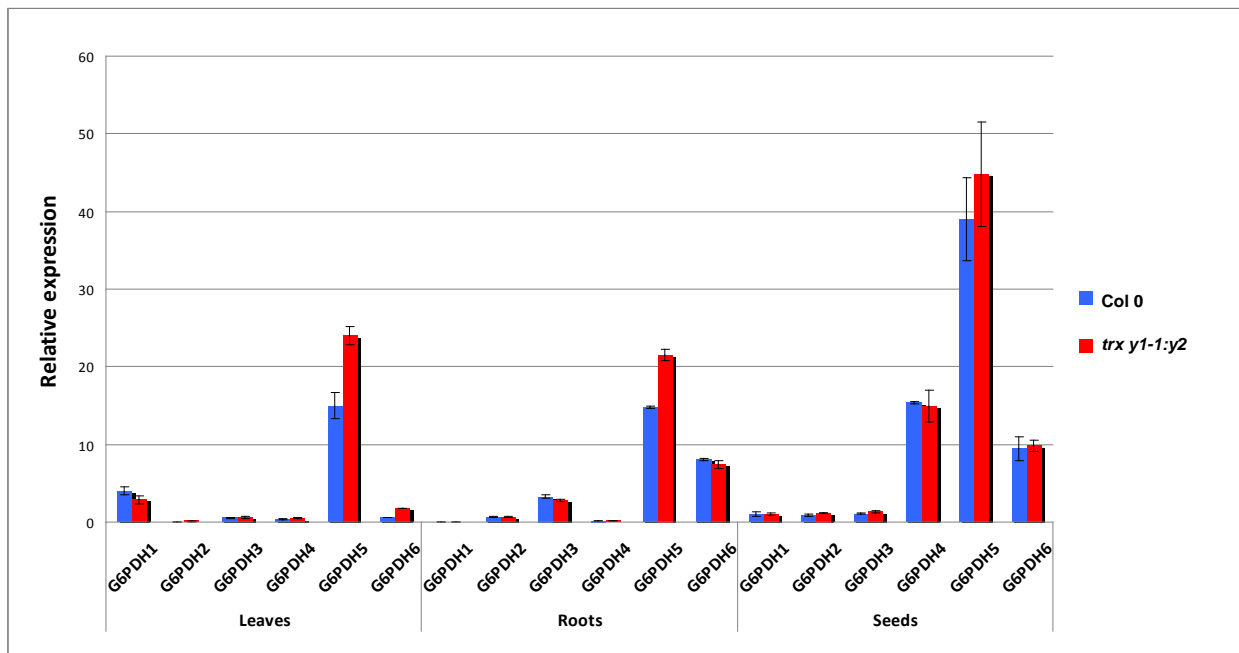
La question d'une éventuelle compensation de l'absence totale de transcrit pour les TRX du type y par un autre type de TRX a été examinée. L'abondance des ARNm pour les autres TRX plastidiales a été évaluée par RT-PCR quantitative dans les feuilles, les racines et les graines du double mutant *trx y1-1:y2*.

Les résultats présentés en figure 54 montrent que, dans tous les organes étudiés, aucune compensation significative n'est observée. Le mutant *trx y1-1:y2*, et par extension les lignées simples mutantes *trx y1-1* et *trx y2*, semblent donc être de bons outils pour étudier la fonction des TRX du type y.

### Expression des G6PDH chez *Arabidopsis thaliana*

Les analyses biochimiques menées au cours de cette thèse ont été largement consacrées à la régulation redox des G6PDH plastidiales et nous avons montré que les TRX jouaient un rôle spécifique et majeur dans la modulation de l'activité de cette enzyme. En complément, il nous a donc paru intéressant d'examiner l'impact *in planta* de la mutation de gènes de TRX sur les G6PDH en examinant, tout d'abord, l'éventualité d'un effet sur l'expression de leurs gènes.

L'étude par RT-PCR quantitative de l'expression des gènes codant pour les six G6PDH a été réalisée sur feuilles, racines et graines d'*Arabidopsis* (Cf. figure 55).



**Figure 55: Comparison of transcript levels of the six G6PDH isoforms in wild-type and *trx y* mutant plants.** Transcript levels were analyzed by real time RT-PCR in leaves, roots, and seeds. Data were normalized to protein phosphatase 2A gene (PP2A), without calibration to allow comparison of transcript abundance between organs. Means  $\pm$  SD of experiments made in triplicate are shown.

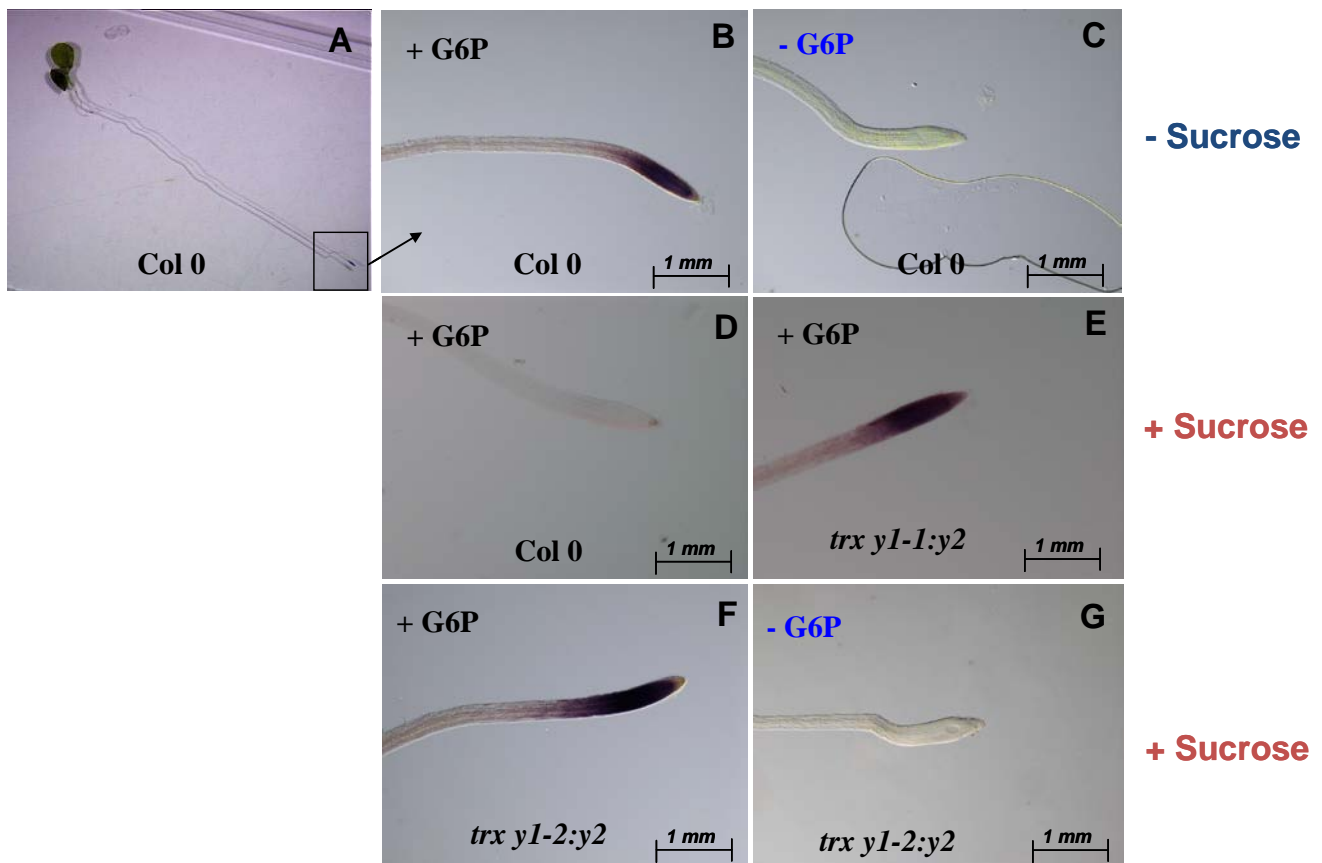


Les résultats obtenus ont permis de confirmer que, parmi les isoformes plastidiales, la G6PDH1 est celle dont le gène s'exprime majoritairement dans les feuilles, et que le gène de la G6PDH3 s'exprime majoritairement dans les racines. Curieusement, nos analyses révèlent une forte expression du gène de la G6PDH4 dans les graines alors que, d'après la littérature, ce gène s'exprimerait très faiblement dans tous les organes (Wakao et Benning, 2005 ; Meyer et al., 2011). Dans les feuilles, la G6PDH4 a été montrée comme impliquée dans l'adressage de la G6PDH1 aux peroxyosomes. L'importance physiologique de G6PDH4 dans la graine suggérée par la forte expression de son gène reste à élucider. Il faut noter qu'aucune activité G6PDH n'a pu être mesurée à ce jour avec cette isoforme, ce qui impliquerait que son hypothétique importance dans la graine ne serait pas liée au fonctionnement du cycle oxydatif des pentoses phosphate. Quel que soit l'organe considéré, les transcrits des isoformes cytosoliques (G6PDH5 et 6) sont plus abondants que ceux des isoformes plastidiales. Cependant, l'isoforme majoritairement exprimée G6PDH5 possédant une faible activité spécifique ( $1,5 \text{ U.mg}^{-1}$  d'après Wakao et Benning, 2005) en comparaison aux isoformes plastidiales ( $39,6$  et  $46,9 \text{ U.mg}^{-1}$  pour G6PDH2 et 3, respectivement; ce travail), l'ensemble des données biochimiques et d'analyses de transcrits suggèrent une contribution physiologique prépondérante des isoformes plastidiales dans la fonction des G6PDH à l'échelle cellulaire.

#### Expression des G6PDH chez *Arabidopsis thaliana* dans un contexte TRX y mutant

A l'exception de l'isoforme G6PDH5, l'expression des autres G6PDH reste inchangée dans le contexte du double mutant *trx y1-1 :y2* (Cf. figure 55).

Une augmentation de l'expression et de l'activité des G6PDH a été plusieurs fois mise en évidence lorsque les plantes sont soumises à des stress, en particulier salin (Valderrama et al., 2006; Nemoto & Sasakuma, 2000), en présence de métaux lourds (Esposito et al., 1998), ou encore en situation de stress oxydatif (Debnam et al., 2004; Hauschild & von Schaewen, 2003). Ainsi, compte-tenu de la capacité fonctionnelle des TRX du type y à réduire des peroxydases plastidiales (Collin et al., 2004 ; Navrot et al., 2006), il est possible que le mutant *trx y1-1 :y2* soit en situation physiologique de stress type pro-oxydant même dans des conditions de culture optimales. Cette situation existerait dans tous les organes analysés : la feuille, la racine et la graine, où une augmentation de l'expression du gène de la G6PDH5 a été observée.



**Figure 56: Histochemical staining of G6PDH activity in Arabidopsis roots of WT (A to D), *trx y1-1:y2* (E) or *trx y1-2:y2* (F and G).** The dark blue colour indicates activity (NBT formazan). Control for G6PDH specific staining (C and G) was done by omitting G6P in the reaction medium. Pictures were taken using a Macroscope view.

## **Etude *in situ* de l'activité G6PDH racinaire chez les doubles mutants TRX y**

La capacité des isoformes de TRX y à activer *in vitro* par oxydation les 2 types (P1 et P2) de G6PDH plastidiales nous a incités à examiner *in planta* l'impact de la mutation des gènes *trx y1* et *trx y2* sur l'activité G6PDH. Pour cela, des colorations d'activité G6PDH *in situ* ont été réalisées dans la racine, organe où le gène de l'isoforme y1 s'exprime fortement et dans lequel ce type d'analyse est facilité. Il faut noter que ce type de technique a été largement utilisé pour mesurer l'activité *in planta* d'autres enzymes du métabolisme mais a dû être mise au point dans le cadre de ce travail pour l'analyse de l'activité G6PDH.

Un exemple de détection *in situ* d'activité G6PDH sur des coupes transversales de foie de rat (Wilma et al., 2003) est décrit dans la littérature mais, chez les végétaux, aucun exemple de ce type d'expérience n'est décrit. Cependant, chez *Arabidopsis*, pour d'autres activités enzymatiques comme la saccharose synthase et l'invertase, des protocoles basés sur une réaction couplée avec de la G6PDH exogène sont publiés (Sergeeva et al., 2006). Un protocole pour doser l'activité G6PDH *in situ*, basé sur les deux travaux précédemment cités, a donc été adapté pour les racines d'*Arabidopsis*.

La méthode de détection mise au point est basée sur la réduction du NBT (formazan de couleur sombre) par la production de NADPH enzymatique substrat dépendante (Cf. section Matériel et Méthodes). Cette méthode permet de détecter une activité déshydrogénase localisée au niveau de la pointe racinaire dépendante de la présence de G6P (Cf. figure 56 A à C), indiquant que la coloration est bien liée à une activité G6PDH.

Cette coloration est absente chez le génotype sauvage lorsque les plantules ont été cultivées sur milieu contenant du saccharose (Cf. figure 56 D). *A contrario* en absence de saccharose, les deux mutants *trx y1-1:y2* et *trx y1-1:y2* montrent une forte coloration au niveau de la pointe racinaire (Cf. figure 56 E à F). Ce résultat montre clairement qu'*in planta* l'absence des TRX du type y a un effet sur l'activité G6PDH. Par contre, lorsque le milieu contient du saccharose, elle est stimulée (Cf. figure 56 E et F).

Dans le génotype sauvage, la présence de sucre dans le milieu de culture conduit à une diminution très marquée, voire une annulation, de l'activité G6PDH dans la pointe racinaire. En considérant que le saccharose conduit à une situation cellulaire très réductrice, ce résultat est cohérent avec la régulation redox de l'activité des isoformes plastidiales (inhibition réductrice de leur activité) et à la rétro-inhibition connue des isoformes cytosoliques par le

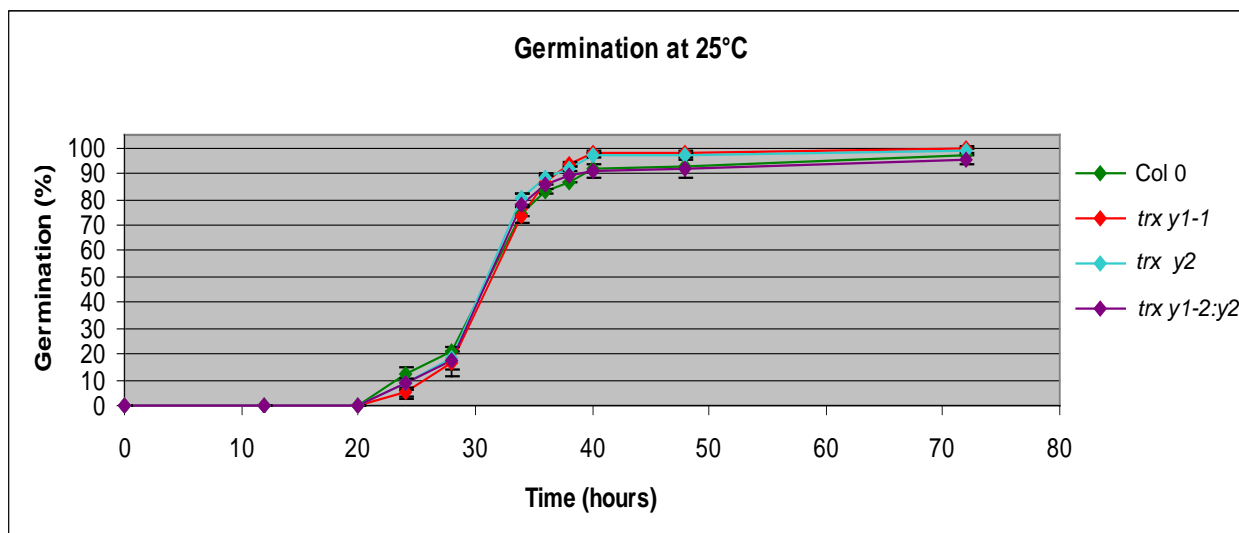


NADPH. Dans le contexte mutant pour les TRX du type y, il semblerait donc que selon notre hypothèse où ils seraient en situation de stress pro-oxydant, la rétro-inhibition des isoformes cytosoliques de G6PDH ne s'opère plus. Dans la racine, comme dans la feuille et la graine, nous avons constaté une augmentation significative des niveaux de transcrits de la G6PDH5 (Cf. figure 55). Ce résultat tend à confirmer la situation physiologique pro-oxydante des mutants des TRX y et suggère également la contribution de l'isoforme G6PDH5 à l'augmentation *in planta* de l'activité G6PDH racinaire. Il sera intéressant d'examiner l'effet du sucre sur les niveaux des transcrits des TRX et des G6PDH dans les racines de plantes sauvages et mutantes cultivées en présence de saccharose. Des études complémentaires de l'activité G6PDH *in situ* dans des mutants pour les isoformes cytosoliques (mutants prochainement mis à notre disposition, collaboration avec G. Noctor, IBP) permettraient de discriminer l'origine plastidiale ou cytosolique de l'activité G6PDH racinaire.

### **Physiologie de la germination des graines mutantes pour les TRX du type y**

Compte-tenu de leur forte expression dans la graine et de leur caractéristique biochimique vis-à-vis de cibles anti-oxydantes, les TRX du type y sont suspectées de participer à l'homéostasie redox dans cet organe. Ainsi, le comportement physiologique (levée de dormance, qualité germinative en présence de stress ou non, réponse aux hormones, vieillissement...) des graines mutantes pour les TRX y devrait être perturbé. L'hypothèse étant qu'une perturbation des systèmes antioxydants de la graine devrait conduire à une mauvaise prise en charge des ROS produits lors de la dessiccation, du stockage à sec, et au moment de l'imbibition et donc, en conséquence, à un déséquilibre de la balance redox vers un état plus oxydant, nous nous attendons à ce que les mutants des TRX y soient en avance au sein de la fenêtre oxydative pour la germination en comparaison à des graines sauvages.

L'objectif de ce travail est d'utiliser les lignées perte de fonction pour les TRX du type y pour, d'une part, valider *in vivo* la fonction anti-oxydante de ce type de TRX et, d'autre part, étudier leur implication dans les mécanismes de signalisation faisant intervenir les ROS qui conduisent à la germination. Chaque expérience a été réalisée avec des lots de graines générés dans les mêmes conditions et simultanément.



**Figure 57: Germination kinetics of non dormant seeds of TRX y mutants.** A batch of 3-month old seeds was used. Seeds were sown on moist paper and incubated at 25°C, in the dark. Germination estimated by the radicle tip emergence through seed teguments was monitored during 3 days. Means  $\pm$  SD of triplicate experiments using 100 seeds each are shown.

Des lots de graines sauvages et des mutants *trx y1-1*, *trx y2* et *trxy1-2:y2* ont été caractérisés. En ce qui concerne les lots de graine correspondant au génotype *trx y1-2*, un génotypage de contrôle a révélé que ces graines produisaient une descendance comportant des hétérozygotes et des homozygotes sauvages et mutants pour le locus *trx y1*. Nous avons confirmé par génotypage que la plante mère qui a produit ces graines était de génotype hétérozygote pour ce locus et elle dérivait bien d'une plante double homozygote mutante dont nous avons pu révérier le génotype à partir de graines gardées en stock. Malgré une autogamie presque totale chez *Arabidopsis*, une fécondation croisée du mutant *trx y1-2* avec une plante a probablement eu lieu au cours de la culture visant à constituer les nouveaux lots de graines destinées à nos analyses sur la physiologie de la germination. La fécondation croisée a pu se faire par des insectes (thrips) parfois présents dans les espaces de culture de l'institut en véhiculant du pollen d'une plante à une autre. En conséquence, les résultats obtenus pour ce génotype ne sont pas présentés dans ce travail.

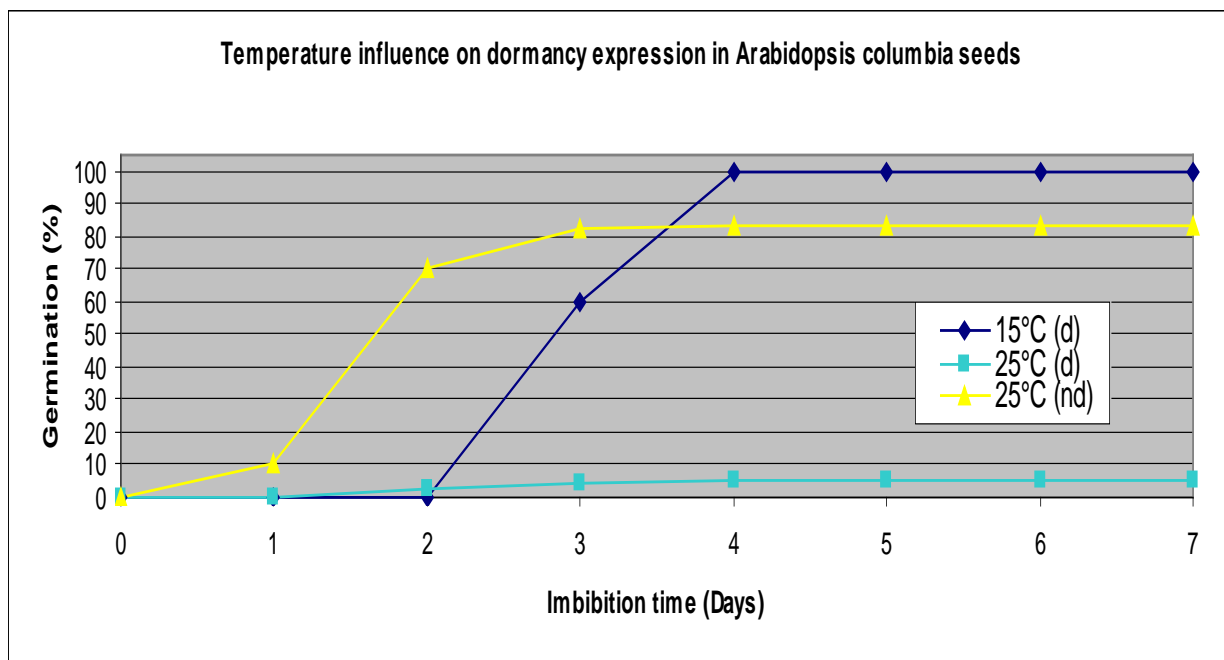
Par ailleurs, les graines du double mutant *trx y1-1:y2* n'ont pas pu être caractérisées au cours de l'étude de cette lignée ayant été obtenue postérieurement aux analyses.

Les graines des mutants de TRX du type y ont été soigneusement observées à la loupe binoculaire et pesées. Aucun phénotype, sur les critères de la taille, la couleur, la forme, l'aspect ou la masse, n'a été observé chez les mutants en comparaison au sauvage de manière significative et reproductible sur plusieurs lots de graines.

### Caractérisation de la qualité germinative des graines sauvages et mutantes pour les TRX du type y

Des graines sauvages et des mutants *trx y1-1*, *trx y2* et *trxy1-2:y2* ont été semées 3 mois après leur récolte (graines non dormantes) à 25°C à l'obscurité sur du papier filtre saturé en eau distillée. Leur germination a été suivie sur une période de 3 jours. Les résultats obtenus sont présentés en figure 57 ; ils montrent que les 4 génotypes analysés présentent des cinétiques de germination très similaires. La qualité germinative d'un lot de graines est une notion qui peut se caractériser par plusieurs paramètres couramment utilisés qui sont :

- le pourcentage final de germination
- le T<sub>50</sub> (temps nécessaire pour obtenir 50 % des graines germées)
- l'intervalle de temps pendant lequel la germination a lieu.



**Figure 58: Seed dormancy in Columbia ecotype of *Arabidopsis thaliana*.** Germination kinetics of dormant (freshly harvested) seeds (d) and non dormant (after 7 weeks of storage at 25°C) seeds (nd). Seeds were sown on moist paper and incubated at 25°C in the dark. Each germination rate was estimated using 100 seeds.



Le  $T_{50}$  est une expression de la vitesse de germination tandis que l'intervalle de temps de germination est lié à l'homogénéité du lot.

Les paramètres définissant la qualité germinative sont identiques pour les quatre génotypes testés : taux de germination de 96 à 99 % ;  $T_{50}$  de 31 heures, et intervalle de germination de 52 heures.

Les graines des mutants de TRX du type y, lorsqu'elles ne sont pas dormantes, ne présentent donc pas de phénotype de germination à 25°C et à l'obscurité.

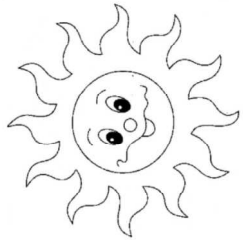
### Caractérisation de la dormance chez *Arabidopsis thaliana* écotype Columbia

La dormance des graines est définie comme une inaptitude des graines à germer dans des conditions favorables. D'un point de vue éco-physiologique, lors de la période estivale, les conditions de température, d'hygrométrie et de pluviométrie ne sont pas optimales pour le bon développement de la jeune plantule, une germination à cette époque pouvant compromettre le bon déroulement du cycle de développement de la plante et donc la viabilité de l'espèce. L'expression de la dormance à des températures estivales permet aux graines naturellement matures de mai à juin de ne pas germer au cours de l'été et donc d'éviter les conditions stressantes de cette saison pour attendre le retour des conditions favorables au printemps de l'année suivante.

Les graines de l'écotype Columbia d'*A. thaliana*, fond génétique de tous les mutants de TRX y, présentent une dormance résiduelle de quelques semaines après maturation/dessiccation. Nous avons tout d'abord cherché à préciser les caractéristiques de la dormance chez l'écotype Columbia dans les conditions expérimentales qui ont été celles de nos analyses de la germination.

Aussitôt après récolte, les graines des génotypes sauvage et mutants ont été stockées sèches à -20°C, ce qui a permis de bloquer les processus physiologiques qui conduisent à la levée de dormance. Ces graines congelées ont constitué les lots de graines dormantes.

L'impact de la température sur l'expression de la dormance a tout d'abord été étudié chez le génotype sauvage en mettant des graines dormantes à germer dans des boîtes de Pétri placées à l'obscurité à 15 ou à 25 °C. Les résultats de germination suivie sur une période de 7 jours sont présentés en figure 58.



HS SH

TRX f

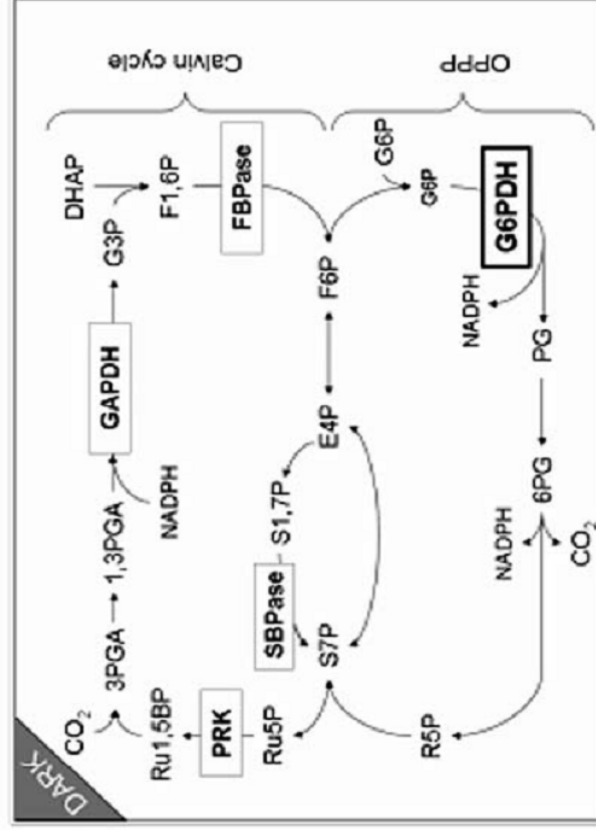
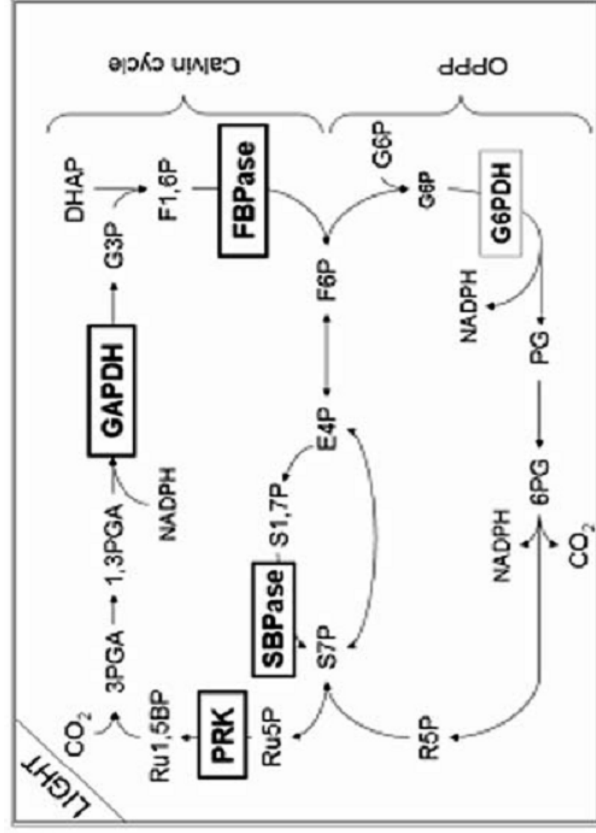
A



S-S

TRX f

B



**Figure 63 : Coordination of the reductive (Calvin-Benson cycle) and the oxidative pentose phosphate pathways by f-type TRX.** Size and rectangle thickness of TRX-f dependent targets indicate activity levels of enzymes. In the light (A), reduction of TRX f allows, on one hand, the activation of the Calvin cycle through the reductive activation of TRX f-strictly dependent enzymes such as phospho-ribulo kinase (PRK), GAPDH and fructose-1,6-bis-phosphate phosphatase (FBPase), Sedoheptulose-1,7-bis-phosphate phosphatase (SBPase) and, on the other hand, the inactivation of the oxidative pentose phosphate pathway (OPPP) by the reductive inactivation of G6PDH catalysing the first step of this pathway. In the dark, (B) oxidised TRX f slows down the Calvin cycle through the oxidative inhibition of G6PDH and, simultaneously, boosts the OPPP through the oxidative activation of G6PDH. This opposite light-dark modulation of G6PDH and Calvin cycle enzymes mediated by TRX f allows the coordination of the two cycles directing the enzymatic steps shared in common by the two cycles (represented as double targeted lines on the present scheme).

