HAL
open science

Analyse structurale et fonctionnelle d'une protéine LEA (Late Embryogenesis Abundant) mitochondriale exprimée dans les graines de pois

Dimitri Tolleter

To cite this version:

Dimitri Tolleter. Analyse structurale et fonctionnelle d'une protéine LEA (Late Embryogenesis Abundant) mitochondriale exprimée dans les graines de pois. Biologie cellulaire. Université d'Angers, 2007. Français. NNT : . tel-00346312

HAL Id: tel-00346312

https://theses.hal.science/tel-00346312

Submitted on 11 Dec 2008

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

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

UNIVERSITE D'ANGERS
UFR SCIENCES

Année : 2007
N° d'ordre : 838

ANALYSE STRUCTURALE ET FONCTIONNELLE D'UNE PROTEINE LEA (LATE EMBRYOGENESIS ABUNDANT) MITOCHONDRIALE EXPRIMEE DANS LES GRAINES DE POIS

THESE DE DOCTORAT

Spécialité : Biologie Cellulaire et Moléculaire Végétale

Ecole Doctorale d'Angers

Présentée et soutenue publiquement, le 3 Septembre 2007, à Angers

par

Dimitri TOLLETER

Devant le jury ci-dessous

Yves Malthiery	Professeur, Université d'Angers	Président
Michel Caboche	Directeur de recherche, INRA/CNRS - URGV, Evry	Rapporteur
Jacques Bourguignon	Ingénieur CEA, CEA/CNRS/UJF/INRA, Grenoble	Rapporteur
Eva Pebay-Peyroula	Professeur, Université Joseph Fourier, Grenoble	Examinateur

Directeur de thèse : Professeur David Macherel
Co-Directrice de thèse : Docteur Marie-Hélène Avelange-Macherel

Thèse préparée au sein de l'UMR Physiologie Moléculaire des Semences
(Université d'Angers, INH, INRA)
16, boulevard Lavoisier, 49045 ANGERS CEDEX 01

UNIVERSITE D'ANGERS
UFR SCIENCES

Année : 2007
N° d'ordre : 838

ANALYSE STRUCTURALE ET FONCTIONNELLE D'UNE PROTEINE LEA (LATE EMBRYOGENESIS ABUNDANT) MITOCHONDRIALE EXPRIMEE DANS LES GRAINES DE POIS

THESE DE DOCTORAT

Spécialité : Biologie Cellulaire et Moléculaire Végétale

Ecole Doctorale d'Angers

Présentée et soutenue publiquement, le 3 Septembre 2007, à Angers

par

Dimitri TOLLETER

Devant le jury ci-dessous

Yves Malthiery	Professeur, Université d'Angers	Président
Michel Caboche	Directeur de recherche, INRA/CNRS - URGV, Evry	Rapporteur
Jacques Bourguignon	Ingénieur CEA, CEA/CNRS/UJF/INRA, Grenoble	Rapporteur
Eva Pebay-Peyroula	Professeur, Université Joseph Fourier, Grenoble	Examinateur

Directeur de thèse : Professeur David Macherel
Co-Directrice de thèse : Docteur Marie-Hélène Avelange-Macherel

Thèse préparée au sein de l'UMR Physiologie Moléculaire des Semences
(Université d'Angers, INH, INRA)
16, boulevard Lavoisier, 49045 ANGERS CEDEX 01

Je tiens à remercier très chaleureusement mes deux encadrants, David et Marie-Hélène Macherel, pour leur disponibilité, leurs conseils, leur envie de faire de la science qu'ils ont su me transmettre. Merci M-H de m'avoir supporté pendant ces trois années et de m'avoir toujours soutenu lorsque j'en avais besoin. En un mot : 本当に有難う

Merci à Madame Eva Pebay-Peyroula, à Messieurs Jacques Bourguignon, Michel Caboche et Yves Malthiery pour l'honneur qu'ils me font en acceptant de juger cette thèse.

Une pensée émue pour Johann, Julie, Claire et Fatima. Je vous rejoins au club des anciens! Aux trois jeunes, Sophie, Virginie et William, je vous souhaite d'avoir les meilleurs résultats possibles pour votre thèse. William je te laisse seul avec les deux filles. Bon courage, et n'oublie pas de protéger tes oreilles de leur bavardages..... Un petit clin d'œil à Céline et Annabelle : vos rires vont me manquer.

Un grand merci à tous les membres de l'ARES pour leurs conseils, et les discussions en tout genre que nous avons pu avoir tous ensemble dans les couloirs.

Merci à Cécile Mangavel, Catherine Passirani, Patrick Saulnier, Michel Jaquinod, Olivier Keech et Marion Dalmais pour leur aide et conseils précieux.

Vielen Dank an das ganze Team der AG Hincha des Max-Planck-Instituts in Golm. Besonders möchte ich mich herzlich bei Dr. D.K. Hincha bedanken, dem ich viel zu verdanken habe, das heilst wertvolle Beratung und Ratschläge und vor allem Geduld, was meine Englischkenntnisse angeht. Einen herzlichen Dank an Michi, die als Französisch Sprachlerin, für mich im Labor wie eine Mutter war. Herzlichen Dank auch an Marina, die mich durch ihre Lieblingsstadt Berlin führte, obwohl ich sowieso Paris immer bevorzugen werde...

Une pensée pour Hélène, Isa et Denis à qui ce sera bientôt le tour

Merci à mes parents et Chrys pour leurs soutiens particulièrement importants pendant ces trois années. Un énorme merci à JP sans qui je n'aurai jamais suivi cette voie, merci de toujours avoir répondu à mes questions et de m'avoir souvent apporté tes corrections (même si parfois elles ont été dures à entendre...)

Liste des principaux collaborateurs ayant contribué à ce travail de thèse.

Nom du (des) collaborateur(s)	**Nom du laboratoire et emplacement**	**Techniques utilisées**
Catherine Passirani Patrick Saulnier	Faculté de Pharmacie, Angers	Liposomes, Nanosizer, Calorimétrie Différentielle
Cécile Mangavel	BIA, INRA, Nantes	FTIR-ATR, Dichroïsme Circulaire, microscopie électronique (MET)
Cédric Gaillard	RIO BIBS, INRA, Nantes	Cryo-MET
Abdelhafid Bendahmane Marion Dalmais	URGV, Evry	Screening de la banque de mutants TILLING
Michel Jaquinod	IRTSV, CEA, Grenoble	Spectrométrie de masse
Lilian Jaquamet	IBS, Grenoble	Crystallographie
Dirk Hincha	MPI, Golm, Allemagne	FTIR, « leakage »
Olivier Keech	UPSC, Umea, Suède	Mitochondrie *Arabidopsis*

Sommaire..... 4
Liste des Figures 8
Liste des Tableaux 10
Liste des Encadrés 10
Liste des Abréviations 11

Introduction..... 13
Avant propos..... 14
Les mitochondries de semences..... 15
Mitochondries végétales..... 15
Particularités des mitochondries de graines 18
Les protéines LEA (Late Embryogenesis Abundant) 27
Données générales 29
Structure des protéines LEA. 33
Fonctions des protéines LEA. 37
Objectifs de la thèse..... 42

Partie 1 : Caractérisation Structurale et Fonctionnelle de la Leam..... 43
Production de la LEAM recombinante 45
Production de la LEAM dans la souche d'*Escherichia coli* BL21AI ... 45
Purification de la LEAM 45
Analyse de pureté 51
Comparaison des protéines native et recombinante 53
Modifications post-traductionnelles 55
Constance dans le profil atypique en gel 2D 57
L'analyse en spectrométrie de masse des modifications post-traductionnelles 57
Structure quaternaire de la LEAM 63
Comportement en gel filtration 63
Test d'oligomérisation par le crosslinking 63
Structure secondaire de la LEAM 67
L'avis des logiciels de bioinformatique 67
L'épreuve de la biophysique 67

Modèle structural de la LEAM 77
Modélisation tridimensionnelle 77
Analogie avec les apolipoprotéines 77
Impact des modifications post-traductionnelles sur la structure 81
Les interactions de la LEAM avec les membranes
et leurs conséquences 83
Protection des liposomes 83
Interaction avec les membranes 93
Conclusion 101

Partie 2 : Initiation de la caractérisation physiologique de la Leam 103
Introduction 105
Les surexpresseurs dans *Arabidopsis thaliana* 107
Obtention des lignées surexprimant la LEAM 107
Vérification de l'expression de la LEAM 111
Phénotypages des surexpresseurs de la LEAM
chez *Arabidopsis thaliana* 113
Mutants de pois sélectionnés par TILLING 119
La méthode du TILLING 119
TILLING sur LEAM 121
Phénotypage des mutants affectés dans la LEAM 123
Mutants d'insertion chez *Arabidopsis thaliana* 129
Choix des orthologues 129
Le choix des lignées d'insertion 129
Principe de sélection 131
Conclusion 131

Discussion et Perspectives 133

Discussion 135
Perspectives..... 147

Procédures expérimentales 149
Matériel végétal et conditions de culture..... 151
Conditions normales de culture 151
Tests de germination..... 151
Test de tolérance aux stress abiotiques 152
Surexpression de la LEAM 153
Surexpression dans *Escherichia coli* 153
Surexpression dans la levure *Saccharomyces cerevisiae* 154
Surexpression dans *Arabidopsis thaliana* 154
Production de la LEAM *in vitro* 158
Préparation d'organites 158
Préparation de mitochondries de levure 158
Préparation de mitochondries d'*Arabidopsis thaliana* 160
Purification des mitochondries de graine de pois..... 162
Intégrité et contrôle respiratoire 162
Techniques biochimiques 162
Dosage de protéines 162
Dosage des chlorophylles 162
Extraction des protéines 163
Electrophorèses de protéines 163
Immunodétection 164
Purification de la LEAM recombinante bactérienne 165
Crosslinking 167
Préparation de liposomes..... 167
Techniques de biologie moléculaire 168
Extraction d'ADN génomique..... 168
Electrophorèse d'acides nucléiques..... 168
Amplification d'ADN génomique (Polymerase Chain Reaction) 169
TILLING 169

Techniques biophysiques 170

Dichroïsme circulaire 170

FTIR-ATR 170

FTIR en transmission 171

Nanosizer 171

Calorimétrie différentielle 172

Leakage 172

Microscopie électronique 173

Spectromètrie de masse 173

Références Bibliographiques 175

Liste des figures

Figure 1 : Arbre de l'Universalité 15
Figure 2 : Représentation schématique de l'organisation de la chaîne respiratoire des mitochondries des plantes 16
Figure 3 Graines de pois germant sur la glace..... 24
Figure 3bis : Les spécificités des mitochondries de graine 26
Figure 4 : Schéma général de la purification de LEAM recombinante, produite par *E. coli*. 44
Figure 5 : Analyse du passage d'un extrait clarifié de bactéries surexprimant la LEAM sur une colonne échangeuse d'anion, la HiTrap Q HP. 46
Figure 6 : Analyse éléctrophorétique d'un extrait contenant la LEAM, après un traitement à la chaleur ou non (95°C, 10 minutes). 48
Figure 7 : Chromatographie sur colonne d'exclusion des fractions enrichies en LEAM issues d'HiTrapQ : Profil d'élution et analyse des fractions par SDS-PAGE 50
Figure 8 : Analyse par le système Experion™ de la protéine LEAM purifiée. .. 52
Figure 9 : Comparaison de LEAM provenant de mitochondries de graine de pois et de surexpression chez *E.coli*. 52
Figure 10 : Analyse électrophorétique bidimensionnelle d'un extrait de matrice mitochondriale de graines de pois (a), et de LEAM purifiée produite à partir d'une surexpression chez *E.Coli* (b). 54
Figure 11 : Profils de LEAM en 2D-PAGE. 56
Figure 12 : Positionnement des modifications post-traductionnelles affectant LEAM. 56
Figure 13 : Analyse en spectrométrie de masse de l'oxydation du tryptophane 20 de LEAM. 58
Figure 14 : Analyse en électrophorèse native PAGE de la LEAM produite chez *E.Coli*, après chauffage (95°C, 10minutes) ou non. 61
Figure 15 : Détermination du poids apparent de LEAM par chromatographie d'exclusion. 62
Figure 16 : Analyse de la structure quaternaire de LEAM par pontage chimique au glutaraldéhyde (crosslinking). 62
Figure 17 : Prédiction *in silico* de structure et d'ordonnancement de LEAM à partir de la séquence primaire en acide aminés (a.a.) de la protéine mature. . 64
Figure 18 : Analyse de la structure secondaire de la LEAM en solution. 66
Figure 19 : Spectres de la LEAM en dichroïsme circulaire réalisés à 20°C, en présence ou absence de TFE (TriFluoroEthanol). 68
Figure 20 : Spectres de LEAM en dichroïsme circulaire en présence d'une quantité croissante de SDS (Sodium dodécyl sulfate). 70
Figure 21 : Comparaison de l'effet du SDS et du TFE sur la structuration en hélice de LEAM. 70
Figure 22 : Spectre en dichroïsme circulaire de LEAM à l'état sec comparé aux spectres de la LEAM hydraté avec ou sans SDS (0,5%) et TFE (70%). .. 72
Figure 23 : Prédiction de structures secondaires à partir des données de dichroïsme circulaire. 73
Figure 24 : Spectres de la bande amide I de LEAM à l'état sec en spectroscopie FTIR. 74
Figure 25 : Modélisation en hélice α de LEAM. 76
Figure 26 : Projection axiale d'un peptide de LEAM (17 a.a.) et de Ac-18A-NH2 via le programme WinPep (Hennig 1999). 76

Figure 27 : Modèle d'interactions d'hélices amphiphiles de classe A avec des phospholipides disposées en mono ou bi-couche. 79
Figure 28 : Impact des modifications post-traductionnelles sur la structures prévisionnelles de la LEAM. 80
Figure 29 : Schéma de formation des différentes classes de liposomes : MLV (MultiLamellar Vesicles), SUV (Small Unilamellar Vesicles) et LUV (Large Unilamellar Vesicles). 82
Figure 30 : Détermination de la taille des liposomes composés de lipoid75. ... .84
Figure 31 : Protection des liposomes contre les effets de la déshydratation (visualisation par la taille). 86
Figure 32 : Protection des liposomes contre les effets de la déshydratation (visualisation par les fuites de fluorophore). 88
Figure 33 : Protection des liposomes contre les effets de la congélation (visualisation par les fuites de fluorophore). 90
Figure 34 : Interaction avec les phospholipides visualisée en DSC (Differential Scanning Calorimetry). 92
Figure 35 : Spectre commenté, obtenu en spectroscopie FTIR, de liposomes composés de POPC et mélangé à la LEAM.....94
Figure 36 : Spectre Infrarouge correspondant à la zone de vibration des phosphates asymétriques (1300-1200 cm^{-1}) des liposomes composés de POPC (240µg), séchés seuls ou en présence de 30µg de LEAM.....96
Figure 37 : Spectre Infrarouge correspondant à la zone de vibration des phosphates asymétriques (1300-1200 cm^{-1}) des liposomes composés de POPC (240µg), séchés seuls ou en présence de 30µg de ArLEA1A ou ArLEA1B ou AavLEA1 [protéine LEA du groupe 3 provenant du nématode *Aphelenchus avanae* (Browne et al. 2002 Nature)]. 98
Figure 38 : Modèle du rôle probable de la LEAM dans les mitochondries de graines. 100
Figure 39 : Carte du vecteur pFP101::LEAM. 108
Figure 40 : Schéma de sélection des *Arabidopsis thaliana* surexprimant la LEAM. 109
Figure 41 : Photographie d'une silique d'*Arabidopsis* surexprimant la GFP, et donc la LEAM, au niveau de ses graines. 110
Figure 42 : Analyse électrophorétique de la présence de la LEAM dans les feuilles d'*Arabidopsis* surexprimant la LEAM. 110
Figure 43 : Courbe de germination des semences d'*Arabidopsis thaliana* sauvage (col0), ou surexprimant la LEAM (LEAM M18 et LEAM M23) 112
Figure 44 : Effet de stress salins sur la germination des graines d'*Arabidopsis thaliana* sauvage (col0 ; WT), ou surexprimant la LEAM (M18 et M23). 112
Figure 45 : Résistance au stress froid des plants d'*Arabidopsis* surexprimant la LEAM (lignée 23).....116
Figure 46 : Schéma du principe du TILLING 118
Figure 47 : Détection de la mutation du mutant 1556 dans son pool d'ADN. ...120
Figure 47bis : Séquence nucléotidique génomique de LEAM.....120
Figure 48 : Positionnement des mutations non silencieuses affectant la *LEAM* chez les mutants issus de la collection de TILLING. 122
Figure 49 : Comparaison de la production moyenne de graines par mutants de chaque lignée. 124
Figure 50 : Détail de la production de graines par mutant.....126
Figure 51 : Projection axiale d'un peptide de AT5G44310 (17 a.a.) via le programme WinPep (Hennig 1999).....128

Figure 52 : Protocole de vérification de l'insertion du T-DNA, ainsi que de sa zygotie. 130
Figure 53 : Simulation d'insertion d'un peptide (motif répété de la LEAM) au niveau de la membrane interne mitochondriale (à l'état sec) 134
Figure 54 : Estimation de la quantité de LEAM nécessaire pour protéger la membrane interne. 136
Figure 55 : Obtention de la construction nucléotidique permettant la synthèse protéique avec le RTS 156
Figure 56 : Principe général de fonctionnement du RTS 157

Liste des Tableaux

Tableau I : Classification des protéines LEA en six groupes, et caractéristiques des superfamilles, trouvées par POPP, les composant. 28
Tableau II : Les protéines LEA non issues de plantes. 30
Tableau III : Localisation subcelllulaire de protéines LEA étudiées 32
Tableau IV : Récapitulatif de la diversité des résultats obtenus pour la caractérisation fonctionnelle des protéines LEA 36
Tableau V : Proportion des différents peptides composant la solution de LEAM purifiée 53
Tableau VI : Structuration de la LEAM sous l'effet de conditions physico-chimiques. 69
Tableau VII : Comparaison *in silico* d'éléments structuraux de protéines apparentées à la LEAM 106

Liste des encadrés

Encadré 1 : Réactions chimiques impliquées dans les modifications post-traductionnelles affectant la LEAM. 59
Encadré 2 : Deux méthodes d'investigation pour suivre l'effet des stress sur les liposomes 82
Encadré 3 : Principe du CD et de la FTIR 95
Encadré 4 : Structure chimique des phospholipides utilisés 166

Liste des abréviations

ABA	Abscisic Acid
ADNc	ADN complémentaire
AFM	Atomic Force Microscopy
ARNt	ARN de transfert
BCPIP	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-Phosphate
BSA	Bovin Serum Albumin
CaMV	Cauliflower Mosaic Virus
CF	CarboxyFluorescéine
CD	Circular Dichroism
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate hydrate
CL	Cardiolipide
CR	Coefficient respiratoire
CTAB	Cetyl TrimethylAmmonium Bromide
dNTP	Désoxynucléotides triphosphate
DPG	Diphosphatidylglycerol
DSC	Differential Scanning Calorimetry
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylene Diamine Tetraacetic Acid
EGTA	Ethylene glycol-bis(2-aminoethylether)-*N,N,N′,N′*-tetraacetic acid
EMS	Ethyl Methyl Sulfate
ES-MS	ElectroSpray Mass Spectrometry
FTIR	Fourier Transformation Infrared
FTIR	ATR Fourier Transformation Infrared-attenuated Total Reflectance
GFP	Green Fluorescent Protein
HSP	Heat Shock Protein
IDH	Isocitrate Déshydrogènase
IEF	Isoelectrofocalisation
KO	Knock-Out
LB	Luria Muriani Broth
LDL	Low Density Lipoprotein
LEA	Late Embryogenesis Abundant
LUV	Large Unilamellar Vesicle
Maldi-Tof	Matrix-Assisted Laser Desorption and Ionisation- Time Of Flight
MDH	Malate Déshydrogènase
MET	Microscopie Electronique à Transmission
MLV	MultiLamellar Vesicle
MOPS	acide 3(N-Morpholino) propanesulfonic
MS	milieu de Murashige et Skoog
NADH	Nicotinamide Adenine Dinucléotide (forme réduite)
NBT	Nitro Blue Tetrazolium
NUF	Non Folding Protein
PAGE	Polyacrylamide Gel Electrophoresis
PAR	Photosynthetically Active Radiation
PC	Phosphatidylcholine

PCR Polymerase Chain Reaction
PE Phosphatidyléthanolamine
PEG Polyethylèneglycol
Pi Point isoélectrique
PIAMT Protein-L-isoaspartyl O-methyltranferase
POPC Palmitoyl-oleyl-sn phosphatidylcholine
PMSF Phenylmethylsulfonyl fluoride
POPC 1-Palmitoyl-2-Oleoyl-*sn*-glycero-3-PhosphoCholine
QTL Quantitative Trait Locus
RFP Red Fluorescent Protein
RNAi interférence des ARNs
RTS Rapid Translation System
SDS Sodium dodécylsulfate
SOPC 1-Stearoyl-2-OleoylPhosphatidylCholine
SUV Small Unilamellar Vesicle
TEA tampon Tris Acetate EDTA
TBS Tris Buffer Saline
TE tampon Tris EDTA
TES *N*,*N*,*N'*,*N'*-Tetraethylsulfamide
TFE Trifluoroethanol
TILLING Targeting Induced Local Lesion IN Genomes
YNB Yeast Nitrogen Base

Introduction

« La clef de toutes les sciences est sans contredit le point d'interrogation ; nous devons la plupart des grandes découvertes au comment ? Et la sagesse de la vie consiste peut être à se demander à tout propos, pourquoi ? »

Honoré de Balzac

Avant propos

Le pois, *Pisum sativum*, est une légumineuse (Fabacae) d'intérêt agronomique connue depuis l'antiquité. Les premières traces écrites remontent à trois cents ans avant Jésus-Christ. Théophraste, dans son livre intitulé « Recherches sur les Plantes », décrit plusieurs espèces de la famille actuelle des Légumineuses et, notamment, le pois. Il était utilisé pour la consommation humaine et pour l'alimentation animale. Au Moyen-âge, le pois était surtout considéré comme légume sec, riche en énergie et en protéines pour l'alimentation. Puis, il fut cultivé comme légume frais. Le petit pois devint alors un légume printanier très apprécié. Suite à l'embargo des Etats-Unis d'Amérique, en 1973, sur le tourteau de soja, tous les pays de l'UE (Union Européenne) ont du faire appel à des produits de substitutions, dont le pois protéagineux. La France, qui était le premier producteur de pois de conserve, est ainsi devenue le premier pays producteur de pois protéagineux dans l'UE. Si le pois protéagineux représente en France 32% de la surface totale de plantes potagères cultivées, il ne représente que 3% des plantes de grande culture (au profit des céréales) (Source GNIS Groupement National Interprofessionnel des Semences, 2005). Plus de 75% des céréaliers européens n'introduisent aucune légumineuse à graines dans leur rotation de culture en raison, essentiellement, de l'intérêt économique sous-évalué de sa culture et de la méconnaissance des innovations variétales récentes. L'intérêt agronomique et environnemental des légumineuses est plus que jamais d'actualité dans l'optique du développement durable, comme le soulignent des propos tenus lors de la conférence du GLIP (Grain Legumes Integrated Project) du 3 Mai 2006 à Bruxelles : « Il est à la fois rentable et bon pour l'environnement d'inclure des légumineuses à graines dans les rotations culturales ». En effet, les légumineuses, en fixant l'azote atmosphérique, permettent d'économiser les apports d'engrais azotés, et elles pourraient se voir offrir de nouveaux débouchés notamment avec la production de chaleur et d'électricité par combustion, méthanisation ou fractionnement. Leur efficience énergétique élevée (leur production nécessite peu d'énergie au regard de l'énergie qu'elles contiennent) les rend très attractives dans

le contexte actuel de prise de conscience politique et sociologique du réchauffement de la planète, et du futur manque d'eau potable dans le monde.