A 15 °C, les taux de germination atteignent 100% en 3 jours, tandis qu'à température plus élevée (25 °C), les graines sont incapables de germer, même au bout de 7 jours. Cette incapacité des graines à germer correspond à l'expression de la dormance puisque à 25°C des graines plus âgées (stockées 7 semaines à 25 °C) du même lot germent rapidement avec un taux de germination de 80%. Ces résultats indiquent que dans l'écotype Columbia d'*Arabidopsis thaliana*, la dormance s'exprime à 25°C et qu'elle ne s'exprime pas à 15°C.

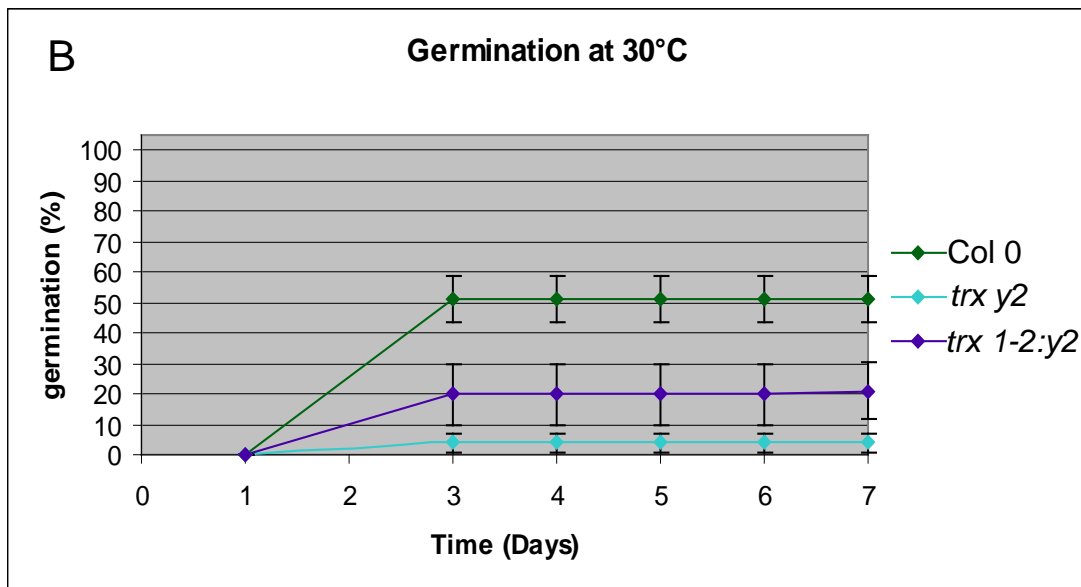
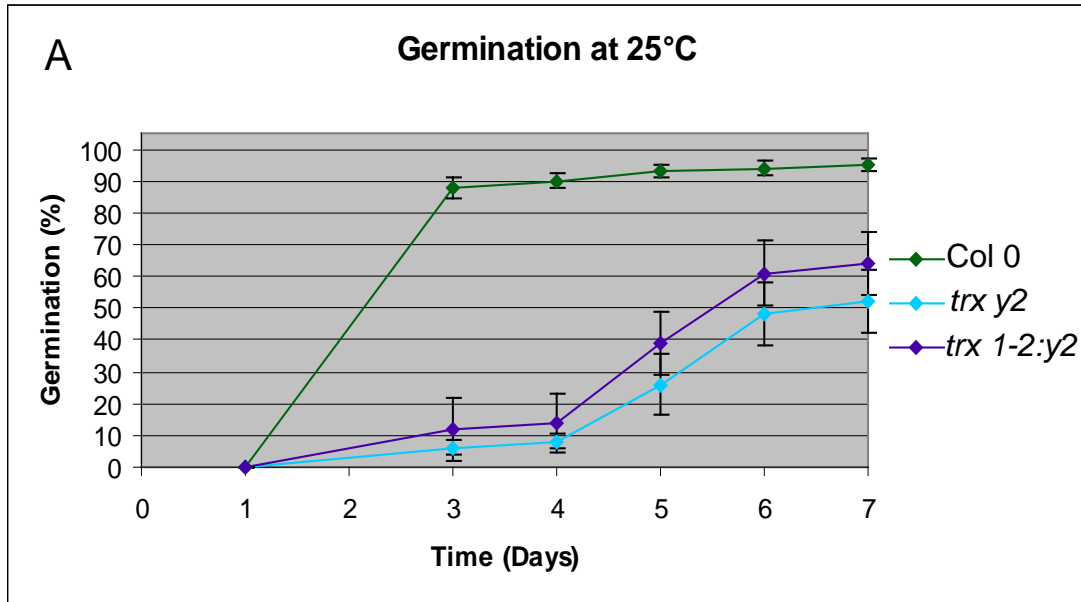
### Caractérisation de la dormance des graines mutantes pour les TRX du type y

Des graines ont été décongelées et stockées à 25°C à l'obscurité pendant 7 semaines. Sur cette période, chaque semaine, une partie de ces graines a été semée à 25°C, température à laquelle la dormance s'exprime. Les germinations ont été recensées au bout de 5 jours après imbibition. Pour contrôler la qualité germinative des graines au cours du stockage à 25°C, un semis a été réalisé en parallèle à 15 °C. Les résultats obtenus sont présentés en figure 59.

A 15°C, toutes les graines germent avec un taux final de germination voisin de 100% au bout de 5 jours, et ce tout au long de la période de stockage de 7 semaines à 25°C. Ce résultat indique que les qualités germinatives des graines sauvages et mutantes sont identiques, et qu'elles n'ont pas été affectées par le stockage.

A 25°C, température où la dormance s'exprime, les résultats montrent que le stockage des graines a pour effet de lever la dormance pour tous les génotypes. La cinétique de levée de dormance semble plus rapide pour le simple mutant *trx y2* par rapport au génotype sauvage. Le simple mutant *trx y1-1* a un comportement de levée de dormance similaire au génotype sauvage. Le double mutant *trx y1-1:y2* est plus dormant que le génotype sauvage. Ces résultats se retrouvent tout au long des 6 premières semaines de levée de dormance et les différences les plus marquées entre génotypes sont observées au bout de 4 semaines de traitement.

Les graines mutantes pour les TRX du type y présentent donc des aptitudes à levée de dormance différentes de celles des graines sauvages. La levée de dormance est accélérée chez les graines mutantes pour l'isoforme TRX y2 dont le gène s'exprime essentiellement dans les organes photosynthétiques. L'effet observé de sa mutation pourrait être dû à son incidence au cours de la formation de la graine. A l'inverse, la surexpression du gène de l'isoforme TRX y1 constatée dans la feuille du mutant *trx y1-2:y2* pourrait expliquer la levée de dormance plus tardive constatée chez ce mutant. Enfin, en prenant également en considération l'absence d'effet sur la levée de dormance dans le mutant *trx y1-1*, validé comme un mutant « perte de fonction » pour le gène *trx y1* à la fois dans la feuille et dans la graine, l'ensemble des



**Figure 60: Effect of long term storage and heat stress during germination on germination kinetics of seeds of TRX y mutants.** Germination kinetics of 9 months old seeds were monitored at 25°C (A) or at 30°C (B). Germination rates correspond to means  $\pm$  SD of triplicate experiments using 100 seeds.

résultats obtenus suggèrent que la TRX y2 pourrait jouer un rôle important *in vivo* dans la mise en place de la dormance qui se fait au moment de la formation de la graine sur la plante mère.

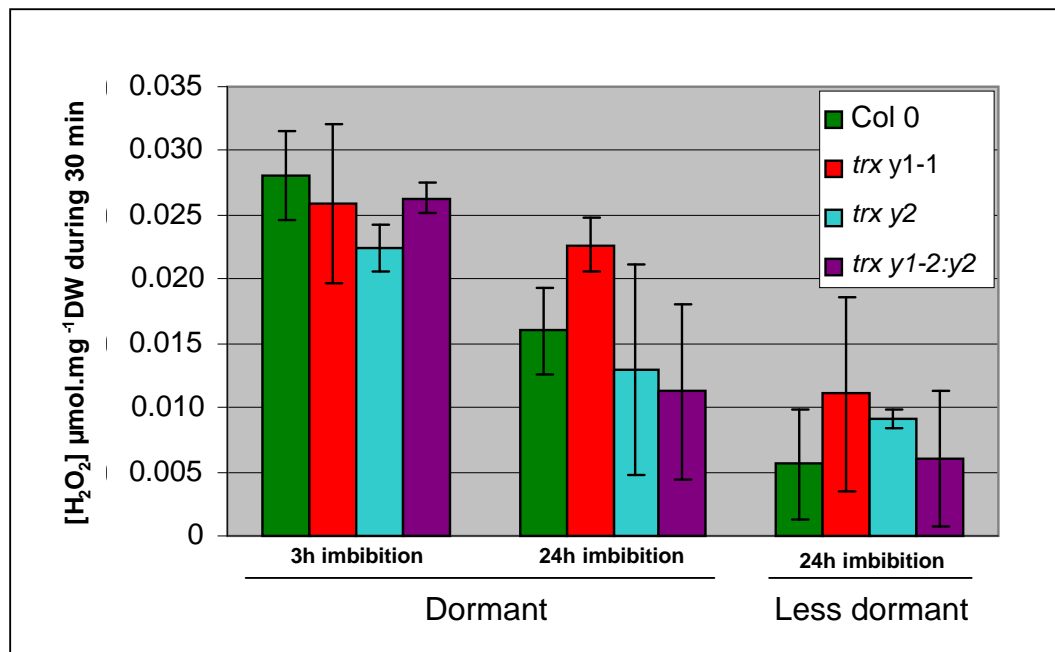
### Caractérisation de la tolérance à un stress thermique des graines mutantes pour les TRX du type y

Pour évaluer la capacité des graines mutantes pour les TRX du type y à conserver leur qualité germinative au cours de leur stockage, des graines âgées de 9 mois conservées dans le grainier de l'IBP (10°C, taux d'hygrométrie 60 %, à l'obscurité) ont été placées dans des conditions de germination optimale (25°C) ou stressante (30°C). Les germinations ont été recensées quotidiennement pendant 5 jours ; les résultats obtenus sont présentés en figure 60.

Après 9 mois de stockage le taux de germination final pour le génotype sauvage est peu affecté puisque les graines germent avec un taux de 95 %. En comparaison, la qualité germinative des mutants *trx y2* et *trx y1-2:y2* est nettement plus affectée, leur taux final de germination étant de 52 et 64 %, respectivement. Les graines mutantes germent également nettement plus lentement que les graines sauvages puisque leur  $T_{50}$ , est d'environ 6 jours contre 2 jours pour le génotype sauvage (Cf. Tableau 10). Lorsque les graines sont mises à germer à 30°C, la qualité germinative pour les trois génotypes est très fortement affectée, se traduisant par une augmentation des paramètres de qualité germinative (Cf. Tableau 10). Elle est nettement plus affectée pour les génotypes mutants que pour le sauvage. Ainsi, quelles que soient les conditions de germination utilisées, optimale ou stressante, il apparaît que les graines des mutants pour les TRX du type y auraient une moins bonne aptitude à la conservation. Ces analyses n'ont pas pu être menées sur le mutant *trx y1-1*, par manque de matériel biologique. Cependant, les graines du simple mutant *trx y2* se sont montrées plus sévèrement affectées que celles du double mutant *trx y1-2:y2* par un stockage de longue durée et des conditions de germination stressantes. La mutation *trx y1-2* conduisant à une augmentation de l'expression du gène *trx y1* dans la feuille et à sa diminution dans la graine, ces résultats suggèrent, comme précédemment par rapport à la dormance des graines, que la TRX y2 pourrait jouer un rôle important dans la physiologie de la graine, au niveau de la plante mère.

Genotype	Temperature	Final rate (%)	T 50 (hours)
Col 0	25°C	95 ± 2.0	48
<i>trx y2</i>		52 ± 10.0	132
<i>trx y1-2:y2</i>		64 ± 10.0	168
Col 0	30°C	51 ± 7.5	72
<i>trx y2</i>		4 ± 3.0	ND
<i>trx y1-2:y2</i>		21 ± 9.5	ND

**Table 10: Effect of long term storage and heat stress during germination on germinative quality parameters of seeds of TRX y mutants.** Germination parameters of 9 months old seeds were monitored at either 25°C or 30°C. Germination rates correspond to means ± SD of triplicate experiments using 100 seeds. T<sub>50</sub> values correspond to the time (hours) necessary to reach a 50 % rate of germination. ND: Not determinable.



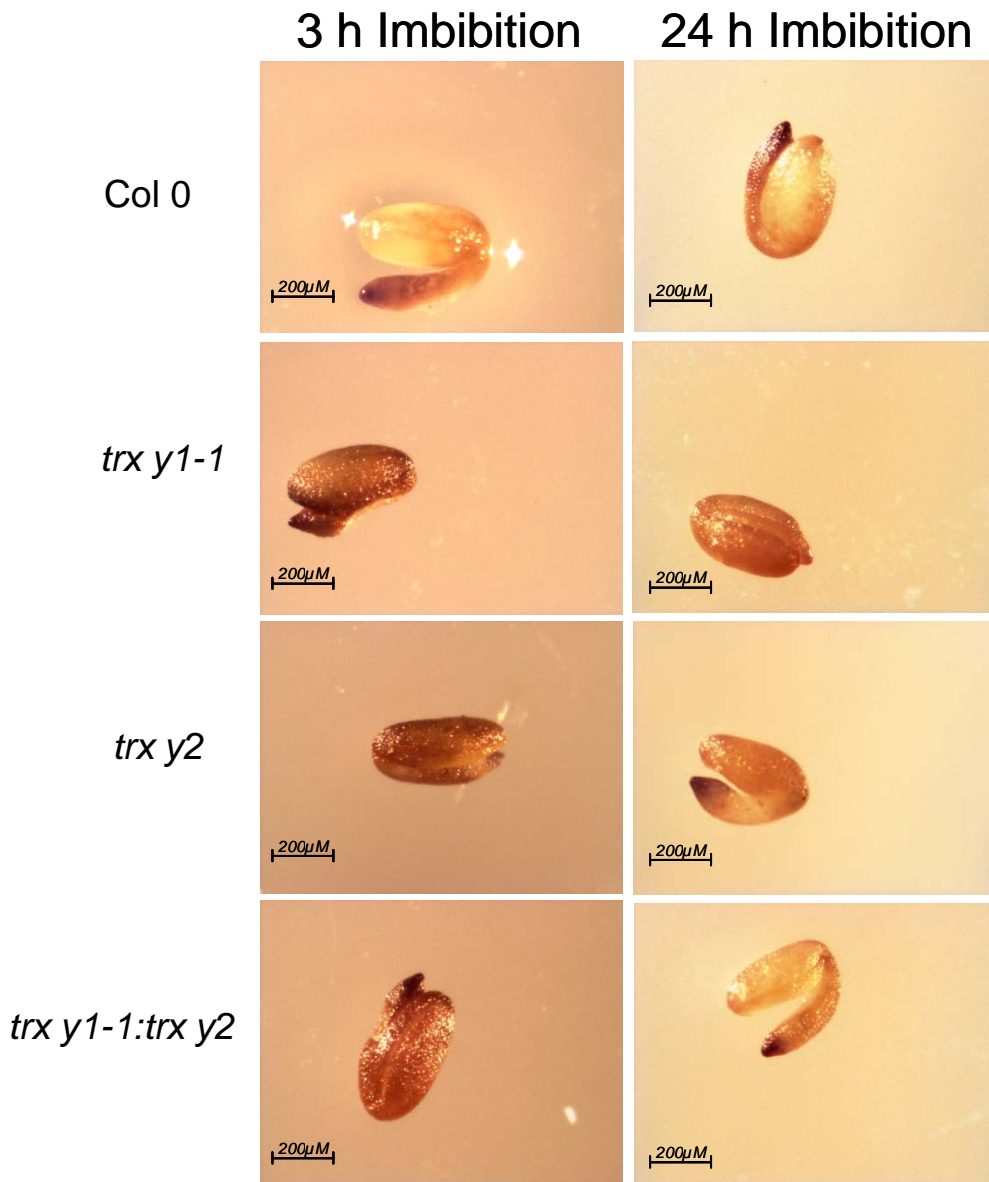
**Figure 61: Production-diffusion of hydrogen peroxide by seeds of TRX y mutants** Dormant seeds and less-dormant seeds (after ripening treatment for 4 weeks, see legend of figure 60 for experimental conditions) were imbibed for 3 or 24 h at 25°C in the dark, prior to incubation in presence of scopoletin. Scopoletin oxidation was monitored using fluorimetry. A concentration of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> diffused from the seeds was calculated upon time of incubation. Data correspond to means ± SD of triplicate experiments.

## **Dosage et localisation *in situ* des formes actives de l'oxygène dans les graines des mutants des TRX du type y**

### Production-diffusion du peroxyde d'hydrogène et levée de dormance

Pour déterminer si les phénotypes de levée de dormance et d'aptitude à la conservation observés pour les mutants de TRX du type y sont liés à une perturbation de l'état redox cellulaire dans les graines, des mesures de la production-diffusion du peroxyde d'hydrogène par unité de temps ont été réalisées sur graines dormantes et moins dormantes ayant subi 1 et 4 semaines de traitement à 25°C, respectivement (voir ci-dessus et Cf. figure 59). Après 3 ou 24 h d'imbibition, les graines sont incubées pendant 30 minutes en présence de scopolétine et d'une peroxydase qui va l'oxyder en utilisant l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> diffusé dans le milieu. L'évolution du signal de fluorescence de la scopolétine, spécifique de la forme réduite, sur la période d'incubation permet de déduire une vitesse de production-diffusion du peroxyde d'hydrogène par le lot de graines analysé. Les résultats obtenus pour les mutants *trx y1-1*, *trx y2* et *trx y1-2:y2* comparés aux graines sauvages sont présentés en figure 61. Lorsque les graines sont dormantes, après 3 h d'imbibition, les différents génotypes ne se distinguent pas. Par contre, après 24 h d'imbibition, la production-diffusion d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, qui est globalement plus faible qu'après 3h d'imbibition, est plus élevée pour le mutant *trx y1-1* par rapport au génotype sauvage. Ces résultats suggèrent que chez Arabidopsis, qu'entre 3 h et 24 h d'imbibition de la graine d'Arabidopsis le taux de peroxyde d'hydrogène diminue et donc que l'équilibre entre sa production et sa détoxification est modifié, soit par une mise en place ou une stimulation des systèmes antioxydants, soit par une inhibition des systèmes de production. Au cours des premières heures de l'imbibition, le contenu en ROS de la graine augmente suite au redémarrage du métabolisme et en particulier de la reprise de la respiration (Bailly et al., 2004). Cette augmentation permettrait de déclencher une signalisation qui conduit à la stimulation des systèmes antioxydants.

Chez Columbia, le gène de la TRX y1 s'exprimant dans la graine sèche et au début de l'imbibition (Collin et al., 2004) dans le mutant *trx y1-1*, sa mutation pourrait expliquer une augmentation de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> causée par la déficience pour un des systèmes antioxydants mis en jeu après 24 h d'imbibition. L'effet de la mutation de la TRX y1 est également retrouvé dans la série d'analyses utilisant des graines moins dormantes (4 semaines de post maturation à sec à 25°C). Globalement, quelque soit le génotype, le contenu en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> après 24 h d'imbibition est plus faible pour des graines non dormantes que dormantes.



**Figure 62: *In situ* staining of superoxide anions in dormant seeds of TRX y mutants.** Wild-type and mutant seeds were imbibed for 3 h or 24 h prior dissection. Intact embryos were stained with 1 mM NBT (NitroBlue Tetrazolium) for 30 min at 25°C in 10 mM Tris-HCl pH 7.5 and extensively washed prior observation with a binocular.



Le comportement germinatif des graines des différents génotypes ne semble donc pas en corrélation avec les mesures de peroxyde d'hydrogène. Après 4 semaines de levée de dormance, les mutants *trx y2* et *trx y1-2:y2* ont un taux de germination respectivement plus et moins élevé que celui de l'écotype Columbia (Cf. figure 59) mais cela ne se traduit pas par des différences significatives de la production-diffusion du peroxyde d'hydrogène des graines après 4 h d'imbibition (Cf. figure 61).

Néanmoins, les dosages d' $H_2O_2$  suggèrent une mise en place des systèmes antioxydants plus efficace chez les graines moins dormantes. Afin d'étayer cette hypothèse, il sera intéressant de reproduire ces analyses en les complétant avec des analyses sur graines sèches. L'examen des charges en ROS de la graine au cours de la phase initiale de l'imbibition et la comparaison entre graines dormantes et non dormantes devrait permettre de mieux cerner le rôle que semble jouer la TRX y1 dans les étapes précoces de la germination.

#### Dosage et localisation *in situ* de la production d'anion superoxyde dans les graines des mutants de TRX y

Des dosages *in situ* des anions superoxydes sur des embryons disséqués à partir de graines dormantes après 3h et 24h d'imbibition ont été réalisés. Ces expériences utilisent le bleu de tétrazolium (NBT) qui, après réaction avec  $O_2^-$ , produit un formazan et permet donc de doser et marquer *in situ* la production de cette forme active de l'oxygène. Les résultats obtenus sur les génotypes Col 0, *trx y1-1*, *trx y2* et *trx y1-2:y2* sont présentés en figure 62. Après 3 heures d'imbibition, l'accumulation de formazan est plus importante dans les embryons mutants que pour les sauvages. En effet, une coloration sombre correspondant à la précipitation du NBT est observée sur toute la surface des embryons mutants de TRX y, alors que cette coloration est absente des cotylédons pour le génotype sauvage. Pour tous les génotypes, une très forte accumulation de formazan est observée au niveau de la pointe racinaire. Après 24 h d'imbibition, la coloration est moins intense qu'après 3 h d'imbibition pour les trois génotypes mutants alors qu'elle ne semble pas avoir évolué dans le génotype sauvage. La différence la plus marquée entre les deux temps d'imbibition concerne le mutant *trx y1-2:y2* dont les cotylédons ne sont plus colorés à 24 h d'imbibition.

Les résultats indiquent que dans l'embryon des graines des mutants de TRX du type y les anions superoxydes sont moins bien détoxiqués. De part sa nature très réactive et l'action des SOD (dismutation en  $H_2O_2$ ) l' $O_2^-$  ne s'accumule pas dans les tissus. Les TRX du type y



étant des substrats efficaces pour des peroxydases qui catalysent la réduction du peroxyde d'hydrogène, on peut émettre l'hypothèse que leur mutation agirait également indirectement sur la détoxification de l'anion superoxyde. Sur la base des patrons de la coloration au NBT obtenus, les TRX y1 et y2 joueraient un rôle anti-oxydant prépondérant dans l'axe embryonnaire et les cotylédons.



# **DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES**

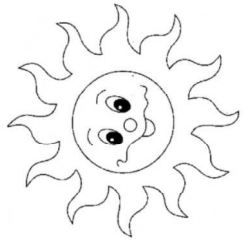


## Régulation redox des déshydrogénases du cycle oxydatif des pentoses phosphate

### Mise en évidence de nouvelles fonctions pour les TRX des types f et y et pour l'isoforme m3

L'étude des spécificités de régulation TRX / G6PDH a permis de montrer que, contrairement à ce qui était mentionné dans la littérature (Wenderoth et al., 1997), les TRX du type f sont capables de réguler très efficacement la forme majoritaire chloroplastique de G6PDH (G6PDH1 chez *Arabidopsis*). Ces analyses ont également révélé que l'isoforme de TRX m3, qui s'était montrée inefficace pour réguler l'activité d'autres cibles de TRX, possède bien une activité oxydoréductase fonctionnelle, de part sa capacité à moduler *in vitro* l'activité de G6PDH plastidiales. Une approche génétique avait permis d'impliquer, cette TRX dans la régulation du transport intercellulaire et dans le maintien des cellules méristématiques et des primordia des organes, mais aucune cible directe de cette TRX n'avait été identifiée (Benitez-Alfonso et al., 2009).

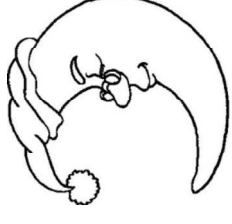
De manière originale, au cours de ce travail de thèse, la régulation redox des G6PDH plastidiales a été étudiée à la fois dans le sens de la réduction, comme c'est en général le cas dans les travaux d'analyse des cibles de TRX, mais aussi dans le sens de l'oxydation, la G6PDH étant activée lorsqu'elle est oxydée par les TRX. Les résultats obtenus ont montré l'intérêt de mener les analyses des régulations redox de cette cible à la fois en réduction et en oxydation puisqu'ils ont révélé qu'une TRX pouvait montrer des efficacités très différentes selon le sens de régulation. Ainsi la TRX y1 est capable d'activer efficacement, mais pas d'inhiber, les G6PDH. Il s'agit du premier exemple de fonction régulatrice pour ce type de TRX, qui jusque là avaient été caractérisées comme des TRX très efficaces pour servir de substrat réducteur de peroxydases à thiols : la PRX Q et une GPX plastidiale (Collin et al., 2004 ; Lamkemeyer et al. 2006; Navrot et al., 2006). Il apparaît donc que, quel que soit leur état redox, les TRX du type y interviennent dans la réponse au stress oxydant. En effet, lorsqu'elles sont réduites, les TRX y interviennent dans la régénération de peroxydases plastidiales tandis que, lorsqu'elles sont oxydées, elles peuvent se comporter comme



HS SH

TRX f

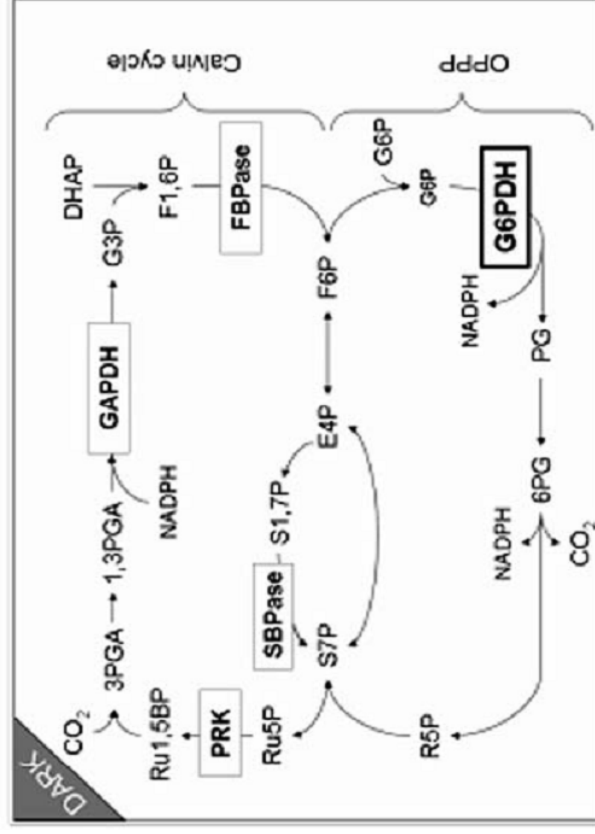
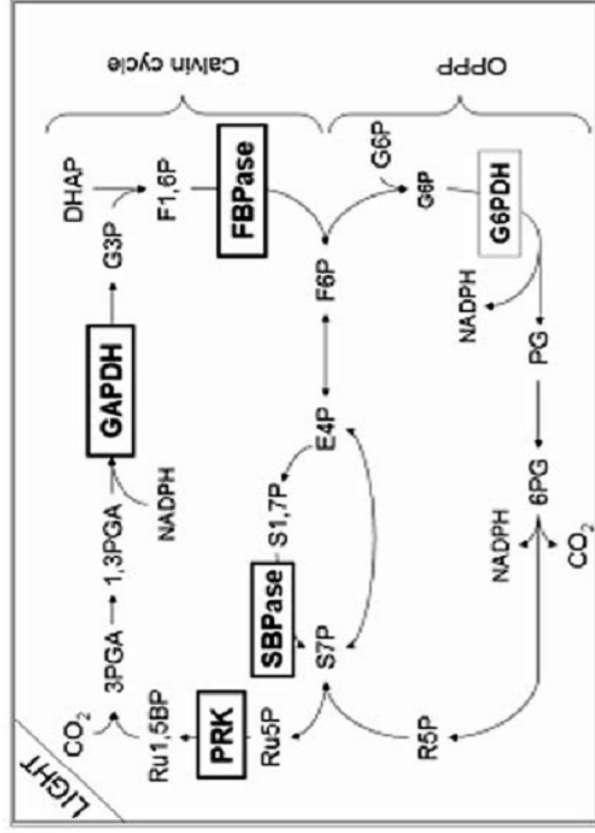
A



S-S

TRX f

B



**Figure 63 : Coordination of the reductive (Calvin-Benson cycle) and the oxidative pentose phosphate pathways by f-type TRX.** Size and rectangle thickness of TRX-f dependent targets indicate activity levels of enzymes. In the light (A), reduction of TRX f allows, on one hand, the activation of the Calvin cycle through the reductive activation of TRX f-strictly dependent enzymes such as phospho-ribulo kinase (PRK), GAPDH and fructose-1,6-bis-phosphate phosphatase (FBPase), Sedoheptulose-1,7-bis-phosphate phosphatase (SBPase) and, on the other hand, the inactivation of the oxidative pentose phosphate pathway (OPPP) by the reductive inactivation of G6PDH catalysing the first step of this pathway. In the dark, (B) oxidised TRX f slows down the Calvin cycle through the oxidative inhibition of TRX f-strictly dependent enzymes and, simultaneously, boosts the OPPP through the oxidative activation of G6PDH. This opposite light-dark modulation of G6PDH and Calvin cycle enzymes mediated by TRX f allows the coordination of the two cycles directing the enzymatic steps shared in common by the two cycles (represented as double targeted lines on the present scheme).



activateurs du cycle oxydatif des pentoses phosphate (générateur de NADPH) via l'activation oxydative des G6PDH.

La dualité du rôle des TRX sur le contrôle du cycle oxydatif des pentoses phosphate pourrait être retransposable à d'autres voies métaboliques régulées par les TRX. Dans les études publiées sur les fonctions régulatrices des TRX, les régulations enzymatiques sous-jacentes n'ont été étudiées que dans le sens de la réduction, ce qui laisse ouverte la possibilité d'éventuelles spécificités dans l'inhibition oxydative des nombreuses cibles de TRX chloroplastiques activées par réduction.

### **Coordination des cycles réducteur (Calvin) et oxydatif des pentoses phosphate par les TRX f**

Dans les chloroplastes, un fonctionnement concomitant du cycle oxydatif des pentoses phosphate et du cycle réducteur des pentoses phosphate (cycle de Calvin) conduirait à la formation d'un cycle futile au niveau des étapes communes aux deux cycles. La régulation antagoniste par la lumière de ces deux cycles est connue depuis longtemps (Scheibe et al., 1981). La mise en évidence, au cours de ce travail de thèse, de la capacité de la TRX f à réguler efficacement l'isoforme de G6PDH1 majoritaire dans les chloroplastes d'Arabidopsis, nous permet de proposer un rôle clé pour cette TRX en tant que coordinatrice des deux cycles (Cf. figure 63).

La TRX f1 étant majoritairement présente dans les organes « verts » d'Arabidopsis et régulant de manière strictement spécifique les enzymes TRX-dépendantes du cycle de Calvin, elle assurerait les co-régulations antagonistes des cycles réducteur (Calvin) et oxydatif des pentoses phosphate. Plusieurs enzymes étant communes aux deux cycles, un régulateur commun semble indispensable. Ainsi, dans les chloroplastes à la lumière, la réduction du pool de TRX f par le système FTR aboutirait à l'activation du cycle de Calvin (activation réductrice des enzymes cibles) et au ralentissement du cycle oxydatif des pentoses phosphate *via* une inactivation réductive de plus de 90 % de l'activité de la première étape enzymatique qui engage ce cycle. La forte inhibition du cycle oxydatif des pentoses phosphate permettrait de limiter les conflits métaboliques avec le cycle de Calvin. *A contrario*, à l'obscurité, l'absence de réduction du pool de TRX conduirait à l'inactivation du cycle de Calvin et à l'activation du cycle oxydatif des pentoses phosphate. La génération de NADPH, via la chaîne de transfert photosynthétique d'électrons et la FNR, étant abolie à l'obscurité, l'activation par oxydation de la G6PDH permettrait donc d'assurer le renouvellement du pool de NADPH pour les diverses réactions métaboliques du chloroplaste dans ces conditions.

**Oxidation (activation)**



**Reduction (inhibition)**



Number of free thiols /monomer	1	3,5
Native apparent molecular weight (kDa)	208.3 ± 9.6	268.8 ± 15.1
K <sub>cat</sub> (min <sup>-1</sup> )	8788.5	707.5
S <sub>0.5</sub> G6P (mM)	3 ± 0.1	15 ± 0.2
G6P accessibility to the active site	Increased	Decreased
Apparent Km NADP <sup>+</sup> (μM)	32.5 ± 2.5	61.5 ± 3.6
K <sub>d</sub> NADP <sup>+</sup> (μM)	17.8	2.6 (*)
K <sub>d</sub> NADPH (μM)	22	1.3 (*)
K <sub>cat</sub> /Km NADP <sup>+</sup>	11.5	270.4

**Table 11: Summary of the biochemical studies on the consequences of G6PDH1redox regulation.** The asterisk indicates that the data were obtained using C149S C157S mutant.

Les travaux évoqués dans ces premiers paragraphes ont fait l'objet d'une publication dans le journal FEBS Letters : Née G, Zaffagnini M, Trost P and Issakidis-Bourguet E (2009) Redox regulation of chloroplastic glucose-6-phosphate dehydrogenase: a new role for f-type thioredoxin. FEBS Lett. 583, 2827-2832 (Cf. Publication).

### **Impact de la régulation redox sur les propriétés catalytiques de la G6PDH1**

Le mécanisme moléculaire conduisant à l'activation ou l'inhibition de l'activité des G6PDH chloroplastiques, suite à la régulation redox par les TRX, a été étudié au cours de ce travail de thèse (Cf. tableau 11). Plusieurs éléments (exposition d'un thiol supplémentaire indépendant des cystéines redox régulées; modification de la masse apparente) laissent penser que des changements conformationnels importants font suite à la réduction de l'enzyme. Ces modifications ne perturbent pas la structure secondaire (dichroïsme circulaire) mais correspondraient plutôt à des réarrangements entre monomères et / ou de domaines de l'enzyme. Suite à la formation du pont disulfure régulateur entre les Cys149 et 157 (validation par mutagenèse dirigée), des réarrangements structuraux conduisent à une augmentation de l'activité spécifique de l'enzyme. Les changements des paramètres catalytiques ( $S_{0,5}$  G6P ;  $K_{mapp}$  NADP<sup>+</sup>) observés entre formes oxydée et réduite, indiquent que l'enzyme utilise plus efficacement ses substrats à l'état oxydé. Cette propriété a pu être reliée à une meilleure accessibilité du G6P au site actif (dérivation des His catalytiques par le DEPC et protection par le G6P). Malgré une diminution du  $K_m$  apparent pour le NADP<sup>+</sup>, l'augmentation de l'efficacité catalytique par oxydation est négativement corrélée avec la capacité de l'enzyme à former un complexe avec le cofacteur ( $K_d$  NADP<sup>+</sup> 10 fois plus faible pour la forme réduite que pour la forme oxydée). Cette propriété pourrait avoir un rôle physiologique dans le chloroplaste en contrôlant la rétro-inhibition de l'enzyme par le NADPH. En effet, le site de fixation du coenzyme des G6PDH différencie peu les formes oxydée et réduite du NADP ( $K_d$  très proche) et ce, quel que soit l'état redox de l'enzyme. De plus, la forme réduite de l'enzyme a plus de 10 fois plus d'affinité pour le NADPH que la forme oxydée. Ainsi, dans un chloroplaste à la lumière en conditions de fonctionnement optimal, où le rapport NADPH / NADP<sup>+</sup> est élevé, l'activité G6PDH pourrait être totalement annihilée par une synergie de l'inhibition réductrice par les TRX et la formation d'un complexe G6PDH/NADPH.



Ce mécanisme permettrait *in vivo* un arrêt complet du cycle oxydatif des pentoses phosphate *via* le verrouillage total de l'activité G6PDH et permettrait donc un fonctionnement optimal du cycle de Calvin.

La modélisation structurale de la G6PDH1 suggère un rôle possible de l'arginine 131 dans le changement d'affinité du site de liaison au coenzyme en fonction de l'état redox de l'enzyme. La production d'une protéine mutée pour ce résidu permettra de tester cette hypothèse. Un mutant de l'Arg131 devrait avoir une faible affinité pour le NADP, même à l'état réduit, mais surtout, le changement d'affinité de l'enzyme pour le cofacteur enzymatique ne devrait plus s'opérer en conséquence de la régulation redox. Si cette prédiction se confirmait expérimentalement, alors l'ensemble des résultats obtenus sur l'étude des effets de la régulation redox de G6PDH1 sur ses propriétés catalytiques, avec le travail de modélisation réalisé, pourront faire l'objet d'une publication.

En complément, au cours de cette thèse, l'obtention de cristaux de G6PDH1 sauvage oxydée et mutante (C149S/C157S), éventuellement en présence du substrat et/ou du cofacteur, a été initiée. La comparaison des structures que nous espérons pouvoir établir prochainement permettra de mieux comprendre les changements structuraux qui font suite à la régulation redox de l'enzyme et conduisent à une modulation de son activité. La résolution d'une structure de la G6PDH1 permettra également de se prononcer objectivement sur l'existence ou non d'un site structural de liaison au NADP(H) sur les isoformes plastidiales de l'enzyme. Il faut noter qu'aucune structure de G6PDH végétale n'étant disponible à ce jour, l'aboutissement des études cristallographiques entreprises au cours de cette thèse présente d'excellentes perspectives de valorisation.

### **Régulation post-traductionnelle d'une 6PGDH chloroplastique**

Les études protéomiques ont identifié la 6PGDH, 3<sup>ème</sup> enzyme du cycle oxydatif des pentoses phosphate, comme potentielle nouvelle cible des TRX. Au cours de ce travail de thèse, une des trois isoformes d'Arabidopsis, proche de la 6PGDH chloroplastique d'épinard, a été obtenue sous forme de protéine recombinante produite dans *E. coli*. Sa modification redox a pu être validée (dosage des thiols par le DTNB), cependant, elle n'a pas été corrélée avec une modulation de l'activité déshydrogénase de l'enzyme. L'analyse bioinformatique (alignement de séquences, Cys spécifiques des 6PGDH plastidiales) et la modélisation structurale qui ont été réalisées suggèrent que les résidus Cys292 et Cys435 pourraient être impliqués dans un pont disulfure.



Il sera intéressant de tester cette possibilité expérimentalement par des expériences de mutagenèse dirigée.

Aucune modification de l'activité déshydrogénase n'a été observée *in vitro* suite à des traitements redox. Une régulation redox de l'activité sur la réaction inverse qui génère le 6-phosphogluconate reste possible et pourrait avoir une importance physiologique toute particulière dans les chloroplastes à la lumière. En effet, en condition réductrice, la production de 6PG à partir de G6P par le cycle oxydatif des pentoses phosphate est très limitée, voire nulle, compte tenu du verrouillage de la G6PDH. Pourtant, à la lumière, une production de 6PG peut être nécessaire pour assurer le fonctionnement de la phosphatase acide (EC 3.1.3.2) qui peut entre autres utiliser ce substrat pour produire du phosphate inorganique (Bozzo et al., 2002). La phosphatase acide associée aux thylacoïdes est importante en cas de carence en phosphate pour produire du phosphate inorganique à partir de phosphate organique (Rengasamy et al., 1981). Une connexion entre le métabolisme du phosphate et la 6PGDH semble d'autant plus concevable que nous avons pu vérifier expérimentalement que l'isoforme plastidiale d'Arabidopsis, identifiée dans une étude du phosphoprotéome de cette même plante (Meimoun et al., 2007), est bien phosphorylable *in vitro*. L'impact de cette modification post-traductionnelle sur la fonctionnalité de l'enzyme reste à élucider.

Une étude récente du protéome chloroplastique (Ferro et al., 2010) a confirmé la localisation subcellulaire des 6PGDH 1 et 2, malgré l'absence d'un peptide d'adressage dans la partie N-terminale de leur séquence protéique. La 6PGDH2 a également été identifiée dans la mitochondrie (Heazlewood et al., 2004). Ces résultats suggèrent donc la possibilité de localisations multiples pour les isoformes de 6PGDH d'Arabidopsis. De manière similaire, la G6PDH1 d'Arabidopsis se localise majoritairement dans le chloroplaste mais elle peut également être adressée au peroxysome *via* un mécanisme de régulation redox, distinct de celui qui régule l'activité de l'enzyme, mettant en jeu l'isoforme G6PDH4 et la TRX m2 (Meyer et al., 2011).

Il serait donc pertinent de vérifier si l'adressage des 6PGDH d'Arabidopsis aux organites pourrait également être redox régulé. Dans ce but, des constructions permettant d'exprimer transitoirement des 6PGDH, dans des versions sauvages ou mutantes pour les Cys régulatrices suspectées, fusionnées avec la GFP pourraient être envisagées pour en étudier la localisation subcellulaire.

			TRX m1	TRX m3	TRX m4	TRX f1	TRX y1	TRX x
P1 Isoform	<b>G6PDH1</b>	Ox	++	+	++	++	++	-
	<b>G6PDH1</b>	Red	++	+	++	++	-	-
P2 Isoform	<b>G6PDH2</b>	Ox	++	++	++	+	++	-
	<b>G6PDH2</b>	Red	++	+	++	-	-	-
	<b>G6PDH3</b>	Ox	++	+	++	-	-	-
	<b>G6PDH3</b>	Red	++	-	+	-	-	-

**Table 12: Summary of TRX efficiencies on redox regulation of G6PDH plastidial isoforms.** Green: high efficiency, orange: mid efficiency; red: low efficiency.



## **Nature des spécificités TRX / cible dans la régulation redox des G6PDH plastidiales**

Les potentiels redox des G6PDH plastidiales de type P1 (G6PDH1) et P2 (G6PDH3) ont été mesurés au cours de ce travail, par rapport aux potentiels redox de l'ensemble des TRX plastidiales. Ils sont moins négatifs ou isopotentiels. Ainsi le transfert des électrons n'apparaît comme un facteur limitant pour aucune des TRX plastidiales vis-à-vis de la régulation redox des G6PDH. Les différences de potentiels redox entre les TRX ne peuvent donc pas expliquer les spécificités TRX / G6PDH. Les ponts disulfure régulateurs des G6PDH1 et 3 ayant des potentiels redox très proches, ce critère ne permet pas, non plus, d'expliquer les spécificités différentes de régulation redox des G6PDH de type P1 (G6PDH1) et de type P2 (G6PDH2 et 3) par les thiorédoxines (Cf Table 12).

Une des originalités de ce travail de thèse a été d'examiner la régulation redox de plusieurs isoformes d'une cible de TRX plastidiale, les isoformes de G6PDH d'*Arabidopsis* présentant des profils d'expression très distincts en fonction de l'organe (Wakao et Benning, 2005) et analyses de transcrits par RT-PCR quantitative), comme cela a pu également être observé pour les membres de la famille des TRX plastidiales (V. Massot, résultats obtenus au laboratoire). En menant cette analyse, notre objectif a été d'intégrer la situation *in planta* où la régulation d'une cible par une TRX est conditionnée par la co-expression de leurs gènes respectifs dans le même organe, au même moment au cours du développement de la plante et dans les mêmes conditions physiologiques. Au cours de ce travail de thèse, de manière cohérente, nous avons montré que la TRX f1, dont le gène s'exprime exclusivement dans les organes photosynthétiques d'*Arabidopsis*, régule efficacement la G6PDH1, forme majoritaire dans les chloroplastes. De même, la TRX y1 active efficacement les isoformes de G6PDH (G6PDH2 et 3) dont les gènes s'expriment principalement dans les organes non-photosynthétiques tout comme celui de la TRX y1. Enfin, nous avons trouvé que les TRX du type m régulent efficacement les trois isoformes de G6PDH étudiées, ce qui peut avoir un sens physiologique, puisque les gènes de ces TRX s'expriment globalement dans tous les organes, même si leur expression est plus forte dans les organes photosynthétiques.

A l'échelle biochimique, nous avons considéré que des interactions spécifiques entre une TRX et sa cible, de type protéine-protéine, étaient les déterminants des spécificités de régulation. Cette hypothèse a été testée expérimentalement par des approches biophysiques.



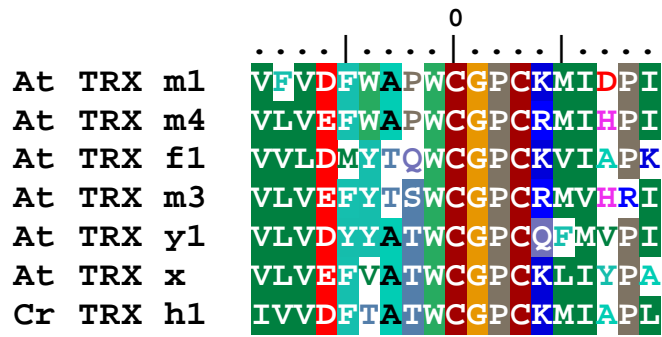
L'ensemble des études d'interaction mises en œuvre indique clairement que les modalités d'interaction entre la TRX et sa cible sont différentes suivant que la TRX agit comme régulateur ou comme substrat de réduction. L'exemple de la formation d'un complexe de forte affinité entre la TRX de type o et la PRX II F mitochondriale indique que, dans le cas où la TRX sert de substrat réducteur pour la cible, l'interaction TRX / cible peut être assez stable pour être étudiée par microcalorimétrie (Barranco-Medina et al., 2008). L'importance mécanistique pour la catalyse de la formation d'un complexe TRX / PRX vient de la nécessité pour la PRX d'interagir avec son réducteur après chaque cycle catalytique pour être régénérée et donc à nouveau fonctionnelle. Lorsque la TRX agit comme régulateur, un événement unique de transfert de 2 électrons entre la TRX et sa cible est suffisant pour transmettre le signal redox et conduire à une modulation fonctionnelle. Dans cette situation, la formation d'un complexe TRX / cible stable semble moins indispensable et pourrait même apparaître comme une mobilisation inutile du régulateur.

En résonance plasmonique de surface, aucune interaction de type protéine-protéine entre des TRX et la G6PDH1 n'a pu être mise en évidence. Ces résultats suggèrent que dans le contexte d'une transduction de signal l'interaction entre la TRX et sa cible est très faible et particulièrement labile, malgré la formation d'un complexe covalent transitoire au cours du mécanisme moléculaire du transfert redox.

En DSC, la stabilisation de la G6PDH1 en présence de TRX, sans lien avec la capacité régulatrice de l'isoforme, est probablement liée à l'activité chaperon connue pour les TRX mise en jeu dans les conditions de dénaturation thermique (Kern et al., 2003).

Dans leur ensemble, les résultats convergent vers l'hypothèse d'une interaction pouvant se limiter à une simple collision entre les deux partenaires. La stœchiométrie TRX / cible pourrait *in vivo* être un moyen de contrôler la probabilité de rencontre et ainsi, même dans le cas d'une régulation post-traductionnelle, l'abondance d'une TRX pourrait être importante dans cette fonction. A concentration élevée, toutes les TRX plastidiales sont capables de réduire la G6PDH1, plus ou moins efficacement, mais ce résultat montre bien que pour une TRX inefficace comme la TRX x, il n'y a pas d'incapacité fonctionnelle et donc d'incompatibilité structurale.

La nature des résidus encadrant le site actif consensus des TRX pourrait être un facteur déterminant pour un bon positionnement des partenaires, l'un par rapport à l'autre, pour une régulation efficace. Un examen des résidus encadrant le site actif des TRX permet d'étayer cette hypothèse (Cf. figure 64). Par exemple, on constate que les TRX les plus efficaces dans la réduction de G6PDH1 (les TRX m1 et m4) possèdent spécifiquement une proline en



**Figure 64: Sequence alignment of TRX active site region.** TRX sequences are ordered (from top to bottom) from the most efficient to the less efficient isoforme for G6PDH1 reduction. The N-terminal cysteine of the active site signature (underlined) is taken as numbering reference. Conserved residues are represented as coloured boxed letters. Accession number: At TRX m1 (AEE27596) At TRX m4 (AEE75659) At TRX f1 (AEE75659) At TRX m3 (AEC06418) At TRX y1 (AEE35886) At TRX x (AEE32536) Cr TRX h1 (EDP02569).

position -2 par rapport la cystéine N-terminale. Un résidu aromatique en position -4 est présent dans les 5 isoformes capables d'activer la G6PDH1 à de faibles concentrations (les TRX f1, m1, m3, m4 et y1). Pour la TRX y1 qui n'est pas efficace dans la réduction, la présence d'un résidu polaire (Gln) en position + 4 à la place d'un résidu basique (Lys ou Arg) suggère l'importance de la charge positive à cette position, par rapport à la capacité d'inhibition. Nous constatons aussi que la TRX y1 se distingue des isoformes efficaces en réduction par la présence en position + 5 d'une Phe à la place d'une Met ou d'une Val. Ces résidus étant tous de nature polaire, l'encombrement stérique du cycle aromatique pourrait jouer un rôle dans l'interaction avec la cible. Les hypothèses émises pourront être éprouvées en réalisant des formes mutées de TRX où ces acides aminés seraient substitués et en testant l'impact des mutations sur les capacités de régulation redox.

Un autre facteur à ne pas exclure jouant sur la spécificité TRX / cible pourrait être la capacité d'une TRX à réduire le pont intermoléculaire transitoire nécessaire à l'aboutissement du processus de réduction. Les expériences en RPS suggèrent que le complexe formé entre la G6PDH1 et la TRX h1 monocystéinique de *Chlamydomonas* (cette TRX étant un très mauvais réducteur pour la G6PDH1) est plus difficile à résoudre que le complexe formé avec la TRX y2.

En perspective d'étude à ce travail, des expériences basées sur l'utilisation de mutants non cystéiniques de TRX est envisagée, elle permettra de tester la composante structurale du rôle des TRX dans la régulation redox. L'aptitude de ces formes mutantes à faciliter la réduction du pont disulfure régulateur de la G6PDH1 par le DTT ou son oxydation par des ROS, sera examinée. L'incapacité des ROS à activer directement l'enzyme suggère un effet structurant des TRX sur leur cible au moment du transfert d'électrons.

Ces analyses apparaissent essentielles pour compléter les études menées au cours de ce travail de thèse et nous renseigneront sur le mécanisme d'interaction et les déterminants de la spécificité fonctionnelle des TRX plastidiales vis-à-vis de leur cible.

### **Mécanisme d'oxydation des TRX**

Le rôle des ROS dans l'oxydation des TRX est depuis longtemps considéré comme central, mais les mécanismes moléculaires qui conduisent à l'oxydation en pont disulfure du dithiol du site actif des TRX sont controversés.



Le système biologique TRX / cible étudié au cours de cette thèse présente l'avantage de mettre en jeu une cible qui est activée par la formation d'un pont disulfure, et qui n'est pas directement activable par l' $H_2O_2$ .

Ce système permet donc de distinguer les effets néfastes indésirables que les ROS peuvent avoir, et qui en général inhibent l'activité catalytique d'une enzyme, de leur effet dans la régulation redox qui est positif dans le cas de la G6PDH, puisqu'elle s'active par oxydation. Nos résultats sur l'activation de la G6PDH1 par la TRX m4 en présence de DTT ou de  $H_2O_2$  montrent que l'oxydation de la TRX via un échange dithiols - pont disulfure (avec le DTTox) est nettement plus efficace qu'une oxydation directe par le ROS. Cette donnée expérimentale est en faveur de l'hypothèse qu'*in vivo* la transduction par les TRX d'un signal oxydatif passerait par l'action de peroxydases qui utilisent les TRX comme substrat de réduction.

Cependant, dans le système Fd / TRX reconstitué, après une pré-illumination inhibant l'enzyme, une réactivation oxydative à l'obscurité est mesurée. L'ajout de DTT oxydé, mais aussi d' $H_2O_2$ , accélère la réactivation à l'obscurité. Cette série d'analyses suggère une action directe des ROS sur un ou plusieurs composants du système Fd / Trx. Très probablement, une oxydation du centre Fe/S de la ferrédoxine et/ou de celui de la FTR se produit en présence de ROS. Dans le système reconstitué *in vitro*, l'oxygène moléculaire dissous dans le milieu expérimental, ou d'autres formes actives de l'oxygène générées à la lumière pendant le fonctionnement de la chaîne de transfert d'électrons thylacoïdienne sont à l'origine de cette oxydation.

L'apport d'une peroxydase avec la préparation de thylacoïdes reste cependant possible (Pitsch et al., 2010). Elle pourrait utiliser la TRX fournie dans le système comme substrat de réduction, et donc conduire à son oxydation. Cette hypothèse pourrait être testée en utilisant des anticorps spécifiques (disponibles au laboratoire ou dans des équipes collaboratrices) des peroxydases à thiol plastidiales dépendantes des TRX.

Afin d'étudier en détail la ou les voies de transduction du signal oxydatif au sein du système Fd / TRX, il sera intéressant de tester directement le rôle des peroxydases à thiols en les rajoutant dans le système, mais aussi celui d'autres enzymes impliquées dans la détoxification des ROS n'impliquant pas les TRX (Super Oxyde Dismutase, Catalase).





## **Etude *in planta* de fonctions pour les TRX y**

Une étude fonctionnelle *in planta*, par une approche de génétique inverse, a été développée au cours de ma thèse pour les TRX plastidiales du type y.

Les analyses biochimiques menées au laboratoire sur les TRX y1 et y2 n'ont pas permis de les distinguer d'un point de vue fonctionnel. Par contre, les gènes de ces TRX présentent des profils d'expression très différents, ce qui laisse penser qu'*in planta* les deux TRX du type y pourraient avoir des rôles physiologiques distincts.

L'analyse des niveaux de transcrits au sein des lignées mutantes disponibles au laboratoire ont permis de valider les lignées *trx y1-1*, *trx y2* et *trx y1-1 :y2* comme des outils fiables et adaptés pour l'étude spécifique du rôle des TRX y *in vivo*. En effet, les analyses par RT-PCR quantitative montrent que les transcrits des gènes *Trx y1* et *Trx y2* sont absents, ou très fortement diminués, par rapport à la plante sauvage dans les feuilles, racines et graines des mutants correspondants.

Les niveaux des transcrits des gènes codant les autres TRX plastidiales ont également été examinés dans le double mutant *trx y1-1 :y2*. Aucune compensation significative des mutations des gènes des TRX y par la surexpression d'une autre TRX plastidiale n'a été détectée dans cette lignée.

En conditions de culture optimales, les mutants de TRX y ne présentent aucun phénotype apparent, bien que, des analyses en cours au laboratoire suggèrent qu'ils seraient moins tolérants à un stress hydrique. Ce résultat tend à confirmer la fonction anti-oxydante mise en évidence pour ce type de TRX par les études biochimiques menées *in vitro* (activateur des G6PDH plastidiales, donneur d'électron à des peroxydases plastidiales). La forte expression de la TRX y1 dans les organes non-photosynthétiques, nous a incité à orienter l'étude des mutants des TRX y sur des aspects fonctionnels précis : l'activité G6PDH *in situ* dans la racine et la qualité germinative de la graine dans laquelle les ROS jouent un rôle essentiel.



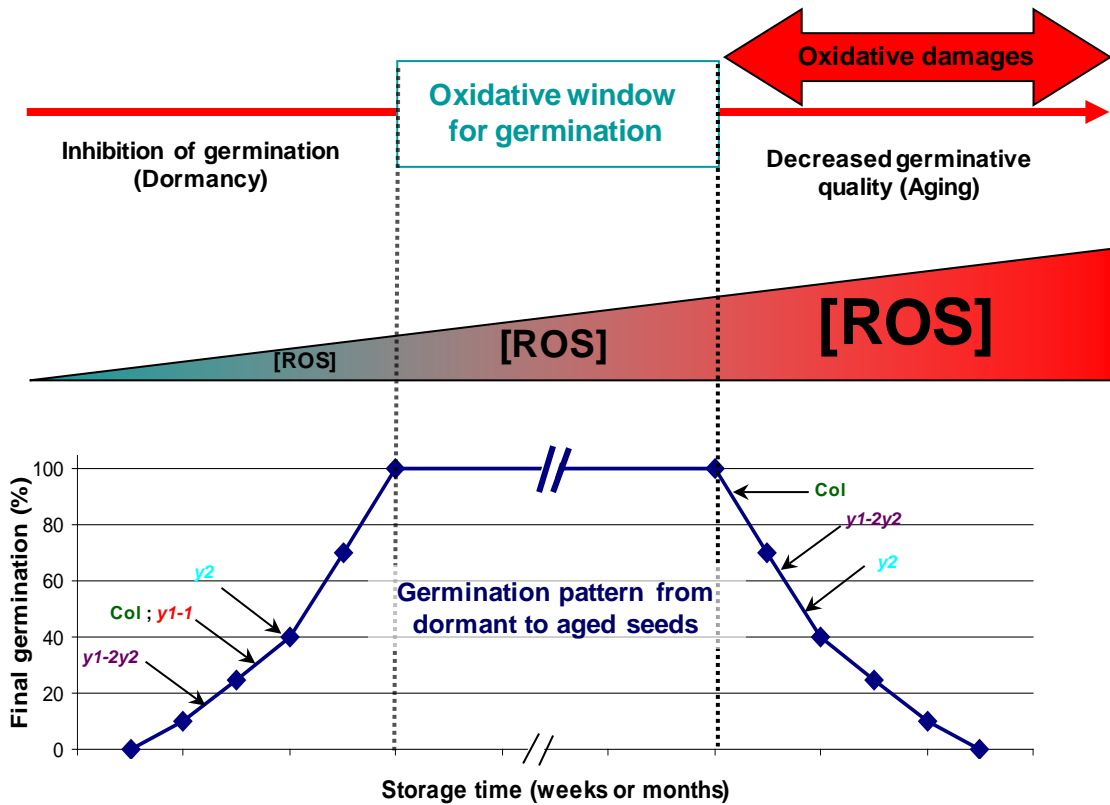
## **Impact de la perte de fonction des TRX y sur l'activité G6PDH racinaire**

L'étude de l'activité G6PDH racinaire a été menée par une technique de coloration *in situ*. Chez le génotype sauvage, une coloration intense a été détectée au niveau de la pointe racinaire (zone d'élongation de la racine principale) et l'activité G6PDH ne semble pas affectée par la mutation des gènes de TRX y. Pourtant, nous avons constaté que, lorsque les plantes sont cultivées sur un milieu contenant du saccharose, l'activité G6PDH n'est plus détectable dans les racines des plantes sauvages alors qu'elle reste très intense dans celles des mutants des TRX y. Ces analyses ne permettent pas de valider *in planta* le rôle des TRX y en tant qu'activateur oxydatif des G6PDH mais elles révèlent un phénotype racinaire pour les mutants correspondants. La présence de saccharose dans le milieu de culture conduit à une disparition de l'activité G6PDH chez le génotype sauvage qui n'est pas observée chez le mutant *y1-1y2*. Il sera intéressant de vérifier si le saccharose a une incidence sur les niveaux des gènes de G6PDH dans la racine. Des analyses de transcrits ont été réalisées sur des racines de plantes sauvages et mutantes. Elles montrent qu'en absence de saccharose dans le milieu de culture, la mutation des gènes des TRX y n'a pas d'incidence sur l'expression des gènes des isoformes qui s'expriment dans la racine : G6PDH, 3, 5 et 6, mis à part le gène de la G6PDH5 (codant une protéine de faible activité spécifique) dont l'expression est augmentée de 30%. Cette augmentation limitée, en admettant qu'elle se reproduise en présence de saccharose, ne semble pas pouvoir expliquer le différentiel très prononcé constaté dans ces conditions entre racines sauvage et mutante.