Il est donc important de continuer à améliorer les légumineuses à graines, notamment au niveau de leurs semences. Dans cette optique, l'UMR Physiologie Moléculaire des Semences prend toute sa place au sein du pôle de compétitivité à vocation mondiale « Pôle végétal spécialisé Anjou Loire », baptisé *Végépolys*. L'objectif de notre laboratoire est d'acquérir une meilleure compréhension de la biologie des semences au cours de la germination et de la levée, en vue d'en améliorer la qualité physiologique. L'équipe MITOSTRESS, dirigée par David Macherel, se focalise sur les propriétés spécifiques des mitochondries de semences (essentiellement de pois) en relation avec la tolérance aux stress abiotiques (tels que la dessiccation et la température). Dans ce but, l'équipe cherche à caractériser la tolérance au stress des mitochondries de semences sur le plan physiologique, et à élucider les mécanismes de protection pouvant être mis en jeu.

Les mitochondries de semences

Mitochondries végétales

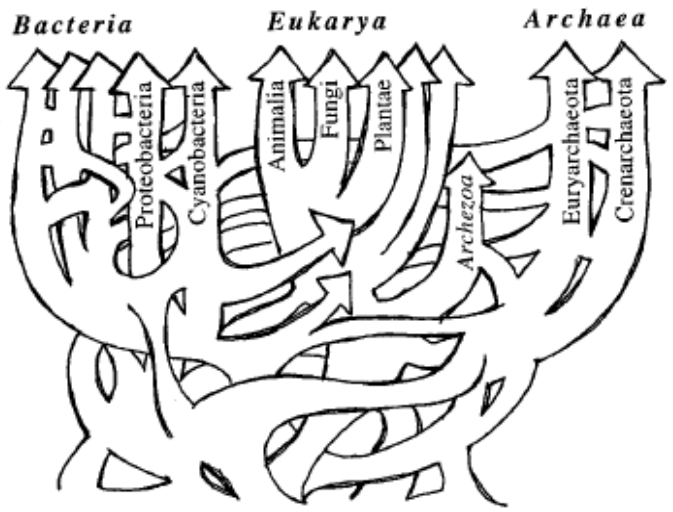


Figure 1 : Arbre de l'Universalité. D'après Doolitle (1999)

Malgré la divergence, dans l'Evolution, des animaux et des plantes (Figure 1 ; Doolittle, 1999) dont le « nœud commun » date de plus d'un milliard d'années, une grande unité au sein des mitochondries est conservée. En effet, animale ou végétale, la

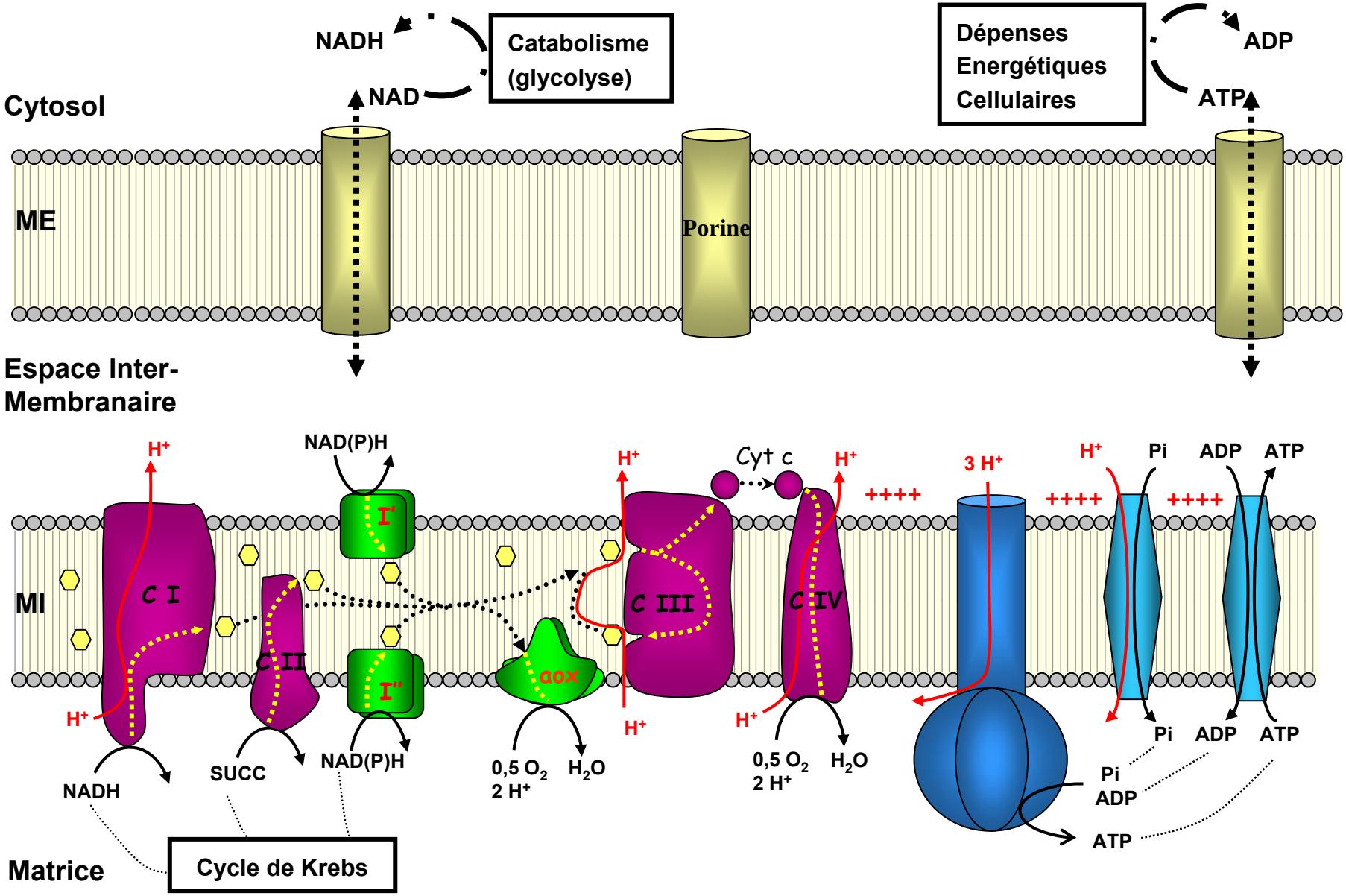


Figure 2 : Représentation schématique de l'organisation de la chaîne respiratoire des mitochondries des plantes.
On identifie les quatre complexes habituels (I, II, III, et IV ; représentés en violet) rencontrés dans toutes les mitochondries. Trois autres complexes, figurés en vert, sont propres aux organites végétaux : une NAD(P)H déshydrogénase externe (I') qui oxyde le NAD(P)H produit dans le cytosol, une NAD(P)H déshydrogénase interne (I'') qui oxyde une partie du NAD(P)H produit dans la matrice et une oxydase alternative (aox) transférant les électrons à l'oxygène en évitant les complexes III et IV. (D'après Stupnikova et al., 2006)

mitochondrie est le siège de la respiration cellulaire : en utilisant l'oxygène, elle produit de l'énergie sous forme d'ATP en oxydant des acides organiques, provenant des grandes voies métaboliques comme la glycolyse, au cours du cycle de Krebs et de la phosphorylation oxydative. La morphologie et la composition en phospholipide des mitochondries animales et végétales sont très similaires. Bien que, dans les deux cas, seulement quelques dizaines de protéines soient le fruit de l'expression de gène mitochondriaux, l'ADN mitochondrial végétal se distingue par une taille bien supérieure. Des différences importantes se situent au niveau fonctionnel, avec des particularités métaboliques propres aux mitochondries végétales, comme l'oxydation rapide du malate, de l'oxaloacetate ou de la glycine (Douce & Neuburger, 1989), ainsi que leur capacité à synthétiser des cofacteurs tels que la biotine (Baldet et al., 1997), le folate (Rébeillé et al., 1997) le lipoate (Gueguen et al., 2000) ou l'ascorbate (Siendones et al., 1999).

Un aspect particulièrement important concerne la chaîne de transfert des électrons qui est en effet plus complexe chez les végétaux, et ce à plusieurs niveaux (voir Figure 2) :

Les mitochondries de plantes possèdent, dans leur membrane interne, cinq NADH déshydrogénases : la déshydrogénase du complexe I (commune avec les animaux), et quatre NAD(P)H déshydrogénases (spécifiques des végétaux et de certains champignons) réparties sur les faces internes et externes de la membrane interne (Rasmusson et Moller, 1990). Ces déshydrogénases supplémentaires permettent en particulier l'utilisation directe du NAD(P)H extramitochondrial, ce dont les mitochondries animales sont incapables (Rustin et al. 1980).

Les mitochondries végétales ont la capacité de transférer directement les électrons du pool des ubiquinones sur l'oxygène par l'intermédiaire de l'oxydase alternative (AOX), sans passer par la voie cytochromique phosphorylante faisant intervenir le complexe cytochrome *bc1* oxydoréductase (complexe III) et la cytochrome *c* oxydase (complexe IV) (pour revue Sluse et Jarmuszkiewicz, 1998). Cette voie alternative permettrait d'évacuer une surcharge d'électrons en empêchant une sur-réduction de la voie cytochromique lorsque celle-ci est saturée, et la production de formes actives de l'oxygène (ROS) nuisibles pour la cellule. Cette dérivation des électrons ne s'accompagne pas de translocation de protons, et ne contribue donc

pas à la synthèse d'ATP. Ce handicap apparent sur le plan énergétique peut devenir un avantage, notamment en concertation avec le métabolisme photosynthétique. En effet, en situation énergétique favorable, l'AOX permet de maintenir une capacité de réoxidation de l'excès d'équivalents réduits provenant du chloroplaste, et ainsi contribue au bon déroulement de la photosynthèse (Hoefnagel et al., 1998,). Cette voie alternative semble donc avoir un rôle majeur dans l'adaptation des plantes aux conditions environnementales variables. Enfin, l'existence d'un antiport H+/K+ très actif diminue la composante ΔpH de la force proton-motrice (Δp) au profit de sa composante électrique (ΔE) qui représente ainsi pratiquement l'intégralité de la force proton-motrice (Douce et Neuburger 1989).

Particularités des mitochondries de graines

Généralité sur la tolérance à la dessiccation et la vie suspendue. Chez les semences orthodoxes, dont le pois et *Arabidopsis* font partie, la tolérance à la dessiccation (TD) est acquise pendant la phase de remplissage des graines. Il s'agit d'un phénomène multifactoriel qui repose sur au moins deux composantes qui sont, d'une part, la biosynthèse de molécules protectrices telles que les glucides non-réducteurs et les protéines de stress [LEA (Late Embryogenesis Abundant) et HSP (Heat Shock Protein) (Hoekstra et al., 2001)] , et d'autre part, la répression coordonnée du métabolisme et l'élimination de réactions néfastes engendrées par des dysfonctionnements métaboliques pendant la dessiccation (Leprince et al., 2000). Même s'il est évident que l'ABA (acide abscissique) joue un rôle majeur sur la régulation de la TD (Kermode et Bewley, 1987) les mécanismes mis en jeu sont loin d'être élucidés.

En fin de maturation, les cellules composant la graine perdent la quasi-totalité de leur eau (environ 90% de leur masse fraîche ; Vertucci et Farrant, 1995). Il en est de même pour les mitochondries, comme pour tous les compartiments de la cellule. A l'état de graine sèche, les manifestations vitales sont très réduites voire absentes : la respiration et le dégagement de chaleur ne sont pas mesurables, les échanges nutritifs nuls, il n'y a ni synthèse ni croissance (Vertucci et Leopold, 1986). Cette réduction temporaire d'activité se nomme vie latente, et son état

physiologique normal et réversible la distingue de la sénescence. Cet état est également élégamment appelé, la « vie-suspendue » (Branca et al., 1999°). La graine, qui se trouve ainsi protégée de nombreuses agressions, peut-être stockée pour de très longues périodes (demi-vie du stockage chez le pois : 97 ans; Walters et al., 2005), et pourra lorsque les conditions extérieures seront favorables retourner à la vie active. Les graines sont ainsi des organismes anhydrobiotes (capables de survivre sans eau), et cette capacité extraordinaire implique que les mitochondries puissent assurer leurs fonctions essentielles, notamment au sortir de la vie suspendue, alors que s'engage une reprise du métabolisme dans le cadre d'un nouveau programme de développement, la germination. On peut donc supposer que les mitochondries de graines possèdent des propriétés spécifiques, en relation avec la TD.

L'impact de la dessiccation sur les mitochondries de graines. Des travaux de microscopie électronique, portant sur le développement de la graine de pois, ont conclu à une régression des mitochondries lors des phases tardives de la maturation (Bain et Mercer, 1966). Cette vision a été confortée par des tentatives d'isolement de mitochondries de graines sèches (Nawa et Asahi, 1971 ; Wilson et Bonner, 1971 ; Sato et Asahi, 1975 ; Attucci et al., 1991). Néanmoins il est clair que la respiration reprend très rapidement pendant l'imbibition, indiquant la présence de mitochondries fonctionnelles (Parrish and Leopold, 1977 ; Erenshaft and Brambl, 1990 ; Benamar et al., 2003 ; Howell et al., 2006). Il est vraisemblable que la mauvaise qualité des organites isolés de graines sèches résulte des dommages provoqués par l'extraction, avec l'hydratation brutale des tissus déshydratés lors du broyage (Benamar et al. 2003). Des travaux récents ont permis de suivre, en microscopie électronique, l'augmentation importante de la taille des mitochondries après seulement 24 heures d'imbibition (Howell et al., 2006). Une réduction de la surface membranaire à l'état sec diminue certainement les risques de détérioration chimique et mécanique, mais requiert cependant une biogenèse membranaire importante lors de la germination. On peut signaler la forte abondance, dans les graines d'*Arabidopsis*, des transcrits de la cardiolipine synthase, une enzyme impliquée dans la biosynthèse du cardiolipide, un

phospholipide spécifique de la membrane interne mitochondriale (Macherel et al., 2007). Il semble également que la composition lipidique des membranes mitochondriales joue un rôle dans la TD. En effet, les membranes de mitochondries de graines sont composées de phospholipides ayant des acides gras moins insaturés, et ayant un ratio PE/PC (phosphatidylethanolamine/phosphatidylcholine) plus faible que celles des membranes mitochondriales d'épicotyle étiolés de pois, organes non résistant à la dessiccation (Stupnikova et al., 2006). Une faible proportion d'acides gras insaturatés diminue le risque de peroxidation par les ROS (Espèces activées de l'oxygène) engendrés lors de la déshydratation, et la PE est par ailleurs connue pour déstabiliser les membranes à faible teneur en eau (Van den Brink-Van der Laan et al., 2004). Il semblerait donc que la composition lipidique des membranes mitochondriales des graines soit ajustée pour répondre au mieux à la nécessité de résister à la perte d'eau.

Le paradoxe de l'oxygène. La consommation d'oxygène par les mitochondries est l'une des premières manifestations décelables lors de l'imbibition (Botha et al., 1992 ; Bewley, 1997). Contrairement aux autres organes de la plante, la graine commençant à germer est composée de tissus compacts et denses. Se pose alors le problème de l'approvisionnement en oxygène de toutes ces cellules qui ont repris une activité métabolique très importante. Il a été clairement montré par l'équipe d'Hardy Rolletschek (IPK Gatersleben) que les embryons de légumineuses et de céréales se développaient dans une atmosphère dépourvue en oxygène (conditions hypoxiques ; Rolletschek et al., 2002, 2004). Lors du développement de la graine, l'activité photosynthétique a en fait pour rôle primordial la production d'oxygène destiné au fonctionnement de la respiration mitochondriale (Borisjuk et al., 2003). Des expériences récentes ont montré que la concentration interne en dioxygène s'effondrait lors de l'imbibition sous l'action de la reprise d'activité des mitochondries (H. Rolletschek, L. Borisjuk, A. Benamar, D. Macherel, données non publiées). Lors de la germination, la respiration mitochondriale s'effectue donc dans un micro-environnement à la limite de l'anoxie. Des travaux récents suggèrent que les mitochondries ajustent, grâce à un mécanisme faisant intervenir

l'oxyde nitrique (NO), leur vitesse de fonctionnement afin de maintenir un niveau d'oxygène minimum et éviter ainsi une anoxie dangereuse pour les tissus. (Macherel D, Borisjuk L, Rolletschek H, Benamar A, publication soumise).

Les mitochondries dans les étapes précoces de la germination. S'il est actuellement impossible de déterminer l'état initial des mitochondries au début de l'imbibition, les arguments évoqués au paragraphe précédent suggèrent la présence dans les graines sèches de mitochondries capables d'assurer une production d'ATP. Néanmoins, les organites doivent nécessairement avoir subi des stress au cours de la maturation de la graine et notamment au cours du processus de dessiccation. De plus, l'entrée d'eau pendant les phases initiales de l'imbibition de la graine cause probablement des dégâts cellulaires, en particulier au niveau des membranes (pour revue, Bewley et Black, 1994). Il est vraisemblable qu'au début de la germination les mitochondries ayant maintenue une intégrité suffisante produisent l'ATP nécessaire au redémarrage du métabolisme, et notamment à la réparation des dégâts inévitablement causés par les variations de teneur hydrique. Des nombreux travaux consacrés à la caractérisation des mitochondries au cours de la germination ressort une tendance générale vers l'amélioration des propriétés fonctionnelles des mitochondries au fur et à mesure de l'imbibition (Botha et al., 1992 ; Benamar et al., 2003). Un point important concerne cependant des différences concernant la biogenèse des mitochondries lors de la germination chez différentes espèces. En effet, un ensemble de travaux analysant l'effet d'inhibiteurs de traduction a conduit Morohashi (1986) à postuler que chez les graines à réserves lipidiques, les protéines mitochondriales seraient synthétisées *de novo* pour la biogenèse de nouvelles mitochondries, tandis que chez les graines à réserves amylacées, les mitochondries pré-existantes assureraient l'intendance énergétique. Si cette hypothèse apparaît attrayante pour expliquer la nécessaire évolution du métabolisme mitochondrial en vue de l'utilisation des lipides de réserve *via* le cycle glyoxylique, elle soulève la question de l'approvisionnement énergétique indispensable dès le début de la germination, qui devrait donc être assuré par des mitochondries pré-existantes. Chez le maïs, Logan et al. (2001) ont caractérisé deux populations mitochondriales dans les embryons extraits de

caryopses. La première population est constituée de mitochondries dépourvues du cycle de Krebs, mais capable d'oxyder le NADH cytosolique. Ces mitochondries seraient les vestiges des mitochondries actives au cours de la maturation de la graine progressivement dégradées lors de l'imbibition. La seconde population consiste en des pro-mitochondries, déficientes en chaperons moléculaires (HSP 60 et 70) et en enzymes du cycle de Krebs, et qui évolueraient en mitochondries parfaitement fonctionnelles au cours de l'imbibition. L'énergie nécessaire au développement des pro-mitochondries pourrait être fournie par l'oxydation du NADH cytosolique par les deux types de mitochondries (Logan et al., 2001). La caractérisation physiologique des mitochondries de graines de pois au cours de la germination a permis de mettre en évidence leur forte capacité d'oxydation du succinate et du NADH cytosolique par rapport aux autres substrats du cycle de Krebs (Benamar et al., 2003). L'oxydation préférentielle de ces substrats pourrait sustenter une production d'ATP au cours de l'imbibition par des mitochondries préexistantes ayant subi les aléas de la dessiccation et de l'imbibition des tissus. En effet, l'oxydation de ces substrats par la membrane interne des mitochondries fait uniquement intervenir les chaînes de transfert d'électrons sans requérir la machinerie sophistiquée du cycle de Krebs qui fait appel à des complexes enzymatiques et à plusieurs cofacteurs. Les mitochondries isolées des graines de pois sont d'ailleurs appauvries en NAD endogène (Benamar et al., 2003). Une telle déficience est souvent observée dans le cas des tissus de réserve, et pourrait être liée à un contrôle métabolique impliquant le transport du NAD dans les mitochondries (Douce et Neuburger, 1989).

Le protéome particulier des mitochondries de graines. Les propriétés spécifiques des mitochondries sont susceptibles de varier d'un tissu à l'autre, ainsi qu'en fonction des conditions environnementales, afin de permettre une parfaite intégration des fonctions mitochondriales avec le métabolisme cellulaire. Un exemple frappant de cette adaptation concerne l'accumulation spectaculaire des protéines du complexe de la glycine décarboxylase dans les mitochondries de feuilles de plantes engagées dans la photorespiration (Douce et al., 2001). Afin d'appréhender de telles adaptations métaboliques, une analyse protéomique

comparative a été réalisée sur le protéome soluble des mitochondries extraites de feuilles vertes et étiolées, de racines et de graines de pois imbibées (Bardel et al., 2002). La carte protéomique des mitochondries de graine s'est distinguée par un profil très particulier, mais comportant cependant les protéines mitochondriales classiques (Bardel et al., 2002). Parmi les protéines majeures figuraient des protéines de réserve, révélant ainsi la présence de corpuscules protéiques contaminant les mitochondries purifiées, mais surtout une abondante protéine de 37 kDa pour laquelle les séquences peptidiques obtenues suggéraient qu'elle puisse faire partie de la famille des protéines LEA (voir partie suivante). Le clonage de l'ADNc correspondant et la caractérisation de la protéine ont montré qu'il s'agissait d'une protéine matricielle, la LEAM (précédemment appelée PsLEAm ; Grelet et al., 2005). Elle est fortement exprimée pendant la dernière phase de développement de la graine, en réponse au stress hydrique et sous le contrôle de l'ABA (Grelet et al., 2005). Il a été montré dans cette étude que LEAM était capable de protéger deux enzymes mitochondriales, la fumarase et la rhodanèse des effets de la dessiccation. De plus amples informations sur cette protéine seront données tout au long de ce manuscrit (pour les plus impatients, voir Tolleter et al., 2007). Les travaux de Bardel et al. (2002) ont également porté l'attention sur l'abondance de l'HSP22 dans les mitochondries de semences. L'HSP22 est une protéine mitochondriale exprimée en réponse au choc thermique (Lenne et Douce, 1994) ou au stress oxydatif (Banzet et al., 1998).

Récemment, un travail minutieux a été mené sur la biogenèse des mitochondries dans des embryons de riz en germination grâce à la combinaison de la protéomique, de l'analyse d'expression des transcrits et de la physiologie moléculaire (Howell et al., 2006). Cette étude, qui confirme la présence d'une protéine LEA mitochondriale, révèle le rôle primordial des protéines du système d'importation dès le début de la germination (Howell et al., 2006). Les protéines des complexes d'importation sont apparues remarquablement abondantes à l'état sec et se sont avérées fonctionnelles dès deux heures après le début de l'imbibition, impliquant que l'apport d'énergie est assuré par l'oxydation du NADH exogène (Howell et al., 2006). Les protéines du cycle de Krebs ne s'accumulent que dans les phases tardives de la germination (Howell et al., 2006).