Une augmentation de l'activité G6PDH a souvent été rapportée en cas de stress pro-oxydant chez les végétaux. Par exemple, dans la feuille d'olivier, l'activité G6PDH est augmentée en réponse à un stress salin qui a été montré comme induisant une augmentation du niveau des ROS (Valderrama et al., 2006). Les résultats suggèreraient donc un rôle des TRX y dans le contrôle de l'homéostasie redox cellulaire de la racine.

## **Rôle des TRX y dans les processus physiologiques de la germination**

L'importance des TRX y dans la détoxification des ROS a été abordée par l'étude du comportement germinatif des graines des mutants correspondants.



**Figure 65: Seed germination behaviour of TRX  $y$  mutant compared to wild-type.** Results on the germination experiment were placed in regard of the concept of an oxidative window for germination. Final germination rates at 25°C in the dark of 4 weeks after-ripened seeds (on the left) or 9 Months aged seeds (on the right) are reported.

Les tests de germination réalisés sur les graines des mutants *trx y1-1*, *trx y2* et *trx y1-2:y2* montrent que leur comportement germinatif est perturbé aussi bien au cours de la levée de dormance qu'au cours du vieillissement des graines.

Des études antérieures ont mis en évidence que, comme pour le tournesol (Oracz et al., 2007 ; 2009), les ROS peuvent jouer un rôle positif dans la levée de dormance chez *Arabidopsis thaliana*, écotype Columbia (Leymarie et al., 2011, Liu et al., 2010). Les phénotypes de germination observés chez les mutants des TRX y sont corrélés à une perturbation de l'homéostasie redox, comme le suggèrent les dosages de peroxyde d'hydrogène et les colorations *in situ* de l'anion superoxyde.

Dans leur ensemble, les résultats obtenus permettent de proposer un rôle pour les TRX y dans les processus de germination chez *Arabidopsis* via une perturbation de l'homéostasie redox (Cf. figure 65). L'implication des TRX y serait directement liée à leur capacité à réduire des peroxydases plastidiales dont l'expression dans la graine devra être étudiée.

### **Conclusion sur l'analyse fonctionnelle *in planta* des TRX plastidiales d'*Arabidopsis***

Globalement, les études menées au cours de cette thèse sur la caractérisation des mutants de TRX du type y montrent qu'ils présentent des phénotypes qui ont pu être révélés par des analyses précises, menées dans la racine et dans la graine. L'étude a été guidée par les données fonctionnelles préalablement obtenues sur ces TRX, des analyses biochimiques de leurs spécificités et des profils d'expression de leurs gènes.

Les données biochimiques disponibles sur les spécificités des TRX plastidiales vis-à-vis de leurs cibles et les profils différentiels d'expression de leurs gènes étayent l'hypothèse de l'existence de spécialisations fonctionnelles au sein de cette famille multigénique, chez la plante modèle *Arabidopsis thaliana*.

Ainsi, l'étude *in planta* du rôle et de l'importance physiologique des TRX plastidiales par une approche de génétique inverse apparaît comme une stratégie de recherche réalisable et pertinente dans le contexte de leurs spécialisations fonctionnelles.



# **MATERIELS ET METHODES**





## **Matériel végétal et conditions de culture**

### **Pisum sativum var. Nain merveille de Kelvedon**

Les graines de petits pois var. Nain merveille de Kelvedon sont semées sur vermiculite et cultivées en serre en jours longs. Les jeunes feuilles de plantes âgées de 5 semaines sont utilisées pour la préparation de thylacoïdes.

### **Arabidopsis thaliana**

Six génotypes d'*A. thaliana* écotype Columbia ont été utilisés dans cette étude. Le génotype sauvage, (Col-0) et 5 génotypes mutants d'insertion ADN-T (SALK) pour les TRXs du type y :

- 2 lignées indépendantes mutantes pour l'isoforme y1 (At1g7660), la lignée N603154 appelée *trxy1.1* et la lignée N541621 appelée *trxy1.2*.
- 1 lignée mutante pour l'isoforme y2 (At1g43560), la lignée N 628065 appelée *trxy2*  
2 lignées doubles mutantes y1y2, la lignée *trxy1.1-trxy2* et *trxy1.2-trxy2*.

Le positionnement de L'ADN-T au niveau des gènes de TRX du type y pour les génotypes mutants est présenté en figure 66.

### **Production des lots de graines d'Arabidopsis**

Les graines sont semées sur terreau et cultivées en jours longs (photopériode de 16 h) en chambre de culture (22°C, 60 % d'humidité relative (HR) le jour avec un éclairage constant de 200  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , et 20°C, 55 % HR la nuit) avec un arrosage régulier tous les 2 ou 3 jours. Les plantes sont repiquées en pots individuels au bout de 2 semaines. Après repiquage, les plantes sont placées dans les mêmes conditions de culture que précédemment.

Les plantes sont récoltées 8 semaines après semis et sont mises à sécher 10 jours (50% HR 18 °C à l'obscurité). Les plantes sont égrainées individuellement, et une partie des graines a été stockée à température ambiante pendant plusieurs semaines pour lever la dormance puis au grainier (60%HR, 10°C à l'obscurité) et constitue le lot de graines « Non Dormantes » (ND). L'autre partie des graines a été conservée à -20°C aussitôt après récolte, ce qui permet de maintenir la dormance pendant plusieurs mois (Millar et al, 2006; Fujii et al, 2007) et constitue le lot de graines « dormantes » (D).

Target gene	Orientation	Primer name	sequence 5'→3'
pGENI construction			
Strep tag II	F	Linker sens	AAACTCGAGAGCGCTAGCGCTAGCGCTTAGCGCTTGGAGCCACCCGCGAGTTGAA AAA TAATAA GGATCCAAA
Strep tag II	R	Linker reverse	TTTGGATCCTTATTA TTTTTCGAACTCGGGTGCTCCAAGCGCTAGCGCTAGC GCTAGCGCTCTCGAGTTT
Bacteria screening and sequencing			
pGENI vector	F	pET near seq up	GAGATCTTTTATTA AAAACAATTGAAA TTCTTCC
pGENI vector	R	pET near seq down	CGTTATTGATCGTATT
pGENI-6PGDH1 construction			
6PGDH1	F	6PGDH1 up	AAACCATGGAGTCGGCCGCACACTATCCCG
6PGDH1	R	6PGDH1 down	AAACTCGAGATGGTTCTTCTTCTGGCAAAGCTTAGTCC
pASK-6PGDH1 site mutagenesis and pASK vector sequencing			
66PDH1	F	66PDH C149S/C157S up	GTACTTTAACTAGCCGGATTGATCAGAGGGAAAAAAGTGGGG
66PDH1	R	66PDH C149S/C157S down	CCCCCACTTTTTTCCCTCTGATCAA TCCGGCTAGTTAAAGTAC
pASK	F	pASK up	GAGTTATTTTACCACCTCCCT
pASK	R	pASK down	CGCAGTAGCGGTAACGG

**Table 13: Oligonucleotides used for pGENi construction, bacteria screening, 6PGDH cloning and site directed mutagenesis.** Orientations are symbolised as F: forward; R: reverse

## **Culture *in vitro***

Des graines stériles ND des six géotypes sont semées sous hotte à flux laminaire sur un milieu ½ MS (Murashige et Skoog, 1962) additionné de saccharose 10 g.L<sup>-1</sup>. Les boîtes sont ensuite scellées avec du scotch 3M micropore, puis placées verticalement (pour éviter que les racines ne pénètrent dans le milieu et faciliter leur prélèvement) en salle de culture jours longs (photopériode de 16 heures, humidité relative de 60%, 20°C pendant la période de lumière, et 18°C pendant la période d'obscurité). Les plantules utilisées sont âgées de 4 ou 7 jours après semis.

La solution de stérilisation est préparée avec une pastille Bayrochlor (Bayrol) dissoute dans 40 mL d'eau. Cette solution est diluée au 1/10<sup>ème</sup> dans de l'éthanol 95 %. Les graines sont incubées 8 min sous agitation régulière puis rincées 2 fois à l'éthanol 95 %. Elles sont ensuite séchées sous une hotte stérile à flux laminaire avant d'être semées.

## **Les souches bactériennes d'*Escherichia coli***

### **La souche DH5αF'**

Cette souche a le génotype F'φ80lacZDM15 recA1 endA1 gyr96 thi -1 hsdR17 (rk-, mk+) supE44 relA1 deoR D(lacZYA-argF)U169 (Hanahan, 1983). Elle ne peut pas effectuer de recombinaison et a été utilisée pour toutes les étapes de clonage et d'amplification des plasmides.

### **La souche BL21 (DE3)**

Cette souche a le génotype hsdS gal (λc Its857 ind1 Sam7 nin5 lacUV5-T7 gene1) (Studier and Moffat, 1986). Elle a été utilisée pour l'expression et la production à haut rendement des protéines recombinantes pour lesquelles les ADNc ont été clonés dans des vecteurs de type pET (plasmide Expression with T7 RNA polymerase, Novagen).

## **Conditions de culture**

Les souches bactériennes sont cultivées et entretenues sur milieu Luria-Bertani gélosé à 37°C (LB agar, Invitrogen). L'antibiotique approprié est ajouté au milieu (30 à 100µg.ml<sup>-1</sup>) pour la sélection des bactéries transformées. Les bactéries sont amplifiées en milieu LB



liquide (LB Broth Base, Invitrogen), à 37°C sous agitation à 180 rpm. L'antibiotique approprié est ajouté pour maintenir la sélection des bactéries transformées lors de l'amplification des plasmides ou pour la production de protéines recombinantes. La croissance de la culture bactérienne est suivie par mesures spectrophotométriques à 600 nm ( $1 \text{ DO}_{600} = 8.10^6 \text{ cellules.mL}^{-1}$ ).

## **Les plasmides**

### **Le vecteur pRARE 2 (Novagen)**

Le vecteur pRARE code pour les ARNt rares chez la bactérie *E.coli* à savoir argU, argW, ileX, glyT, leuW, proL, metT, thrT, tyrU, thrU et argX, permettant de reconnaître les codons AGG, AGA, AUA, CUA, CCC, GGA, CGG respectivement. Il a été utilisé pour la production de l'isoforme recombinante G6PDH4. Ce vecteur porte un gène de résistance au chloramphénicol et permet la sélection des bactéries transformées sur milieu additionné de cet antibiotique.

### **Les vecteurs pASK-G6PDH**

Le vecteur pASK (IBA) est un vecteur d'expression de protéine recombinante sous le contrôle d'un promoteur inductible à l'anhydrotetracycline. Il est utilisé dans la souche bactérienne DH5 $\alpha$ , et permet de rajouter à une extrémité de la protéine une étiquette Strep - tag II composée de 8 acides aminés mimant la structure de la biotine. Les propriétés du Strep tag II ont été utilisées pour purifier les protéines recombinantes ainsi que pour la construction de la sensor chip utilisée pour les analyses en SPR. Le vecteur pASK porte un gène de résistance à l'ampicilline et permet la sélection des bactéries transformées sur milieu additionné de cet antibiotique.

Les constructions pASK -G6PDH pour les 4 isoformes plastidiales ont gracieusement été mises à notre disposition par le laboratoire du professeur C. Benning, et permettent l'expression des ADNc des G6PDHs plastidiales matures d'*A. thaliana* avec l'étiquette Strep tag II en C terminal (Wakao & Benning 2005).

### **le vecteur pGENI**

Ce vecteur d'expression a été construit (Cf. plus loin) à partir du vecteur commercial pET 16b (Novagen) au sein duquel une séquence codant pour le Strep tag II a été intégrée dans le site multiple de clonage dans le but de combiner l'efficacité du système d'expression T7 avec les qualités d'utilisation du strep tag II.



Le vecteur pET 16 b possède une origine de répllication bactérienne (ORI) qui permet la répllication autonome du plasmide. Le promoteur et le site d'initiation de la transcription ainsi que le terminateur proviennent du gène 10 du phage T7 (Φ 10). Un gène de résistance à l'ampicilline permet la sélection des bactéries transformées sur milieu additionné de l'antibiotique correspondant.

## **Méthodes relatives aux acides nucléiques**

### **Méthodes générales relatives à l'ADN**

#### Amplification de l'ADN par PCR

La réaction de polymérisation en chaîne (PCR) consiste à amplifier un fragment d'ADN encadré par deux séquences connues. Elle nécessite de déterminer et de synthétiser des couples d'amorces. Le mélange réactionnel de PCR contient : 100 à 500 ng de matrice d'ADN, 0,4-1 mM de désoxyribonucléotides (dNTP), 0,5-1 μM de chaque amorce ainsi qu'une unité de GoTaq® Flexi DNA Polymerase (Promega).

La PCR est un enchaînement de cycles successifs (30-35) comprenant successivement trois étapes, de dénaturation de l'ADN (15-30 sec à 94°C), d'hybridation des amorces (30 sec à 50-60°C) et de polymérisation d'une matrice d'ADN (60-90 sec à 72°C). Les conditions de la PCR varient en fonction de la température de fusion ( $T_m$  ou melting temperature) des amorces et de la taille du fragment qu'on cherche à amplifier. Toutes les PCRs ont été réalisées avec un thermocycleur GeneAmp® PCR System 2700 ou 9700 (Applied Biosystems).

#### Dosage des acides nucléiques

Les acides nucléiques sont dosés directement par spectrophotométrie au NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific). Un μL de la préparation est déposé sur le lecteur puis un faisceau laser lit l'absorbance à travers la colonne de liquide formée par magnétisme. Un spectre est réalisé tandis que l'absorbance à 260 nm est donnée directement tout comme le rapport de pureté  $A_{260}/A_{280}$  et la concentration de l'échantillon. Cette dernière est calculée sachant qu'1 unité d'absorbance à 260 nm correspond à une concentration de 40 μg/mL pour l'ARN et 50 μg/mL pour de l'ADN double brin.





## Electrophorèse en gel d'agarose

Les échantillons d'ADN sont mélangés à du bleu de charge (Tris HCl pH 7,9 100 mM ; Bleu de bromophenol 0,25% (p/v) ; Xyène cyanol 0,25% (p/v) EDTA 250mM Glycérol 50% (p/v) à diluer 10 fois, puis déposés sur un gel d'agarose (agarose 0,8 à 1 %, BET 1 µg/mL) réalisé dans du tampon TAE (Tris-acétate pH 7 40 mM ; EDTA 1mM), et enfin, séparés en fonction de leur taille dans un champ électrique de 120 V dans le même tampon. Le marqueur de taille utilisé est le Smartladder (Eurogentec). Le BET, agent intercalant fluorescent de l'ADN, permet de visualiser l'ADN sous UV.

## Séquençage

Le séquençage a été utilisé pour vérifier les séquences nucléiques lors de différents étapes de clonage, mais également pour valider et préciser la nature des produits de PCR lors de l'amplification de l'ADNc de la 6PGDH1 d'Arabidopsis. L'ensemble des séquençages a été réalisée en prestation de service chez Eurofins MWG operon (<http://www.eurofinsdna.com/products-services/custom-dna-sequencing.html>).

## **Méthodes liées à l'ARN**

### **Extraction d'ARN totaux d'organes végétaux**

Les ARN totaux ont été extraits à partir de 30 mg de matériel frais congelé dans l'azote liquide et réduits en poudre, à l'exception des graines (10 mg). Le kit NucleoSpin® RNA Plant kit (Macherey-Nagel) a été utilisé pour l'ensemble des extractions. Ce kit est basé sur le principe de séparation des acides nucléiques grâce à la présence d'ions chaotropes qui déstructurent les protéines. Les ARN et les ADN s'adsorbent sur une membrane de silice dans un tampon éliminant toute trace de RNAses. Après un traitement à la DNase, les seuls acides nucléiques restant sont les ARN, ils sont élués dans 30 µL d'eau (RNase free) fournie dans le kit. L'extraction des ARN totaux de graines nécessite de rajouter 5% (p/v) de PVP (polyvinylpyrrolidone) au tampon d'extraction, afin d'adsorber les polyphénols.



## **Transcription inverse**

L'étape de transcription inverse est réalisée avec 3 µg d'ARN totaux purifiés. Le kit SuperScript II First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen) a été utilisé selon les recommandations du fournisseur. La transcription inverse est réalisée avec une amorce oligo(dT) qui permet la synthèse des ADN complémentaires (ADNc) à partir des ARN messagers qui reflètent l'expression des gènes dans l'échantillon analysé.

## **PCR semi quantitative**

La RT-PCR semi-quantitative permet de comparer les variations relatives d'expression de gènes en les comparant à celle d'un gène « domestique » (PP2A) dont l'expression est constante. Les réactions PCR ont été réalisées sur 25 cycles avec 10 ng d'ADNc et 250 nM d'amorces spécifiques pour chaque gène analysé (Cf. table 13). Le nombre de cycles a été déterminé de manière à se situer dans la phase exponentielle de l'amplification par PCR, permettant ainsi l'analyse semi-quantitative de l'expression du gène. Les amplicons sont ensuite analysés sur gel d'agarose 0,8%.

## **PCR quantitative en temps réel**

L'étude des profils d'expression des gènes a été conduite en utilisant la technique de PCR quantitative en temps réel. Basée sur l'utilisation des ADNc, ces PCR permettent de détecter les niveaux d'expressions des gènes en utilisant des couples d'amorces spécifiques (Cf. table 13) remplissant des contraintes élevées : pas d'hybridation entre elles ni avec aucune autre séquence du génome (principalement important coté 3' de l'amorce), teneur en GC comprise entre 40 et 60%, T<sub>m</sub> comprise entre 59 et 61°C, taille de l'amorce comprise entre 20 et 22 pb, et amplicon de taille inférieure à 150 pb. Le choix des amorces a été réalisé à l'aide du logiciel Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/>) et la spécificité de l'hybridation a été vérifiée par Blast sur le site du TAIR (<http://www.arabidopsis.org/Blast/index.jsp>).

L'efficacité de chaque couple d'amorce est au préalable testée et validée en réalisant des séries de dilution d'un ADN témoin sur une échelle de concentrations allant de 4 µg à 70 ng. Lorsque la constante d'efficacité est comprise entre 90 et 100%, les couples sont acceptés. La détection des acides nucléiques se fait par incorporation d'un agent spécifique fluorescent qui se fixe à l'ADN double brin, le SYBR green (Roche Applied Science). La quantification

Target gene	Orientation	Primer name	sequence 5'→3'
mRNA transcript level			
TRX f1	F	qPCRf1sens1	ACGACGACGTTGTGTTTCTAAAG
TRX f1	R	qPCRf1rev1	CTTCCTTGACAACCTTGTATCC
TRX f2	F	qPCRf2sens1	AGCTATCGGAGAAGTACCAGGAC
TRX f2	R	qPCRf2rev1	CTTCAATGGCTGCAAGTAAGTCT
TRX m1	F	qPCRm1sens1	TAACACTGATGAGTCTCCTGCAA
TRX m1	R	qPCRm1rev1	GATGCTGGTTGCTAAAAGTGCTT
TRX m2	F	qPCRm2sens1	TGAAGCTCAGGAAACTACTACCG
TRX m2	R	qPCRm2rev1	CAGTGTAATGCTGTGCTAGATCG
TRX m3	F	qPCRm3sens2	AGTTACACAACGATCATGGGAAG
TRX m3	R	qPCRm3rev2	CGTCTATTATCCTGTGGACCATC
TRX m4	F	qPCRm4sens1	TATGATTCACCCATAGTTGACC
TRX m4	R	qPCRm4rev1	CTATCTTTCTTCTCACCGCCTTT
TRX x	F	qPCRxsens1	CAGCTATGGAAGCCTTATCTCAG
TRX x	R	qPCRxrev1	GTAATAGCACCTTCCCTTCTGCT
TRX y1	F	qPCRy1sens1	GAGGCACTTCTACTTTTCATCCT
TRX y1	R	qPCRy1rev1	GTTCATGATCCAACCTATGGCTTC
TRX y2	F	qPCRy2sens1	CTGAGAAGTACCCAAGTCTTGCT
TRX y2	R	qPCRy2rev1	GAATTCTCAATACGCTCAACGAG
G6PDH1	F	qPCRg6pdh1sens	TGCGTAGATAAATCCTTGTTACC
G6PDH1	R	qPCRg6pdh1rev	CTCCGAAATGCTCGATTTAG
G6PDH2	F	qPCRg6pdh2sens	GGTGACGTCAGTATTGACCAG
G6PDH2	R	qPCRg6pdh2rev	TGGTACATAACCAAATTGCAC
G6PDH3	F	qPCRg6pdh3sens	GGAAACTTTCTTTTCGCTTTTCAG
G6PDH3	R	qPCRg6pdh3rev	AAAGGGTGGCAAGAATAGGG
G6PDH4	F	qPCRg6pdh4sens	TGGGCAGATGACTGAAGAAG
G6PDH4	R	qPCRg6pdh4rev	CAGGGAATGGCACAGCTTC
G6PDH5	F	qPCRg6pdh5sens	TCGGTCCCATACAAACAAGG
G6PDH5	R	qPCRg6pdh5rev	GGATCCAAATGTAGCCATGAG
G6PDH6	F	qPCRg6pdh6sens	TCAGACTCACGGCTATATCTGG
G6PDH6	R	qPCRg6pdh6rev	CGAGGAGGGACTATTTCAGCA
PP2A	F	qPCRPP2Asens1	GATGCAATCTCTCATTCCGATAG
PP2A	R	qPCRPP2Arev1	AGAGCTTGATTTGCGAAATACC

**Table 13: Oligonucleotides used for mRNA transcription analysis.** Orientations are symbolised as F : forward ; R reverse

de l'expression est réalisée lorsque la fluorescence émise par l'ADN amplifié est supérieure à la fluorescence basale.

Les réactions ont été réalisées avec 5 ng/5 µL d'ADNc, 2,5 µL de milieu contenant 250 nM de chaque amorce, et 7,5 µL de réactif SYBR Green sur une plaque de 96 puits, protégée par un film optique thermocollant. Cette étude a été menée à l'aide d'un appareil thermocycleur LightCycler® 480 Real-Time PCR System (Roche Applied Science). Le protocole d'amplification était constitué d'une étape d'activation à 95°C de 10 min, de 45 cycles d'amplification à 95°C pendant 15 sec, puis 20 sec à 60°C, et 15 sec à 72°C, pour finir par 30 sec à 95°C. La courbe de fusion a été mesurée à la fin de chaque PCR entre 65°C et 95°C pour confirmer la spécificité des amorces et la présence d'un seul amplicon. Les résultats sont standardisés en comparant les résultats de chaque gène à une référence, le gène PP2A dont l'expression est constante dans l'ensemble des organes et des conditions. La quantification de l'expression des gènes est calculée en utilisant la méthode des CT comparatifs (Livak and Schmittgen, 2001).

## **Techniques relatives aux clonages**

### **Restriction de l'ADN**

Les fragments d'ADN ont été digérés par les enzymes de restriction appropriées pendant 2 h, dans les tampons et à la température recommandés par le fournisseur (Invitrogen).

### **Purification des produits de restriction**

L'ADN est extrait du gel d'agarose après migration, à l'aide du kit Nucleospin® Extract II (Macherey-Nagel). Le principe de ce kit est identique au kit utilisé dans le paragraphe « Extraction d'ARN totaux d'organes végétaux » (à l'exception du fait que le kit ne contient pas d'agent anti-RNase ni de DNase). L'ADN est remis en suspension dans un volume final de 40 µL de TE (Tris HCl 10 mM pH 7,9, EDTA 1 mM).

### **Ligature**

Les ADNc et les vecteurs de type pET, digérés et purifiés, sont ligaturés par la ligase T4 ligafast (Promega) pendant 30min à température ambiante puis toute la nuit à 4°C.



## **Transformation d'*E. coli* par électroporation**

### **Préparation des cellules**

L'électroporation est utilisée pour transformer la souche DH5 $\alpha$  avec des produits de ligature. Les bactéries sont cultivées dans 1 L de milieu LB. Lorsque la culture atteint une absorbance à 600 nm de l'ordre de 0,5 (phase exponentielle de croissance), les cellules sont récoltées par centrifugation à 4°C, pendant 5 min à 4000 g. Elles sont lavées dans un litre de glycérol 10 %, puis collectées à nouveau. Ces étapes sont répétées successivement avec des volumes plus faibles : 500 mL, 250 mL puis 4 mL. Les bactéries rendues compétentes sont aliquotées par 40  $\mu$ L, et se conservent plusieurs mois à -80°C.

### **Electroporation**

Les bactéries compétentes (40  $\mu$ L) sont transformées par 20 à 100 ng d'ADN issu de la ligature, dans une cuve à électroporation de 1 mm, à l'aide de l'appareil E.coli Pulser<sup>TM</sup> (Bio-Rad, tension de 1,8 kV). Elles sont immédiatement reprises dans 1 mL de LB additionnée de 3% glucose et cultivées pendant 30 min à 37°C. Les bactéries sont ensuite étalées (100 et 900  $\mu$ L) sur milieu LB additionné de l'antibiotique approprié pour sélectionner les transformants ayant intégré le plasmide.

## **Transformation d'*E. coli* par le DMSO**

### **Traitement de compétence des cellules**

La méthode au DMSO donne de plus faibles rendements que l'électroporation, elle est utilisée pour transformer les bactéries avec des plasmides purifiés. Les bactéries cultivées en milieu LB sont récoltées par centrifugation (10000 g, 10 min à 4°C) lorsque l'absorbance de la culture à 600 nm atteint 0,5. Le culot est repris dans 1/10e du volume de culture de TSB (« Transformation and Storage Buffer », PEG 4000 10 %, DMSO 5 %, MgSO<sub>4</sub> 10 mM et MgCl<sub>2</sub> 10 mM dans du LB), et laissé au repos pendant 10 min dans la glace. Les bactéries sont aliquotées par 150  $\mu$ L et se conservent à -80°C. Elles gardent une bonne compétence à la transformation pendant au moins 3 mois.

Target gene	Orientation	Primer name	sequence 5'→3'
pGENI construction			
Strep tag II	F	Linker sens	AAACTCGAGAGCGGCTAGCGCTAGCGCTTAGCGCTTGGAGCCACCCGCGAGTTCGAA AAA TAATAA GGATCCAAA
Strep tag II	R	Linker reverse	TTTGGATCCTTATTAATTTTTTTCGAACTCGGGTGCTCCAAGCGCTAGCGCTAGC GCTAGCGCTCTCGAGTTT
Bacteria screening and sequencing			
pGENI vector	F	pET near seq up	GAGATCTTTTATTAACAAAATTGAAAATTCCTTCC
pGENI vector	R	pET near seq down	CGTTATTGATCGTATT
pGENI-6PGDH1 construction			
6PGDH1	F	6PGDH1 up	AAACCATGGAGTCGGCCGCACACTATCCCG
6PGDH1	R	6PGDH1 down	AAACTCGAGATGGTTCTTCTTCTGGCAAAGCTTAGTCC
pASK-6PGDH1 site mutagenesis and pASK vector sequencing			
66PDH1	F	66PDH C149S/C157S up	GTACTTTAACTAGCCGGGATTGATCAGAGGGAAAAAAGTGGGG
66PDH1	R	66PDH C149S/C157S down	CCCCCACTTTTTTCCCTCTGATCAA TCCGGCTAGTTAAAGTAC
pASK	F	pASK up	GAGTTATTTTACCACCTCCCT
pASK	R	pASK down	CGCAGTAGCGGTAACGG

**Table 13: Oligonucleotides used for pGENi construction, bacteria screening, 6PGDH cloning and site directed mutagenesis.** Orientations are symbolised as F: forward; R: reverse



## Transformation

Si des cellules fraîches sont utilisées, il suffit d'ajouter 100 ng d'ADN aux 150 µL de bactéries, et de les laisser sur glace 30 min. Dans le cas de bactéries conservées et congelées, il faut réaliser un choc thermique supplémentaire à 42°C de 30 secondes, avant de les transférer sur glace. Les cellules sont ensuite mises en culture dans 1 mL de LB + 3 % de glucose, pendant 1 h à 37°C. 10-100 µL sont étalées sur boîte LB additionnée de l'antibiotique approprié à la sélection du plasmide utilisé.

## Criblage des transformants par PCR

La présence du plasmide recombinant dans les clones transformants est détectée par PCR en prélevant directement des colonies bactériennes avec une pointe stérile. Les cellules sont reprises dans 20 µL d'eau et chauffées à 95°C pendant 2 min. Les débris cellulaires sont éliminés par centrifugation à 10000 g pendant 5 min, et 15 µL d'extrait sont utilisés pour la PCR. La présence de l'insert est validée en criblant par PCR avec des amorces (Cf. table 14). Les clones positifs ayant un insert de taille attendue sont sélectionnés.

## Extraction et purification de l'ADN plasmidique bactérien

Les cellules bactériennes ayant intégré le plasmide d'intérêt sont mises en culture dans 3 mL de milieu LB avec l'antibiotique adapté, à 37°C sur une nuit. Les plasmides recombinants sont extraits par la méthode de lyse alcaline et précipités au PEG (Zhou et al., 1997, annexe1).

## Construction du vecteur pGENI

Au sein du vecteur pET 16 b (Novagen), une cassette d'environ 70 pb codant pour l'étiquette « Strep tag II » a été clonée dans le vecteur pET16b entre les sites *Xho* I et *Bam* HI en amont desquels peut être cloné la séquence d'ADN que l'on veut exprimer. La cassette (« linker ») a été reconstituée par dénaturation/hybridation (10 minutes à 90°C puis 1 heure à température ambiante) des deux oligonucléotides linker-sens et linker-rev (Cf. table 13). Pour le clonage, 2µg de pET16b et 1µg de cassette ont été restreints séquentiellement par *Bam* HI et par *Xho* I.

*NcoI* polyHis  
 5' C<sup>▼</sup> C ATG GGC CAT CAT CAT CAT CAT CAT CAT CAT CAC AGC AGC GGC  
 Met Gly His His His His His His His His His Ser Ser Gly  
*NdeI* *XhoI*  
 CAT ATC GAA GGT CGT CA<sup>▼</sup> T ATG C<sup>▼</sup> TC GAG AGC GCT AGC GCT AGC GCT  
 His Ile Glu Gly Arg His Met Leu Glu Ser Ala Ser Ala Ser Ala  
*BamHI*  
 AGC GCT TGG AGC CAC CCG CAG TTC GAA AAA TAA TAA G<sup>▼</sup> GA TCC 3'  
 Ser Ala Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys stop stop  
*Strep-Tag*

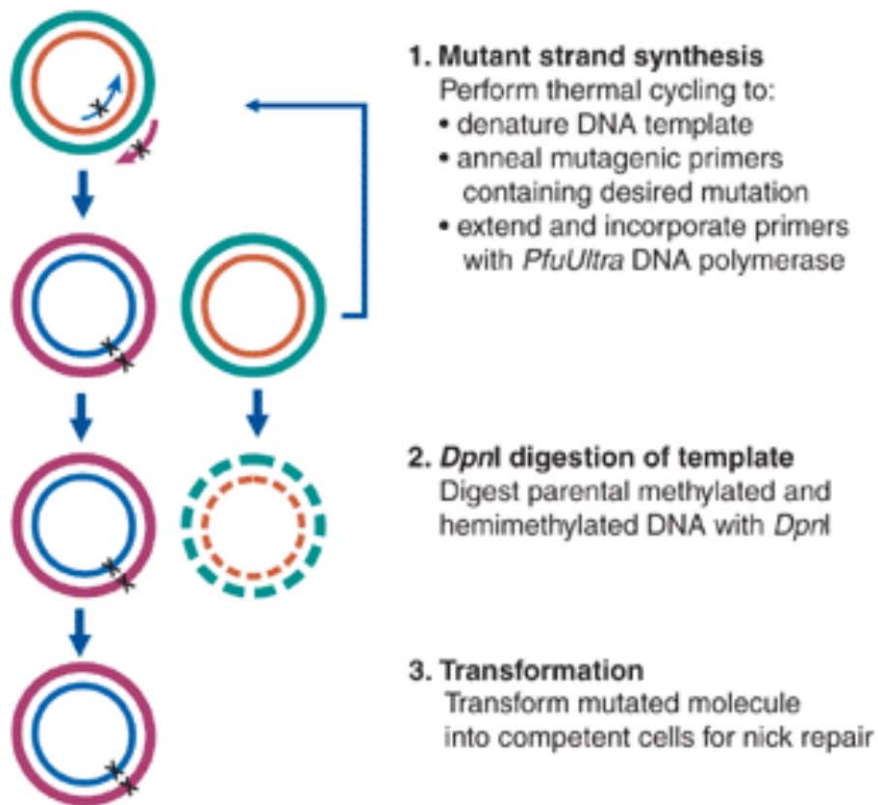
**Figure 67: Details of multiple cloning sites of pGENI vector.** NcoI/BamHI cloning allows the production of an untagged protein. XhoI/BamHI cloning allows the production of a poly His tagged protein NcoI/XhoI allows the production of a strep tagged protein.

Les produits de restriction ont été purifiés (élimination des constituants des réactions de restriction) sur colonne de silice grâce au kit « Nucleospin Extract II » (Macherey Nagel). 500ng de pET16b digérés ont ensuite été déphosphorylés par la Shrimp Alcaline Phosphatase pendant 30 minutes à 37°C puis l'enzyme a été inactivée par traitement thermique (65°C pendant 10 minutes). L'échantillon a été centrifugé pendant 10 min (température ambiante et vitesse maximale). Les échantillons ont été dessalés par dialyse sur membrane semi-perméable Millipore (pore de 0,025µm) placée sur un grand volume d'eau distillée pendant 20 min à température ambiante. La ligation est effectuée sur 100 ng de pET16b digéré déphosphorylé et 10 ng de « linker » digéré (rapport 1mol/8mol) par la ligase du bactériophage T4 (Ligafast, Promega), à température ambiante pendant 30 minutes puis à 4°C toute une nuit.

La souche DH5αF' a été transformée par électroporation et les colonies résistantes à l'antibiotique ont été criblées par PCR sur colonies. Les oligonucléotides utilisés sont pET near seq up et pET near seq down, s'hybridant, respectivement, environ 50 pb en amont du site *Nco* I et en aval du site *Bam* HI du vecteur pET16b. Le crible a permis d'isoler les colonies porteuses du vecteur pGENI qui ont été mises en culture pour réaliser une extraction de plasmide. La construction obtenue a ensuite été vérifiée par séquençage. Une représentation du site de clonage du vecteur pGENI est disponible en figure 67.

### **Préparation de l'ADNc de 6PGDH1**

L'ADNc de la 6PGDH1 a été obtenu à partir du plasmide RAFL (Riken Arabidopsis Full Length cDNA) 06-15-016. L'ADNc (1463pb) a été amplifié avec la paire d'oligonucléotides 6PGDH1up et 6PGDH1down qui permettent d'introduire un site *Nco*I et un site *Xho*I aux extrémités 5' et 3' de l'ADNc de la 6PGDH. L'amplification s'est faite avec une polymérase thermostable et fidèle, la Pfu polymérase (Promega). Le produit de PCR a ensuite été purifié (élimination du plasmide matrice RAFL et des constituants de la réaction de PCR) par électrophorèse sur gel d'agarose 0,8% puis récupéré et purifié sur colonne de silice grâce au kit « Nucleospin Extract II » (Macherey Nagel).



**Figure 68: QuickChange Site-Directed Mutagenesis makes use of primers that contain the desired mutation.** The primers were designed to change the Cys149 and 157 residues to serines.

## **Clonage de la 6PGDH1 dans pGENI**

Deux  $\mu\text{g}$  de pGENI et 1  $\mu\text{g}$  de l'ADNc de 6PGDH1 ont été digérés par les enzymes *Nco* I et *Xho* I dans le tampon adéquat (Invitrogen) et à 37°C pendant 1h. Les produits de restriction ont été purifiés (élimination des constituants de la réaction de restrictions et du fragment de vecteur d'environ 70 pb entre les sites *Nco* I et *Xho* I) sur colonne de silice (kit « Nucleospin Extract II » Macherey Nagel). 400ng de pGENI restreint ont ensuite été déphosphorylés (comme précédemment décrit pour la construction du vecteur pGENI). La ligation est effectuée sur 100ng de plasmide restreint déphosphorylé (comme précédemment décrit pour la construction du vecteur pGENI) et d'insert (rapport environ 1mol/3mol).

La souche d'*E. coli* DH5 $\alpha$ F' a été transformée par électroporation et sélectionnée pour la résistance à l'ampicilline. Les colonies résistantes à l'antibiotique ont été criblées par PCR sur colonies à l'aide des oligonucléotides 6PGDH1med et 6PGDH1down (Cf. table 12) s'hybridant, respectivement, dans la partie médiane et à l'extrémité 3' de l'ADNc 6PGDH1. La préparation plasmidique à partir des clones positifs a été vérifiée par séquençage.

## **Mutagenèse dirigée**

La mutagenèse dirigée des deux cystéines régulatrices de l'isoforme G6PDH1 a été effectuée en partant du vecteur pASK-G6PDH1. Pour ce faire, un couple d'amorces complémentaires a été nécessaire (Cf. table 12). La mutation a été faite sur les deux cystéines en même temps. Une PCR a été effectuée en utilisant le kit "QuikChange site-directed mutagenesis kit" (Stratagene) selon les recommandations du fabricant pour donner le nouveau vecteur (Cf. figure 68), soit pASK-G6PDH C149S C157S



## **Technique liée à la caractérisation phénotypique des mutants d'insertion**

### **Test de germination**

Trente graines des six génotypes analysés sont déposées en semis agencés dans des boîtes de Pétri en verre de diamètre 9 cm, pourvu de coton saturé d'eau et surmonté d'un papier whatman (papier filtre, qualité n °5, 90mm de diamètre), sur lequel six sections (une par génotype) ont été tracées. Quatre boîtes sont réalisées par série et 3 répliquats biologiques ont été réalisés. Les boîtes sont placées à l'obscurité dans des enceintes thermostatées à 15, 20, 25 ou 30°C, en fonction des expériences. Les boîtes sont observées sous la loupe binoculaire quotidiennement et les graines germées, c'est-à-dire celles dont la radicule a percé l'albumen, sont comptabilisées et retirées de la boîte. La moyenne et l'écart-type entre les répliquats biologiques par conditions ont été déterminés.

### **Dosage de la production diffusion du peroxyde d'hydrogène sur graines**

Le dosage du peroxyde d'hydrogène produit et diffusé par unité de temps est basé sur les propriétés fluorescentes de la scopolétine réduite. L'oxydation de la scopolétine par l'intermédiaire d'une peroxydase consommant l'  $H_2O_2$  du milieu conduit à une diminution de la fluorescente.

Quinze mg de graines des 6 génotypes sèches ou imbibées 3 h ou 24 h à 25 °C sont incubés à l'obscurité à 25 °C dans 250  $\mu$ l de tampon potassium phosphate (20 mM, pH 6.0) contenant 5  $\mu$ M de scopolamine et une unité de Horse Radish Peroxydase (HRP) (Boehringer Mannheim). Après 30 minutes d'incubation, et récupération par centrifugation du surnageant, la fluorescence du milieu réactionnel est évaluée (excitation: 346 nm, émission: 455 nm) au fluorimètre (Carry eclipse, Varian). La variation de fluorescence est convertie en concentration molaire d' $H_2O_2$  par mg de poids sec, diffusée en 30 minutes en utilisant une courbe de calibration linéaire réalisée parallèlement avec une gamme d' $H_2O_2$ . Les résultats correspondent à une moyenne et un écart-type de 3 répliquats biologiques.





### **Coloration *in situ* des anions superoxydes ( $O_2^{\cdot-}$ ) par le NBT**

Les graines de chacun des six génotypes (Col-0, *trxy1.1*, *trxy1.2*, *trxy2*, *trxy1.1-trxy2*, *trxy1.2-trxy2*) sont imbibées sur du coton saturé en eau dans une boîte de Pétri pendant trois ou vingt-quatre heures à 25°C. L'imbibition terminée, les téguments, sont minutieusement retirés de la graine pour en extraire l'embryon, sous la loupe binoculaire. Après avoir réussi à sortir plusieurs embryons intacts de chaque génotype, ces derniers sont plongés dans une solution contenant 1mM NBT dans du Tris 10mM à pH 7.5 et incubés pendant 30 minutes dans une étuve à l'obscurité à 25°C. Ensuite, les embryons sont lavés de façon extensive avec du Tris 10mM pH 7,5 pour stopper la réaction. Les embryons sont montés sur lames et les résultats observés à la loupe binoculaire (stéréomicroscope SV11 ZEISS). Les images sont capturées à l'aide du logiciel Axiovision ZEISS.

### **Détection de l'activité G6PDH *in situ***

Les plantules des différents génotypes âgées de 4 ou 7 jours sont fixées dans une solution à 2% (pds/vol) de paraformaldehyde (PFA) avec 2% (pds/vol) de polyvinylpyrrolidone 40, à 4°C pendant 1 h. La fixation permet de figer les cellules dans leur état physiologique au moment du prélèvement, et également peut entraîner la formation de pores dans les cellules.

Les plantules sont ensuite lavées 5 fois 10 min dans du tampon Hepes 100mM pH 7,4. Le lavage a pour but de retirer tous les sucres solubles présents dans la plantule pour annuler toutes les réactions métaboliques endogènes, et ne mesurer que des réactions dépendantes d'un apport exogène de substrat.

Après les étapes de fixation et de lavage, les plantules sont incubées (bain-marie) à 30°C dans un milieu réactionnel contenant 100 mM d'Hepes pH 7.4, les deux substrats de la G6PDH à savoir, 1 mM de nicotinamide adénine dinucléotide phosphate ( $NADP^+$ ) et 10 mM de glucose-6-phosphate (G6P), 5 mM de  $MgCl_2$ , 0,7% (pds/vol) d' Albumine sérique de bœuf (BSA), 0,05% (pds/vol) de NBT et un cocktail d'inhibiteurs de protéases (spécial plantes, SIGMA). Le temps d'incubation est de 10 minutes. Le contrôle négatif de l'expérience, permettant de s'assurer que la coloration est bien liée à l'activité G6PDH, consiste à incuber les plantules comme précédemment dans un milieu réactionnel sans G6P.



La réaction est stoppée en plongeant les plantules dans 1 mL d'eau froide. La réaction colorimétrique est alors observée à la loupe binoculaire (stéréomicroscope SV11 ZEISS), microscope (AZ 100 NIKON) et les images sont capturées à l'aide des logiciels Axiovision ZEISS et NIS-ELEMENTS NIKON respectivement.

## **Techniques liées à l'analyse des protéines**

### **Méthodes biochimiques**

#### Dosage des protéines

##### *Dosage BCA*

Cette méthode a été utilisée pour doser les protéines dans les extraits solubles bactériens et foliaires. Elle est basée sur la réduction à pH alcalin du cuivre, par les liaisons peptidiques et certains acides aminés tels que la cystéine, la cystine, le tryptophane et la tyrosine. Les ions cuivreux ( $\text{Cu}^+$ ) forment un complexe pourpre avec deux molécules d'acide bicinchoninique (BCA). Le tampon du dosage est constitué de 10 mL de BCA et de 200  $\mu\text{L}$  de  $\text{CuSO}_4$  4 %. Vingt  $\mu\text{L}$  (plusieurs dilutions) de l'extrait protéique sont ajoutés à 1 mL de milieu de dosage et incubés 10 min à 50°C. Le complexe ions cuivreux/acide bicinchoninique absorbe à 562 nm, ce qui permet de doser les protéines en comparant les valeurs obtenues avec l'extrait protéique à une gamme étalon réalisée avec la sérum albumine bovine (BSA)

##### *Absorbance à 280 nm*

La concentration des protéines recombinantes purifiées est déterminée en mesurant l'absorbance à 280 nm. Elle correspond à l'absorbance des acides aminés aromatiques. Leurs coefficients d'extinction molaire ( $\epsilon$  en  $\text{M}^{-1}$ ) sont de 5600 (Tryptophane, W), 1400 (Tyrosine, Y) et 90 (Phénylalanine, F).

#### Electrophorèse en conditions dénaturantes (SDS-PAGE)

L'électrophorèse en conditions dénaturantes permet de séparer les protéines en fonction de leur masse moléculaire, en présence de SDS (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970 ; Schägger et Von Jagow, 1987). L'extrait protéique est, dans un premier temps, dénaturé par un traitement thermique de 3 min à 100°C, tandis que le SDS chargé négativement se répartit le long des chaînes polypeptidiques. Les protéines sont ainsi déposées sur le gel de polyacrylamide de 12 % et ne migrent plus qu'en fonction de leur masse (leurs charges étant



pour toutes identiques). Un marqueur de masse moléculaire (Novex sharp Prestained) est utilisé pendant la migration afin de déterminer par comparaison, la masse des protéines d'intérêt. Les compositions du gel et des solutions sont détaillées en annexe.

A la fin de la migration, les protéines sont révélées par coloration du gel au bleu de Coomassie (solution en annexe) ou sont transférées sur une membrane en vue d'une détection immunologique par Western-blot.

### Transfert des protéines sur membrane

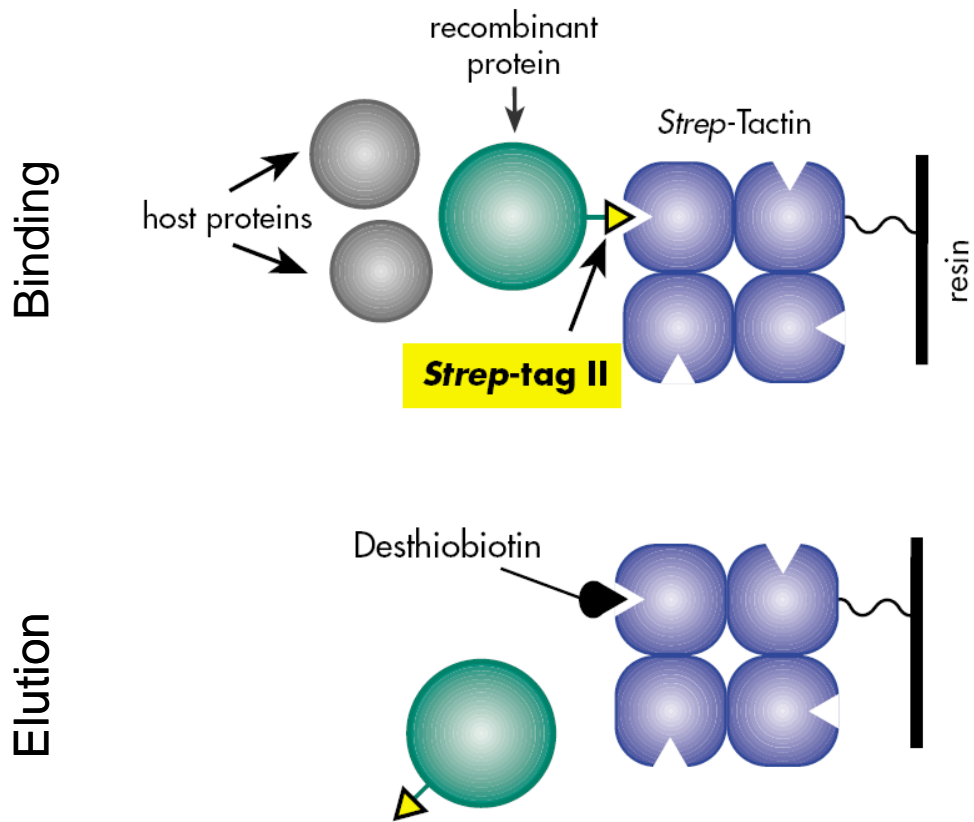
Après la migration, le gel de polyacrylamide est équilibré 20 min dans du tampon PBS (25 mM phosphate de potassium pH 7,5, 150 mM NaCl). Les protéines sont transférées sur de nitrocellulose (0,45 µm, Hybond-ECL, Amersham Bioscience), pendant 30 min en présence de PBS, sous une tension constante de 15 V dans un appareil d'électrotransfert semi-sec (trans-blot cell, BioRad).

### Western-blot

La membrane est saturée par une solution de PBS contenant 3% de BSA. Elle est incubée ensuite en présence de l'anticorps commercial Anti Strep tag II (*Strep*MAB-Classic horseradish peroxidase (HRP) conjugate ; IBA) à la dilution 1/10000 puis est lavée. L'activité de la peroxydase, est capable, en présence de peroxyde, d'oxyder le luminol (dérivé du diacylhydrazide) en acridinium ester qui réagit avec les peroxydes en pH alcalin pour former un complexe chimioluminescent (maximum d'émission à 430 nm). Ce nouveau composé impressionne un film photographique que l'on applique contre la membrane 1 min après le traitement. Le protocole et les solutions sont détaillés en annexe.

### Production des protéines recombinantes

Les 4 G6PDH plastidiales ont été produites dans des bactéries ~~DH5~~ tandis que la 6GDH1 a été produite dans la souche BL21 pour utiliser le système de l'ARN polymérase T7. L'avantage de ce système d'expression réside dans l'utilisation de la polymérase T7, 5 fois plus rapide que son homologue bactérienne. De plus, l'ADNc du gène d'intérêt cloné dans le vecteur de type pET est la seule séquence transcrite par l'ARN polymérase du bactériophage T7. Ce système de production est donc très spécifique et très efficace.



**Figure 69 : Principle of Strep tag II fusion protein purification.** The 8 amino acid tail in N or C terminus allow the binding of the tagged protein to strep-tactin resin. After an extensive washing, tagged protein can be eluted by desthiobiotin competition for the Strep-tactin resin.

Une colonie recombinante est cultivée en milieu LB liquide supplémenté en ampicilline (LB/Amp), à 37°C sous agitation toute une nuit pour obtenir une culture saturée. Cette culture est ensuite diluée 50 à 100 fois dans un erlenmeyer de 2 L contenant 700 mL de milieu LB/Amp puis incubée dans les mêmes conditions. La croissance bactérienne est suivie par la turbidité mesurée à 600 nm. Lorsque la turbidité est comprise entre 0,4 et 0,6 unité de DO, 0,2  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  d'anhydrotétracycline (production des G6PDH) ou 300 $\mu\text{M}$  d'IPTG (production de la 6PGDH) est ajouté à la culture. L'expression du gène est strictement réprimée jusqu'à l'induction. La culture est ensuite incubée 16 h à 24 h sous agitation à différentes températures de 23, 28, 30, ou 37°C afin de produire les protéines recombinantes. La biomasse bactérienne est récupérée par centrifugation à 12 000 g 20 minutes à 4°C. Après lavage des cellules par du TBS (« Tris Buffer Saline » : Tris 30 mM pH 7,9, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM) et centrifugation dans les mêmes conditions que précédemment, les culots obtenus sont congelés à -20°C.

### Extraction des protéines recombinantes

Une fois décongelé, le culot bactérien est resuspendu dans le tampon d'extraction (TBS additionné d'un cocktail d'inhibiteurs de protéases « Roche Complete mini EDTA-free ») éventuellement additionné du cofacteur NADP à 200  $\mu\text{M}$ . Cette suspension bactérienne est ensuite traitée par trois passages à la presse de French à une pression de 10000 PSI soit environ 7 MPa ce qui permet d'éclater les cellules lorsque celles-ci reviennent brutalement à une pression normale. L'extrait contenant les protéines hydrosolubles est clarifié par centrifugation à 22 000 g, 20 min à 4°C.

### Purification des protéines recombinantes

Les protéines recombinantes de l'extrait brut soluble sont purifiées grâce à l'étiquette « Strep tag II » additionnée en C-terminal. Cette étiquette imite la structure de la biotine qui permet d'immobiliser les protéines recombinantes sur une colonne d'affinité streptavidine (Cf. figure 69). L'extrait brut est chargé sur la colonne de chromatographie d'affinité « GE Healthcare HITrap streptavidin HP, 1mL ». Après lavage de la résine par 15 mL de tampon TBS, la protéine d'intérêt est éluée par 10 mL de TBS additionné de 2,5 mM de desthiobiotine. La compétition pour la liaison avec la streptavidine entre l'étiquette « Strep Tag II » et la desthiobiotine qui est rajoutée en très large excès, permet d'élué la protéine recombinante. L'éluat protéique est ensuite concentré sur une cellule de concentration





(Amicon) équipée d'une membrane qui permet de retenir les molécules de poids moléculaire supérieur à 30kDa (YM30).

### Test de phosphorylation *in vitro*

La réaction de phosphorylation est réalisée en présence de 2 $\mu$ Ci de [<sup>32</sup>P] ATP, de 10 $\mu$ g de 6PDH1 recombinante, 500mM de tampon HEPES pH 7,5, 50  $\mu$ M d'ATP froid, 0,5 mM d'EGTA, 12,5 mM de MgCl<sub>2</sub> et 1 unité de protéine kinase A (PKA Catalytic Subunit from bovine heart Sigma P 2645) dans un volume final de 50  $\mu$ L à 25°C pendant 1heure. La réaction est stoppée par ajout de tampon Laemmli et une incubation de 5 minutes à 95 °C. Les protéines sont ensuite séparées par SDS-PGE, puis colorées au bleu de coomassie. Une autoradiographie du gel est ensuite réalisée en mettant le gel en contact avec un écran Phosphor et l'image générée sur l'écran est acquise grâce au système Personal FX Imager, Bio-Rad. Les réactions de phosphorylation destinées à mesurer l'activité 6PGDH au cours du traitement ont été réalisées sur 5  $\mu$ g de 6PGDH1 préalablement réduite ou oxydée dans les conditions précédemment décrites à l'exception de l'ATP radiomarqué qui a été omis. Un aliquote du mélange réactionnel est prélevé à intervalles réguliers pour mesurer l'activité 6PGDH.

### Mesure de l'activité G6PDH

La G6PDH catalyse l'oxydation du glucose-6-phosphate (G6P) en 6-phosphogluconate en présence de NADP<sup>+</sup> qui est alors réduit en NADPH + H<sup>+</sup>. Le milieu de dosage contient en excès du glucose-6-phosphate à 2 mM et du NADP à 200  $\mu$ M, pH 7,9 en Tris-HCl à 100 mM. Le G6P étant acide lorsqu'il est dissout dans l'eau, la solution mère de G6P à 200 mM est ramenée à un pH neutre par quelques gouttes de NaOH à 10N. Le volume de milieu de dosage utilisé est de 1 mL par essai et le test d'activité est réalisé à 30°C. La mesure d'absorbance à 340nm permet de suivre l'apparition du NADPH dans une cuve de spectrophotomètre en fonction du temps. La variation de la DO à 340 nm sur 1 minute permet de calculer l'activité de l'enzyme en appliquant la loi de Beer-Lambert avec  $\epsilon_{340nm}$  NADPH = 6200 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>.

### Mesure de l'activité 6PGDH

La 6PGDH1 catalyse l'oxydation et la décarboxylation du 6-phosphogluconate (6PG) en ribulose-5-phosphate en présence de NADP<sup>+</sup> qui est alors réduit en NADPH. Le milieu de dosage de l'activité de la 6PGDH contient, en excès, du 6PG à 2 mM et du NADP<sup>+</sup> à 200  $\mu$ M, en Tris-HCl 100 mM pH 7,9. Le 6PG étant acide quand il est dissout dans l'eau, la solution



mère de 6PG (200 mM) est ramenée à pH neutre par du NaOH 10N. Le volume de milieu de dosage utilisé est de 1mL par essai et le test d'activité est réalisé à 30°C. La mesure d'absorbance à 340nm permet de suivre l'apparition du NADPH dans une cuve de spectrophotomètre en fonction du temps. La variation de la DO à 340 nm sur une minutes permet de calculer l'activité de l'enzyme en appliquant la loi de Beer-Lambert avec  $\epsilon_{340nm}$  NADPH= 6200 M<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>.

### Traitement d'oxydation et de réduction des protéines recombinantes

Pour obtenir des préparations protéiques dans un état 100 % réduit ou oxydé, un échantillon protéique purifié est incubé en présence de 20 mM de DTT (traitement réducteur) ou 5mM de diamide (traitement oxydant) pendant 40 et 5 minutes respectivement en tampon Tris-HCl 100 mM pH 7,9. Après incubation, la préparation est dessalée en chargeant 500  $\mu$ L sur une colonne de gel filtration (Colonne NAP 5, GE Healthcare, Sephadex<sup>TM</sup> G-25). Les protéines sont ensuite éluées par 700  $\mu$ L de tampon d'extraction ce qui permet d'obtenir une préparation finale exempte de DTT ou de diamide. Après dessalage, la concentration de protéines est évaluée via une lecture de l'absorbance à 280 nm.

Les effets des traitements oxydant ou réducteur par les différentes redoxines plastidiales d'Arabidopsis disponibles au laboratoire sous forme de protéines recombinantes en conditions d'oxydation ou de réduction sur la G6PDH ont été testés. Les différentes isoformes de G6PDHs ou la 6PGDH1 sont incubées (dans leur état d'activation en sortie de colonne (Vinit) pour les cinétiques en oxydation, et après traitement oxydant (Vmax) pour les cinétiques en réduction) à température ambiante en tampon Tris 100 mM (à pH 7,9 dans le sens de la réduction et à 6,9 dans le sens de l'oxydation pour se placer respectivement dans les conditions d'un chloroplaste à la lumière et à l'obscurité, en présence de 10  $\mu$ M (dans le sens de l'oxydation) ou 1  $\mu$ M (dans le sens de la réduction) de TRXcp. Le mélange réactionnel contient soit du dithiothréitol (DTT) réduit (DTT red) à 1 mM ou du DTT oxydé (DTTox) à 10 mM, concentrations auxquelles l'agent chimique n'a pas d'effet direct sur l'activité de la cible. Les TRX ainsi réduites ou oxydées par le DTT, vont pouvoir agir sur le pont disulfure régulateur des protéines. Une partie aliquote du mélange réactionnel est prélevée après différents temps d'incubation pour mesurer l'activité comme décrit précédemment. A partir de ces mesures, les courbes secondaires, exprimées en pourcentage de l'activité maximale, d'activation ou d'inhibition en fonction du temps de traitement redox, sont réalisées. Chaque expérience a été répétée un minimum de 3 fois. De même, l'incidence sur l'activité des protéines d'un traitement par du glutathion (GSH) réduit ou en présence de 4



glutarédoxines (GRX) recombinantes plastidiales (GRX S12 S15 et S14 de peuplier et GRX S16 d'Arabidopsis, mises à notre disposition par le laboratoire de J-P Jacquot, Université de Nancy) a été testée. Les protéines sont incubées en présence de 1 et 5 mM de GSH. Les tests de réduction par les GRX ont été réalisés en présence de 50  $\mu$ M de GRX et 1 mM de DTTred.

### Concentration de demi-activation de G6PDH1

Pour déterminer la concentration nécessaire pour amener la G6PDH1 à 50 % de son activité maximale, cette isoforme dans son état d'activation en sortie de colonne (Vinit) est incubée pendant une minute en présence d'une gamme de concentrations en TRX allant de 0 à 330  $\mu$ M. Après incubation de 1 à 3 minutes, l'activité G6PDH est déterminée comme précédemment décrit. Ces mesures permettent de tracer les courbes d'activation ou d'inhibition exprimées en pourcentage de l'activité maximale en fonction de la concentration en TRX permettant de déterminer la concentration de demi-activation ou inhibition (S1/2). Chaque expérience a été répétée 3 à 5 fois.

### Inactivation des G6PDH par la DEPC

Le diéthyl pyrocarbonate (DEPC) est couramment utilisé pour étudier le rôle des résidus histidine dans les protéines. En effet, cette molécule réagit avec les groupes imidazole, des histidines et abolit leur réactivité. Le DEPC a été utilisé pour dériver les histidines conservées du site actif des G6PDH et étudier leur accessibilité.