Figure 3 : Graines de pois germant sur la glace.
Des graines sèches de pois ont été placées sur la glace dans une boite de polystyrène couverte, stockée à 1,5°C. La glace était changée toutes les semaines, et la photographie a été prise au bout de six semaines. Une fois transférées sur sol, ces graines ayant germées sur la glace se sont développées normalement en plantes matures. (Couverture Plant. Physiol. Vol 140 de Janvier 2006)

Ceci renforce l'idée que l'activité initiale des mitochondries de graines est supportée par l'oxydation du NADH et/ou du succinate exogène lors de l'imbibition (Logan et al., 2001 ; Benamar et al., 2003).
La connaissance des protéomes mitochondriaux des plantes modèles a fait d'énormes progrès grâce aux avancées technologiques tant au niveau moléculaire que cellulaire (Heazlewood et Millar, 2005 ; Heazlewood et al., 2005 ; Millar et al., 2005). Mais pour les mitochondries de graine il reste le problème de l'isolement des organites, qui est un écueil. Une façon indirecte d'acquérir des informations est d'analyser le protéome global des graines ou des embryons, et de d'examiner la présence de protéines potentiellement mitochondriales (Rajjou et al. 2004). Il faut ensuite, avec d'autres méthodes, démontrer la localisation subcellulaire de telle ou telle protéine d'intérêt. Cette méthode est néanmoins limitée par la faible représentativité du protéome mitochondrial au sein du protéome cellulaire.

La « cross-tolérance ». Nous avons vu précédemment que les mitochondries de graines se distinguent par l'accumulation de protéines de stress comme la protéine HSP22 et la LEAM (Bardel et al., 2002 ; Grelet et al., 2005 ; Howell et al., 2006), ainsi que par une composition membranaire particulière (Stupnikova et al., 2006). Ces éléments contribuent à la capacité des mitochondries à résister à la dessiccation. Mais la question est de savoir si l'adaptation à une telle contrainte, indispensable à la survie de l'espèce, est capable de conférer un avantage dans d'autres situations pénalisantes. Cela semble être le cas pour les mitochondries de graines de pois, qui contrairement aux mitochondries d'épicotyles (tissus non tolérant à la dessiccation), sont capables de fonctionner à des températures extrêmes de 40°C et -3,5°C (Stupnikova et al., 2006). Cette remarquable tolérance aux températures extrêmes contribue sans doute à la capacité des graines de pois à germer sur un lit de glace à 0°C (Figure 3).
Ce concept de « super-mitochondrie » capables de résister à différent stress, en particulier la dessiccation, repose sur plusieurs spécificités des mitochondries de graines, rassemblées dans la Figure 3bis. Un des éléments marquants est l'accumulation de LEAM, cette protéine matricielle appartenant à la famille des

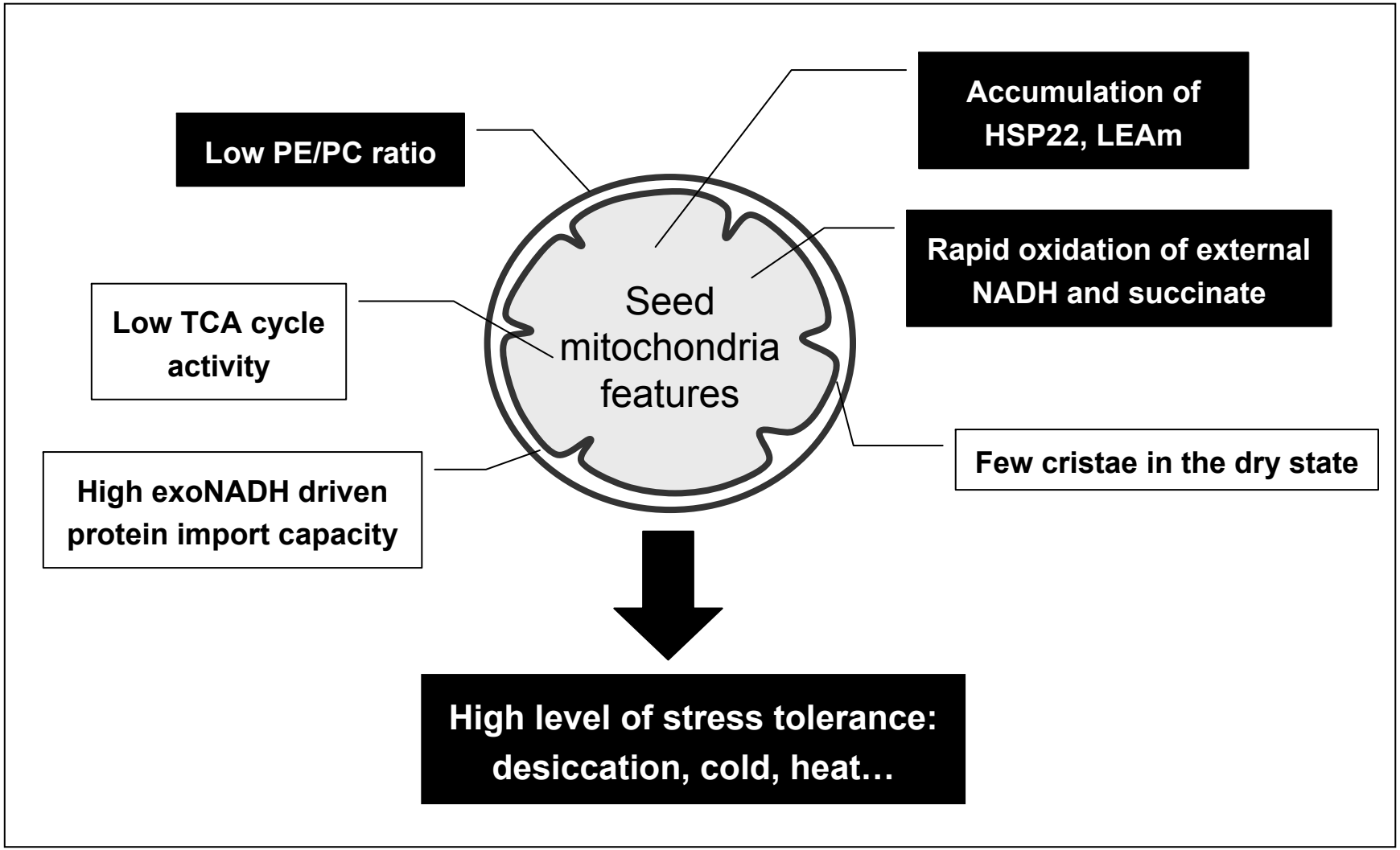


Figure 3bis : Les spécificités des mitochondries de graine.

Ce schéma résume l'ensemble des points abordés dans cette introduction. Les points relatifs à la tolérance à la dessiccation sont sur fond noir, ceux plus relatifs au métabolisme sont sur fond blanc. (D'après Macherel et al., 2007)

PE/PC, ratio phosphatidylethanolamine/phosphatidylcholine ; TCA, tricarboxylic acid cycle.

LEA. Il convient donc de préciser quelles sont les caractéristiques de cette famille de protéines, qui sont étudiée depuis plus de 20 ans, mais qui restent cependant toujours énigmatiques.

Les protéines LEA (Late Embryogenesis Abundant)

Préambule. Les premières protéines LEA ont été découvertes dans les graines de coton il y a plus de 25 ans (Dure et al. 1981). L'idée que ces protéines pouvaient représenter un ensemble a été proposée cinq années plus tard par la même équipe (Galau et al., 1986). Leurs travaux portaient sur un groupe d'ARNm (ARN messager) qui s'accumulaient fortement au cours des phases tardives de la maturation des semences de coton, et dont l'expression semblait en partie liée à l'ABA (acide abscissique). Ces ARNm se distinguaient de ceux codant pour les protéines de réserves par une expression légèrement plus tardive et surtout par leur persistance dans la graine sèche (Galau et al., 1986). La dénomination « ABA-inductible » n'a pas été retenue car il semblait déjà aux auteurs que l'expression de ces gènes pouvait être contrôlée autrement. Par la suite, le clonage et le séquençage des ADNc codant pour des protéines LEA de plusieurs espèces végétales ont commencé à mettre à jour la grande diversité des séquences protéiques (Baker et al., 1988). La première classification a été établie un an plus tard, toujours par la même équipe, en se basant sur des similarités de séquences protéiques (Dure et al. 1989). Ce bref historique de la genèse du « groupe » des protéines LEA a pour but de mettre en exergue une particularité étonnante: en effet, cet ensemble de protéines n'a pas été regroupé en fonction de critères structuraux (fibreuse ou globulaire), de composition (holoprotéine ou hétéroprotéine), de solubilité (albumine, globuline, scléroprotéine), ou de rôle biologique (enzyme, protéine régulatrice, protéine de structure, de défense, de transport, de stockage, protéine contractile ou motrice). En réalité, leur regroupement ne s'est fait sur aucun des fondements traditionnels de la classification des protéines mais plutôt sur des critères d'expression, à la manière des HSP (Heat Shock Protein) autre groupe de protéines « conjoncturelles »,

Groupe de LEA	Motif spécifique	Super-famille LEA	Pfam	POPP consensus
1	GGQTRREQLGEEGYS QMGRK	4	PF00477	+E, +G, +EG, +GG, +KG, +QE, +RK, +GGE, +KGG
1		6		+E, +G, +DE, +EG, +ES, +GG, +GQ, +RE, +RK, +ARE, +DES, +REG
2	DEYGNP (domaine Y)	1	PF0257	+G, -L, +EK, +GG, +GT, +EKL, +IKE, +KEK, +KIK, +KKG, +KLP, +LPG
2	EEKK (domaine K)	10	PF0257	-F, +G, -I, +AG, +EK, +GG, +GQ, +KE, +SS, +EKL, +GAG, +IKE, KEK, +KLP, +LPG, +SSS
2	Sn (domaine S)	3	PF0257	-F, -I, -L, -R, -W, +DK, +EK, +KK, +KL, +LP, +TH, +EKK, +KEK, +KLP, +LPG
3	TAQAAKEKAGE	2	PF02987	+A, -C, +E, -F, -I, +K, -L, -P, +AE, +AK, +EK, +ET, +GE, +GK, +KE, +AAE, +AKD, +EKA
3		5	PF02987	+A, -I, +K, -L, -P, +Q, +T, -V, +AA, +AQ, +EK, +KE, +KT, +QA, +QQ, +QS, +QT, +TQ, +AAK, +AQA, +EKT, +QAA, +TQQ
4		(299)	PF03760	+D, -R, +AS, +IP, +KV, +VS, +TIP
5		(297)	PF03242	+A, +R, +S, +AM, +GA, +GY, +RP, +SF, +SS, +YS
6		7	PF04927	+A, -F, -L, +AA, +AE, +MQ, +QS, +VA, +AAA, +GVA, +QSA, +SAA

Tableau I : Classification des protéines LEA en six groupes, et caractéristiques des superfamilles, trouvées par POPP, les composant.
Le POPP (Protein or Oligonucleotide Probability Profile) consensus est donné pour chacune des superfamilles. Un '+' indique une surreprésentation significative d'un peptide, un '-' une sous-représentation significative. La famille Pfam correspondante est précisée dans chaque cas (Bateman et al., 2000), ainsi que le motif consensus spécifique s'il existe. (D'après Wise, 2003 et Wise et Tunnacliffe, 2004)

associées sur la base de leur expression en réponse au choc thermique (pour revue Lindquist, 1986). Ce n'est qu'une vingtaine à une trentaine d'année après leur découverte que le rôle majeur de chaperonne moléculaire des HSP a émergé (Ellis et Vandervies, 1991 ; Gething et Sambrook, 1992). Rien pour l'instant ne laisse présager une telle unité de fonction pour les LEA, même si certains rôles commencent à se détacher, comme nous le verrons ultérieurement.

Données Générales

Caractéristiques et classification des protéines LEA. Comme nous l'avons précédemment énoncé, les protéines LEA n'ont pas une unité structurale ou fonctionnelle définie. Le challenge de leur classification a donc été de leur trouver des caractéristiques communes, basées sur l'étude de la séquence protéique, en l'absence de caractérisation fonctionnelle. Afin d'ordonner l'ensemble de ce groupe comportant de très nombreux membres (plus de 50 gènes chez *Arabidopsis thaliana* ; Hundertmark et Hincha, 2007), il a été tenté à maintes reprises de les regrouper en familles (très forte connexion évolutive, grande similarité de séquences, de l'ordre de 30%) et superfamilles (origine évolutive commune mais lointaine, similarité de séquences faibles, mais avec certaines caractéristiques remarquables semblables). La première classification de Dure (Dure et al., 1989) a été complétée et modifiée de nombreuse fois (Bray, 1993 ; Dure, 1993 ; Cuming, 1999). Il n'y a malheureusement pas eu de réel consensus sur ces évolutions, entrainant des affectations différentes pour certaines protéines (Wise, 2003). Par une analyse bioinformatique et statistique (POPP : Proteine or Oligonucleotide Propability Profile), Michael Wise a proposé une nouvelle classification (Wise 2003). Cette classification, découpant les protéines LEA en six grandes classes (Tableau I), se rapproche du découpage réalisé par Bateman et al. (2000, 2004) dans la base de donnée Pfam (Protéin families database ; basé sur le regroupement de protéines au sein de familles par homologies de séquences de domaine). Les trois premiers groupes rassemblent la majorité des protéines, les groupes 4, 5 et 6 étant minoritaires.

(Remarque : le nom vernaculaire de déhydrine est donné essentiellement pour des protéines du deuxième groupe).

Groupe de LEA	ID SwissProt	Expr	Espèces
Procaryotes			
1	GSIB_BACSU	?	*Bacillus subtilis*
3	Q3EHT1_ACTSC	?	*Actinobacillus succinogenes*
3	UB72_DEIRA	D	*Deinococcus radiodurans*
3	Q3XWV0_ENTFC	?	*Enterococcus faecium*
3	Q39ZB1_GEOMG	?	*Geobacter metallireducens*
3	Y1339_HAEIN	?	*Haemophilus influenzae*
3	Q11Z91_POLSJ	?	*Polaromonas sp.*
3	Q2LPL8_SYNAS	?	*Syntrophus aciditrophicus*
Eucaryotes			
3	LEA1_APHAV	D	*Aphelenchus avenae*
3	AfrLEA1	D	*Artemia franciscana*
3	AfrLEA2	D	*Artemia franciscana*
3	Q61VH9_CAEBR	?	*Caenorhabditis briggsae*
3	O16527_CAEEL	D	*Caenorhabditis elegans*
3	Q19790_CAEEL	?	*Caenorhabditis elegans*
3	Q54VG7_DICDI	?	*Dictyostelium discoideum*
3	Q8SVY9_ENCCU	?	*Encephalitozoon cuniculi*
3	Q1XI26_9DIPT	D	*Polypedilum vanderplanki*
3	Q1XI25_9DIPT	D	*Polypedilum vanderplanki*
3	Q1XI24_9DIPT	D	*Polypedilum vanderplanki*
3	ArLEA1A*	D	*Adineta ricciae*
3	ArLEA1B*	D	*Adineta ricciae*
4**	RAB28_HUMAN	?	*Homo sapiens*

Tableau II : Les protéines LEA non issues de plantes.
La colonne Expr indique si le gène codant pour la protéine LEA correspondant est induit (D) dans des conditions de dessiccation. (modifié d'après Tunnacliffe et Wise, 2007)
* protéine non encore référencée dans SwissProt (voir Pouchkina et al., soumis)
** par homologie avec RAB28 de maïs

Une caractéristique commune à l'ensemble des protéines LEA est la faible représentation, voire l'absence, des résidus cystéine et tryptophane. En revanche les protéines LEA sont caractérisées par un enrichissement en acides aminés (a.a.) chargés (R, D, E, H et K) ainsi qu'en acides aminés polaires (R, N, D, E, Q, H, K, S et T). De cette composition particulière résulte une forte hydrophilicité partagée par toutes les protéines LEA. Il ne faut cependant pas les assimiler avec le groupe des hydrophilines (Garay-Arroyo, 2000), même si de très nombreuses protéines LEA ont été classées comme telles par ces auteurs. En effet, les hydrophilines se caractérisent par une abondance de résidus glycine (G) ce qui n'est pas le cas de toutes les protéines LEA, et il existe très clairement des hydrophilines qui ne sont pas des LEA. Les deux groupes se chevauchent donc, mais ne sont pas identiques. La signification de l'adhésion à l'un et/ou l'autre de ces deux groupes reste à élucider.

Les protéines LEA, qui sont très hydrophiles, restent solubles après un chauffage à 95°C pendant 10 minutes. L'agrégation induite par le chauffage étant due à la dénaturation des protéines et à l'exposition des domaines hydrophobes en résultant, les protéines LEA qui ne comptent peu ou pas de domaine hydrophobe, ne s'agrègent pas. Cette propriété a été exploitée pour la purification de certaines protéines LEA (Jepson et Close, 1995 ; Svensson et al., 2000 ; Tolleter et al., 2007).

Comme nous l'avons vu, la caractéristique unitaire des protéines LEA est, chez les plantes, leur accumulation lors des phases tardives de la maturation de la graine (d'où leur appellation). Outre cette expression liée au développement, des stress environnementaux (froid, forte concentration saline, dessiccation) ou la présence d'ABA sont capables de ré-induire l'expression de nombreuses protéines LEA (Wise, 2003).

Cette définition canonique ne peut être la règle pour toutes les protéines LEA, car elles ne sont pas spécifiques des plantes (Tableau II). A titre d'exemple, AavLEA1 du nématode anhydrobiote *Aphelenchus avenae*, une protéine LEA du groupe 3, est surexprimée en cas de dessiccation ou de stress osmotique, mais pas lors de stress thermique ou oxydant (Browne et al., 2002, 2004). Chez le rotifère bdelloïde *Adineta ricciae* tolérant à la dessiccation, deux allèles d'un même gène

ID SwissProt	Groupe LEA	Espèces	Localisation subcellulaire	Référence
DHN1_MAIZE	2	*Zea Mays* (maïs)	Nuc/cyt	Goday et al. 1994
ERD14_ARATH	2	*Arabidopsis thaliana*	Clp/Per	SUBA At1g76180
DHR18_ARATH	2	*Arabidopsis thaliana*	Nuc/cyt	Nylander et al. 2001
COR47_ARATH	2	*Arabidopsis thaliana*	Nuc/cyt	SUBA At1g20440
Q9ZR21_CITUN	2	*Citrus unshiu*(citron)	Mit[a]	Hara et al. 2003
TAS14_SOLLC	2	*Solanum lycopersicum* (tomate)	Nuc/cyt	Godoy et al. 1994
DHR21_ORYSA	2	*Oryza sativa* (riz)	Cyt	Mundy and Chua 1988
CS120_WHEAT	2	*Triticum aestivum* (blé)	Nuc/cyt	Houde et al. 1995
CO410_WHEAT	2	*Triticum aestivum* (blé)	PlMem	Danyluk et al. 1998
VCaB45b[b]	2	*Apium gravolens* (céleri)	Vac	Heyen et al. 2002
LEA13_GOSHI	2	*Gossypium hirsutum* (cotton)	Cyt	Roberts et al. 1993
LEAD7_GOSHI	3	*Gossypium hirsutum* (cotton)	Clp	Roberts et al. 1993
Q06540_WHEAT	3	*Triticum aestivum* (blé)	Clp	NDong et al. 2002
Q8S385_SECCE	3	*Secale cereale* (seigle)	Clp	NDong et al. 2002
DRPF_CRAPL	3	*Craterostigma plantagineum* (plante de resurrection)	Clp	Iturriaga et al. 1992
Q42512_ARATH	3	*Arabidopsis thaliana*	Clp	Lin and Thomashow 1992b
LEAD8_DAUCA	3	*Daucus carota* (carotte)	Cyt	Franz et al. 1989
Q39873_SOYBN	3	*Glycine max* (soja)	ER	Hsing et al. 1995
LEA1_HORVU	3	*Hordeum vulgare* (orge)	CPV/Cyt	Marttila et al. 1996
Q93Y63_9ROSA	3	*Morus bombycis* (mûrier)	ER	Ukaji et al. 2001
Q41060_PEA	3	*Pisum sativum* (pois)	Cyt	Alban et al. 2000
Q5NJL5_PEA	3	*Pisum sativum* (pois)	Mit	Grelet et al. 2005
LEA1_APHAV	3	*Aphelenchus avenae* (nematode)	Cyt	Goyal et al. 2005b
MtPM25[c]	6	*Medicago truncatula*	Nuc/cyt	Buitink, comm. personnelle

Tableau III : Localisation subcellulaire de protéines LEA étudiées.
Il s'agit de localisation déterminée expérimentalement, et non grâce à des logiciels de prédictions d'adressage.
Clp : chloroplaste, Per : peroxisome, Nuc : noyau, Cyt : cytoplasme, Mit : mitochondrie, PlMem : membrane plasmique, ER : reticulum endoplasmique (sécrétion), CPV : Corps protéines vacuolaires, Vac : vacuole. Les résultats produits par SUBA (Heazlewood et al., 2006) sont issus de localisation par protéine fusion avec la GFP, et de fractionnement cellulaire suivi d'identification des protéines par spectrométrie de masse. (d'après Tunnacliffe et Wise, 2007)
[a] étude réalisée sur du tabac transgénique
[b] séquence disponible dans Heyen et al. (2002)
[c] Sequence disponible dans Boudet et al. (2006)

Ar-lea-1 codent pour des protéines LEA ayant des fonctions différentes, l'une interagissant avec les membranes, et l'autre protégeant des protéines de l'agrégation, lors de la dessiccation (Pouchkina et al., soumis).

Localisation subcellulaire. Les protéines LEA sont apparemment présentes dans beaucoup de compartiments cellulaires (Tableau III). Le rôle de ces protéines étant certainement lié à la TD, il semble logique que la plupart des compartiments de la cellule requière leur présence. La protéine Q5NJL5_PEA (LEAM) est la première protéine LEA dont la localisation dans la matrice mitochondriale a été démontrée (Grelet et al., 2005). On peut également signaler la localisation nucléaire de MtPM25, protéine LEA du groupe 6, découverte chez *Medicago Truncatula,* et susceptible de modifier la dynamique conformationnelle de l'ADN ou de la chromatine pendant la dessiccation (Boudet et al., 2006 ; Buitink J., communication personnelle).

Structure des protéines LEA.

« Natively Unfolded protein ». Etant donné la diversité des protéines LEA, il est difficile de définir une structure type. Il est cependant possible de faire ressortir certains éléments : pour les représentants des trois groupes majoritaires de protéines LEA (1, 2 et 3), l'absence de structure en solution semble systématique. Cette observation fait suite à un ensemble d'études en dichroïsme circulaire dans l'UV-lointain sur la structure secondaire des protéines LEA en solution. C'est par exemple le cas de la protéine p11 du pois (LEA du groupe 1) qui est non structurée à 98% (Russouw et al. 1995) ou de la protéine Em de blé (*Triticum aestivum*), également du groupe 1, qui présente 70% de « pelotes statistiques non périodique » (« random coil ») (McCubbin et al., 1985). Il en est de même pour protéine EMB-1 de carotte (*Daucus carota*), qui ne présente aucune structure secondaire ou tertiaire lorsqu'elle est analysée en RMN du proton (Eom et al. 1996). De même les études en spectroscopie FTIR sur la protéine MtEm6 (*Medicago truncatula*, groupe 1) montrent que plus de la moitié de la séquence polypeptidique est non structurée (Boudet et al. 2006). Il en va de même pour les représentants du groupe 2, comme par exemples des protéines LEA provenant du

maïs (*Zea maïs*), de la plante de résurrection (*Craterostigma plantagineum*), du niébé (*Vigna unguiculata*), du citronnier (*Citrus*) et d'*Arabidopsis* qui sont toutes non structurées en solution (Ceccardi et al. 1994 ; Lisse et al., 1996 ; Ismail et al., 1999 ; Hara et al., 2001 ; Mouillon et al., 2006). Le même constat est fait pour plusieurs protéines du groupe 3 (Wolkers et al., 2001 ; Goyal et al., 2003). De ce fait, elles font parties, pour la plupart, des protéines « natively unfolded » (Tunnacliffe et Wise, 2007). Le cas de ces protéines, longtemps ignorées et remettant en cause le dogme « une structure ⇔ une fonction » sera discuté dans la dernière partie de ce manuscrit.

Une structuration sous condition. Les prédictions de structure secondaire suggèrent pourtant que les protéines LEA de la classe 3 forment de nombreuses hélices α alors que les protéines de la classe 1 et 2 seraient moins structurées (Wise et Tunnacliffe, 2004). Il semblerait en fait que les protéines LEA puissent changer de structure tridimensionnelle dans certaines conditions de stress. Ainsi la protéine rGmD-19 de soja (*Glycine max* ; classe 1) est essentiellement non structurée à 10°C alors qu'à 80°C elle adopte une structure en hélices α (Soulages et al., 2002). A 80°C, la protéine rGmDHN1, une déhydrine de soja, adopte une conformation particulière d'hélices polyproline de type II (Soulages et al., 2003). Le stress thermique ne semble pas le seul facteur capable d'induire un changement de conformation des protéines LEA. En effet, une protéine issue du pollen de quenouille (*Typha latifolia*) et présentant des similarités de séquence avec les protéines LEA de la classe 3 forme des hélices α après un séchage rapide (Wolkers et al., 2001). Ismail et al. (1999) ont démontré qu'une déhydrine (classe 2) d'asperge (*Asparagus officinalis*) peut adopter une conformation en hélices α en présence de SDS, suggérant un éventuel rôle dans la stabilisation des protéines et des membranes. Ces transitions de structure se retrouvent chez des protéines LEA d'autres règnes, comme dans le cas de la protéine Aav-LEA1 (protéine proche de la classe 3) du nématode *Aphelenchus avenae* qui arbore en condition native une conformation non structurée tandis qu'après séchage cette protéine comporte de nombreuses hélices α (Goyal et al., 2003). La protéine Aav-LEA1 semble aussi avoir pour particularité de former des structures coiled-coil. Goyal et al. (2003)

ont proposé que ces structures puissent former des filaments servant alors à augmenter la résistance des cellules aux pressions physiques imposées lors de la dessiccation. L'éventuelle formation de structures coiled-coil par les protéines LEA a également émergée au travers d'une analyse bioinformatique de la famille des protéines LEA (Wise et Tunnacliffe, 2004).

Le cas particulier des protéines des groupes 4, 5, 6. Contrairement à celles des groupes majeurs, les protéines LEA des groupes minoritaires 4, 5 et 6 comportent une moindre proportion de résidus polaires, ce qui à pour conséquence une plus grande hydrophobicité, et elles sont en général plutôt structurées, même en solution. C'est par exemple le cas de la protéine Lea14 (groupe 4 d'*Arabidopsis thaliana*, dont la structure, à savoir une hélice α et deux feuillets β antiparallèles, a été déterminée par RMN (Résonance Magnétique Nucléaire) (PDB entry 1xo8 ; Singh et al. 2005). L'analyse de la structure secondaire à l'état hydraté, mesuré par spectroscopie FTIR (Fourrier Transformation InfraRed), montre que la protéine MtPM25 (groupe 6) de *Medicago truncatula* présente un pourcentage significatif d'hélices α (33%) et de feuillet β (18%) (Boudet et al., 2006). De façon intéressante, un séchage lent induit une structuration majoritairement en hélice α (56%) mais également, ce qui est rarement décrit dans la littérature, une augmentation de la proportion de feuillet β (25%) (Boudet et al., 2006).
Une telle divergence des propriétés physico-chimiques entre les protéines des groupes 4, 5 et 6 d'une part, et les protéines des groupes majoritaires 1, 2 et 3 d'autre part, a conduit Tunnacliffe et Wise (2007) à réexaminer la pertinence du classement des protéines des groupes 4, 5 et 6 avec les protéines LEA. Ils se sont basés sur l'analyse par FOLDINDEX (Prilusky et al., 2005), de la probabilité pour les protéines d'acquérir une structure secondaire, pratiquement nulle pour les protéines du groupe 1, 2 et 3. Cette probabilité est en revanche forte pour les protéines canoniques des groupes minoritaires. Ces résultats, ainsi que leur plus forte hydrophobicité et leurs caractéristiques de séquences particulières (voir tableau I) indiquent que les protéines des groupes minoritaires ne présentent pas les caractéristiques majeures des trois groupes majoritaires. Donc, à l'exception de leur expression pendant la phase tardive du développement de la graine, ces

Nom de la protéine LEA	Organisme et/ou tissu sources	Mét hode	Organisme ou protéine cible	Résultats obtenus	Référence
HIC6	Chlorelle	S	levure	Augmentation de la tolérance au gel	Honjoh et al., 1999
HVA1	Orge	S	riz	Augmentation de la tolérance au déficit hydrique et au stress salin	Xu et al., 1996
LE25	Tomate	S	levure	Augmentation de la tolérance au gel et au stress salin	Imai et al., 1996
Em	Blé	S	levure	Meilleure tolérance au stress osmotique et salin	Swire-Clark et Marcotte, 1999
CuCOR19	Citron	S	tabac	Augmente la tolérance au froid	Hara et al., 2003
CuCOR19	Citron	IV	lipides	Inhibe peroxydation	Hara et al., 2003
gène *DR1172* (homologue de *LEA76)*	*Deinococcus radiodurans*	KO	*Deinococcus radiodurans*	Sensibilité au séchage accrue	Battista et al., 2001
HVA1, le4 et le25	Orge, Tomate	S	levure	Augmentation de la tolérance au stress salin et à au gel	Zhang et al., 2000
Déhydrines	Apex de bouleau acclimaté au froid	IV	α-amylase	Augmentation de l'activité après 90 min à 4°C	Rinne et al., 1999
P-80 et Dhn5	Orge	IV	lactate déshydrogénase (LDH)	Augmentation de l'activité après 5 cycles de congélations/décongélations (C/D)	Bravo et al., 2003
PCA60	Prunier	IV	LDH	Augmentation de l'activité après 9 cycles de C/D	Wisniewski et al., 1999
HIC6 et HIC12	Chlorelle	IV	Test de protection *in vitro* de la LDH	Augmentation de l'activité après 24 h à -20°C	Honjoh et al., 2000
VcaB45	Céleri	IV	Liaison aux ions et phosphorylation	Activité de liaison au calcium améliorée lorsque la protéine est phosphorylée	Heyen et al., 2002
ITP (Iron Transport Protein)	Ricin	IV	liaison aux ions	Liaison aux ions Fe^{3+} *in vitro* ; activité de transport dans le phloème de cet ion *in vivo*	Krüger et al., 2002
ERD14	*Arabidopsis*	IV	liaison aux ions et de phosphorylation	Activité de liaison à plusieurs ions qui est améliorée lorsque la protéine est phosphorylée	Alsheikh et al., 2003
DHN1	Maïs	IV	liaison à des liposomes	Liaison de la protéine à des liposomes formés par des phospholipides acides	Koag et al., 2003
HVA1	Orge	S	Riz-Blé	Augmentation de la tolérance à la dessiccation (TD)	Xu et al., 1996 Sivamani et al., 2000
PMA80 PMA1959	Blé	S	Riz	Augmentation de la TD	Cheng et al., 2002
CuCor19	Citron	S	Tabac	Augmentation tolérance au froid	Hara et al., 2003
WCS19	Blé	S	Tabac	Augmentation tolérance au gel	NDong et al., 2002
COR15A	*Arabidopsis*	S	*Arabidopsis*	Augmentation tolérance au gel	Artus et al., 1996
RAB18 + COR47	*Arabidopsis*	S	*Arabidopsis*	Augmentation tolérance au gel	Puhakainen et al., 2004
XERO2 + ERD10	*Arabidopsis*	S	*Arabidopsis*	Augmentation tolérance au gel	Puhakainen et al., 2004
WCOR410	Blé	S	Feuilles de fraisier	Augmentation tolérance au gel	Houde et al., 2004
EM6	*Arabidopsis*	KO	*Arabidopsis*	Protéine indispensable au bon developpement de la graine	Manfre et al., 2006

Tableau IV : Recapitulatif de la diversité des résultats obtenus pour la caractérisation fonctionnelle des protéines LEA.

S ; surexpression ; IV : *in vitro* ; KO : mutant supprimant la présence de la protéine

protéines ne semblent pas avoir leur place, en l'état actuel des connaissances, parmi les protéines LEA. Ceci n'étant pour l'instant qu'une hypothèse, nous continuerons cependant à les assimiler à des protéines LEA dans la suite de ce rapport.

Fonctions des protéines LEA.

Un rôle protecteur des protéines LEA a été mis en évidence par des études *in vitro* sur des enzymes ou liposomes ou *in vivo* par des approches de transgenèse sur des bactéries, levures et plantes. Un aperçu de la diversité de ces travaux est proposé dans le Tableau IV.

Analyses in vitro. Les résultats montrent que des formes recombinantes de protéines appartenant aux groupes 1 à 4 sont capables de protéger les activités enzymatiques de certaines enzymes des effets de la déshydratation ou de la congélation. Une stabilisation de la lactate déshydrogénase et de la malate déshydrogénase pendant un stress froid et/ou un stress hydrique a été rapportée pour des protéines LEA provenant du citronnier (*Citrus unshiu*) (Hara et al., 2001 ; Sanchez-Ballesta et al., 2004), de la chlorelle (*Chlorella*) (Honjoh et al., 2000), de l'orge (*Hordeum vulgare*) (Bravo et al., 2003), d'*Arabidopsis* et de *Craterostigma plantagineum* (Reyes et al., 2005 ; Lin et al., 1992). Grelet et al. (2005) ont montré que la protéine LEA mitochondriale du pois, LEAM, empêchait partiellement l'inactivation, après déshydratation, de deux enzymes mitochondriales, la fumarase et la rhodanèse. Les déhydrines semblent également intervenir à des niveaux d'hydratation intermédiaire. Ainsi, l'activité α-amylase soumise à un faible potentiel hydrique, est augmentée par la présence d'une déhydrine de bouleau (*Betula pubescens* ; Rinne et al., 1999). Diverses protéines LEA sont également capables de protéger des enzymes contre le gel. Par exemple, la déhydrine PCA60 de prunier et les 'cold-induced dehydrins', P-80 et Dhn5 d'orge, ont montré une activité cryoprotectrice sur la lactate déshydrogénase après respectivement neuf et cinq cycles de congélation/décongélation (Wisniewski et al., 1999 ; Bravo et al., 2003).

Il n'est pas encore clairement établi que les protéines LEA puissent protéger les membranes des effets de la dessiccation. Koag et al. (2003) ont montré qu'une déhydrine DHN1 de maïs interagissait faiblement *in vitro* avec des liposomes formés de phospholipides acides. Un éventuel effet protecteur des liposomes n'a cependant pas été testé dans ces travaux. Cependant, cette interaction n'a pas été confirmée par Soulages *et al.* (2003) avec une approche différente, se focalisant sur les transitions de structure de la protéine. De manière similaire, les protéines LEA du groupe 1 ne semblent pas interagir avec des phospholipides de liposomes unilamellaires (Soulages et al., 2002). En revanche, une petite protéine LEA-like de levure (HSP-12 ; groupe 6) est capable de protéger l'intégrité membranaire de liposomes contre la dessiccation lorsqu'elle est 15 fois plus abondante en masse que les lipides (Sales et al., 2000). Sa localisation au niveau du plasmalemme a été observée par immunomarquage (Sales et al., 2000).

Le mode d'action des protéines LEA comme agent protecteur au niveau moléculaire est largement basé sur des hypothèses plutôt que sur des faits expérimentaux. En comparant les propriétés hydrodynamiques de protéines cellulaires telles que la BSA, la myosine ou la β-caséine, McCubbin et al. (1985) ont montré que la protéine Em (groupe 1) possède un potentiel d'hydratation beaucoup plus élevé. Pour la AavLEA1 (groupe 3), il a été calculé que la protéine contiendrait 20 fois plus d'eau associée qu'une protéine globulaire de taille équivalente (Goyal et al., 2003). Boudet et al. (2006) ont montré que MtPM25 était également capable de retenir plus d'eau (3 fois) qu'une protéine globulaire de taille équivalente. La structuration en hélices-α amphiphiles (Cuming, 1999) ou de type polyproline II (Soulages et al., 2002) permettrait aux protéines LEA des groupes 1, 2 et 3 d'organiser les molécules de solvant en cas de déficit hydrique ou d'augmentation en sels dans la solution. Dès lors, il a été suggéré que les protéines LEA seraient capables de maintenir la structure des macromolécules en maintenant un niveau d'hydratation minimale autour de celles-ci, empêchant ainsi leur dénaturation ou leur changement de conformation (hypothèse de l'exclusion préférentielle, Hoekstra et al., 2001). De plus, à des teneurs en eau très faibles, elles pourraient agir comme les glucides non réducteurs selon l'hypothèse du remplacement de l'eau (Hoekstra et al., 2001). En effet ces glucides sont capables

grâce à leurs hydroxyles de se substituer à l'eau lors de la dessiccation, et d'établir des interactions avec les phospholipides (principalement au niveau de leur tête polaire), qui préviennent ainsi la transition de la phase liquide-cristal à la phase gel rigide de la membrane induite par le dessèchement (Crowe et al., 1997). Cependant, la possibilité pour les protéines LEA d'empêcher cette transition délétère n'a pas encore fait l'objet d'une validation expérimentale. En revanche, il a été démontré que des protéines LEA contrecarrent les effets hydrophobes qui, en augmentant pendant le retrait de l'eau, induisent la perte de conformation et d'activité enzymatique (Reyes et al., 2005). Par ailleurs, les protéines LEA pourraient également jouer un rôle de chaperonne (Goyal et al., 2005). Ceci a été démontré *in vitro* sur la citrate synthase, une enzyme formant un dimère qui s'agrège lors d'un choc thermique ou après déshydratation (Goyal et al., 2005). La présence des protéines Em du blé ou AavLEA1 du nématode *A. Avenae* réduit fortement l'agrégation de l'enzyme qui survient normalement après plusieurs cycles de déshydratation et réhydratation. Par contre, ces deux protéines LEA n'empêchent pas l'inactivation enzymatique suite à une agrégation induite après traitement à 40°C. Il semblerait donc que le mode d'action de chaperonne soit différent de celui des HSP (Goyal et al., 2005).

Certaines protéines LEA peuvent également diminuer les effets toxiques des ions lors de stress salins. Cela a bien été démontré expérimentalement *in vitro* pour toutes les déhydrines acides (Alsheikh et al., 2005) et annoncé par modélisation *in silico* pour les protéines LEA du groupe 3. Par exemple, la VcaB45, une déhydrine vacuolaire du céléri et la ERD14, une déhydrine d'*A. thaliana* séquestrent *in vitro* les ions Ca^{2+} et Fe^{2+} (Heyen et al., 2002 ; Alsheikh et al., 2003). Dans les deux cas, la complexation des ions est régulée par l'état de phosphorylation de la protéine (Heyen et al., 2002 ; Alsheikh et al., 2003). De même, une déhydrine localisée dans le phloème de ricin, possède la capacité de lier les ions Fe^{3+} *in vitro* (Krüger et al., 2002). Les ions fer augmentent les risques de formation d'espèces activées de l'oxygène (ROS) et donc de stress oxydatif, car à faibles concentrations, ils catalysent la formation de $OH^{\cdot}$ en présence de H_2O_2 (réaction de Fenton). De par leur capacité à fixer le fer, ces déhydrines pourraient empêcher la formation de ROS en inhibant la réaction de Fenton

(Rodriguez et al, 2005) et ainsi jouer indirectement un rôle antioxydant (Hara et al., 2003, 2004).

A l'état sec, grâce à la forte concentration de glucide, le cytoplasme forme un état vitreux, et il a été suggéré que les protéines LEA puissent contribuer à sa formation (Wolkers et al., 1999 ; Buitink et Leprince, 2004). Ainsi, en l'incorporant à une matrice de saccharose ou de raffinose, la protéine D7 du pollen *T. latifolia* ou la protéine GmPM16 d'embryon de soja (groupe 4) augmentent la température de transition vitreuse (T_g) du système à l'état sec (Wolkers et al., 2001 ; Shih et al., 2004). De plus, la D7 semble participer aux propriétés physico-chimiques de l'état vitreux car elle renforce le réseau de liaisons H avec le saccharose et modifie la densité moléculaire de la matrice vitreuse (Wolkers et al., 1999 ; Buitink & Leprince, 2004)

Analyses in vivo. Les techniques de transgénèse ont permis d'aborder l'analyse fonctionnelle d'un certain nombre de protéines LEA *in vivo*. Ces études ont principalement consisté à tester la tolérance d'organismes transgéniques surexprimant des protéines LEA à des stress thermiques, hydriques et salins. Ainsi, la protéine HVA1 d'orge surexprimée chez le riz a permis d'accroître significativement la tolérance des plantules au NaCl et à la sécheresse (20% de croissance supplémentaire pour l'un ; Xu et al., 1996 ; et 28% de masse sèche pour l'autre ; Sivamani et al., 2000). Des résultats similaires, pour un stress de déshydratation, ont été obtenus avec les protéines PMA1959 et PMA80 de blé, respectivement des groupes 1 et 2, surexprimées chez le riz (Cheng et al., 2002).

La tolérance au froid de tabac transgénique est augmentée par l'expression d'un gène LEA du citronnier (CuCOR19 ; Hara et al., 2003). De même, la tolérance à la congélation de plantes transgéniques est augmentée par l'expression ectopique d'un gène de blé, *WCS19* (Ndong et al., 2002), d'*Arabidopsis*, *COR15A* (Artus et al., 1996), ou par la co-expression des gènes *RAB18* et *COR47* d'une part, et *XERO2* et *ERD10* d'autre part (Puhakainen et al., 2004). La tolérance à la congélation de feuilles de fraisiers (*Fragaria* x *anassaca*) est également accrue par l'expression d'un gène de blé, *WCOR410* (Houde et al., 2004). Grâce une approche d'analyse de mutants d'insertion d'*Arabidopsis,* il semblerait que la

protéine EM6 soit requise pour un développement normal de la graine (Manfre et al., 2006). Il existe également des données montrant un effet bénéfique de la surexpression de protéines du groupe 5 sur des plantules d'*Arabidopsis* exposées au NaCl et LiCl (Borrell et al., 2002). Le rôle de protection contre les stress a également été montré par des travaux de génétique quantitative. Ainsi, chez l'orge et le soja, des gènes de déhydrines ont été colocalisés avec des QTL correspondant à des traits phénotypiques liés à la tolérance aux stress hydriques et hivernaux (Campbell & Close, 1997).

D'autre part, l'expression, chez le tabac, de deux protéines LEA d'épinard (*Spinacia oleracera*) induites par le froid (Kaye et al., 1998) et de trois protéines LEA de *Craterostigma plantagineum* induites par la dessiccation (Iturriaga et al., 1992), n'a procuré aucun avantage significatif vis-à-vis de la tolérance à la congélation et à la dessiccation. Cela peut indiquer que toutes les protéines LEA ne contribuent pas significativement à la tolérance aux stress, ou qu'elles ont besoin d'un contexte particulier pour fonctionner.

Des études ont également été menées sur d'autres organismes que des plantes. Ainsi, des levures surexprimant une protéine du groupe 4 de tomate (LE25) résistent mieux au stress salin et au gel (Imai et al., 1996). Un effet similaire a été montré sur des levures surexprimant une protéine Em (groupe 1) (Swire-Clark & Marcotte, 1999). Par ailleurs, la surexpression de la protéine HIC6 de chlorelle chez la levure permettrait d'augmenter la survie au gel de 40% (Honjoh et al., 1999). Du fait de leur diversité structurale, les protéines LEA ne jouent probablement pas des rôles identiques. Ceci a été suggéré par une étude comparative de la croissance de levures surexprimant les protéines Le4 et HVA1, respectivement des groupes 2 et 3, en présence de NaCl ou KCl (Zhang et al., 2000). La protéine HVA1 est apparue plus efficace pour protéger les levures contre le NaCl, tandis que la protéine Le4 confère aux levures une meilleure tolérance au KCl.

Ce panorama des connaissances acquises sur les protéines LEA fait apparaître une grande diversité des données structurales et fonctionnelles. Toutefois, une forte hydrophilicité, et une absence de structuration en solution semblent constituer une

signature pour la majorité des protéines LEA (groupe 1, 2 et 3). Leur expression ainsi que certaines de leurs propriétés suggèrent que les protéines LEA sont impliquées dans la tolérance à la dessiccation des graines, et plus généralement dans la résistance des plantes à des stress abiotiques (stress hydrique, salin, thermique). Le défi actuel consiste à élucider les mécanismes moléculaires par lesquels les protéines LEA contribuent à ces tolérances.

Ce manuscrit, et le travail qui y est consigné, ont pour ambition de préciser quelles sont les caractéristiques biochimiques et structurales de la protéine LEAM, afin de faire émerger sa fonction.

Objectifs de la thèse

Lors de travaux antérieurs, notre équipe avait identifié et caractérisé les modalités d'expression d'une protéine LEA du groupe 3 (LEAM), qui s'accumule dans la matrice des mitochondries de graine de pois (Grelet et al., 2005). Des résultats préliminaires avaient également montré que la forme mature de la LEAM était capable, lors de test *in vitro*, de protéger deux enzymes matricielles, la fumarase et la rhodanèse, de la dessiccation.