Après oxydation ou réduction totale de l'isoforme G6PDH1, la protéine recombinante a été incubée en tampon Tris 100mM pH 7,9 additionnée de 0,02 mM de DEPC diluée extemporanément dans l'éthanol pur. Des aliquotes sont prélevés à intervalles réguliers pour mesurer l'activité G6PDH. Des expériences visant à protéger le site actif par le substrat des effets du DEPC ont également été réalisées pour étudier l'accès du G6P à son site de fixation. Une pré-incubation des formes oxydées et réduites de 5 minutes en tampon Tris 100 mM et en présence de 2,5 mM de G6P a été réalisée avant l'ajout de DEPC dans le mélange réactionnel. L'inhibition au cours du temps a été mesurée comme précédemment. L'utilisation d'un mélange réactionnel sans DEPC a permis d'évaluer les effets aspécifiques liés à l'incubation en présence d'éthanol.



### Dérivation au DTNB

Le DTNB, acide 5,5' dithiobis-2-nitrobenzoïque, est capable de réagir avec les thiols protéiques libres et accessibles, ce qui entraîne la libération d'une molécule de TNB-délectable à 412 nm ( $\epsilon_M = 13.600 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$  ; Habeeb 1972). La protéine native (40  $\mu\text{M}$ ) est mise en présence de DTNB 1 mM, dans du Tampon Tris-HCl 30 mM pH 7,9 EDTA 1 mM. L'apparition de TNB<sup>-</sup> est mesurée au spectrophotomètre.

### Dérivation chimique des thiols avec l'acide 4-acetamido-4'-maleimidylstilbene-2,2'-disulfonique (AMS)

L'AMS est un dérivé de maléimide, il réagit spécifiquement avec les groupes thiols à un pH voisin de la neutralité. La dérivation des groupements thiols d'une protéine avec l'AMS modifie son comportement électrophorétique. Après réduction ou oxydation complète de la 6PGDH1, 20  $\mu\text{g}$  de protéine ont été mis en contact de 25 mM d'AMS en tampon sodium phosphate (25 mM pH 7,5) puis est incubée à l'obscurité 1 heure à température ambiante. Les formes réduites (dérivés) et oxydées sont ensuite séparées par SDS-PAGE.

### Détermination des masses apparentes de G6PDH1 réduite et oxydée par gel filtration

Après réduction ou oxydation complète de la G6PDH1, 500  $\mu\text{l}$  de protéine à une concentration voisine de  $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  est déposée sur une colonne de tamisage moléculaire Superdex-200 (1,6 x 60 cm, 120 mL ; Amersham Pharmacia Biotech) équilibrée en tampon 100mM tris pH 7,9 EDTA 1mM. Le débit est de  $0,2 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . Ce type de chromatographie permet de séparer les protéines en fonction de leur masse : le trajet à parcourir par les protéines dans le gel varie selon leur taille, les plus petites étant éluées en dernier. La colonne a été auparavant calibrée dans les mêmes conditions par des protéines standard de poids moléculaire connu (Böehringer) : ferritine, 450 kDa (volume mort) ; catalase, 240 kDa ; aldolase, 158 kDa ; sérumalbumine bovine, 68 kDa ; ovalbumine, 45 kDa ; chymotrypsinogène, 25 kDa ; cytochrome C, 12,5 kDa.

### Détermination du potentiel redox du pont disulfure régulateur

Pour évaluer le potentiel redox du pont disulfure régulateur des G6PDH1 et 3, ces enzymes ont été incubées dans une gamme de potentiel redox allant de -402,2 à -282,6 mV. Un mélange de DTT<sub>ox</sub> et de DTT<sub>red</sub> permet d'établir cette gamme. Elle est réalisée en tampon Tricine 100 mM pH 7,9. La concentration finale en DTT total est de 20 mM.





Le rapport  $[DTTox] / [DTTred]$  permet via l'équation de Nernst  $E = E_0 + ((RT/nF) \ln([Ox]/[Red]))$  de calculer la valeur du potentiel redox définie par l'équilibre des deux produits. Les enzymes sont incubées dans cette gamme à 30°C pendant 3 h ce qui permet d'ajuster l'équilibre redox de la cible sur celui défini par le ratio des solutions de DTT, ou pendant 1 h en présence de 3,5  $\mu\text{M}$  de TRX m4 (la TRX permettant de catalyser la mise en place de l'équilibre). Après incubation, l'activité G6PDH est mesurée comme précédemment. Ces mesures permettent de générer la courbe d'activation exprimée en pourcentage de l'activité maximale en fonction du potentiel redox. L'ajustement de la courbe a été réalisé à partir de l'équation de Nernst par traitement informatique (logiciel Co-Plot). La valeur du potentiel redox du pont disulfure régulateur correspond au potentiel redox de demi-activation de l'enzyme.

### Système Fd/ TRX reconstitué

Pour reconstituer le système de réduction physiologique des TRXs chloroplastiques, des thylacoïdes sont préparés à partir de feuilles de pois (*Pisum sativum*) var « Nain merveille de Kelvedon » cultivés pendant 2 à 3 semaines après semis en serre naturelle. Les feuilles sont broyées dans un tampon isotonique MES 50 mM pH 6,9, sorbitol 0,3 M,  $\text{MgCl}_2$  1 mM. Le broyat est filtré sur une toile à bluter (maille 50  $\mu\text{m}$ ) pour récupérer les chloroplastes dans le filtrat. Les chloroplastes sont collectés par centrifugation 45 secondes à 4 500 g à 4°C puis lavées dans un tampon isotonique HEPES 50 mM pH 7,5, sorbitol 0,3 M,  $\text{MgCl}_2$  1 mM. Après centrifugation 45 secondes à 4500 g à 4°C, les chloroplastes sont repris dans un tampon hypotonique HEPES 50 mM pH 7,5,  $\text{MgCl}_2$  5 mM pour les faire éclater. Une centrifugation de 5 minutes à 4500 g à 4°C permet de récupérer les thylacoïdes avant de les laver dans un tampon HEPES 50 mM pH 7,5, EDTA 1 mM, NaCl 5 mM pour éliminer les protéines solubles qui pourraient venir contaminer le système reconstitué. Après une nouvelle centrifugation de 5 minutes à 4500 g à 4°C, les thylacoïdes sont repris dans le tampon de broyage. La quantité de thylacoïdes est estimée par dosage à 652 nm de la chlorophylle extraite dans l'acétone 80%. Le système Fd/ TRX reconstitué contient les thylacoïdes fraîchement préparés (équivalent à 10 à 20  $\mu\text{g}$  de chlorophylle), 0,5 $\mu\text{M}$  de Fd d'épinard (*Spinacea oleracea*), 1  $\mu\text{M}$  de FTR de *Synechocystis* (*Synechocystis sp* Pcc 78.03) et 5  $\mu\text{M}$  de TRX f1. Après ajout de l'enzyme cible, le mélange réactionnel est incubé à 25°C sous une intensité lumineuse de 100  $\mu\text{E.m}^2.\text{s}^{-1}$ . Une partie du mélange réactionnel est prélevée après différents temps d'incubation pour mesurer l'activité G6PDH.



Pour évaluer l'effet de l'obscurité, l'illumination est arrêtée. De même pour évaluer l'effet sur l'activité de la cible d'un oxydant au sein du système, 1 et 100  $\mu\text{M}$  de peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) sont ajoutés.

## **Méthodes Biophysiques**

### **Calorimétrie différentiel à balayage (DSC)**

Le DSC permet de mesurer des variations calorimétriques qui résultent d'un changement d'état d'un corps soumis à une variation de température. Les expériences de DSC ont été réalisées à l'aide d'un appareil VP-DSC (Microcal).

La cellule de mesure, qui contient la G6PDH sous différentes formes (réduite, oxydée, ou mutante) à une concentration voisine de 10  $\mu\text{M}$  ou une TRX f ou x à des concentrations voisines de 85  $\mu\text{M}$ , ainsi que la cellule de référence contenant uniquement le tampon utilisé (Sodium phosphate 25 mM pH 7,5), sont soumises à une augmentation régulière de température ( $1\text{K}\cdot\text{min}^{-1}$  entre 20 et  $110^\circ\text{C}$ ). Des thermocouples situés sous les cellules permettent de déterminer l'écart de température entre les deux cellules au cours de la dénaturation thermique de l'enzyme. Les résultats sont visualisés sous formes d'une courbe  $\Delta\text{Cp}$  (variation de la capacité calorimétrique) en fonction de la température appelée thermogramme. Le DSC permet donc de suivre la dénaturation thermique de la protéine et permet de déterminer sa température de demi-transition (température à laquelle le maximum de dénaturation est observé au cours de l'augmentation de température). La stabilisation de la G6PDH par formation d'un complexe avec une TRX a été évaluée en pré-incubant environ 5  $\mu\text{M}$  de G6PDH réduite avec environ 45  $\mu\text{M}$  de TRX f ou x oxydée avant d'analyser la stabilité du complexe en DSC. Chaque mesure a été précédée par une mesure de ligne de base correspondant au tampon seul. La capacité calorifique du tampon a été soustraite des thermogrammes expérimentaux.

### **Calorimétrie de titration isotherme (ITC)**

L'affinité ( $K_d$ ) du cofacteur (sous sa forme réduite  $\text{NADP}^+$  et oxydée  $\text{NADPH}$ ) à son site de fixation pour la forme sauvage oxydée et la forme mutante de la G6PDH1 a été évaluée par ITC. Les résultats ont été générés grâce à un appareil ITC 200 (Microcal). A  $25^\circ\text{C}$ , des injections de 2  $\mu\text{L}$  d'une solution à 1,25 mM de  $\text{NADP}^+$  ou  $\text{NADPH}$  en tampon sodium phosphate 25 mM pH 7,5 sont réalisées toutes les 180 secondes dans la cellule expérimentale (sous agitation ( $1000\text{ rpm}\cdot\text{min}^{-1}$ )) contenant 55 à 88  $\mu\text{M}$  de G6PDH diluée dans le même tampon que le  $\text{NADP(H)}$ . De même, l'affinité de la TRX f et m pour la forme



mutante de G6PDH a été évaluée en injectant avec les mêmes paramètres que précédemment décrit, une solution de TRX f ou m à 335 et 527  $\mu\text{M}$  respectivement dans la cellule contenant 33 ou 44  $\mu\text{M}$  de G6PDH C149S C157S. A chaque injection correspond un signal d'échange thermique qui signe l'interaction de la G6PDH avec le NADP(H) ou la TRX. L'intensité de ce signal est proportionnelle à la quantité de ligand fixée sur la G6PDH. Les mesures de dégagement de chaleur permettent d'obtenir l'isotherme à partir duquel les paramètres de l'interaction sont déduits. L'effet calorimétrique de la dilution du ligand est évalué une fois que tous les sites de fixation de l'enzyme sont saturés (dernières injections). Les données expérimentales ont été ajustées à une courbe de titration théorique en utilisant le logiciel ORIGIN (Microcal).

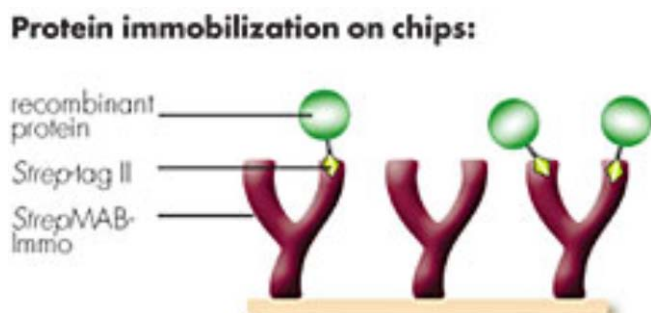
### Dichroïsme circulaire (DC)

Le dichroïsme circulaire permet d'étudier le contenu en structure secondaire des protéines. Une lumière polarisée rectilignement, correspondant à la somme d'une lumière polarisée circulairement gauche et d'une autre polarisée circulairement droite, passe à travers la solution de protéines à analyser. Après la traversée de la solution protéique, l'amplitude des deux composantes n'est plus égale. La spectroscopie DC est une spectroscopie qui mesure l'ellipticité, liée à la différence d'absorption par l'échantillon de la lumière polarisée circulairement gauche et de la lumière polarisée circulairement droite en fonction de la longueur d'onde. L'analyse des spectres DC pour des longueurs d'onde entre 190 et 250 nm permet de déterminer la proportion des différentes structures secondaires d'une protéine.

Les trois formes de G6PDH1 disponible (oxydée, réduite, et mutante) diluées à  $5\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  dans un tampon sodium phosphate 25 mM pH 7,5 (supplémenté de 2 mM de DTT red dans le cas de la G6PDH réduite) ont été placées séquentiellement dans une cuve en quartz de trajet optique de 0,5 mm. Les spectres ont été enregistrés à 25°C à l'aide d'un spectropolarimètre Jasco-810 équipé d'un contrôleur thermique à effet Peltier PFD 423S/L

### Mesure d'interaction en résonance plasmonique de surface (SPR)

Le phénomène optique de résonance plasmonique de surface (SPR) permet la mesure en temps réel des interactions entre deux molécules. Le système de détection enregistre les changements de concentration massique de macromolécules présentes à la surface d'une fine couche métallique appelée sensor chips. Ces variations sont visualisées par un graphique, appelé sensorgramme, où sont représentés les variations de résonance en fonction du temps (les variations de résonances étant exprimées en unité de résonance ou RU). A titre



**Figure 70: Principle BIAcore sensor chips building with of strep tag II fusion protein.** Strep Mab-Immo antibody can be covalently attached on CM-5 sensor chip. Then strep tagged protein can be immobilized by the recognition and the binding of strep tag II at the surface of the sensor chips for real time SPR analysis

d'exemple, la liaison de 1 ng d'une protéine par  $\text{mm}^2$  à la surface d'une sensor chip entraîne une variation du signal de 1000 RU.

L'étude des interactions G6PDH / TRX en temps réel par SPR est réalisée à l'aide d'un appareil BIAcore 1000 upgrade. Une sensor chips permettant la liaison covalente d'un anticorps (sensor chip CM-5) est employée pour l'ensemble des expérimentations.

Un débit de 5  $\mu\text{l}/\text{min}$  du tampon de passage (HEPES 10 mM pH 7,5 NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, Tween 20 0,005 %) est appliqué au flux liquidien et l'appareil est thermostaté à 25°C.

Dans un premier temps, la surface de la sensor chip est activée par une mixture de 0,4 M N-hydroxysuccinimide (NHS) et 0,1 M ethyl-N-(3-diethylaminopropyl)carbodiimide (EDC) au ratio 1:1. L'anticorps Strep Mab-Immo (IBA) est fixé de façon covalente (Cf. figure 70) par injection de 35  $\mu\text{L}$  d'une solution de cet anticorps à 50  $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$  diluée dans un tampon sodium acétate 10 mM pH 4,5, puis les groupes encore réactifs de la sensor chips sont désactivés par injection de 25  $\mu\text{L}$  d'une solution d'éthanolamine 1 mM pH 8,5. La G6PDH sauvage ou mutante est ensuite fixée à l'anticorps (Cf. figure 69) par injection de 35  $\mu\text{L}$  d'une solution protéique à 100  $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ . Une cellule de flux ne contenant que le Strep Mab-Immo a été également construit pour mesurer l'interaction aspécifique des TRX avec cet anticorps. L'analyse de l'ensemble des interactions en temps réel est réalisée à un débit de 50  $\mu\text{l}.\text{min}^{-1}$ .

Pour l'analyse de l'interaction G6PDH sauvage ou mutante avec les TRX sauvages, une gamme d'analyte (TRX f ou x sauvage) de 50 à 500  $\mu\text{M}$  dans le tampon de passage à été injectée à la surface de la sensor chip contenant la G6PDH sauvage ou mutante.

L'analyse de l'interaction de TRX monocystéinique (Cr TRX h1 et At TRX y2) avec la G6PDH sauvage a été réalisée en conduisant les cycles suivants : dans un premier temps, la G6PDH est oxydée par injection de 30  $\mu\text{l}$  d'une solution de DTNB à 0,5mM, puis l'analyte (TRX monocystéinique h1 ou y2) est injectée à la surface de la sensor chips à une concentration de 20, 40, 60 ou 80  $\mu\text{M}$ . Le complexe covalent ainsi formé est ensuite dissocié par injection de 30  $\mu\text{l}$  de DTT réduit à une concentration de 2 mM. Les différences des spectres de résonance : Cellule de flux chargée en G6PDH – Cellule de flux chargée en Strep Mab-Immo, ont été enregistrées.

### **Cristallisation de G6PDH1**

Des criblages de conditions de cristallisation ont été réalisés en kit : Classics, MBClass, MBClass II, PEG II, MPD et Stura-Macrosol (Nextal, Jena, Hampton Research, MDL).





Les criblages ont été réalisés de façon automatisée (Robot Cartesian) en plaque 96 puits en suivant la technique de la diffusion de vapeur en goutte assise. Des gouttes de 0,2  $\mu\text{l}$  (0,1  $\mu\text{l}$  de protéines + 0,1  $\mu\text{l}$  de solution de cristallisation) ont été réalisées sur un promontoire situé au dessus d'un puits contenant 100 $\mu\text{l}$  de solution de cristallisation. Les plaques sont ensuite scellées et équilibrées à 18 °C pendant plusieurs jours. Différentes préparations protéiques de 5 à 20  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  ont été utilisées pour les criblages : G6PDH sauvage, oxydée ou mutante C149S C157S en présence ou non de 5 mM de  $\text{NADP}^+$  et/ou 5 mM de Glucosamine-6-phosphate. Une observation régulière des plaques à la loupe binoculaire permet de repérer la présence de précipité cristallin dans certaines conditions.

Les conditions permettant la cristallisation de la G6PDH sont ensuite reproduites et optimisées en boîte manuelle 24 puits en suivant la technique de diffusion de vapeur en goutte suspendue. Une gamme de concentration de précipitant est explorée dans une dimension de la plaque 24 puits tandis qu'une gamme de pH est explorée dans l'autre dimension. Les gouttes de 2  $\mu\text{l}$  (1  $\mu\text{l}$  de protéines + 1  $\mu\text{l}$  de solution de cristallisation) sont disposées sur une lamelle en verre qui est ensuite scellée au-dessus des puits de 1 mL contenant la solution de cristallisation correspondante. Les boîtes manuelles sont équilibrées plusieurs jours à 18°C et l'observation régulière des gouttes à la loupe binoculaire permet de déceler la présence de cristaux.



# **PUBLICATION**





## Redox regulation of chloroplastic glucose-6-phosphate dehydrogenase: A new role for f-type thioredoxin <sup>☆</sup>

Guillaume Née<sup>a</sup>, Mirko Zaffagnini<sup>b</sup>, Paolo Trost<sup>b</sup>, Emmanuelle Issakidis-Bourguet<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Institut de Biotechnologie des Plantes, UMR 8618 CNRS/Université Paris-Sud, Orsay, France

<sup>b</sup>Laboratory of Molecular Plant Physiology, Department of Experimental Evolutionary Biology, University of Bologna, Bologna, Italy

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 15 April 2009

Revised 6 July 2009

Accepted 20 July 2009

Available online 23 July 2009

Edited by Judit Ovádi

#### Keywords:

Glucose-6-phosphate dehydrogenase

Oxidative pentose phosphate pathway

Redox regulation

Plastidial thioredoxin

### ABSTRACT

Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) is the key enzyme of the oxidative pentose phosphate pathway supplying reducing power (as NADPH) in non-photosynthesizing cells. We have examined in detail the redox regulation of the plastidial isoform predominantly present in *Arabidopsis* green tissues (AtG6PDH1) and found that its oxidative activation is strictly dependent on plastidial thioredoxins (Trxs) that show differential efficiencies. Light/dark modulation of AtG6PDH1 was reproduced in vitro in a reconstituted ferredoxin/Trx system using f-type Trx allowing to propose a new function for this Trx isoform co-ordinating both reductive (Calvin cycle) and oxidative pentose phosphate pathways.

© 2009 Federation of European Biochemical Societies. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH, EC.1.1.149) generates NADPH by oxidizing glucose-6-phosphate in the first step of the oxidative pentose phosphate pathway (OPPP). In higher plants, NADPH is mainly produced in plastids where NADP is reduced in the light by the photosynthetic electron flow, or generated by the OPPP in the dark or in non-photosynthetic tissues. In chloroplasts, G6PDH is known to be inactivated in the light through reduction by thioredoxins (Trxs) [1,2]. Trxs are thiol-disulfide oxidoreductases found in all free living organisms [3].

In plants, many Trx isoforms are found, especially in plastids where they are subdivided into four types: the f- and m-types, initially defined by biochemical studies and the x- and y-types more recently identified by genomics [4]. In the model plant *Arabidopsis thaliana* (*Arabidopsis*), nine plastidial Trx isoforms are found and could be functionally distinguished by previous studies [4]. F-type Trx regulates the activity of all redox-sensitive Calvin cycle enzymes, in some cases specifically as for glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) [5] and fructose-1,6-bisphosphate

phosphatase [FBPase, 6], while m-type Trx was previously proposed to specifically regulate chloroplast G6PDH [2]. Based on these specific effects, Trx m was proposed as a regulator of catabolism, while Trx f would regulate anabolic processes. The x- and y-type Trxs were recently found to have an antioxidant function as electron donors for specific plastidial peroxidases [6,7].

Four genes encoding G6PDH plastidial isoforms were identified in *Arabidopsis*, including a redox-regulated isoform (AtG6PDH1) that recent biochemical analysis suggested to be the predominantly expressed isoform in green tissues [8]. Here, the redox regulation of AtG6PDH1 was examined in detail by comparing the efficiencies of the different plastidial Trx isoforms. As previously observed for potato chloroplast G6PDH [2], m-type Trxs efficiently regulate the activity of AtG6PDH1 but, quite unexpectedly, Trx f was very efficient too. Physiological relevance of this finding was tested in an in vitro reconstituted ferredoxin/Trx system [9] where light driven Trx f-dependent AtG6PDH1 inactivation and reversible activation in the dark could be demonstrated. It is concluded that Trx f can efficiently modulate both anabolic and catabolic metabolisms in chloroplasts.

### 2. Materials and methods

#### 2.1. Production and purification of recombinant proteins

Expression and purification of *Arabidopsis* recombinant plastidial Trx f1, m1, m3, m4, x, and y1 were performed as described previously [6,7], recombinant *Arabidopsis* GAPDH (B<sub>4</sub>), glutaredoxins

<sup>☆</sup> This work was supported in part by a MENRT grant to G.N. and by a FIRB grant from the Ministero dell'Istruzione, dell'Università e della Ricerca of Italy.

\* Corresponding author. Address: Institut de Biotechnologie des Plantes, UMR 8618, Bâtiment 630, Université Paris-Sud, 91405 Orsay Cedex, France. Fax: +33 (0) 1 69 15 34 23.

E-mail address: emmanuelle.issakidis-bourguet@u-psud.fr (E. Issakidis-Bourguet).



(Grxs) S14, S16 (CGFS active site) and Poplar Grx S12 (CSYS active site) were prepared by already published procedures [10–12]. Recombinant *Arabidopsis* G6PDH1 (AtG6PDH1) was produced in *Escherichia coli* using the DH5 $\alpha$  strain and the pASK-G6PDH1 plasmid [8]. Expression of mature AtG6PDH1 was induced for 16 h at 28 °C by addition of 2 mg ml<sup>-1</sup> anhydrotetracyclin to exponentially growing cells. The recombinant protein was purified by affinity chromatography using a streptavidin column (HiTrap streptavidin HP, GE Healthcare) and competitive elution with 2.5 mM desthiobiotin. Production yields were about 6–7 mg L<sup>-1</sup> cell culture. The recombinant protein (ca. 63 kDa) was purified to homogeneity, as confirmed by SDS-PAGE and Coomassie blue staining. Dialyzed concentrated preparations (ca. 15 mg/ml), were stable in 100 mM Tris-HCl, pH 7.9 for several months when kept at -20 °C.

## 2.2. Enzyme assays

G6PDH activity was measured in the presence of 2 mM glucose-6-phosphate and 200  $\mu$ M NADP in 100 mM Tris-HCl, pH 7.9 by following, at 30 °C, the appearance of NADPH at 340 nm using a spectrophotometer (Beckman DU 7400). GAPDH activity assay was performed as described previously [10].

## 2.3. Pre-reduced or oxidized protein preparations

To obtain fully oxidized or reduced preparations, AtG6PDH1 was treated with 20 mM dithiothreitol (DTTred) or 5 mM diamide for 40 and 5 min, respectively, in 100 mM Tris-HCl, pH 7.9 then desalted using NAP-5 columns (Sephadex<sup>TM</sup> G-25 columns, GE Healthcare). Oxidized GAPDH was prepared as previously described [10].

## 2.4. Redox treatments

Six purified recombinant Trxs from *Arabidopsis* (Trx f1, m1, m3, m4, y1 and x) were tested in vitro for their capacity to catalyze disulfide bond oxidation/reduction in reduced/oxidized AtG6PDH1.

The target was incubated in the presence of either 10 mM trans-4,5-dihydroxy-1,2-dithiane (DTTox) alone or supplemented with 10  $\mu$ M Trx in oxidation tests or 1 mM dithiothreitol (DTTred) alone or supplemented with 1  $\mu$ M Trx in reduction tests. G6PDH activity was measured on aliquots as a function of time of incubation. All experiments were repeated at least three times.

For other redox treatments, pre-oxidized AtG6PDH1 was incubated (10 min) either with 5 mM GSH, or with 2  $\mu$ M NTRC (NADP-Trx reductase) plus 0.2 mM NADPH. Glutaredoxin (Grx) was also tested by incubating (10 min) the oxidized enzyme in the presence of various recombinant plastidial isoforms (10  $\mu$ M) from *Arabidopsis* (Grxs S14 and S16) or poplar (Grxs S12) with 1 mM DTTred as electron donor [11,12]. Pre-reduced AtG6PDH1 was incubated (10 min) with 1 mM GSSG or 1 mM GSH plus 100  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> or with a range of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentrations from 1 to 100  $\mu$ M.

All redox treatments were done at room temperature in 100 mM Tris-HCl at pH 7.9 (reduction) or pH 6.9 (oxidation) to mimic the physiological pH of the chloroplast in the light or in the dark, respectively.

## 2.5. Determination of Trxs half-saturation concentrations for G6PDH

In order to confirm Trx specificities, half-saturation concentrations were determined by incubating (2 min) pre-reduced or pre-oxidized AtG6PDH1 (3  $\mu$ M) with various concentration of Trxs using DTTred (1 mM) or DTTox (10 mM) as electron donor or final electron acceptor. All experiments were repeated at least three times.

## 2.6. Structural analysis

Transit peptide sequence prediction of AtG6PDH1 (Q43727) was made using the ChloroP program (<http://www.cbs.dtu.dk/services/ChloroP/>). Mature sequence was then submitted to SWISS-MODEL Workspace (<http://swissmodel.expasy.org/workspace/>) to generate 3-D modelling from the known structure of a human variant G6PDH isoform (2BH9).

## 2.7. Midpoint redox potential

Oxidation-reduction titrations were carried out by measuring G6PDH activity to monitor the redox state of the regulatory disulfide in the presence of mixtures of oxidized and reduced DTT to poise the ambient-redox potential. AtG6PDH1 (10  $\mu$ M) in its initial redox state was incubated at 25 °C in 100 mM Tricine-NaOH, pH 7.9, with a total concentration of 20 mM DTT for 3 h. Experiments were repeated three times. The data fit the Nernst equation for a single two-electron process ( $n = 2$ ). To check the independence of the redox equilibration towards time and DTT concentration, an additional  $E_m$  was determined by adding 3.5  $\mu$ M of recombinant *Arabidopsis* Trx m4 to speed up the redox equilibration.

## 2.8. Ferredoxin/thioredoxin light system

The light/dark regulation of AtG6PDH1 by plastidial Trx was investigated in a ferredoxin (Fd)/Trx light reconstituted system using freshly prepared thylakoids from pea obtained as described previously [13]. Pre-oxidized AtG6PDH1 or GAPDH (B<sub>4</sub>) was incubated at 25 °C with an equivalent of 10–20  $\mu$ g chlorophyll of thylakoids, 5  $\mu$ M Fd from *Chlamydomonas* [14], 1  $\mu$ M *Synechocystis* sp. Pcc 7803 Fd-Trx reductase (FTR) [15] and 5  $\mu$ M Trx f1 or m4 under a 100  $\mu$ E m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> light intensity.

## 3. Results and discussion

### 3.1. Redox modulation of recombinant protein activity

The recombinant AtG6PDH1 previously obtained from *E. coli* was strongly inactivated upon incubation with a chemical reductant [8] suggesting a redox regulation of its activity like previously found for pea and potato chloroplast isoforms [1,2]. In our hands, purified AtG6PDH1 displayed a specific activity of 20.3  $\pm$  0.21 U/mg. It was increased to 139.5  $\pm$  10.9 U/mg (100% activity) upon oxidation by diamide and decreased to 11.23  $\pm$  0.66 U/mg (8% activity) upon reduction by reduced DTT (DTTred). The effects of these treatments were fully reversed by reduced or oxidized Trx, respectively.

### 3.2. Trx f regulates AtG6PDH1 activity as efficiently as m-type Trxs

Previous work with crude G6PDH preparations and heterologous Trx proteins suggested that chloroplast G6PDH is strictly regulated by m-type Trxs, Trx f from spinach being unable to catalyze the reductive inactivation of the recombinant potato enzyme [2]. To further investigate Trx specificity, we tested the ability of six *Arabidopsis* Trx isoforms representative of the four previously characterized plastidial types [4] to redox regulate AtG6PDH1 activity in vitro. Trx m2, f2 and y2 isoforms were not tested because we assumed that their reactivity is equivalent to that found with Trx m1, f1 and y1, respectively. The corresponding genes result from recent duplication events [16] yielding Trxs sharing ca. 90% sequence identity at the amino acid level and that could never be functionally distinguished in our previous biochemical tests [6,7,11].