Les objectifs du travail de thèse présenté dans ce rapport étaient :

1) d'effectuer une caractérisation approfondie des propriétés structurales et fonctionnelles de la LEAM par des approches de biochimie
2) d'initier des approches de génétique reverse afin de préciser le rôle physiologique de la LEAM

Nous verrons en quoi les résultats obtenus ont bousculé les hypothèses qui avaient été formulées au début de ce travail, vérifiant ainsi les propos d'Isaac Asimov : « The most exciting phrase to hear in science, the one that heralds new discoveries, is not 'Eureka!' (I found it!) but 'That's funny ...' »

Partie 1 :

Caractérisation Structurale et Fonctionnelle de la Leam

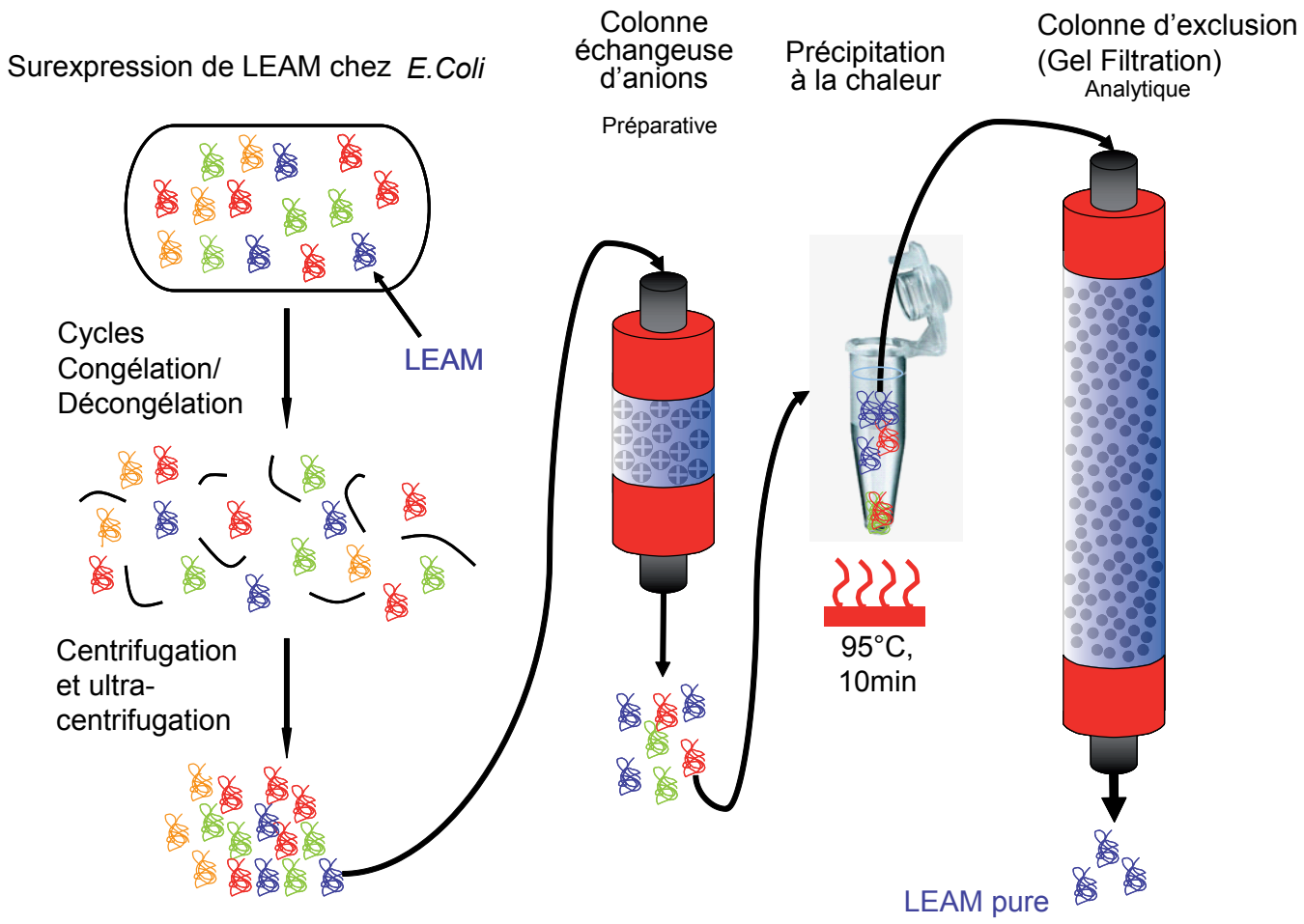


Figure 4 : Schéma général de la purification de LEAM recombinante, produite par *E. coli*.
La LEAM est représentée en bleu, les protéines contaminantes en jaune, vert et rouge.

Production de la LEAM recombinante

La caractérisation biochimique et biophysique de la LEAM nécessite une importante quantité de protéine. La LEAM a donc été surexprimée dans un système bactérien, sous sa forme mature (sans séquence d'adressage ou « peptide transit »), telle qu'on la retrouve dans la matrice des mitochondries de graines de pois. Afin de ne pas modifier ses propriétés structurales et fonctionnelles, LEAM a été produite sans l'adjonction d'étiquette d'affinité (TAG) qui aurait pourtant autorisé une purification simplifiée et rapide. Le schéma général de production et de purification de LEAM est présenté dans la Figure 4.

Production dans la souche d'*Escherichia coli* (*E.coli*) BL21AI

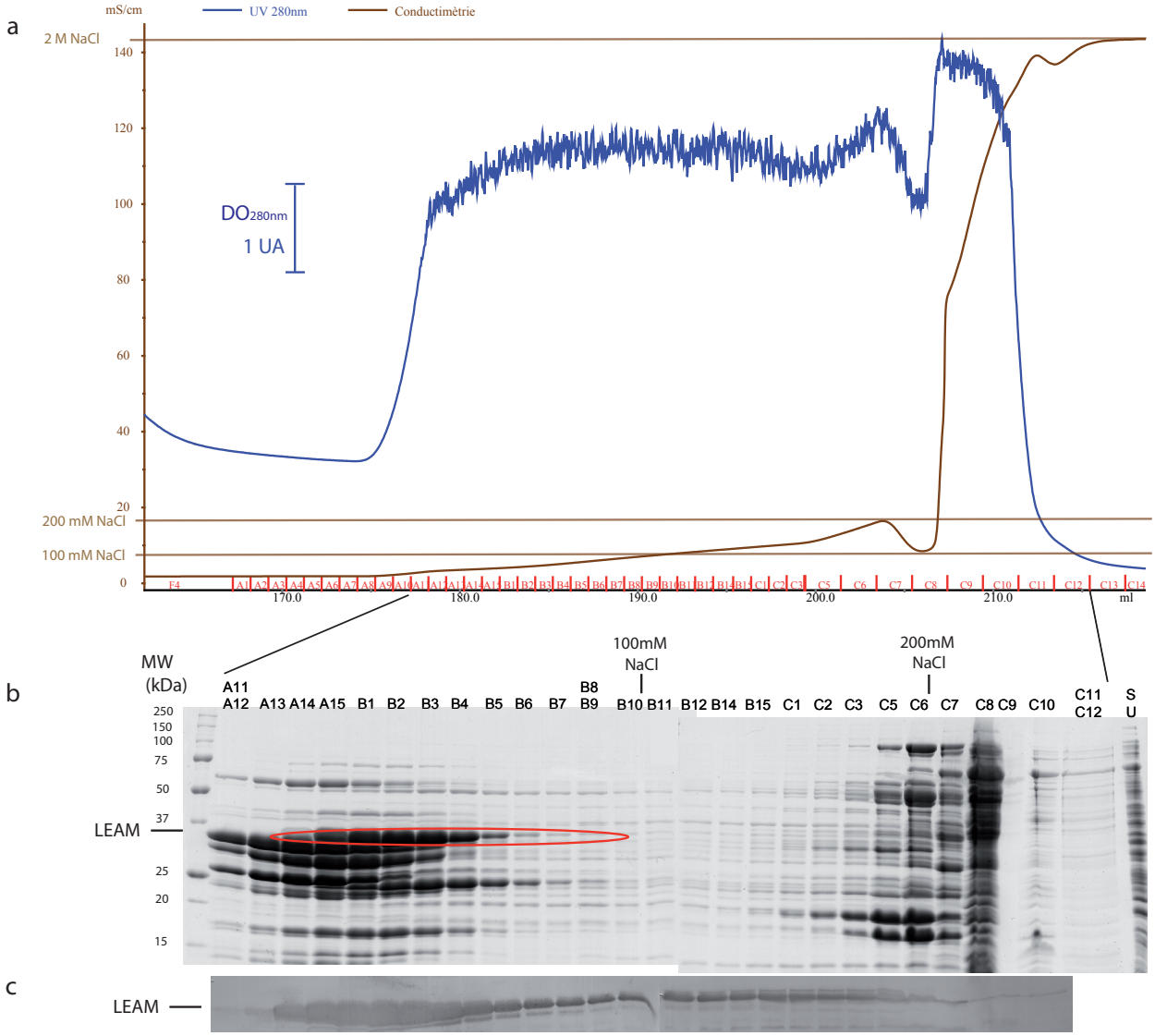
Le système permettant la surexpression de LEAM dans *E.coli* a été mis au point précédemment (Thèse Johann Grelet, 2004 ; Grelet et al. 2005). L'utilisation du vecteur de surexpression pET3aY (portant le gène *dnaY* transcrivant pour les ARNt AGG/AGA) a permis d'optimiser la traduction de LEAM qui présente de nombreux codons rares chez E.Coli (18 codons AGG et AGA). Seules les bactéries BL21AI, connues pour leur tolérance aux protéines toxiques, ont permis d'obtenir une surexpression de LEAM, même si celle-ci demeure très faible. Les conditions d'induction établies initialement se sont révélées optimales en termes de durée d'induction et de température (2h, 37°C).

Trois cycles de congélation/décongélation permettent de lyser les bactéries et ainsi de récupérer les protéines solubles dans une solution tamponnée à pH 7,4 après clarification par une centrifugation basse vitesse, suivi d'une d'ultracentrifugation. Un cocktail anti-protéase est ajouté pour protéger la LEAM d'éventuelles dégradations. L'option d'un éclatement par sonication a été écartée pour ne pas inutilement augmenter la complexité de l'extrait et éviter d'éventuelles altérations de la structure de la protéine.

Purification de la LEAM

L'absence d'étiquette d'affinité nécessite de s'appuyer sur les propriétés biochimiques de LEAM, pour établir un schéma de purification: un pI acide de

A


a
mS/cm
UV 280nm
Conductimètrie
2 M NaCl
200 mM NaCl
100 mM NaCl
DO280nm
1 UA
170.0
180.0
190.0
200.0
210.0
ml
b
MW (kDa)
100mM NaCl
200mM NaCl
LEAM
c
LEAM

B

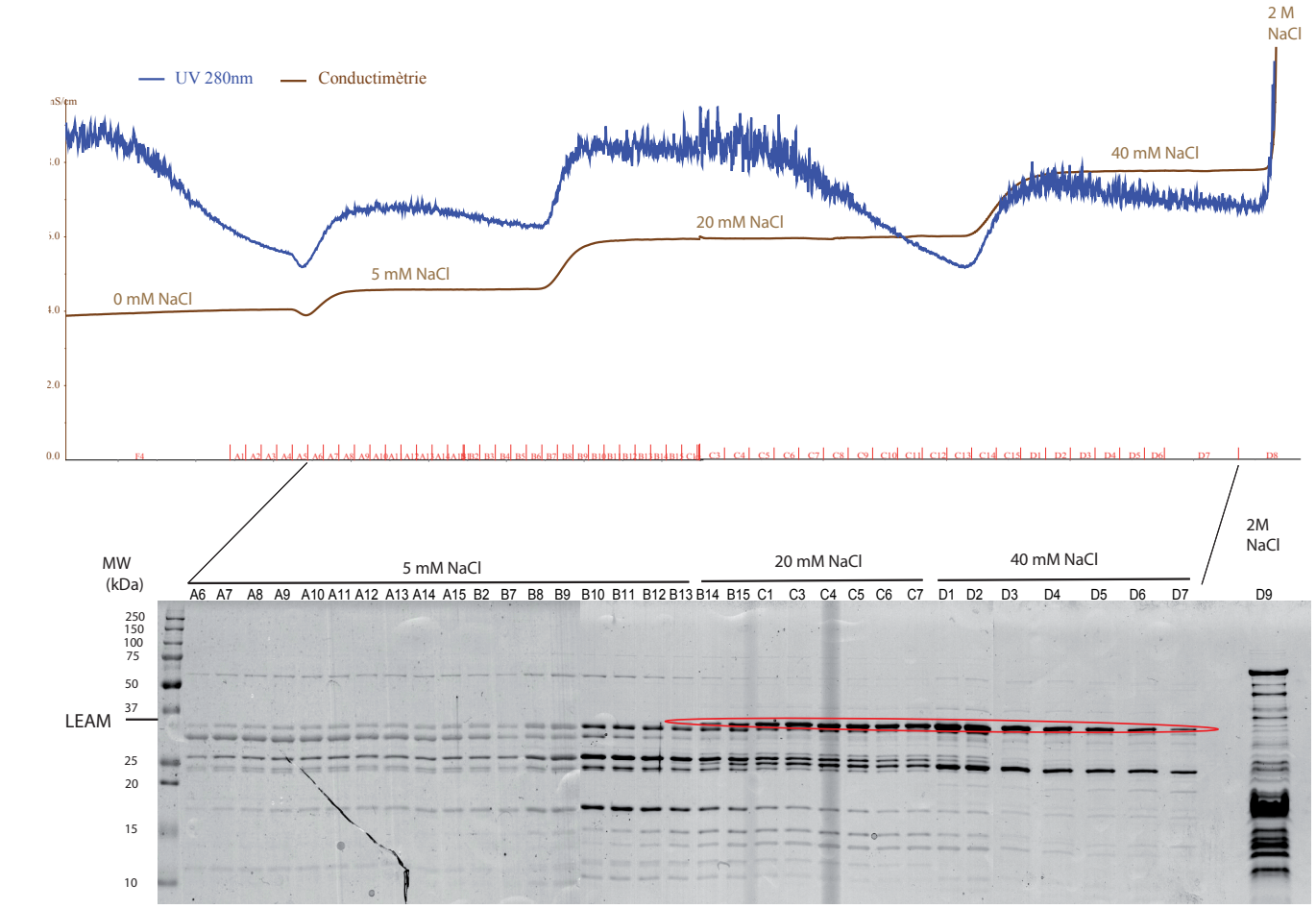


Figure 5 : Analyse du passage d'un extrait clarifié de bactéries surexprimant la LEAM sur une colonne échangeuse d'anion, la HiTrap Q HP (GE Healthcare).

A. L'élution est réalisée avec un gradient linéaire de NaCl (0-200mM et 200mM-2M). En (**a**) est présenté le profil d'élution des protéines, détectées en UV à 280nm. Toutes les fractions correspondant à l'élution ont été analysées en SDS-PAGE (**b**) et en western blot en utilisant un anticorps anti-LEAM(**c**).

B. L'élution est réalisée avec des paliers de concentration (step) de NaCl (0mM, 5mM, 20mM, 40mM et 2M) . En (**a**) est présenté le profil d'élution des protéines, suivies en UV à 280nm. Toutes les fractions correspondant à l'élution ont été analysées en SDS-PAGE suivie d'une coloration au bleu de Coomassie (**b**). La LEAM est entourée en rouge.

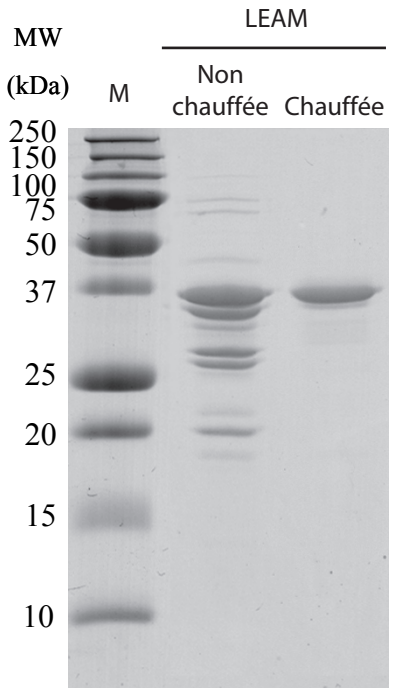


Figure 6 : Analyse éléctrophorétique d'un extrait contenant la LEAM, après un traitement à la chaleur ou non (95°C, 10 minutes).
20 µg d'une fraction enrichie en LEAM est soit directement déposé sur gel (non chauffé) soit préalablement chauffée (95°C, 10 minutes ; chauffée) avant le traitement de l'échantillon pour le SDS-PAGE

5,1, une masse de 37kDa, la solubilité à la chaleur – c'est-à-dire que la LEAM ne précipite pas lors d'un chauffage à 90°C pendant 10 minutes.

La première étape repose sur la charge théorique de la protéine au pH de la solution. La différence existant entre son pI (5,1) et le pH de la solution d'élution (7,4) appelle à l'utilisation d'une colonne échangeuse d'anions. Les premiers tests menés sur une colonne analytique de type monoQ avaient montré la pertinence de ce choix (Thèse J Grelet, 2005). Etant donné les quantités importantes de protéines à traiter, et le fait que cette chromatographie ne constitue qu'une première étape de purification, une colonne préparative de type HiTrapQ HP (GE HC) a été sélectionnée.

L'utilisation d'un gradient linéaire de NaCl (0 - 200mM) lors de l'élution a permis de montrer qu'une très faible force ionique suffisait à décrocher LEAM de la colonne (Figure 5A). L'utilisation de paliers de concentration en sel a permis de rendre les résultats plus reproductibles que dans le cas d'un gradient linéaire. Les concentrations optimales de décrochage ont été optimisées avec des paliers à 5mM et 40mM de NaCl (Figure 5B). Ainsi, à 5mM sont écartées les protéines très faiblement retenues (parmi lesquelles LEAM est très faiblement représentée). A 40mM la majorité de LEAM contenue dans l'échantillon de départ est éluée de la colonne. Les protéines récupérées sont concentrées environ 40 fois par ultrafiltration afin d'obtenir un volume final d'environ 250µL.

La deuxième étape consiste en une précipitation à la chaleur de nombreuses protéines, permettant d'enrichir le surnageant en LEAM qui est thermo-soluble (Figure 6). Il a été vérifié par la suite, principalement lors des tests biophysiques sur la LEAM, que ce chauffage n'interférait en rien sur les propriétés structurales de la protéine.

La dernière étape fait appel à la masse relative de LEAM, qui va la discriminer des autres protéines. Une chromatographie d'exclusion basée sur une colonne de gel filtration de type Superdex 200 (GE HC) est réalisée.

(Remarque : La chromatographie d'exclusion a également pour nom, chromatographie d'exclusion-diffusion, de tamisage moléculaire, de gel filtration, de filtration sur gel, de perméation de gel)

Traditionnellement l'élution sur ce type de colonne se fait avec un tampon contenant 100mM de NaCl. Un comparatif d'élution avec ou sans sel a été réalisé

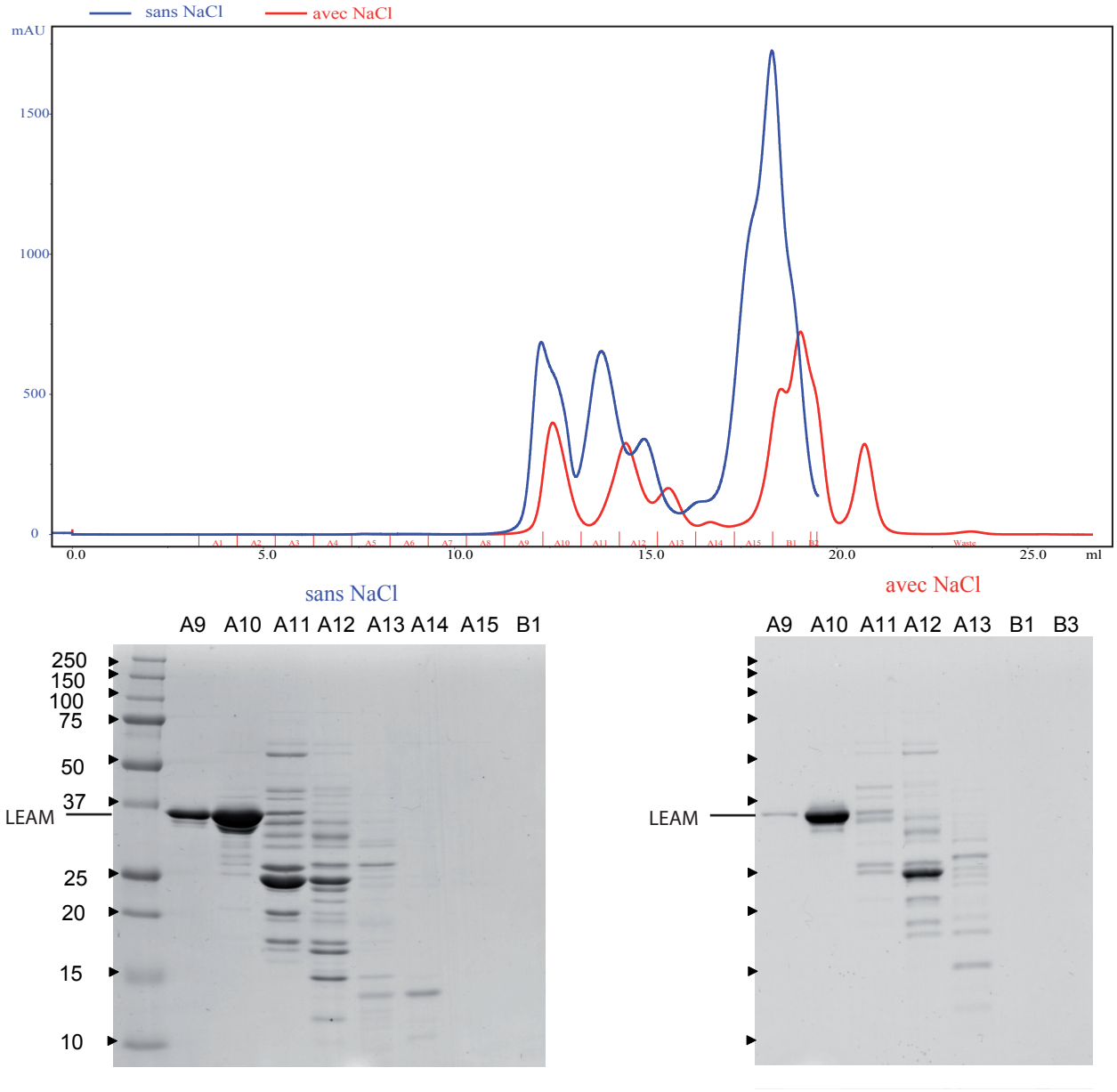


Figure 7 : Chromatographie sur colonne d'exclusion des fractions enrichies en LEAM issues d'HiTrapQ : Profil d'élution et analyse des fractions par SDS-PAGE
La courbe en bleu correspond au spectre obtenu sans NaCl, la courbe en rouge est obtenue en présence de NaCl 0,15 M.

(Figure 7). Même si le profil d'élution est influencé par la présence de sel, la séparation de LEAM des autres protéines reste inchangée. Il a donc été choisi de travailler sans sel, rendant ainsi la LEAM « prête à l'emploi » dès la sortie de la colonne. En fonction des expériences ultérieures, une étape de concentration sur membrane d'ultrafiltration est nécessaire.

En résumé, avec le système d'expression bactérien et la méthode de purification sans l'utilisation de « TAG », il faut environ 1,3 litre de culture bactérienne (DO_{600nm} = 1,2) pour obtenir 100µg de LEAM purifiée.

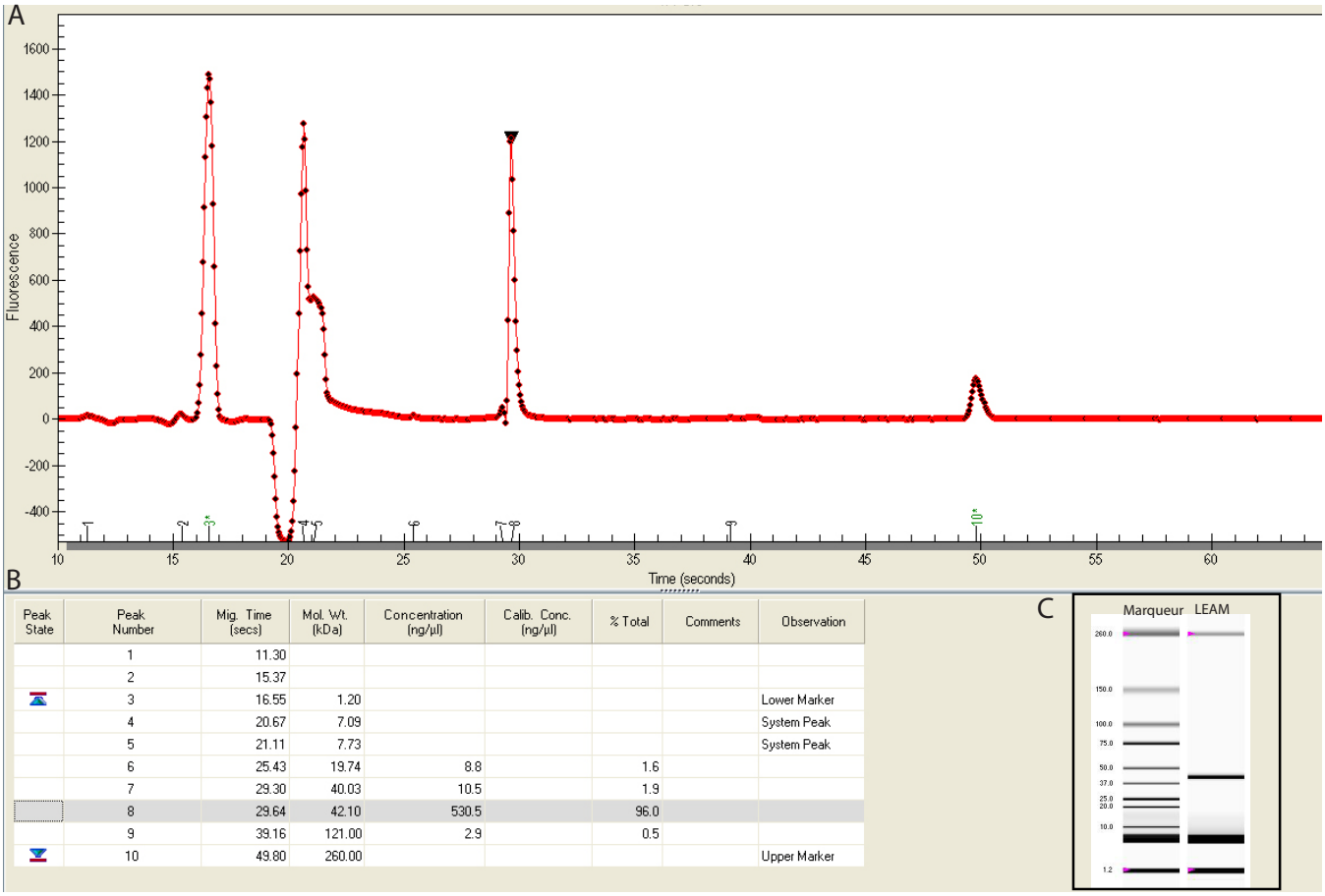
Analyse de pureté

Afin de vérifier la pureté de la protéine recombinante, trois techniques ont été utilisées : deux méthodes d'électrophorèse (SDS-PAGE et système Experion™ (BioRad)) et une méthode de spectrométrie de masse, le MALDI-ToF en mode linéaire.

Le système Experion™ Bio-Rad est un système d'électrophorèse 1D automatisé qui assure la séparation, la coloration, la décoloration, la détection des bandes, la quantification et l'analyse de données. Il s'appuie sur un système d'interaction des protéines avec le SDS, les complexes étant révélés par fluorescence. Cette méthode possède un bon niveau de résolution, et surtout de quantification. La SDS PAGE ainsi que l'analyse par le système Experion™ montrent un degré de pureté de LEAM supérieur à 96% (Figure 8).

Malgré l'utilisation de deux méthodes de coloration très différentes, la SDS-PAGE ainsi que l'Experion™, un biais très important subsiste. En effet ces méthodes de coloration qui ont été mises au point pour révéler un ensemble de protéines, sont basées sur des propriétés moyennes des protéines (présence de certains acides aminés aromatiques par exemple). Cette technique peut devenir problématique lorsque l'on a une population réduite de protéines présentant des caractéristiques éloignées de la moyenne.

La spectrométrie de masse permet une analyse plus fine des constituants de notre solution de LEAM, et surtout indépendante de tout marquage chimique.



Peak State	Peak Number	Mig. Time (secs)	Mol. Wt. (kDa)	Concentration (ng/µl)	Calib. Conc. (ng/µl)	% Total	Comments	Observation
	1	11.30						
	2	15.37						
	3	16.55	1.20					Lower Marker
	4	20.67	7.09					System Peak
	5	21.11	7.73					System Peak
	6	25.43	19.74	8.8		1.6		
	7	29.30	40.03	10.5		1.9		
	8	29.64	42.10	530.5		96.0		
	9	39.16	121.00	2.9		0.5		
	10	49.80	260.00					Upper Marker

Figure 8 : Analyse par le système Experion™ de la protéine LEAM purifiée.
3 µg de LEAM purifiée est déposé dans le système Experion™ (BioRad). Le profil de séparation lors de l'électrophorèse est donné en **A**. L'analyse de ce profil par le logiciel de l'Experion™ permet d'obtenir la taille et la quantité relative de chaque protéine (B). A partir de ces données un profil similaire à celui d'une SDS-PAGE peut être élaboré (**C**).
N.B. : La taille de 42kDa donnée ici à la LEAM est due à un problème de migration des marqueurs. La LEAM de cet échantillon a bien un poids moléculaire de 37kDa (vérifié en SDS-PAGE)

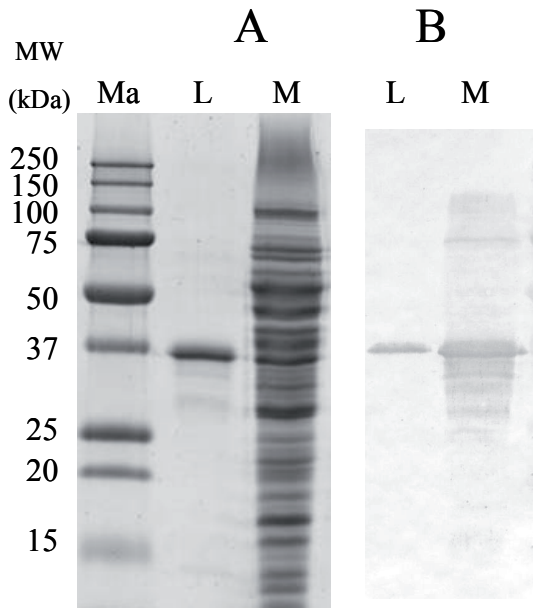


Figure 9 : Comparaison de LEAM provenant de mitochondries de graine de pois et de surexpression chez *E.coli*.
20 µg de protéines mitochondriales (M) et 1,5µg de protéines recombinantes (L) ont été analysés par SDS-PAGE réalisée sur gel de polyacrylamide 13,5%, suivie d'une coloration au bleu colloïdale (**A**) ou d'un western blot (Anti-corps anti-LEAM) B (dans ce cas la quantité de LEAM recombinante a été réduite à 150 ng). Les marqueurs de poids moléculaires (Ma) sont indiqués avec leur masse respective en kDa.

Les résultats de MALDI-ToF, réalisés sur un seul lot par la plate-forme B.I.B.S. de l'unité B.I.A., INRA de Nantes, montrent un degré de pureté de plus de 90% (Tableau V).
(Un peptide de 17kDa a également été détecté dans cette étude. Mais, lors des multiples analyses ultérieures de MS/MS, aucun peptide, ou combinaison de peptide, lui correspondant n'a été retrouvé. Nous l'avons donc considéré comme un contaminant isolé, et exclu de cette étude).

Pic (MW en Dalton)	% de protéines totales
34852	90,5
32415	5
29027	4,5

Tableau V : Proportion des différents peptides composant la solution de LEAM purifiée. (données issues de MALDI-ToF en mode linéaire)

Cette procédure de purification a été éprouvée sur plusieurs appareils de FPLC (Fast Protein liquid chromatography), permettant maintenant la production de LEAM en routine par Nicole Payet au sein de notre équipe.

Comparaison des protéines native et recombinante

Afin de vérifier si la protéine LEAM recombinante (produite chez *E.coli*) était identique à la protéine native (de pois), des analyses en spectrométrie de masse et en analyse electrophorétique mono- et bi-dimensionnelle ont été réalisées.

L'analyse de LEAM recombinante ou native - contenue dans l'extrait protéique de matrice mitochondriale de graines de pois- en SDS-PAGE (électrophorèse monodimensionnelle) montre après coloration au bleu de Coomassie que les deux protéines ont la même masse moléculaire de 37kDa (Figure 9A). Ce résultat est confirmé par une révélation en western blot avec un anticorps anti-LEAM (Figure 9B). Cet anticorps a été obtenu et testé pendant la thèse de Johann Grelet, et il s'est avéré très spécifique. Les protéines de masse moléculaire inférieure à 37 kDa et reconnues en western blot dans l'extrait

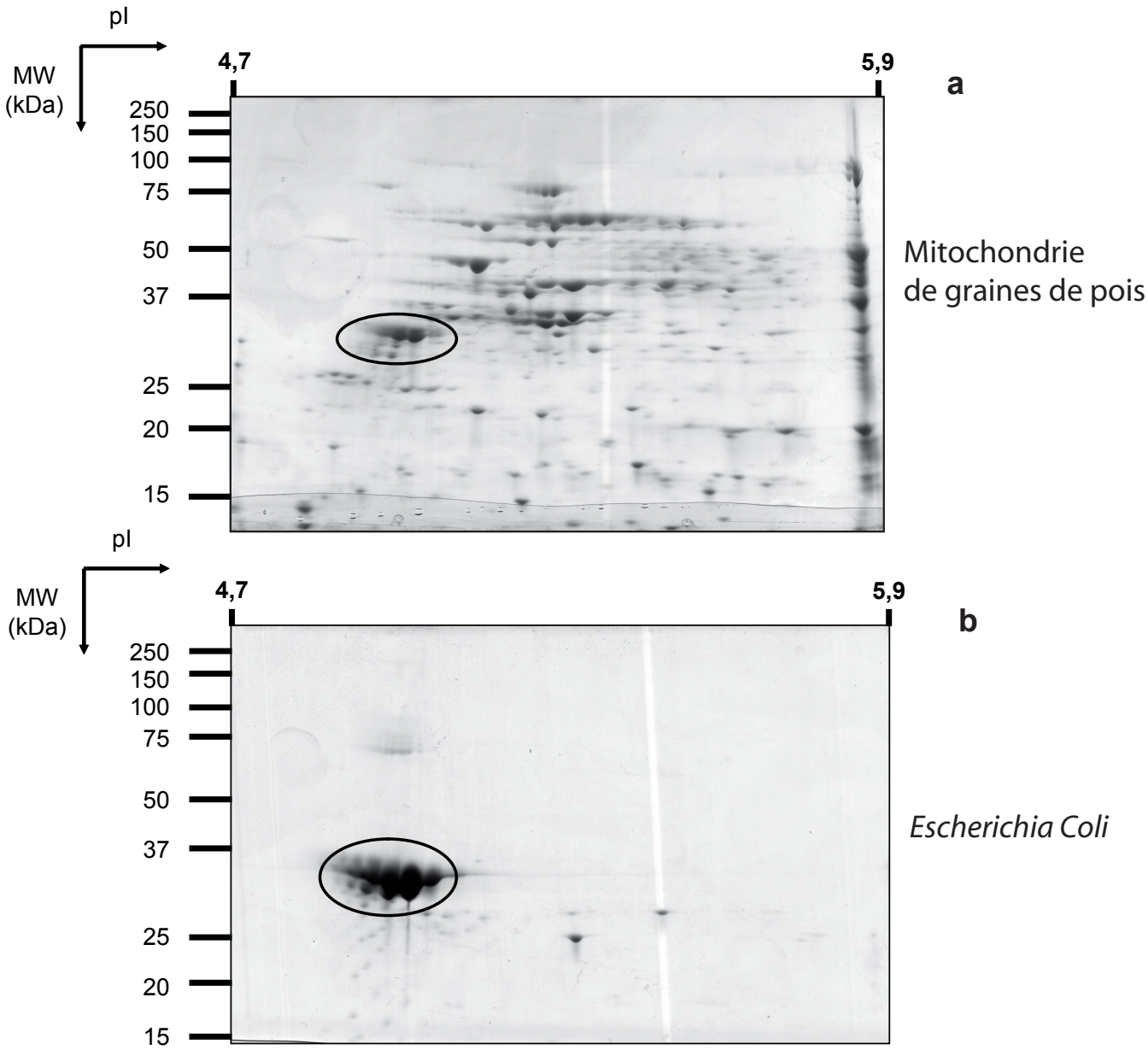


Figure 10 : Analyse électrophorétique bidimensionnelle d'un extrait de matrice mitochondriale de graines de pois (a), et de LEAM purifiée produite à partir d'une surexpression chez *E.Coli* (b).

L'isoélectrofocalisation a été réalisée à partir de 100 µg de protéines mitochondriales et 30 µg de protéine recombinante, sur un gradient linéaire de pH (4,7-5,9). Le SDS-Page qui a fait suite, a été réalisé sur un gel gradient de polyacrylamide (10-14%), révélé au bleu colloïdal. Les spots correspondant à la LEAM sont entourés.

matriciel sont donc probablement des formes de dégradation ou de maturation de la LEAM.

L'analyse de la LEAM en électrophorèse bidimensionnelle révèle une « signature » caractérisée par un chapelet de quatre spots principaux à 37kDa s'étalant sur une zone de pH comprise entre 4,9 et 5,2, ainsi que deux spots de plus faibles intensités à une taille légèrement inférieure d'environ 36 kDa (Figure 10a). La protéine LEAM recombinante présente exactement le même profil caractéristique (Figure 10b). L'analyse de cette signature sera discutée ultérieurement.

La spectrométrie de masse, réalisée en collaboration avec Michel Jaquinod (CEA, IRTSV, Laboratoire d'Etude de la Dynamique des Protéomes, INSERM, ERM 0201, Grenoble) en NanoLc-ESI-MS/MS sur des peptides issus de la digestion par la trypsine de la LEAM recombinante, montre un profil similaire à celui obtenu pour la LEAM native (données non montrées).

L'ensemble de ces résultats montrent que LEAM recombinante, issue de la surexpression de sa séquence codante chez *E.coli*, est identique à la protéine native de la matrice mitochondriale de graines de pois. La protéine recombinante peut donc être utilisée avec confiance pour des analyses structurales et fonctionnelles.

Modifications post-traductionnelles

Les résultats de la figure 10 sont surprenants puisque la LEAM exhibe en 2D-PAGE un profil complexe, identique pour la protéine de pois et pour la protéine recombinante issue de l'expression d'un gène synthétique chez *E.coli*. Ce profil pourrait donc résulter de modifications post-traductionnelles.

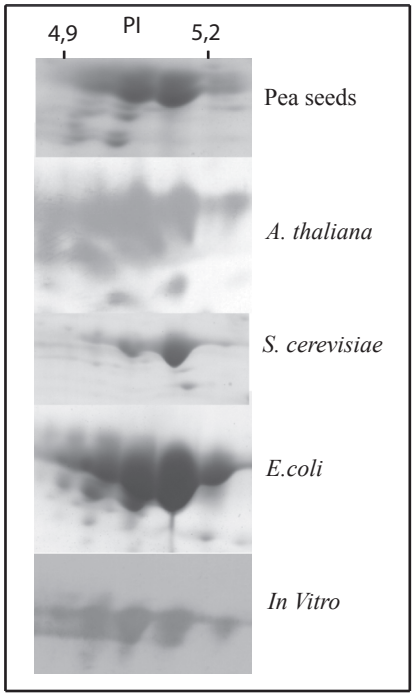


Figure 11 : Profils de LEAM en 2D-PAGE.
100 µg d'extrait protéique sont déposés pour l'isoélectrofocalisation avec un gradient linéaire de pH (4,7-5,9). La SDS-PAGE est réalisée sur gel gradient de polyacrylamide (10-14%), révélée soit au bleu colloïdal pour les mitochondries de graines de pois, *Saccharomyces cerevisiae* et *Escherichia coli*, soit par western blot (Anticorps anti-LEAM) pour *Arabidopsis thaliana* et pour l'extrait obtenu par synthèse *InVitro* avec le système RTS (Roche).

a

SHQSDWRNAADGKRNSSMDWAYNSTSKARQDADEIADRERKTLNGDVDSEDVKQYVRDAKERTKE
AANRAAENADSAGVKSRDYAYDAKEKTKDAANRAAENVESAGEKAKDYAYDAKERTKDAANRAAEN
AESVGEKARDYAYDAKERTKEAAQNAGETAKDYAYGAKERTKEAAESAGGTARDYAYDATDKTKEA
VGTVADKTKEGAKKTAEMTKEGAEKTAETTGEVAGAATEALKSAGEMAKRTAQGAWETAKDATQKIK
ETVVGKDDDDNDRGGGVGAVVDEYDVELKRKGYGESKGYDMSKGYGENKGYDQNRGY

b

Recapitulatif

position dans la protéine mature	acide aminé	acide aminé modifié
20	Tryptophane (Trp – W)	Kynurenine / Tryptophane oxygené
23	Asparagine (Asp – N)	IsoAspartate / Aspartate
44	Asparagine (Asp – N)	IsoAspartate / Aspartate
250	Glutamine (Gln – Q)	PyrrolidoneCarboxylate
253	Tryptophane (Trp – W)	Kynurenine / Tryptophane oxygené

Figure 12 : Positionnement des modifications post-traductionnelles affectant LEAM.
Les acides aminés présentant des formes déamidées (asparagine et glutamine) ou oxydées (tryptophane) sont indiqués en rouge dans la séquence protéique de la LEAM mature (**a**). La position des acides aminés modifiés ainsi que le résultat de leurs modifications sont présentés en **b**.

Constance dans le profil atypique en gel 2D

LEAM a été également surexprimée dans des mitochondries d'organismes eucaryotes (*A. thaliana* et *S. cerevisiae*). Quel que soit l'organisme utilisé pour la surexpression (eucaryote ou procaryote), les protéines recombinantes présentent toujours la même signature en gel 2D (Figure 11). Ce résultat écarte les modifications post-traductionnelles de type phosphorylation, glycosylation, myristoylation, propres aux eucaryotes.

Enfin, la protéine a été synthétisée *in vitro* par un système acellulaire, le RTS (Rapid Translation System) (*Roche)*. Un profil similaire est alors obtenu (Figure 11), ce qui exclut finalement tout processus biologique dans ce mécanisme de modifications post-traductionnelles. Elles sont spontanées.

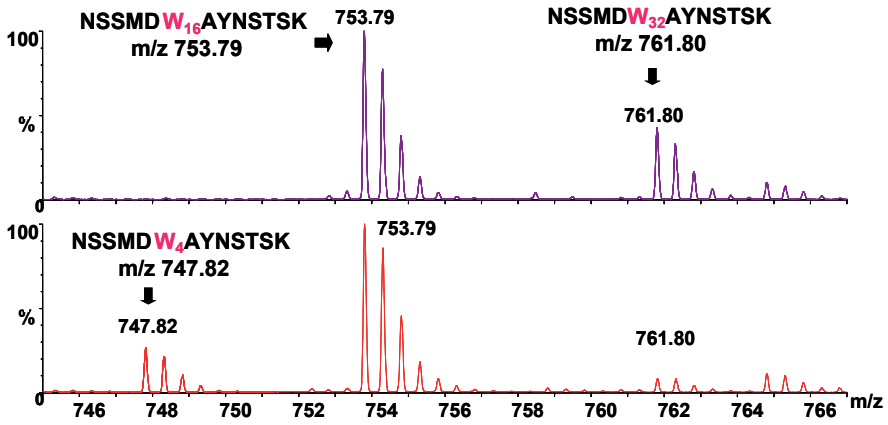
L'analyse en spectrométrie de masse des modifications post-traductionnelles

Afin de caractériser ces modifications vraisemblablement d'origine chimique, une analyse fine par spectroscopie de masse en electrospray (NanoLC-ESI-MS/MS) a été réalisée par Michel Jaquinod, au CEA de Grenoble, sur la LEAM produite chez *E. coli*. Il a ainsi été montré que LEAM peut subir cinq modifications majeures : La déamidation des résidus Asparagine, Asn23 et 44, ainsi que de la Glutamine Gln250 et l'oxydation des tryptophanes Trp20 et 253 (Figure 12). Les réactions chimiques correspondantes sont précisées dans l'Encadré 1. La Figure 13 présente les spectres de masses obtenus pour le peptide contenant le tryptophane 20. Les différentes étapes menant à la kynurenine depuis le tryptophane sont ainsi visualisées, et confirmées par deux méthodes.

D'après les analyses faites sur chaque spot visible en électrophorèse bidimensionnelle, il semble qu'ils abritent un mélange de différentes formes de LEAM (données non montrées).

Toutes les modifications post-traductionnelles remaniant la LEAM sont donc des modifications chimiques, intrinsèques et spontanées.

A



B

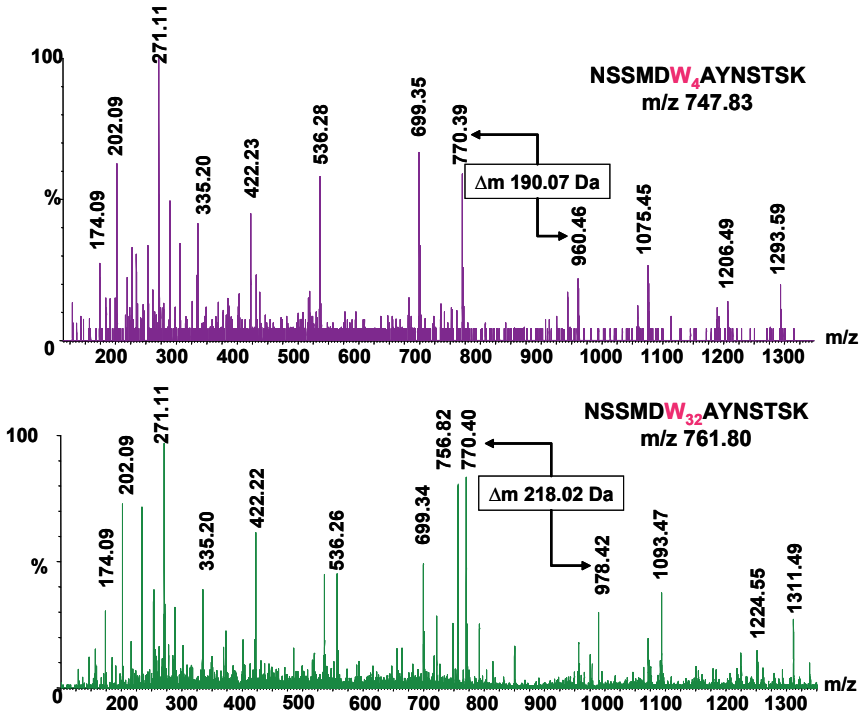


Figure 13 : Analyse en spectrométrie de masse de l'oxydation du tryptophane 20 de LEAM.

L'échantillon protéique a été digéré par la trypsine et les peptides obtenus ont été analysés par spectrométrie de masse selon deux techniques.

A. Les mono- et dihydroxy-tryptophanes et les N-formylkynurenine sont identifiés par spectrométrie de masse en electrospray (ES-MS) et ES-MS/MS. Les spectres présentés sont un zoom (masse de 745-767) sur le tryptophane du peptide NSSMDWAYNSTSK.

Le spectre du haut montre le spectre caractéristique d'un tryptophane avec des additions successives d'oxygène (+16Da, +32Da). Le spectre du bas correspond à la kynurenine avec un incrément de 4 Da par rapport au peptide non modifié.