Incubation of AtG6PDH1 with various Trxs in the presence of a chemical reductant (DTTred) or oxidant (DTTox) revealed that Trx isoforms differentially regulate this target, as shown by kinetics presented in Fig. 1. Most notably, Trx f1 appeared to regulate AtG6PDH1 activity as efficiently as Trx m1 or m4 leading to nearly full inhibition or activation within few min when tested at micromolar concentrations. By contrast, Trx x was a very poor regulator of G6PDH activity. Trx y1 was also inefficient as inhibitor but it showed high efficiency in activation. Noteworthy, AtG6PDH1 is the first target enzyme being significantly regulated *in vitro* by Trx m3 bringing a functional confirmation of its oxidoreductase capacity previously assumed on the basis of thermodynamics and structural modelling [6]. Half-saturation concentrations were determined for all Trx tested confirming their differential capacities to regulate AtG6PDH1 (Table 1).

### 3.3. Activity is strictly regulated by Trxs

Previous studies showed an effect of high concentrations of reduced or oxidized glutathione (GSH or GSSG) on plastidial G6PDH activity [17]. We tested the effect of physiological concentrations (1–5 mM) of GSH and GSSG on AtG6PDH1 activity and could not evidence any significant regulation, even after prolonged incubation times (not shown). We also tested plastidial Grx isoforms from *Arabidopsis* and poplar that showed a very poor ability to modulate AtG6PDH1 activity (data not shown). Finally, the plastidial NTRC [18] also proved to be inefficient in regulating G6PDH (data not shown). The possibility of a direct activation of AtG6PDH1 by reactive oxygen species (ROS) was also questioned. When reduced AtG6PDH1 was incubated in the presence of hydrogen peroxide, no modulation of its activity was observed even at a concentration as high as 100  $\mu$ M, likely corresponding to drastic oxidative stress conditions [19]. Overall, our data indicate that the redox regulation of AtG6PDH1 is strictly Trx-dependent and that its activation cannot occur under oxidative conditions without Trx.

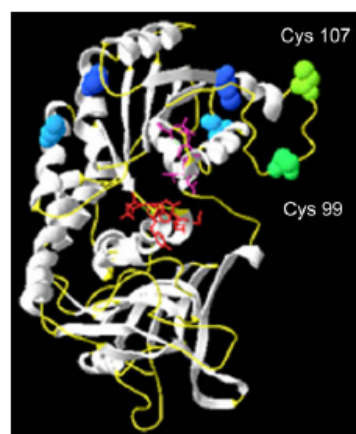
### 3.4. Cysteine residues involved in the redox regulation of G6PDH are surface accessible

Previous studies on the potato chloroplastic isoform of G6PDH have shown that its redox regulation involves two conserved Cys residues [2]. Potato P1 and *Arabidopsis* G6PDH1 proteins share 78% identity. Their sequence alignment [8] identifies two regulatory cysteines at positions 99 and 107 in the *Arabidopsis* isoform. 3-D modelling reveals that Cys99 and Cys107 are positioned in an unstructured, most probably flexible, loop located near the active site and the cofactor binding domain (Fig. 2). They are predicted to be surface exposed and therefore easily accessible to

**Table 1**

Half-saturation concentrations of plastidial Trxs for G6PDH inhibition or activation. Determinations were done at a constant concentration of AtG6PDH1 (3  $\mu$ M) incubated with a range of *Arabidopsis* (At) plastidial Trx concentrations (from 1 to 600  $\mu$ M) with 1 mM DTTred or 10 mM DTTox as electron donor or final electron acceptor, respectively.

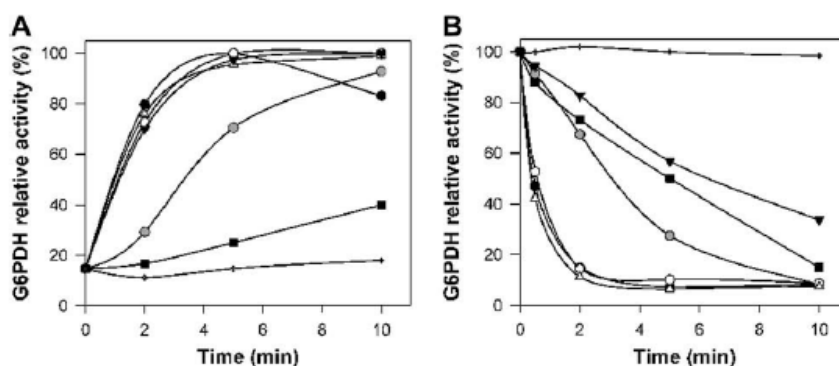
At Trxs	S <sub>0.5</sub> inhibition ( $\mu$ M)	S <sub>0.5</sub> activation ( $\mu$ M)
Trx m1	0.64 ± 0.03	1.48 ± 0.16
Trx m3	1.58 ± 0.01	4.3 ± 0.61
Trx m4	0.75 ± 0.03	1.1 ± 0.11
Trx f1	0.61 ± 0.06	2.67 ± 0.19
Trx y1	7.27 ± 0.38	2.87 ± 0.06
Trx x	10.53 ± 0.15	29.25 ± 2.17



**Fig. 2.** 3-D modelling of AtG6PDH1 structure. Modelling was made using the Swiss-Model workspace (<http://swissmodel.expasy.org/workspace/>) based on the known structure of a human variant G6PDH isoform (2BH9) presenting 47% identity with AtG6PDH1 (mature form). The Swiss-prot PDB viewer program (available at: <http://expasy.org/spdbv/>) allowed the coloration of cysteine residues according to their accessibility from dark blue (less accessible) to bright green (more accessible). Structured parts of the protein appear in grey while unstructured regions are coloured in yellow. The NADP binding domain is shown in violet and the G6PDH consensus active site sequence (DH YLGKE) is in red. The 2 conserved Cys residues involved in the redox regulation of plastidial G6PDH isoforms are numbered. They are located at a surface-exposed unstructured loop close to the active site and cofactor binding domain.

Trx. Flexibility of the loop does not allow a precise measuring of the distance between these cysteines.

However, a ca. 18 Å distance could be roughly estimated, which is not compatible with a spontaneous disulfide bond formation, suggesting that a Trx-linked conformational change is required



**Fig. 1.** Differential regulation of AtG6PDH1 by plastidial Trxs. m-type Trxs: m1 (●), m3 (⊙) and m4 (○); Trx f1 (Δ); Trx y1 (▼) and Trx x (■). Trxs were tested (A) at 10  $\mu$ M and 10 mM DTTox for activation (oxidation) kinetics and (B) at 1  $\mu$ M in the presence of 1 mM DTTred for inhibition (reduction) kinetics. DTTox or DTTred alone (+) had no effect.



for this purpose. A similar role was previously proposed for Trx in the regulation of CF1  $\gamma$ -subunit of ATPase [20].

### 3.5. Redox potential of AtG6PDH1 partly explains Trx specificities

The redox midpoint potential ( $E_m$ ) of AtG6PDH1 was determined by measuring the activity of G6PDH equilibrated with different DTT redox buffers. Titration gave an excellent fit to the Nernst equation for a two-electron redox couple corresponding to a single regulatory disulfide (Fig. 3). At pH 7.9, an  $E_m$  value of  $-329.9 \pm 1.2$  mV was found. Hence, the regulatory disulfide of AtG6PDH1 being less negative than *Arabidopsis* f- and m-type Trxs (previously found between  $-351$  and  $-358$  mV) is favourably reduced, but less favourably oxidized, by these isoforms [6]. Indeed, half-saturation concentrations for these thioredoxins are significantly lower in reduction than in oxidation. On the other hand, regulation by Trx  $\gamma$ , being isopotential [7] with the regulatory disulfide of AtG6PDH1, would be thermodynamically feasible in both direc-

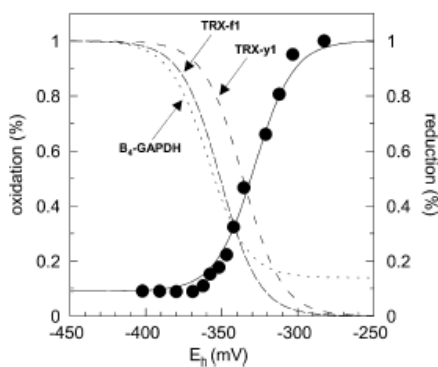


Fig. 3. Redox titration of chloroplastic AtG6PDH1. The percentage of oxidation was determined by measuring G6PDH activity (closed circles) after 3 h incubation at 25 °C with 20 mM DTT in various dithiol-disulfide ratios. Interpolation curve (full line) was obtained by non-linear regression of the data using a Nernst equation for 2-electrons exchanged ( $n=2$ ) and one redox component. For comparison, redox titrations of  $B_4$ -GAPDH ( $E_{m,7.9} = -359$  mV, [10]), Trx  $\gamma$ 1 ( $E_{m,7.9} = -336$  mV, [7]) and Trx f1 ( $E_{m,7.9} = -351$  mV, [6]) are represented as dotted, dashed and short-dashed sigmoids, respectively.

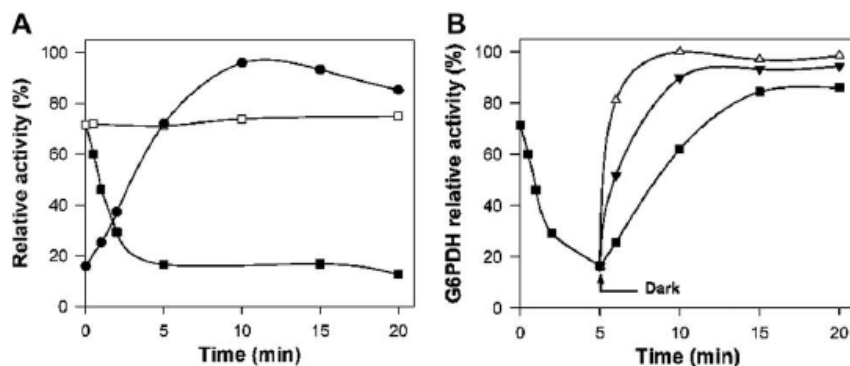


Fig. 4. Activity of AtG6PDH1 and GAPDH ( $B_4$ ) in a reconstituted Fd/Trx light system. This system comprises freshly prepared pea thylakoids and recombinant Fd, FTR and Trx f1 (see "materials and methods" for details). (A) Reductive inactivation of AtG6PDH1 (■) and reductive activation of AtGAPDH  $B_4$  (●) (from [20]) upon illumination. Control experiment for G6PDH inactivation was made by omitting FTR and Trx (□). (B) After 5 min of illumination, the G6PDH assay was transferred to the dark, in absence (■), or in presence of oxidants: 100  $\mu$ M  $H_2O_2$  (▼) or 10 mM DTTox (▲). The maximal (100%) activity of enzymes in the light reconstituted system corresponds to 140 u/mg for G6PDH and 130 u/mg for GAPDH.

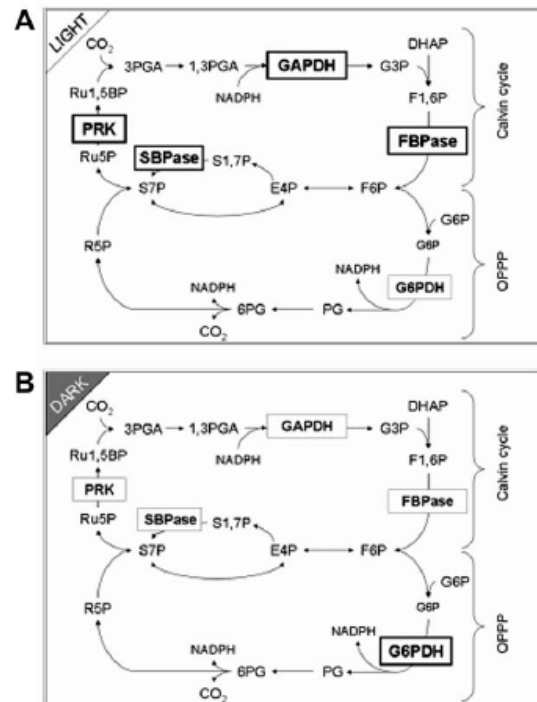


Fig. 5. Coordination of the reductive (Calvin-Benson cycle) and the oxidative pentose phosphate pathways by f-type Trx. Size and rectangle thickness of Trx-f dependent targets indicate activity levels of enzymes. In the light (A), reduction of Trx f allows, on one hand, the activation of the Calvin cycle through the reductive activation of Trx f-strictly dependent enzymes such as phospho-ribulo kinase (PRK), GAPDH and fructose-1,6-bis-phosphate phosphatase (FBPase), Sedoheptulose-1,7-bis-phosphate phosphatase (SBPase) and, on the other hand, the inactivation of the oxidative pentose phosphate pathway (OPPP) by the reductive inactivation of G6PDH catalysing the first step of this pathway. In the dark, (B), oxidised Trx f slows down the Calvin cycle through the oxidative inhibition of Trx f-strictly dependent enzymes and, simultaneously, boosts the OPPP through the oxidative activation of G6PDH. This opposite light-dark modulation of G6PDH and Calvin cycle enzymes mediated by Trx f allows the coordination of the two cycles directing the enzymatic steps shared in common by the two cycles (represented as double targeted lines on the present scheme).



tions, although inactivation (reduction) was found to be kinetically restrained (Fig. 1B).

### 3.6. Light dependent regulation of AtG6PDH1 by Trx f

The ability of Trx f to regulate AtG6PDH1 activity was confirmed in an *in vitro* reconstituted Fd/Trx system comprising thylakoids and recombinant Fd, FTR and Trx f1 (Fig. 4). As expected, upon illumination, a strong and fast reductive inhibition of AtG6PDH1 activity was observed and was dependent on the presence of all the components of the Fd/Trx system. Comparable results were obtained when using Trx m4 (not shown). In the same system, GAPDH, a well-known Trx f-dependent Calvin cycle enzyme [10], was light activated with comparable kinetics (Fig. 4A) [21]. G6PDH activity could be recovered by transferring the mixture from light to dark, reversibility of inactivation certifying redox modulation of the enzyme (Fig. 4B). In the dark, reactivation could be enhanced by the addition of oxidants, such as DTTox and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> at concentrations that did not show any direct effect on the activity of the enzyme.

## 4. Concluding remarks

In present work we have examined in detail the redox regulation of G6PDH that catalyzes the regulatory step in the OPPP, being tightly regulated by metabolites (NADPH/NADP<sup>+</sup>, RuBP: [22]). The opposite redox regulations of G6PDH and Calvin cycle enzymes were previously shown on chloroplast preparations [23–25]. Several Calvin cycle enzymes, such as GAPDH and FBPase, are known to be strictly regulated by Trx f [5,6]. The present work shows that this same Trx is also very efficient in the opposite regulation of G6PDH. This co-regulation is essential because it directs the reversible enzymatic steps that are common to the reductive and the oxidative pentose phosphate pathways (Fig. 5). In addition to Trx f, the various Trxs m isoforms are also very efficient in the regulation of G6PDH activity, including Trx m3. For the last isoform, the present work constitutes the first report of an oxidoreductase activity. To our knowledge, only a phenotypic effect has been observed on null mutant plants for this isoform [26]. Considering the recent plastid proteomic data Trxs f seem to be the most probable regulators of G6PDH1 in *Arabidopsis* leaves. Indeed, f1 and f2 AtTrx isoforms and AtG6PDH1 were among the most abundant stromal proteins while m-type Trxs (except m3 isoform) were found to be associated to thylakoid membranes (Plant Proteome Database: <http://ppdb.tc.cornell.edu/>) [27].

Trx f specific enzymes (GAPDH and FBPase) are activated at much lower redox potentials (ca. –360 mV) than that required for G6PDH inactivation (–330 mV, this work). Thus under normal light/dark regime, G6PDH activity (hence OPPP) should drop very rapidly at the onset of illumination, ensuring an efficient temporal separation of catabolic and anabolic pathways (as illustrated in Fig. 4A). In the dark, activation of G6PDH needs the specific action of oxidized Trx potentiated by ROS (Fig. 4B). Concerning the new Trx isoforms x and y that were not tested in previous studies, no activity could be detected for Trx x, but Trx y1 was active essentially for the oxidative activation of G6PDH. As Trx y is also a very efficient reductant of plastidial peroxidase Q [6], it seems to fulfil an antioxidant function whatever its redox state.

## Acknowledgments

Authors are grateful to Pr Christopher Benning (Michigan state university, East Lansing, USA) and to Dr. Nicolas Rouhier (université Poincaré, Vandoeuvre, France) for kindly providing the pASK-G6PDH1 expression plasmid and glutaredoxin protein samples,

respectively. We also thank Myroslawa Miginiac-Maslow for critical reading of the manuscript.

## References

- [1] Scheibe, R. and Anderson, L. (1981) Dark modulation of NADP-dependent malate dehydrogenase and glucose-6-phosphate dehydrogenase in the chloroplast. *Arch. Biochem. Biophys.* 636, 58–64.
- [2] Wenderoth, L., Scheibe, R. and Von Schaewen, A. (1997) Identification of the cysteine residues involved in redox modification of plant plastidial glucose-6-phosphate dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* 272, 26895–26990.
- [3] Holmgren, A. (1989) Thioredoxin and glutaredoxin systems. *J. Biol. Chem.* 264, 13963–13966.
- [4] Lemaire, S.D., Michelet, L., Zaffagnini, M., Massot, V. and Issakidis-Bourguet, E. (2007) Thioredoxins in chloroplasts. *Curr. Genet.* 51, 343–365.
- [5] Marri, L., Zaffagnini, M., Collin, V., Issakidis-Bourguet, E., Lemaire, S.D., Pupillo, P., Sparla, F., Miginiac-Maslow, M. and Trost, P. (2009) Prompt and easy activation by specific thioredoxins of Calvin cycle enzymes of *Arabidopsis thaliana* associated in the GAPDH/CP12/PRK supramolecular complex. *Mol. Plant* 2, 259–269.
- [6] Collin, V., Issakidis-Bourguet, E., Marchand, C., Hirasawa, M., Lancelin, J.M., Knaff, D.B. and Miginiac-Maslow, M. (2003) The *Arabidopsis* plastidial thioredoxins: new functions and new insights into specificity. *J. Biol. Chem.* 278, 23747–23752.
- [7] Collin, V., Lamkemeyer, P., Miginiac-Maslow, M., Hirasawa, M., Knaff, D.B., Dietz, K.J. and Issakidis-Bourguet, E. (2004) Characterization of plastidial thioredoxins from *Arabidopsis* belonging to the new  $\gamma$ -type. *Plant Physiol.* 136, 4088–4095.
- [8] Wakao, S. and Benning, C. (2005) Genome-wide analysis of glucose-6-phosphate dehydrogenases in *Arabidopsis*. *Plant J.* 41, 243–256.
- [9] Buchanan, B.B. (1991) Regulation of CO<sub>2</sub> assimilation in oxygenic photosynthesis: the ferredoxin/thioredoxin system. Perspective on its discovery, present status, and future development. *Arch. Biochem. Biophys.* 288, 1–9.
- [10] Sparla, F., Pupillo, P. and Trost, P. (2002) The C-terminal extension of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase subunit B acts as an autoinhibitory domain regulated by thioredoxins and nicotinamide adenine dinucleotide. *J. Biol. Chem.* 277, 44946–44952.
- [11] Vieira Dos Santos, C., Laugier, E., Tarrago, L., Massot, V., Issakidis-Bourguet, E., Rouhier, N. and Rey, P. (2007) Specificity of thioredoxins and glutaredoxins as electron donors to two distinct classes of *Arabidopsis* plastidial methionine sulfoxide reductases B. *FEBS Lett.* 581, 4371–4376.
- [12] Bandyopadhyay, S., Gama, F., Molina-Navarro, M.M., Gualberto, J.M., Claxton, R., Naik, S.G., Huynh, B.H., Herrero, E., Jacquot, J.P., Johnson, M.K. and Rouhier, N. (2008) Chloroplast monothiol glutaredoxins as scaffold proteins for the assembly and delivery of [2Fe–2S] clusters. *EMBO J.* 27, 1122–1133.
- [13] Miginiac-Maslow, M., Decottignies, P., Jacquot, J.P. and Gadal, P. (1990) Regulation of corn leaf NADP-malate dehydrogenase light-activation by the photosynthetic electron flow. Effect of photoinhibition studied in a reconstituted system. *Biochem. Biophys. Acta* 1017, 273–279.
- [14] Jacquot, J.P., Stein, M., Suzuki, A., Liottet, S., Sandoz, G. and Miginiac-Maslow, M. (1997) Residue Glu-91 of *Chlamydomonas reinhardtii* ferredoxin is essential for electron transfer to ferredoxin–thioredoxin reductase. *FEBS Lett.* 400, 293–296.
- [15] Schürmann, P. (2002) Ferredoxin-dependent thioredoxin reductase: a unique iron-sulfur protein. *Method Enzymol.* 347, 403–411.
- [16] Meyer, Y., Vignols, F. and Reichheld, J.P. (2002) Classification of plant thioredoxins by sequence similarity and intron position. *Method Enzymol.* 347, 394–402.
- [17] Wendt, U.K., Wenderoth, L., Tegeler, A. and Von Schaewen, A. (2000) Molecular characterization of a novel glucose-6-phosphate dehydrogenase from potato (*Solanum tuberosum* L.). *Plant J.* 23, 723–733.
- [18] Spinola, M.C., Perez-Ruiz, J.M., Pulido, P., Kirchsteiger, K., Guinea, M., Gonzalez, M. and Cejudo, F.J. (2008) NTRC new ways of using NADPH in the chloroplast. *Physiol. Plant.* 133, 516–524.
- [19] Queval, G., Hager, J., Gakière, B. and Noctor, G. (2008) Why are literature data for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> contents so variable? A discussion of potential difficulties in the quantitative assay of leaf extracts. *J. Exp. Bot.* 59, 135–146.
- [20] Stumpp, M.T., Motohashi, K. and Hisabori, T. (1999) Chloroplast thioredoxin mutants without active-site cysteines facilitate the reduction of the regulatory disulphide bridge on the  $\gamma$ -subunit of chloroplast ATP synthase. *Biochem. J.* 341, 157–163.
- [21] Michelet, L., Zaffagnini, M., Marchand, C., Collin, V., Decottignies, P., Tsan, P., Lancelin, J.M., Trost, P., Miginiac-Maslow, M., Noctor, G. and Lemaire, S.D. (2005) Glutathionylation of chloroplast thioredoxin f is a redox signaling mechanism in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 16478–16483.
- [22] Lendzian, K. and Bassham, J.A. (1975) Regulation of glucose-6-phosphate dehydrogenase in spinach chloroplasts by ribulose 1,5-disphosphate and NADP/NADP<sup>+</sup> ratios. *Biochem. Biophys. Acta* 396, 260–275.
- [23] Mvé Akamba, L. and Anderson, L.E. (1981) Light modulation of glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase and glucose-6-phosphate dehydrogenase by photosynthetic electron flow in pea chloroplasts. *Plant Physiol.* 67, 197–200.



- [24] Scheibe, R., Geissler, A. and Fickenscher, K. (1989) Chloroplast glucose-6-phosphate dehydrogenase:  $K_m$  shift upon light modulation and reduction. *Arch. Biochem. Biophys.* 274, 290–297.
- [25] Huppe, H.C., Farr, T.J. and Turpin, D.H. (1994) Coordination of Chloroplastic metabolism in N-limited *Chlamydomonas reinhardtii* by redox modulation. *Plant Physiol.* 105, 1043–1048.
- [26] Benitez-Alfonso, Y., Cilia, M., San Roman, A., Thomas, C., Maule, A., Hearn, S. and Jackson, D. (2009) Control of Arabidopsis meristem development by thioredoxin-dependent regulation of intercellular transport. *PNAS* 105, 3615–3620.
- [27] Zybailov, B., Rutschw, H., Friso, G., Rudella, A., Emanuelsson, O., Sun, Q. and van Wijk, K.J. (2008) Sorting signals, N-terminal modifications and abundance of the chloroplast proteome. *PLoS ONE* 3 (4), e1994.





**REFERENCES  
BIBLIOGRAPHIQUES**



- Adams, M.J., Gover, S., Leaback, R., Phillips, C., and Somers, D.O. (1991). The structure of 6-phosphogluconate dehydrogenase refined at 2.5 Å resolution. *Acta Crystallogr B* 47 ( Pt 5), 817-820.
- Arsova, B., Hoja, U., Wimmelbacher, M., Greiner, E., Ustün, S., Melzer, M., Petersen, K., Lein, W., and Börnke, F. (2010). Plastidial thioredoxin z interacts with two fructokinase-like proteins in a thiol-dependent manner: evidence for an essential role in chloroplast development in *Arabidopsis* and *Nicotiana benthamiana*. *Plant Cell* 22, 1498-1515.
- Au, S.W., Gover, S., Lam, V.M., and Adams, M.J. (2000). Human glucose-6-phosphate dehydrogenase: the crystal structure reveals a structural NADP(+) molecule and provides insights into enzyme deficiency. *Structure* 8, 293-303.
- Bailly, C., El-Maarouf-Bouteau, H., and Corbineau, F. (2008). From intracellular signaling networks to cell death: the dual role of reactive oxygen species in seed physiology. *C R Biol* 331, 806-814.
- Balmer, Y., Koller, A., del Val, G., Manieri, W., Schürmann, P., and Buchanan, B.B. (2003). Proteomics gives insight into the regulatory function of chloroplast thioredoxins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 370-375.
- Balmer, Y., Vensel, W.H., Cai, N., Manieri, W., Schürmann, P., Hurkman, W.J., and Buchanan, B.B. (2006). A complete ferredoxin/thioredoxin system regulates fundamental processes in amyloplasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 2988-2993.
- Bandyopadhyay, S., Gama, F., Molina-Navarro, M.M., Gualberto, J.M., Claxton, R., Naik, S.G., Huynh, B.H., Herrero, E., Jacquot, J.P., Johnson, M.K., and Rouhier, N. (2008). Chloroplast monothiol glutaredoxins as scaffold proteins for the assembly and delivery of [2Fe-2S] clusters. *EMBO J* 27, 1122-1133.
- Barranco-Medina, S., Krell, T., Bernier-Villamor, L., Sevilla, F., Lázaro, J.J., and Dietz, K.J. (2008). Hexameric oligomerization of mitochondrial peroxiredoxin PrxIIIF and formation of an ultrahigh affinity complex with its electron donor thioredoxin Trx-o. *J Exp Bot* 59, 3259-3269.
- Batz, O., Logemann, E., Reinold, S., and Hahlbrock, K. (1998). Extensive reprogramming of primary and secondary metabolism by fungal elicitor or infection in parsley cells. *Biol Chem* 379, 1127-1135.
- Bautista, J.M., Mason, P.J., and Luzzatto, L. (1995). Human glucose-6-phosphate dehydrogenase. Lysine 205 is dispensable for substrate binding but essential for catalysis. *FEBS Lett* 366, 61-64.