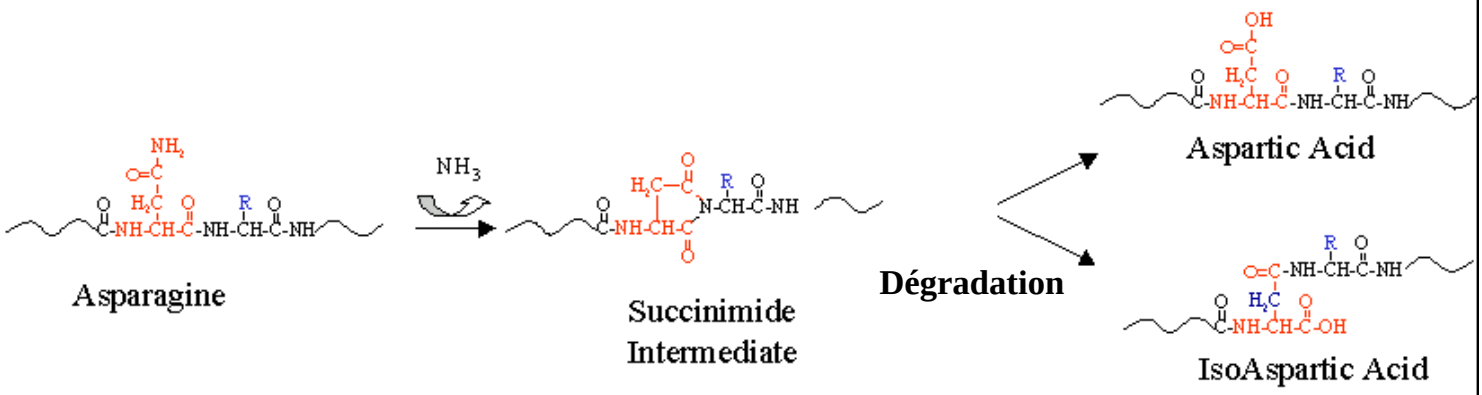
B. Spectres de fragmentation du peptide NSSMDWAYNSTSK modifié.

Le spectre de fragmentation du haut, du peptide ayant un m/z de 747,83 correspond à une forme contenant de la kynurenine. Le tryptophane oxydé est noté W_4. Le profil de fragmentation montre clairement la perte d'un acide aminé (a.a.) de 190,1 Da correspondant à la perte d'un résidu kynurenine.

Le spectre du bas, correspond à la fragmentation du peptide ayant un m/z de 761,80. Le tryptophane doublement oxydé est noté W_{32}. . Le pattern de la fragmentation montre clairement la perte d'un a.a. de 218,02 Da correspondant à la perte d'un résidu tryptophane oxydé deux fois.

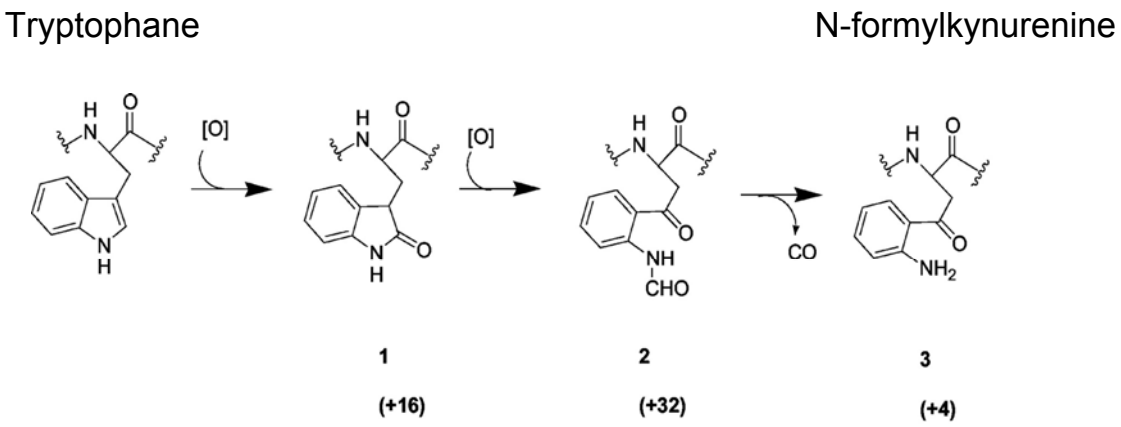
Encadré 1 : Réactions chimiques impliquées dans les modifications post-traductionnelles affectant la LEAM

La déamidation est une modification post-traductionnelle commune ayant pour résultat la conversion d'un résidu d'asparagine à un mélange d'isoaspartate et d'aspartate. La déamidation des résidus de glutamine peut se produire mais avec un taux très inférieur.



Déamidation de l'asparagine

La N-formylkynurenine est issue d'une double oxydation du tryptophane. Cette modification post-traductionnelle est fréquente chez les protéines mitochondriales



Oxydation du tryptophane

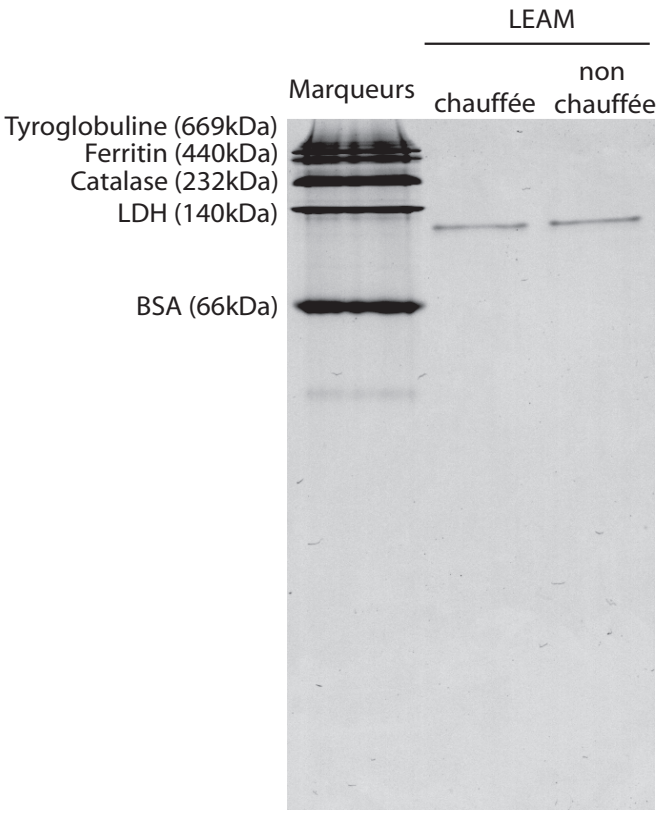
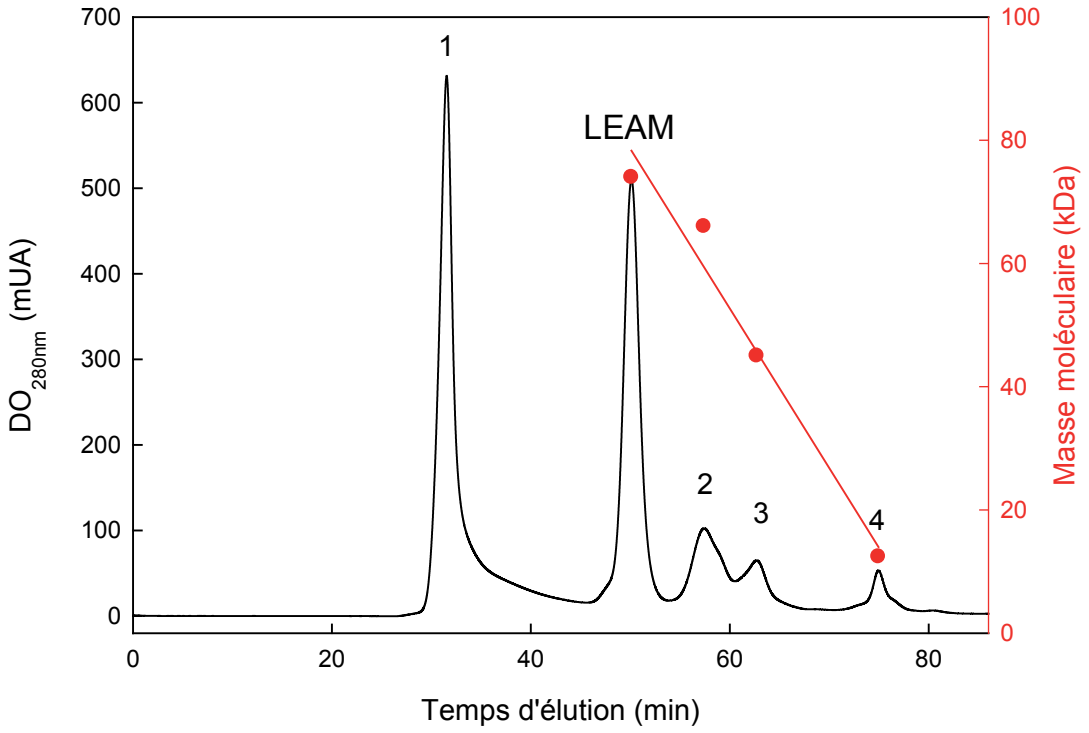


Figure 14 : Analyse en électrophorèse native PAGE de la LEAM produite chez *E. Coli*, après chauffage (95°C, 10minutes) ou non.

En référence a été mis un mélange de protéines : la tyroglobuline (669000Da), la Ferritine (440000Da), la Catalase (232000Da) la lactate déshydrogénase (140000Da) et la BSA (Bovine Serum Albumin) (66000Da) (GE Healthcare). 10 µg de protéines recombinantes ont été déposés sur gel de polyacrylamide 13,5% (en absence de SDS), séparées par électrophorèse et révélées par une coloration au bleu colloïdal (Invitrogen)



pic	composé	Masse Moléculaire (Da)
1	Bleu Dextran	2000000
2	BSA	67000
3	ovalbumine	45000
4	cytochrome c	12400
	LEAM	≈ 74000

Figure 15 : Détermination du poids apparent de LEAM par chromatographie d'exclusion.
La BSA l'Ovalbumine et le Cytochrome *c* sont utilisés comme référence pour étalonner la colonne d'exclusion Superdex200 (GE Healthcare). Une droite de corrélation linéaire entre le temps d'élution et la masse moléculaire est obtenue avec un coefficient de corrélation (R^2) supérieur à 0,98. La masse moléculaire de la LEAM est déterminée grâce à l'équation de cette droite. L'ensemble des masses moléculaires est récapitulé dans le tableau.

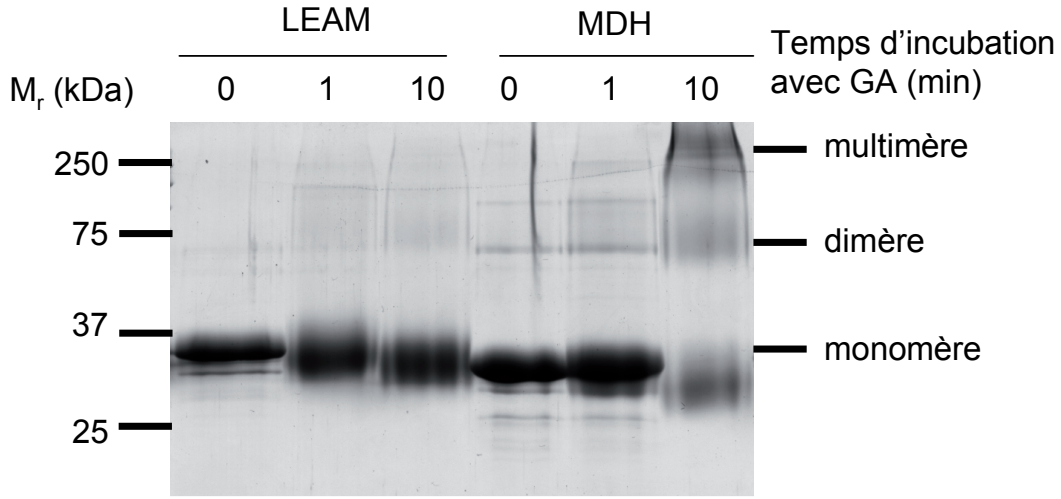


Figure 16 : Analyse de la structure quaternaire de LEAM par pontage chimique au glutaraldéhyde (crosslinking).
8µg de LEAM ou 10µg de Malate DésHydrogénase (MDH) sont incubées avec 0,25% de glutaraldéhyde (GA), à 30°C pendant 0, 1 ou 10 minutes. Les échantillons sont ensuite analysés en SDS-PAGE sur gel gradient 8-20% avec coloration au bleu de Coomassie.

Structure quaternaire de la LEAM

Comportement en gel filtration

En électrophorèse non dénaturante (sur gel de polyacrylamide), la protéine recombinante est présente sous forme d'une bande unique (Figure 14). Alors que sa masse moléculaire en SDS-PAGE est de 37 kDa, son poids apparent a été estimé à 74 kDa en chromatographie d'exclusion (Figure 15).

Un extrait matriciel de mitochondrie de graines de pois a été analysé par la même technique, dans les mêmes conditions, et la fraction contenant la LEAM a été identifiée par western blot. La protéine mitochondriale possède également un poids apparent de 74 kDa (données non montrées).

*Ces résultats pourraient suggérer que LEAM se trouve à l'état natif sous la forme d'un dimère.*La technique du crosslinking chimique a été utilisée pour vérifier cette hypothèse.

Test d'oligomérisation par le crosslinking

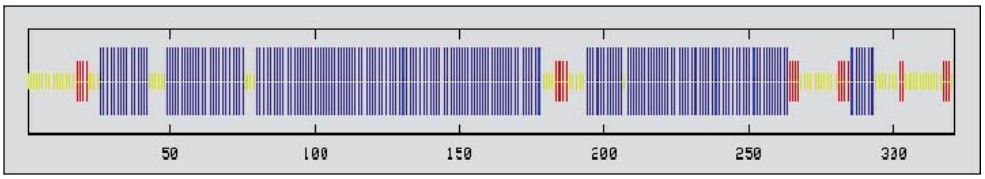
L'incubation de protéines avec un agent pontant comme le glutaraldéhyde permet de fixer les liaisons faibles entre polypeptides et donc de préserver certaines structures quaternaires avant leur analyse par SDS-PAGE. La concentration en glutaraldéhyde, la température et le temps d'incubation doivent être optimisés afin de minimiser les pontages artefactuels intermoléculaires (Azem *et al.*, 1998).

La malate déshydrogénase (MDH) mitochondriale a été choisie comme protéine de référence : c'est une protéine matricielle présente sous forme d'un homodimère (masse moléculaire d'une sous-unité : 36 kDa). Dans des conditions de crosslinking permettant de conserver la structure dimérique de la MDH, voire de favoriser des structures multimériques, la LEAM apparaît sous forme d'une bande unique à 37kDa (Figure 16).

La LEAM est donc sous forme monomérique à l'état natif. Une conformation structurale particulière de LEAM pourrait expliquer son élution anormale sur la colonne de gel filtration. Le doublement de son poids apparent semble donc n'être qu'une coïncidence.

A

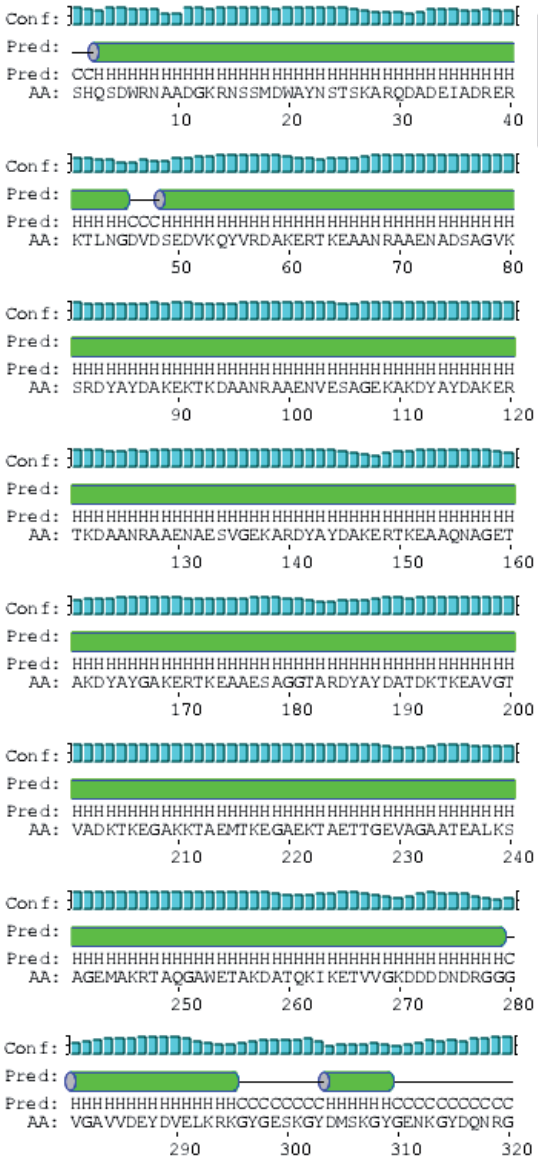
Prédiction de structure secondaire de LEAM par Gor4 (Garnier et al. 1996)



70% d'hélice α

Traits longs bleues pour les hélices alpha,
Traits moyens rouge pour les zones intermédiaires,
Traits courts jaunes pour les boucles

Prédiction de stucture secondaire de LEAM par PSIPRED (McGuffin et al. 2000)



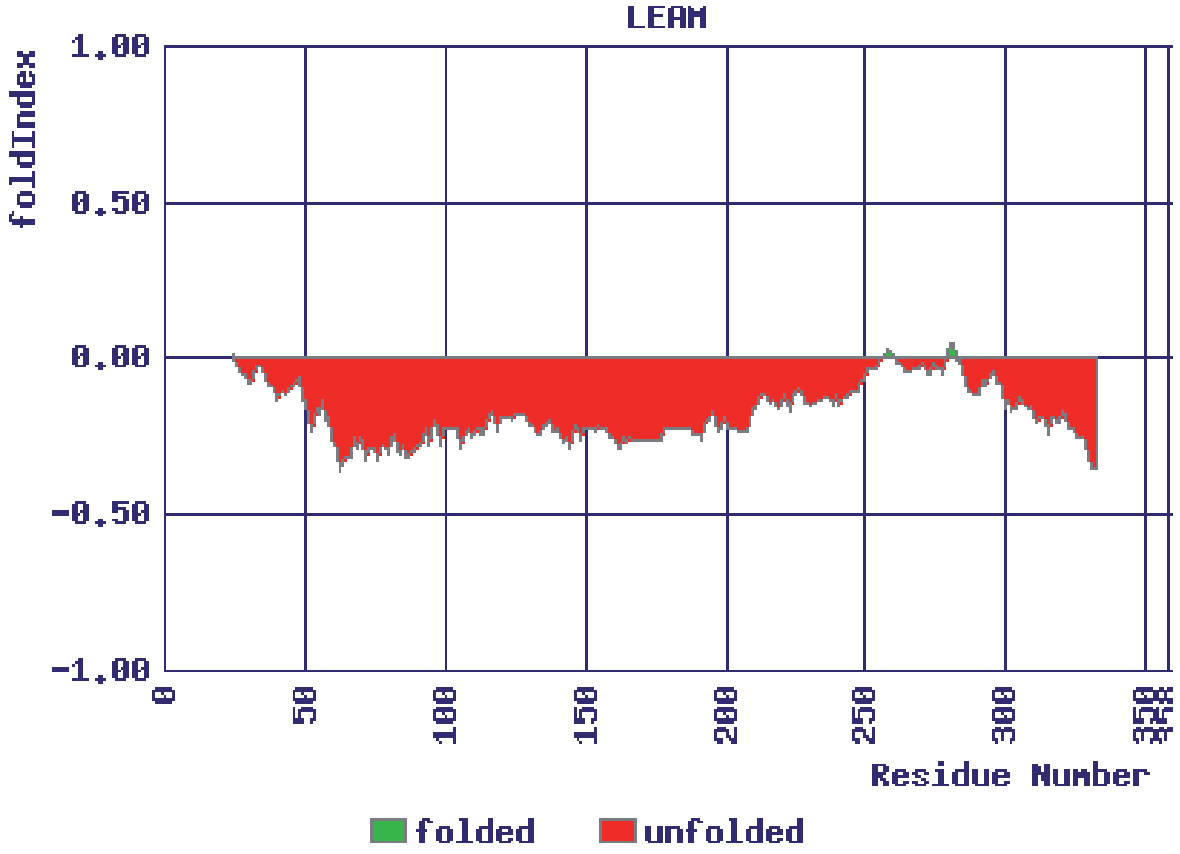
90% d'hélice α

Figure 17 : Prédiction *in silico* de structure et d'ordonnancement de LEAM à partir de la séquence primaire en acide aminés (a.a.) de la protéine mature.

A. Prédictions de structures secondaires à partir de la séquence primaire par les programmes Gor4 et PSIPRED.

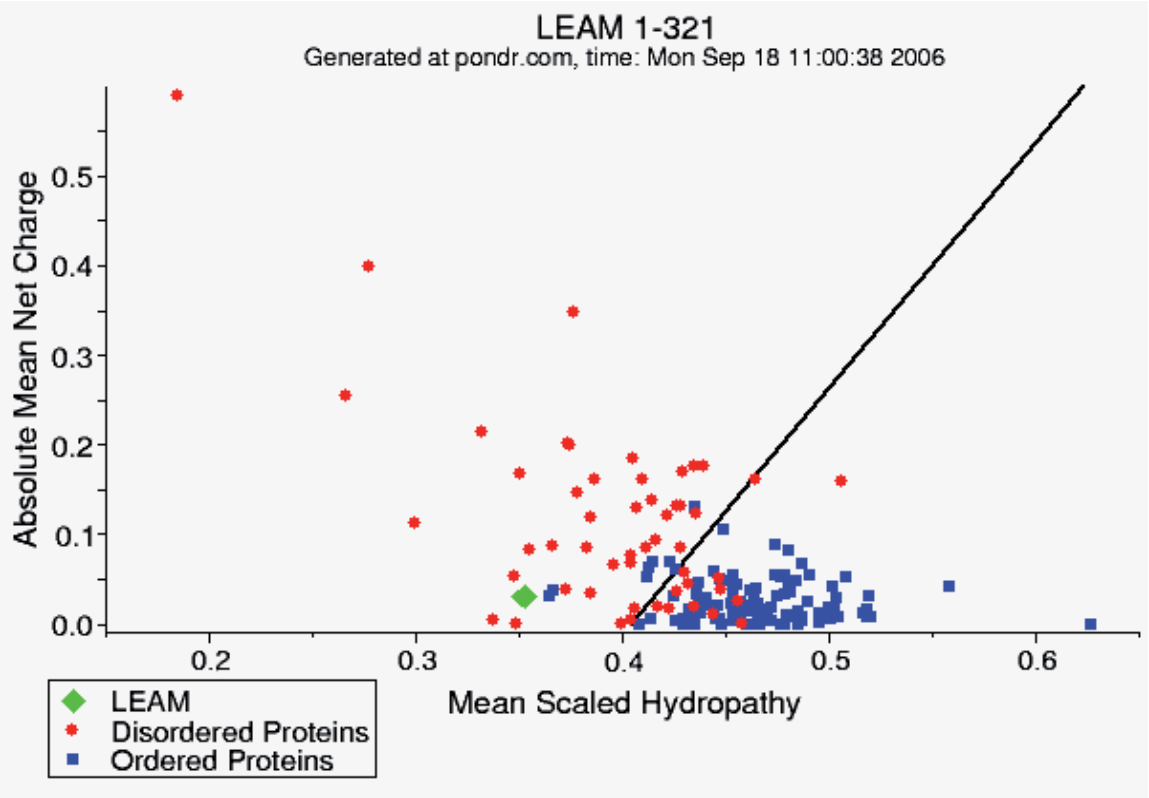
B. Prédictions de structures désordonnées à partir de la séquence primaire par les programmes FOLDINDEX et PONDR