- Benitez-Alfonso, Y., Cilia, M., San Roman, A., Thomas, C., Maule, A., Hearn, S., and Jackson, D. (2009). Control of Arabidopsis meristem development by thioredoxin-dependent regulation of intercellular transport. Proc Natl Acad Sci U S A 106, 3615-3620.**
- Berdis, A.J., and Cook, P.F. (1993). Overall kinetic mechanism of 6-phosphogluconate dehydrogenase from *Candida utilis*. Biochemistry 32, 2036-2040.**
- Bozzo, G.G., Raghothama, K.G., and Plaxton, W.C. (2002). Purification and characterization of two secreted purple acid phosphatase isozymes from phosphate-starved tomato (*Lycopersicon esculentum*) cell cultures. Eur J Biochem 269, 6278-6286.**
- Brandes, H.K., Larimer, F.W., Geck, M.K., Stringer, C.D., Schürmann, P., and Hartman, F.C. (1993). Direct identification of the primary nucleophile of thioredoxin f. J Biol Chem 268, 18411-18414.**
- Buchanan, B.B., and Wolosiuk, R.A. (1976). Photosynthetic regulatory protein found in animal and bacterial cells. Nature 264, 669-670.**
- Buchanan, B.B., and Luan, S. (2005). Redox regulation in the chloroplast thylakoid lumen: a new frontier in photosynthesis research. J Exp Bot 56, 1439-1447.**
- Buchanan, B.B., and Balmer, Y. (2005). Redox regulation: a broadening horizon. Annu Rev Plant Biol 56, 187-220.**
- Bridges, R.B., Palumbo, M.P., and Wittenberger, C.L. (1975). Purification and properties of an NADP-specific 6-phosphogluconate dehydrogenase from *Streptococcus faecalis*. J Biol Chem 250, 6093-6100.**
- Chi, Y.H., Moon, J.C., Park, J.H., Kim, H.S., Zulfugarov, I.S., Fanata, W.I., Jang, H.H., Lee, J.R., Lee, Y.M., Kim, S.T., Chung, Y.Y., Lim, C.O., Kim, J.Y., Yun, D.J., Lee, C.H., Lee, K.O., and Lee, S.Y. (2008). Abnormal chloroplast development and growth inhibition in rice thioredoxin m knock-down plants. Plant Physiol 148, 808-817.**
- Chibani, K., Tarrago, L., Schürmann, P., Jacquot, J.P., and Rouhier, N. (2011). Biochemical properties of poplar thioredoxin z. FEBS Lett 585, 1077-1081.**
- Chow, L.P., Iwadate, H., Yano, K., Kamo, M., Tsugita, A., Gardet-Salvi, L., Stritt-Etter, A.L., and Schürmann, P. (1995). Amino acid sequence of spinach ferredoxin:thioredoxin reductase catalytic subunit and identification of thiol groups constituting a redox-active disulfide and a [4Fe-4S] cluster. Eur J Biochem 231, 149-156.**
- Collet, J.F., and Messens, J. (2010). Structure, function, and mechanism of thioredoxin proteins. Antioxid Redox Signal 13, 1205-1216.**



- Collin, V., Issakidis-Bourguet, E., Marchand, C., Hirasawa, M., Lancelin, J.M., Knaff, D.B., and Miginiac-Maslow, M. (2003). The Arabidopsis plastidial thioredoxins: new functions and new insights into specificity. *J Biol Chem* 278, 23747-23752.**
- Collin, V., Lamkemeyer, P., Miginiac-Maslow, M., Hirasawa, M., Knaff, D.B., Dietz, K.J., and Issakidis-Bourguet, E. (2004). Characterization of plastidial thioredoxins from Arabidopsis belonging to the new  $\gamma$ -type. *Plant Physiol* 136, 4088-4095.**
- Cosgrove, M.S., Gover, S., Naylor, C.E., Vandeputte-Rutten, L., Adams, M.J., and Levy, H.R. (2000). An examination of the role of asp-177 in the His-Asp catalytic dyad of *Leuconostoc mesenteroides* glucose 6-phosphate dehydrogenase: X-ray structure and pH dependence of kinetic parameters of the D177N mutant enzyme. *Biochemistry* 39, 15002-15011.**
- Cossar, J.D., Rowell, P., and Stewart, W.D.P. (1984). Thioredoxin as a Modulator of Glucose-6-phosphate Dehydrogenase in a N<sub>2</sub>-Fixing Cyanobacterium. *Journal of General Microbiology* 130, 991-998.**
- Czechowski, T., Stitt, M., Altmann, T., Udvardi, M.K., and Scheible, W.R. (2005). Genome-wide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization in Arabidopsis. *Plant Physiol* 139, 5-17.**
- Dai, S., Friemann, R., Glauser, D.A., Bourquin, F., Manieri, W., Schürmann, P., and Eklund, H. (2007). Structural snapshots along the reaction pathway of ferredoxin-thioredoxin reductase. *Nature* 448, 92-96.**
- Debnam, P.M., Fernie, A.R., Leisse, A., Golding, A., Bowsher, C.G., Grimshaw, C., Knight, J.S., and Emes, M.J. (2004). Altered activity of the P2 isoform of plastidic glucose 6-phosphate dehydrogenase in tobacco (*Nicotiana tabacum* cv. Samsun) causes changes in carbohydrate metabolism and response to oxidative stress in leaves. *Plant J* 38, 49-59.**
- Esposito, S., Carillo, E., and Carfagna, S. (1998). Ammonium metabolism stimulation of glucose-6P dehydrogenase and phosphoenolpyruvate carboxylase in young barley roots. *Journal of Plant Physiology* 153, 61-66.**
- Ferro, M., Brugière, S., Salvi, D., Seigneurin-Berny, D., Court, M., Moyet, L., Ramus, C., Miras, S., Mellal, M., Le Gall, S., Kieffer-Jaquinod, S., Bruley, C., Garin, J., Joyard, J., Masselon, C., and Rolland, N. (2010). AT\_CHLORO, a comprehensive chloroplast proteome database with subplastidial localization and curated information on envelope proteins. *Mol Cell Proteomics* 9, 1063-1084.**
- Flohé, L. (2010). Changing paradigms in thiology from antioxidant defense toward redox regulation. *Methods Enzymol* 473, 1-39.**





- Friso, G., Giacomelli, L., Ytterberg, A.J., Peltier, J.-B., Rudella, A., Sun, Q., and Wijk, K.J.v. (2004). In-Depth Analysis of the Thylakoid Membrane Proteome of *Arabidopsis thaliana* Chloroplasts: New Proteins, New Functions, and a Plastid Proteome Database. *The Plant Cell Online* 16, 478-499.
- Fujii, H., Verslues, P.E., and Zhu, J.K. (2007). Identification of two protein kinases required for abscisic acid regulation of seed germination, root growth, and gene expression in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 19, 485-494.
- Gaymard, E., Franchini, L., Manieri, W., Stutz, E., and Schürmann, P. (2000). A dicistronic construct for the expression of functional spinach chloroplast ferredoxin:thioredoxin reductase in *Escherichia coli*. *Plant Sci* 158, 107-113.
- Geck, M.K., Larimer, F.W., and Hartman, F.C. (1996). Identification of residues of spinach thioredoxin f that influence interactions with target enzymes. *J Biol Chem* 271, 24736-24740.
- Glauser, D.A., Bourquin, F., Manieri, W., and Schürmann, P. (2004). Characterization of ferredoxin:thioredoxin reductase modified by site-directed mutagenesis. *J Biol Chem* 279, 16662-16669.
- Habeeb, A.F., Schrohenloher, R.E., and Bennett, J.C. (1972). Studies of the component chains of human IgM by citraconylation. *Biochim Biophys Acta* 263, 339-350.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166, 557-580.
- Hauschild, R., and von Schaewen, A. (2003). Differential regulation of glucose-6-phosphate dehydrogenase isoenzyme activities in potato. *Plant Physiol* 133, 47-62.
- He, W., Wang, Y., Liu, W., and Zhou, C.Z. (2007). Crystal structure of *Saccharomyces cerevisiae* 6-phosphogluconate dehydrogenase Gnd1. *BMC Struct Biol* 7, 38.
- Heazlewood, J.L., Tonti-Filippini, J.S., Gout, A.M., Day, D.A., Whelan, J., and Millar, A.H. (2004). Experimental analysis of the *Arabidopsis* mitochondrial proteome highlights signaling and regulatory components, provides assessment of targeting prediction programs, and indicates plant-specific mitochondrial proteins. *Plant Cell* 16, 241-256.
- Hirasawa, M., Ruelland, E., Schepens, I., Issakidis-Bourguet, E., Miginiac-Maslow, M., and Knaff, D.B. (2000). Oxidation-reduction properties of the regulatory disulfides of sorghum chloroplast nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-malate dehydrogenase. *Biochemistry* 39, 3344-3350.
- Hirasawa, M., Schürmann, P., Jacquot, J.P., Manieri, W., Jacquot, P., Keryer, E., Hartman, F.C., and Knaff, D.B. (1999). Oxidation-reduction properties of chloroplast thioredoxins, ferredoxin:thioredoxin reductase, and thioredoxin f-regulated enzymes. *Biochemistry* 38, 5200-5205.



- Hisabori, T., Hara, S., Fujii, T., Yamazaki, D., Hosoya-Matsuda, N., and Motohashi, K. (2005). Thioredoxin affinity chromatography: a useful method for further understanding the thioredoxin network. *J Exp Bot* 56, 1463-1468.
- Hishiya, S., Hatakeyama, W., Mizota, Y., Hosoya-Matsuda, N., Motohashi, K., Ikeuchi, M., and Hisabori, T. (2008). Binary reducing equivalent pathways using NADPH-thioredoxin reductase and ferredoxin-thioredoxin reductase in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *Plant Cell Physiol* 49, 11-18.
- Holmgren, A. (1976). Hydrogen donor system for *Escherichia coli* ribonucleoside-diphosphate reductase dependent upon glutathione. *Proc Natl Acad Sci U S A* 73, 2275-2279.
- Holmgren, A. (1989). Thioredoxin and glutaredoxin systems. *J Biol Chem* 264, 13963-13966.
- Horling, F., Lamkemeyer, P., König, J., Finkemeier, I., Kandlbinder, A., Baier, M., and Dietz, K.J. (2003). Divergent light-, ascorbate-, and oxidative stress-dependent regulation of expression of the peroxiredoxin gene family in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 131, 317-325.
- Häberlein, I., Würfel, M., and Follmann, H. (1992). Non-redox protein interactions in the thioredoxin activation of chloroplast enzymes. *Biochim Biophys Acta* 1121, 293-296.
- Issakidis, E., Saarinen, M., Decottignies, P., Jacquot, J.P., Crétin, C., Gadal, P., and Miginiac-Maslow, M. (1994). Identification and characterization of the second regulatory disulfide bridge of recombinant sorghum leaf NADP-malate dehydrogenase. *J Biol Chem* 269, 3511-3517.
- Iwadate, H., Yano, K., Kamo, M., Gardet-Salvi, L., Schürmann, P., and Tsugita, A. (1994). Amino acid sequence of spinach ferredoxin:thioredoxin reductase variable subunit. *Eur J Biochem* 223, 465-471.
- Kanji, M.I., Toews, M.L., and Carper, W.R. (1976). A kinetic study of glucose-6-phosphate dehydrogenase. *J Biol Chem* 251, 2258-2262.
- Kern, R., Malki, A., Holmgren, A., and Richarme, G. (2003). Chaperone properties of *Escherichia coli* thioredoxin and thioredoxin reductase. *Biochem J* 371, 965-972.
- Kobrehel, K., Wong, J.H., Balogh, A., Kiss, F., Yee, B.C., and Buchanan, B.B. (1992). Specific reduction of wheat storage proteins by thioredoxin h. *Plant Physiol* 99, 919-924.
- Kolodkin-Gal, I., and Engelberg-Kulka, H. (2008). The extracellular death factor: physiological and genetic factors influencing its production and response in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 190, 3169-3175.



- Kolodkin-Gal, I., Hazan, R., Gaathon, A., Carmeli, S., and Engelberg-Kulka, H. (2007). A linear pentapeptide is a quorum-sensing factor required for mazEF-mediated cell death in *Escherichia coli*. *Science* 318, 652-655.
- Kosow, D.P. (1974). Glucose 6-phosphate dehydrogenase of human blood platelets. Kinetics and regulatory properties. *Arch Biochem Biophys* 162, 186-193.
- Kotaka, M., Gover, S., Vandeputte-Rutten, L., Au, S.W., Lam, V.M., and Adams, M.J. (2005). Structural studies of glucose-6-phosphate and NADP<sup>+</sup> binding to human glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 61, 495-504.
- Krepinsky, K., Plaumann, M., Martin, W., and Schnarrenberger, C. (2001). Purification and cloning of chloroplast 6-phosphogluconate dehydrogenase from spinach. Cyanobacterial genes for chloroplast and cytosolic isoenzymes encoded in eukaryotic chromosomes. *Eur J Biochem* 268, 2678-2686.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Laurent, T.C., Moore, E.C., and Reichard, P. (1964). Enzymatic synthesis of deoxyribonucleotides. Iv. Isolation and characterization of thioredoxin, the hydrogen donor from *Escherichia coli* b. *J Biol Chem* 239, 3436-3444.
- Leegood, R.C., and Walker, D.A. (1980). Regulation of fructose-1,6-bisphosphatase activity in intact chloroplasts. Studies of the mechanism of inactivation. *Biochim Biophys Acta* 593, 362-370.
- Lemaire, S.D., Michelet, L., Zaffagnini, M., Massot, V., and Issakidis-Bourguet, E. (2007). Thioredoxins in chloroplasts. *Curr Genet* 51, 343-365.
- Lennon, B.W., Williams, C.H., and Ludwig, M.L. (2000). Twists in catalysis: alternating conformations of *Escherichia coli* thioredoxin reductase. *Science* 289, 1190-1194.
- Levy, H.R., Vought, V.E., Yin, X., and Adams, M.J. (1996). Identification of an arginine residue in the dual coenzyme-specific glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Leuconostoc mesenteroides* that plays a key role in binding NADP<sup>+</sup> but not NAD<sup>+</sup>. *Arch Biochem Biophys* 326, 145-151.
- Leymarie, J., Vitkauskaitė, G., Hoang, H.H., Gendreau, E., Chazole, V., Meimoun, P., Corbineau, F., El-Maarouf-Bouteau, H., and Bailly, C. (2011). Role of Reactive Oxygen Species in the Regulation of Arabidopsis Seed Dormancy. *Plant Cell Physiol*.
- Li, S., Lauri, A., Ziemann, M., Busch, A., Bhave, M., and Zachgo, S. (2009). Nuclear activity of ROXY1, a glutaredoxin interacting with TGA factors, is required for petal development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 21, 429-441.



- Liu, Y., Ye, N., Liu, R., Chen, M., and Zhang, J. (2010). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mediates the regulation of ABA catabolism and GA biosynthesis in Arabidopsis seed dormancy and germination. *J Exp Bot* 61, 2979-2990.
- Livak, K.J., and Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25, 402-408.
- Marchand, C.H., Vanacker, H., Collin, V., Issakidis-Bourguet, E., Maréchal, P.L., and Decottignies, P. (2010). Thioredoxin targets in Arabidopsis roots. *Proteomics* 10, 2418-2428.
- Marx, C., Wong, J.H., and Buchanan, B.B. (2003). Thioredoxin and germinating barley: targets and protein redox changes. *Planta* 216, 454-460.
- Meimoun, P., Ambard-Bretteville, F., Colas-des Francs-Small, C., Valot, B., and Vidal, J. (2007). Analysis of plant phosphoproteins. *Anal Biochem* 371, 238-246.
- Mestres-Ortega, D., and Meyer, Y. (1999). The Arabidopsis thaliana genome encodes at least four thioredoxins m and a new prokaryotic-like thioredoxin. *Gene* 240, 307-316.
- Meyer, T., Hölscher, C., Schwöppe, C., and von Schaewen, A. (2011). Alternative targeting of Arabidopsis plastidic glucose-6-phosphate dehydrogenase G6PD1 involves cysteine-dependent interaction with G6PD4 in the cytosol. *Plant J* 66, 745-758.
- Meyer, Y., Reichheld, J.P., and Vignols, F. (2005). Thioredoxins in Arabidopsis and other plants. *Photosynth Res* 86, 419-433.
- Meyer, Y., Buchanan, B.B., Vignols, F., and Reichheld, J.P. (2009). Thioredoxins and glutaredoxins: unifying elements in redox biology. *Annu Rev Genet* 43, 335-367.
- Michelet, L., Zaffagnini, M., Massot, V., Keryer, E., Vanacker, H., Miginiac-Maslow, M., Issakidis-Bourguet, E., and Lemaire, S.D. (2006). Thioredoxins, glutaredoxins, and glutathionylation: new crosstalks to explore. *Photosynth Res* 89, 225-245.
- Michelet, L., Zaffagnini, M., Marchand, C., Collin, V., Decottignies, P., Tsan, P., Lancelin, J.M., Trost, P., Miginiac-Maslow, M., Noctor, G., and Lemaire, S.D. (2005). Glutathionylation of chloroplast thioredoxin f is a redox signaling mechanism in plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 16478-16483.
- Millar, A.A., Jacobsen, J.V., Ross, J.J., Helliwell, C.A., Poole, A.T., Scofield, G., Reid, J.B., and Gubler, F. (2006). Seed dormancy and ABA metabolism in Arabidopsis and barley: the role of ABA 8'-hydroxylase. *Plant J* 45, 942-954.





- Moon, J.C., Jang, H.H., Chae, H.B., Lee, J.R., Lee, S.Y., Jung, Y.J., Shin, M.R., Lim, H.S., Chung, W.S., Yun, D.J., and Lee, K.O. (2006). The C-type Arabidopsis thioredoxin reductase ANTR-C acts as an electron donor to 2-Cys peroxiredoxins in chloroplasts. *Biochem Biophys Res Commun* 348, 478-484.
- Navrot, N., Collin, V., Gualberto, J., Gelhaye, E., Hirasawa, M., Rey, P., Knaff, D.B., Issakidis, E., Jacquot, J.P., and Rouhier, N. (2006). Plant glutathione peroxidases are functional peroxiredoxins distributed in several subcellular compartments and regulated during biotic and abiotic stresses. *Plant Physiol* 142, 1364-1379.
- Nemoto, Y., and Sasakuma, T. (2000). Specific expression of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) gene by salt stress in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Sci* 158, 53-60.
- Née, G., Zaffagnini, M., Trost, P., and Issakidis-Bourguet, E. (2009). Redox regulation of chloroplastic glucose-6-phosphate dehydrogenase: a new role for f-type thioredoxin. *FEBS Lett* 583, 2827-2832.
- Oracz, K., El-Maarouf-Bouteau, H., Kranner, I., Bogatek, R., Corbineau, F., and Bailly, C. (2009). The mechanisms involved in seed dormancy alleviation by hydrogen cyanide unravel the role of reactive oxygen species as key factors of cellular signaling during germination. *Plant Physiol* 150, 494-505.
- Oracz, K., El-Maarouf Bouteau, H., Farrant, J.M., Cooper, K., Belghazi, M., Job, C., Job, D., Corbineau, F., and Bailly, C. (2007). ROS production and protein oxidation as a novel mechanism for seed dormancy alleviation. *Plant J* 50, 452-465.
- Pelletier, S., and Lucy, C.A. (2002). High-performance liquid chromatographic separation and indirect fluorescence detection of thiols. *J Chromatogr A* 972, 221-229.
- Pitsch, N.T., Witsch, B., and Baier, M. (2010). Comparison of the chloroplast peroxidase system in the chlorophyte *Chlamydomonas reinhardtii*, the bryophyte *Physcomitrella patens*, the lycophyte *Selaginella moellendorffii* and the seed plant *Arabidopsis thaliana*. *BMC Plant Biol* 10, 133.
- Pérez-Ruiz, J.M., Spínola, M.C., Kirchsteiger, K., Moreno, J., Sahrawy, M., and Cejudo, F.J. (2006). Rice NTRC is a high-efficiency redox system for chloroplast protection against oxidative damage. *Plant Cell* 18, 2356-2368.
- Quan, H., Fan, G., and Wang, C.-c. (1995). Independence of the Chaperone Activity of Protein Disulfide Isomerase from Its Thioredoxin-like Active Site. *Journal of Biological Chemistry* 270, 17078-17080.
- Rengasamy, A., Selvam, R., and Gnanam, A. (1981). Isolation and properties of an acid phosphatase from thylakoid membranes of *Sorghum vulgare*. *Arch Biochem Biophys* 209, 230-236.



- Reumann, S., Babujee, L., Ma, C., Wienkoop, S., Siemsen, T., Antonicelli, G.E., Rasche, N., Lüder, F., Weckwerth, W., and Jahn, O. (2007). Proteome analysis of Arabidopsis leaf peroxisomes reveals novel targeting peptides, metabolic pathways, and defense mechanisms. *Plant Cell* 19, 3170-3193.
- Rivas, S., Rougon-Cardoso, A., Smoker, M., Schauser, L., Yoshioka, H., and Jones, J.D. (2004). CITRX thioredoxin interacts with the tomato Cf-9 resistance protein and negatively regulates defence. *EMBO J* 23, 2156-2165.
- Rouhier, N., Gelhaye, E., Corbier, C., and Jacquot, J.P. (2004). Active site mutagenesis and phospholipid hydroperoxide reductase activity of poplar type II peroxiredoxin. *Physiol Plant* 120, 57-62.
- Rowland, P., Basak, A.K., Gover, S., Levy, H.R., and Adams, M.J. (1994). The three-dimensional structure of glucose 6-phosphate dehydrogenase from *Leuconostoc mesenteroides* refined at 2.0 Å resolution. *Structure* 2, 1073-1087.
- Ruuska, S.A., Girke, T., Benning, C., and Ohlrogge, J.B. (2002). Contrapuntal networks of gene expression during Arabidopsis seed filling. *Plant Cell* 14, 1191-1206.
- Sanz-Barrio, R., Millán, A.F., Carballeda, J., Corral-Martínez, P., Seguí-Simarro, J.M., and Farran, I. (2011). Chaperone-like properties of tobacco plastid thioredoxins f and m. *J Exp Bot*.
- Sasaki, Y., Kozaki, A., and Hatano, M. (1997). Link between light and fatty acid synthesis: thioredoxin-linked reductive activation of plastidic acetyl-CoA carboxylase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 11096-11101.
- Sat, B., Hazan, R., Fisher, T., Khaner, H., Glaser, G., and Engelberg-Kulka, H. (2001). Programmed cell death in *Escherichia coli*: some antibiotics can trigger mazEF lethality. *J Bacteriol* 183, 2041-2045.
- Scheibe, R., and Anderson, L.E. (1981). Dark modulation of NADP-dependent malate dehydrogenase and glucose-6-phosphate dehydrogenase in the chloroplast. *Biochim Biophys Acta* 636, 58-64.
- Schroeder, L., Christoff, M., and Levy, H.R. (1984). Glucose-6-phosphate dehydrogenase from rabbit erythrocytes. *Biochim Biophys Acta* 784, 48-52.
- Schägger, H., and von Jagow, G. (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem* 166, 368-379.
- Schürmann, P., and Buchanan, B.B. (2008). The ferredoxin/thioredoxin system of oxygenic photosynthesis. *Antioxid Redox Signal* 10, 1235-1274.
- Sergeeva, L.I., Keurentjes, J.J., Bentsink, L., Vonk, J., van der Plas, L.H., Koornneef, M., and Vreugdenhil, D. (2006). Vacuolar invertase regulates elongation of *Arabidopsis thaliana* roots as revealed by QTL and mutant analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 2994-2999.



- Serrato, A.J., Pérez-Ruiz, J.M., and Cejudo, F.J. (2002). Cloning of thioredoxin h reductase and characterization of the thioredoxin reductase-thioredoxin h system from wheat. *Biochem J* 367, 491-497.
- Silverberg, M., and Dalziel, K. (1975a). [48] 6-Phospho-d-gluconate dehydrogenase from sheep liver. In *Methods in Enzymology*, W.A. Wood, ed (Academic Press), pp. 214-220.
- Silverberg, M., and Dalziel, K. (1975b). Fluorescence studies of coenzyme binding to 6-phosphogluconate dehydrogenase. *Arch Biochem Biophys* 168, 646-651.
- Spínola, M.C., Pérez-Ruiz, J.M., Pulido, P., Kirchsteiger, K., Guinea, M., González, M., and Cejudo, F.J. (2008). NTRC new ways of using NADPH in the chloroplast. *Physiol Plant* 133, 516-524.
- Stenbaek, A., Hansson, A., Wulff, R.P., Hansson, M., Dietz, K.J., and Jensen, P.E. (2008). NADPH-dependent thioredoxin reductase and 2-Cys peroxiredoxins are needed for the protection of Mg-protoporphyrin monomethyl ester cyclase. *FEBS Lett* 582, 2773-2778.
- Studier, F.W., and Moffatt, B.A. (1986). Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol* 189, 113-130.
- Stumpp, M.T., Motohashi, K., and Hisabori, T. (1999). Chloroplast thioredoxin mutants without active-site cysteines facilitate the reduction of the regulatory disulphide bridge on the gamma-subunit of chloroplast ATP synthase. *Biochem J* 341 ( Pt 1), 157-163.
- Sundaramoorthy, R., Iulek, J., Barrett, M.P., Bidet, O., Ruda, G.F., Gilbert, I.H., and Hunter, W.N. (2007). Crystal structures of a bacterial 6-phosphogluconate dehydrogenase reveal aspects of specificity, mechanism and mode of inhibition by analogues of high-energy reaction intermediates. *FEBS J* 274, 275-286.
- Tetaud, E., Hanau, S., Wells, J.M., Le Page, R.W., Adams, M.J., Arkison, S., and Barrett, M.P. (1999). 6-Phosphogluconate dehydrogenase from *Lactococcus lactis*: a role for arginine residues in binding substrate and coenzyme. *Biochem J* 338 ( Pt 1), 55-60.
- Thompson, R.E., Spivey, H.O., and Katz, A.J. (1976). Rat liver cytoplasmic glucose-6-phosphate dehydrogenase. Steady-state kinetic properties and circular dichroism. *Biochemistry* 15, 862-867.
- Valderrama, R., Corpas, F.J., Carreras, A., Gómez-Rodríguez, M.V., Chaki, M., Pedrajas, J.R., Fernández-Ocaña, A., Del Río, L.A., and Barroso, J.B. (2006). The dehydrogenase-mediated recycling of NADPH is a key antioxidant system against salt-induced oxidative stress in olive plants. *Plant Cell Environ* 29, 1449-1459.



- Vieira Dos Santos, C., Laugier, E., Tarrago, L., Massot, V., Issakidis-Bourguet, E., Rouhier, N., and Rey, P. (2007). Specificity of thioredoxins and glutaredoxins as electron donors to two distinct classes of Arabidopsis plastidial methionine sulfoxide reductases B. *FEBS Lett* 581, 4371-4376.
- Villet, R.H., and Dalziel, K. (1969). The nature of the carbon dioxide substrate and equilibrium constant of the 6-phosphogluconate dehydrogenase reaction. *Biochem J* 115, 633-638.
- Villet, R.H., and Dalziel, K. (1972a). Studies of 6-phosphogluconate dehydrogenase from sheep liver. 1. Kinetics of the reductive carboxylation reaction. *Eur J Biochem* 27, 244-250.
- Villet, R.H., and Dalziel, K. (1972b). Studies of 6-phosphogluconate dehydrogenase from sheep liver. 2. Kinetics of the oxidative-decarboxylation reaction, coenzyme binding and analyses for metals. *Eur J Biochem* 27, 251-258.
- Wakao, S., and Benning, C. (2005). Genome-wide analysis of glucose-6-phosphate dehydrogenases in Arabidopsis. *Plant J* 41, 243-256.
- Wang, X.T., Au, S.W., Lam, V.M., and Engel, P.C. (2002). Recombinant human glucose-6-phosphate dehydrogenase. Evidence for a rapid-equilibrium random-order mechanism. *Eur J Biochem* 269, 3417-3424.
- Wenderoth, I., Scheibe, R., and von Schaewen, A. (1997). Identification of the cysteine residues involved in redox modification of plant plastidic glucose-6-phosphate dehydrogenase. *J Biol Chem* 272, 26985-26990.
- Wendt, U.K., Wenderoth, I., Tegeler, A., and Von Schaewen, A. (2000). Molecular characterization of a novel glucose-6-phosphate dehydrogenase from potato (*Solanum tuberosum* L.). *Plant J* 23, 723-733.
- Wendt, U.K., Hauschild, R., Lange, C., Pietersma, M., Wenderoth, I., and von Schaewen, A. (1999). Evidence for functional convergence of redox regulation in G6PDH isoforms of cyanobacteria and higher plants. *Plant Mol Biol* 40, 487-494.
- Whitney, S.M., von Caemmerer, S., Hudson, G.S., and Andrews, T.J. (1999). Directed mutation of the Rubisco large subunit of tobacco influences photorespiration and growth. *Plant Physiol* 121, 579-588.
- Williams, C.H., Arscott, L.D., Müller, S., Lennon, B.W., Ludwig, M.L., Wang, P.F., Veine, D.M., Becker, K., and Schirmer, R.H. (2000). Thioredoxin reductase two modes of catalysis have evolved. *Eur J Biochem* 267, 6110-6117.
- Wilma, M.F., Klazina, S.B., Jonas S.S.G, D.J., and Noorden, C.J.F.V. (2003). Post-translational Regulation of Glucose-6-phosphateDehydrogenase Activity in (Pre)neoplastic Lesions in Rat Liver. *The Journal of Histochemistry & Cytochemistry* Volume 51(1), 105-112.





**Yano, H., Wong, J.H., Cho, M.J., and Buchanan, B.B. (2001). Redox changes accompanying the degradation of seed storage proteins in germinating rice. *Plant Cell Physiol* 42, 879-883.**

**Zhou, A., Jiang, X., and Xu, X. (1997). Improved alkaline lysis method for rapid isolation of plasmid DNA. *Biotechniques* 23, 592-594.**





## Résumé

Les thioredoxines (TRX) sont des protéines ubiquistes à activité d'oxydoréductase de ponts disulfure de protéines dites « cibles ». Le génome d'*Arabidopsis thaliana* code une vingtaine de TRX canoniques dont 10 (divisées en 5 types : f, m, x, y et z) sont localisées dans les plastes. Les TRX f sont connues depuis plus de trente ans pour être des régulateurs centraux du métabolisme photosynthétique, mais les approches expérimentales récentes (protéomique, génétique inverse.) indiquent que ces protéines interviennent dans des métabolismes non photosynthétiques variés, notamment le cycle oxydatif des pentoses phosphate (COPP). Ce travail a consisté à analyser *in vitro* la capacité des TRX plastidiales à réguler les déshydrogénases du COPP qui assurent la majorité de la production de pouvoir réducteur (sous forme de NADPH) dans des conditions non-photosynthétiques. Les résultats obtenus ont été validés dans un système ferredoxine/TRX reconstitué et ont permis de proposer un modèle de régulation stricte par certaines TRX de la glucose-6-phosphate déshydrogénase chloroplastique G6PDH1 où la TRX f assure la coordination des cycles réductif (cycle de Calvin) et oxydatif des pentoses phosphate. Des approches biochimiques et biophysiques ont permis de mettre en évidence plusieurs modifications de propriétés catalytiques et structurales faisant suite à la régulation redox de G6PDH1 et d'aborder les déterminants des spécificités de régulations.

Ce travail *in vitro* a été complété par une caractérisation *in vivo* (basée sur l'utilisation de mutants perte de fonction) de l'importance des TRX y dans le contrôle de l'activité G6PDH racinaire, et les processus de germination. Les résultats obtenus suggèrent que, dans les graines, ce type de TRX interviendrait dans les processus de levée de dormance et de vieillissement *via* son interconnexion avec les mécanismes de détoxification des formes actives de l'oxygène.

Mots clefs : Thioredoxines plastidiales, glucose-6-phosphate déshydrogénase, 6-phosphogluconate déshydrogénase, signalisation oxydative.

## Summary

Thioredoxins are ubiquitous thiol-disulfide oxidoreductases on target proteins. In *Arabidopsis*, many TRX isoforms are found, especially in plastids where 10 isoforms are found and subdivided into five types (f, m, x, y and z type). The f-type TRX is known for decades as a regulator of photosynthetic metabolism, but proteomics and genetics indicate that these proteins might regulate many non photosynthetic metabolic pathways, such as the oxidative pentose phosphate pathway (OPPP).

In this work, I have examined *in vitro* the redox regulation of OPPP dehydrogenases by plastidial TRX, the OPPP being a major source of reducing power (as NADPH) in non-photosynthesizing conditions. Biochemical studies were reproduced in a reconstituted ferredoxin / TRX system, allowing to propose a new function for f-type TRX isoforms coordinating both reductive (Calvin cycle) and oxidative pentose phosphate pathways. Biochemical and biophysical approaches revealed several modifications of catalytic and structural properties accompanying the redox regulation of G6PDH1, the first dehydrogenase of the OPPP.

*In vivo* studies, using reverse genetics were developed, to analyse the possible role of y-type TRX in the control of root G6PDH activity and germination physiology. Seeds of y-type TRX mutants display an altered behaviour in dormancy and aging. The possible role of y-type TRX in the control of seed germination through their antioxidant function is discussed.

Keywords: Plastidial thioredoxins, glucose-6-phosphate dehydrogenase, 6-phosphogluconate dehydrogenase, oxidative signalling.