B Prediction de regions desordonnées de LEAM par FOLDINDEX



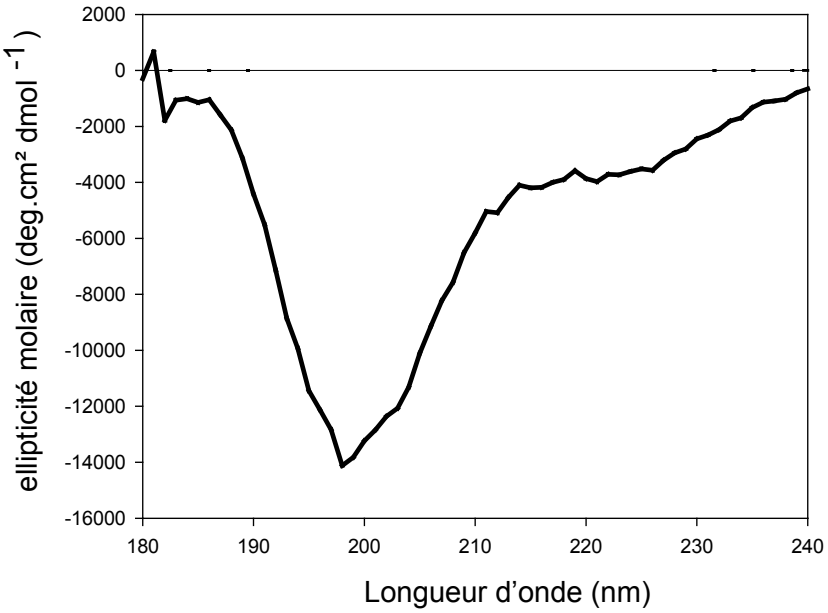
97,5% des résidues de LEAM sont dans une structure desordonnée

Diagramme de l'espace charge/hydropathie de 50 protéines désordonnées et 60 structurées par PONDR (http://www.pondr.com)

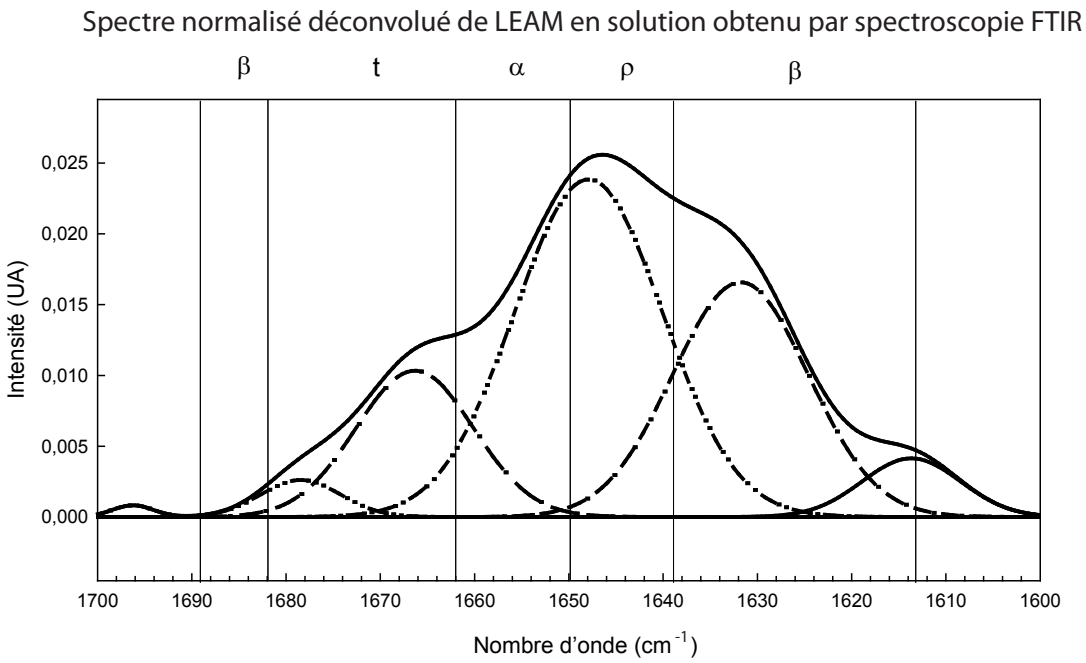


LEAM est une protéine classée parmis les protéines non structurées

A



B



1689-1682, 1639-1613 : β sheet
1649-1639 : random coil
1662-1649 : α helix
1682-1662 : turn

Figure 18 : Analyse de la structure secondaire de la LEAM en solution.

A. Spectre de la LEAM en solution obtenu par dichroïsme circulaire à 20 °C. La protéine a été solubilisée à une concentration finale de 1,2 mg/mL dans du tampon phosphate de sodium 5 mM pH 7,5.

B. Spectre déconvolué normalisé dans la région amide I de LEAM en solution obtenu par spectroscopie FTIR-ATR (Fourier Transform InfraRed - Attenuated Total Reflectance). Les attributions de pics sont données à partir d'une compilation de données (Byler & Susi 1986).

Structure secondaire de la LEAM

L'avis des logiciels de bioinformatique

L'analyse de la séquence en acides aminés de la LEAM par des programmes informatiques permet de pronostiquer son état conformationnel. Des logiciels de prédiction de structure secondaire (PSIPRED, GOR4) prédisent, avec une très forte probabilité, que la LEAM mature est une protéine structurée constituée majoritairement d'hélices α (alpha) (70% à 96%, Figure 17A). Cependant, plusieurs protéines LEA ont été décrites comme non structurées à l'état natif (McCubbin et al. 1985, Russouw et al. 1995, 1997, Goyal et al. 2003). Une analyse bioinformatique de LEAM réalisée avec des programmes de prédiction des protéines désordonnées (FOLDINDEX, PONDR) indique que 97,5% de la protéine ne serait pas structurée (natively unfolded) (Figure 17B), avec la même assurance que celle fournie par les logiciels de prédiction de structure secondaire.

Ces logiciels de prédiction de structure apportent ainsi des pronostics en apparence contradictoires. Des méthodes biophysiques (CD, FTIR) ont donc été utilisées pour analyser les propriétés structurales de la LEAM.

L'épreuve de la biophysique

Comportement de la LEAM en solution. La LEAM en solution a été analysée par deux méthodes : le dichroïsme circulaire (CD) et la spectroscopie FTIR (Fourier Transformation InfraRed) (Figure 18). Son spectre en CD dans la région des UV lointains (180-240nm) est typique d'une protéine non structurée (random coil) (Figure 18A) (voir Encadré 3, p).

Le spectre obtenu en spectroscopie FTIR-ATR (Fourier Transformation InfraRed – Attenuated Total Reflectance) a été déconvolué au niveau de la bande amide I (1600-1700 cm^{-1}) (Figure 18B). Il est composé de trois pics principaux, centrés à 1668 cm^{-1}, 1633 cm^{-1} et 1648 cm^{-1}. Ces pics se situent respectivement dans les zones attribuées aux coudes (turns), aux feuillets β et aux régions non structurées. Le pic correspondant à ces dernières est majoritaire tant en surface qu'en hauteur, confirmant l'état désordonné de la LEAM en solution.

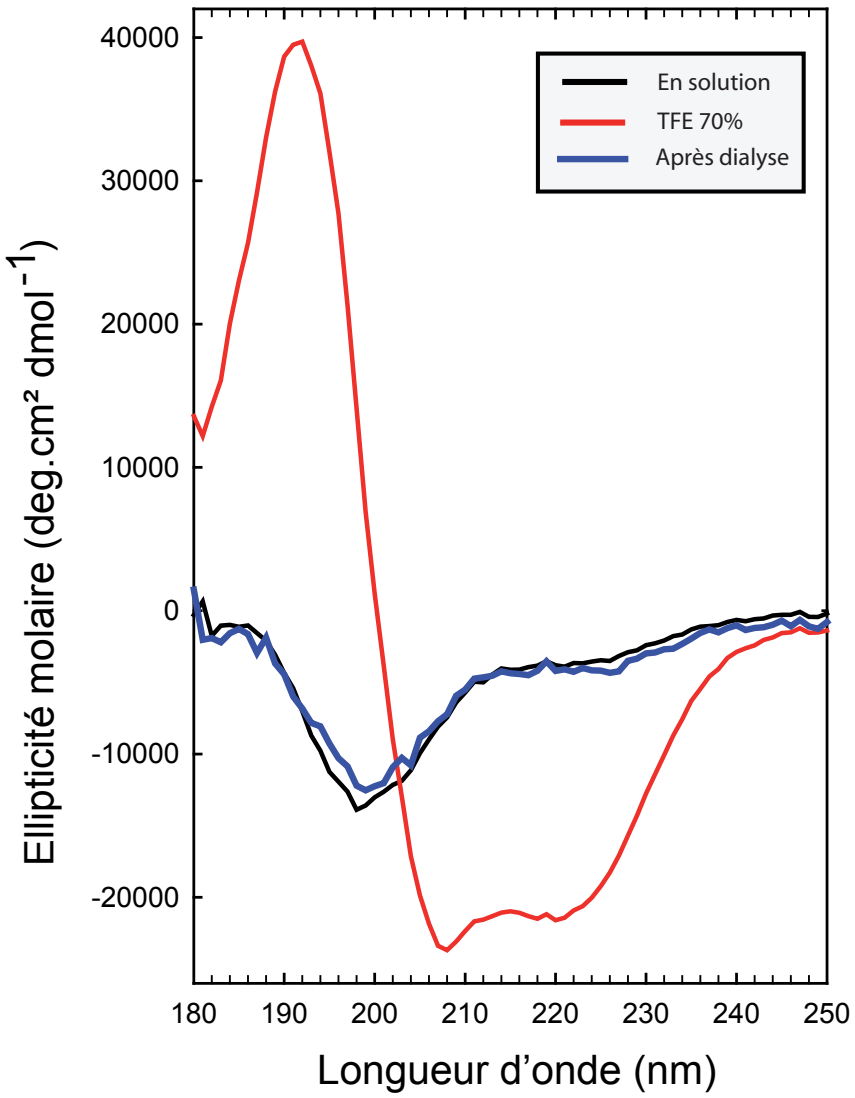


Figure 19 : Spectres de la LEAM en dichroïsme circulaire réalisés à 20°C, en présence ou absence de TFE (TriFluoroEthanol).
La protéine a été solubilisée à une concentration finale de 1,2 mg/ml dans du tampon phosphate de sodium 5 mM pH 7,5.
Le TFE est enlevé par dialyse (seuil de coupure : 3500Da) contre le tampon phosphate.

L'absence de structure ordonnée de la LEAM en solution pourrait expliquer son comportement anormal en chromatographie d'exclusion, avec une masse apparente double de sa masse théorique. En effet, une protéine désordonnée voit son rayon de Stoke, et donc son volume hydrodynamique, augmenter par rapport à une protéine structurée de même taille.

La LEAM se comporte ainsi comme d'autres protéines LEA non structurées qui présentent une masse apparente supérieure à leur masse théorique (Tunnacliffe et Wise, 2007).

Structuration en présence de TFE et SDS. Il a été décrit à plusieurs reprises que des protéines LEA pouvaient se structurer sous l'effet de différents facteurs, physiques ou chimiques (voir introduction). Nous avons donc acquis des spectres de CD dans différentes conditions (Chauffage, concentration, phospholipides, osmoticum, etc…) décrites dans le Tableau VI, sans parvenir à induire une modification de structure de la protéine. Seuls des agents comme le TFE (TriFluoroEthanol) ou le SDS, ainsi que la dessiccation ont permis d'induire des changements structuraux (Tableau VI).

Traitements	Effet de structuration de LEAM
Augmentation de la température (20-100°C) par pas de 20°C	non
Chaps (0,4 % m/v)	non
Triton X100 (1 % m/v)	non
Desoxycholate (0,4 % m/v)	non
PEG -1,5MPa à 20°C	non
Glycérol (20%)	non
Augmentation de la concentration en LEAM (X5)	non
Phospholipides (PC, PE, cardiolipides) (1-10 mg/mL)	non
Séchage puis réhydratation	non
TFE (10-70%)	oui
SDS (0,05-5%)	oui
Séchage	oui

Tableau VI : Structuration de la LEAM sous l'effet de conditions physico-chimiques. Tableau réalisé à partir des données obtenues en CD

Le TFE, est un cosolvant réputé pour favoriser le repliement en hélice α des protéines (Luo & Baldwin 1997). Le spectre obtenu avec 70% de TFE est effectivement caractéristique d'une protéine structurée en hélice α, avec une augmentation de l'ellipticité moléculaire à 191nm et une baisse à 222nm (Figure 19). L'élimination du TFE par dialyse permet de retrouver le spectre antérieur. Il est donc vraisemblable qu'il y ait eu

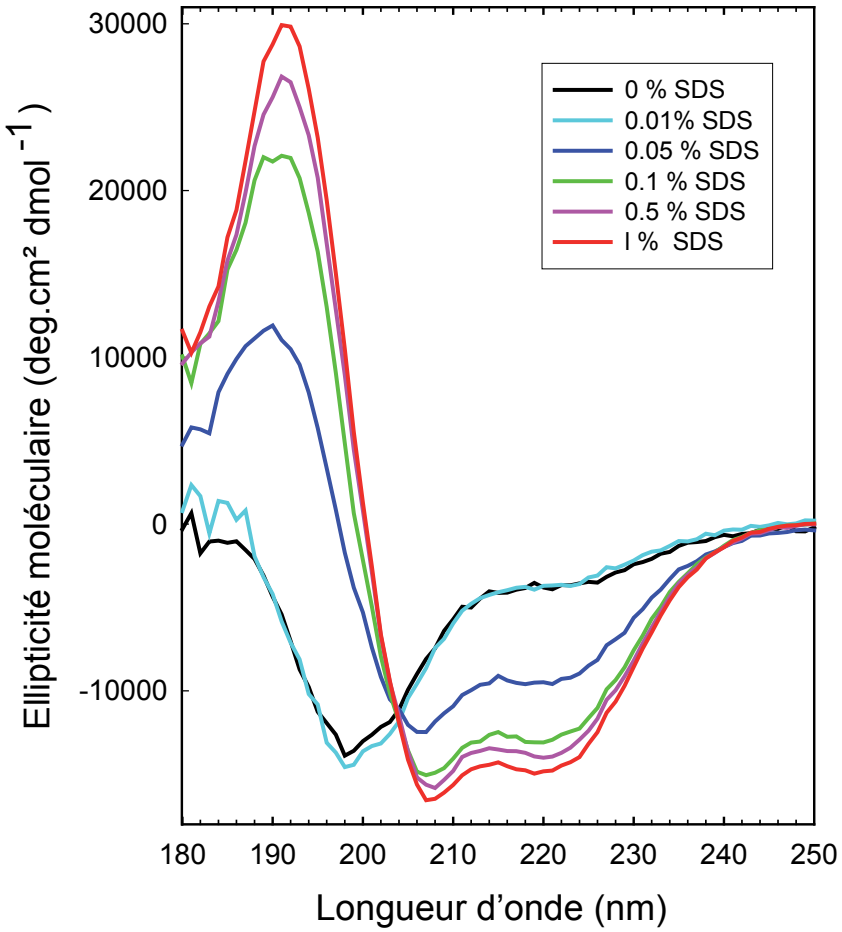


Figure 20 : Spectres de LEAM en dichroïsme circulaire en présence d'une quantité croissante de SDS (Sodium dodécyl sulfate).

La protéine a été solubilisée à une concentration finale de 1,2 mg/ml dans du tampon phosphate de sodium 5 mM pH 7,5. L'expérience a été réalisée à 20 °C.

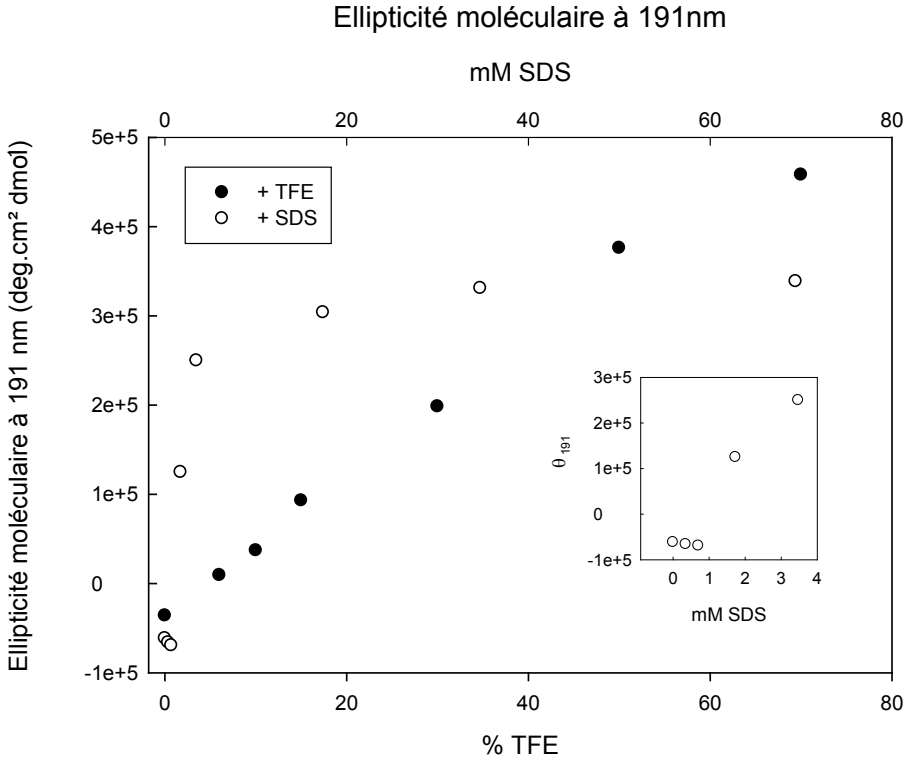


Figure 21 : Comparaison de l'effet du SDS et du TFE sur la structuration en hélice de LEAM.

L'ellipticité moléculaire à 191nm (θ) est spécifique des hélices alpha. La relation entre la formation d'hélice alpha et la proportion de TFE dans la solution est linéaire (coefficient de linéarité supérieur à 0,99), alors que pour le SDS la corrélation est hyperbolique. L'encadré est un agrandissement du pied de la courbe pour les très faibles concentrations en SDS (0-4mM).

restauration de l'état désordonné de la LEAM, ce qui indiquerait que la transition structurale est réversible (Figure 19).
L'ajout de SDS permet également une structuration en hélice α de la protéine (Figure 20). Jusqu'à 0,01% de SDS le spectre de la LEAM reste typique de celui d'une protéine non structurée. Cependant à partir de 0,05% de SDS, et ce jusqu'à 1% le spectre devient typique d'une protéine structurée en hélice α.

L'ellipticité moléculaire à 191nm permet de suivre la structuration en hélice α de LEAM en fonction de la concentration en TFE et SDS (Figure 21). La relation entre la formation des hélices α et la concentration en TFE est linéaire (coefficient de corrélation supérieur à 0,99) contrairement aux résultats obtenus avec le SDS, où la relation est hyperbolique.
Dans le cas du TFE les mécanismes proposés jusqu'ici, envisagent soit une interaction directe du TFE avec les polypeptides (Jasanoff & Fersht, 1994), soit des interférences du TFE avec les liaisons hydrogènes entre l'eau et les liaisons peptidiques (Cammers-Goodwin et al., 1996). L'effet maximal du SDS, quand à lui, est obtenu pour une concentration (2 à 2,5 mM) correspondant à la concentration critique de formation de micelles par le détergent (Figure 21). Cette observation suggère un lien causal entre la présence des micelles et la structuration de LEAM. Le TFE et le SDS pourraient donc induire le repliement de la LEAM par des mécanismes différents, ce qui expliquerait ainsi les effets de concentrations observés (Figure 21)
LEAM est donc capable de se structurer en hélice α *sous l'effet de deux agents chimiques différents, le SDS et le TFE. Cette structuration semble réversible*.

Structuration à l'état déshydraté. Pour tendre vers les conditions dans lesquelles la LEAM se trouve *in vivo*, c'est-à-dire celles de la graine sèche, un spectre en CD a été réalisé sur la protéine déshydratée dans une atmosphère dépourvue de vapeur d'eau (Figure 22). Ce spectre s'avère comparable à celui obtenu lorsque la LEAM est repliée en hélice α.
Le logiciel DICHROWEB (Lobley et al., 2002) compare les spectres étudiés à ceux de protéines de références dont la structure est parfaitement connue (analyse des cristaux protéiques par diffraction des rayons X). Il est ainsi possible

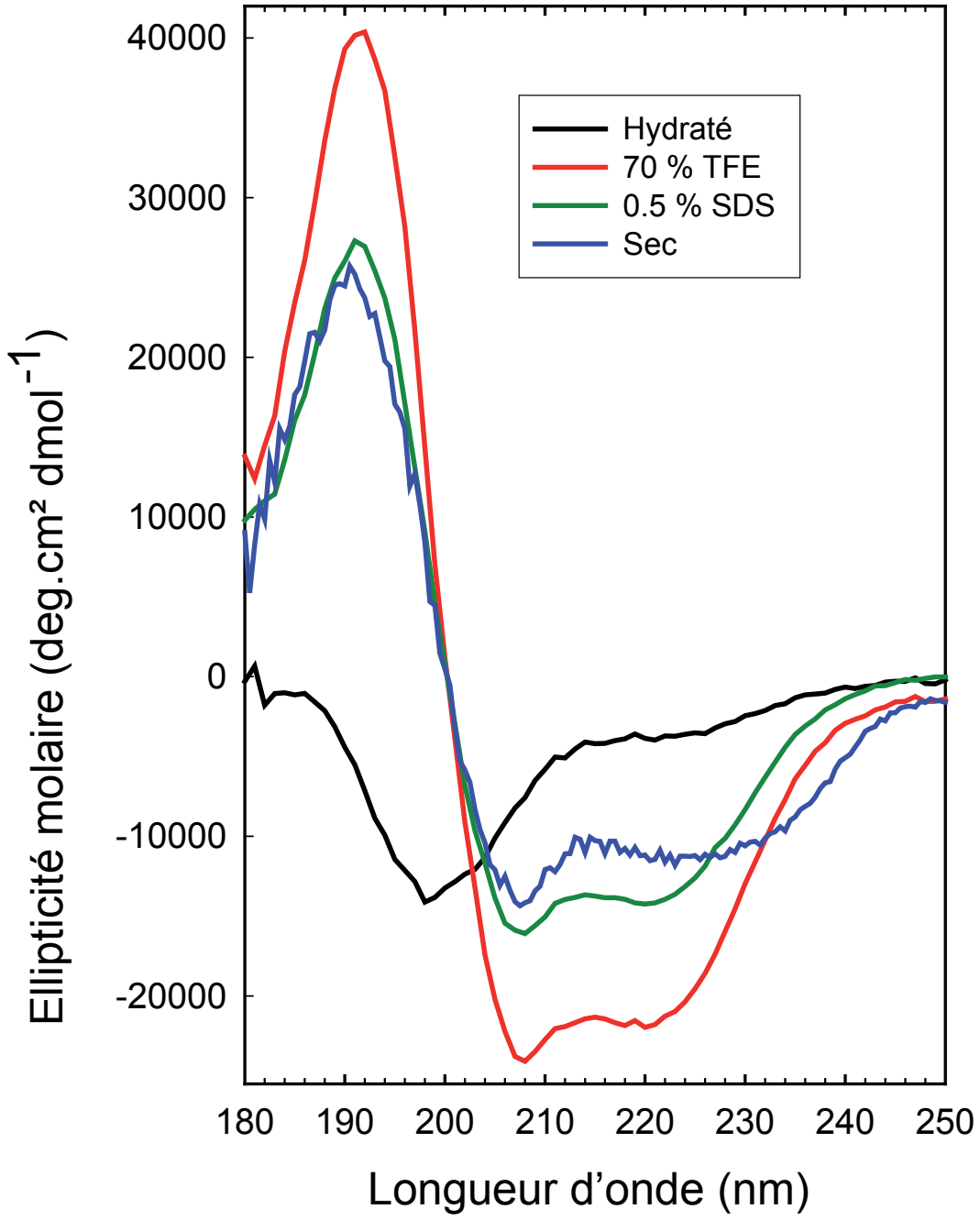
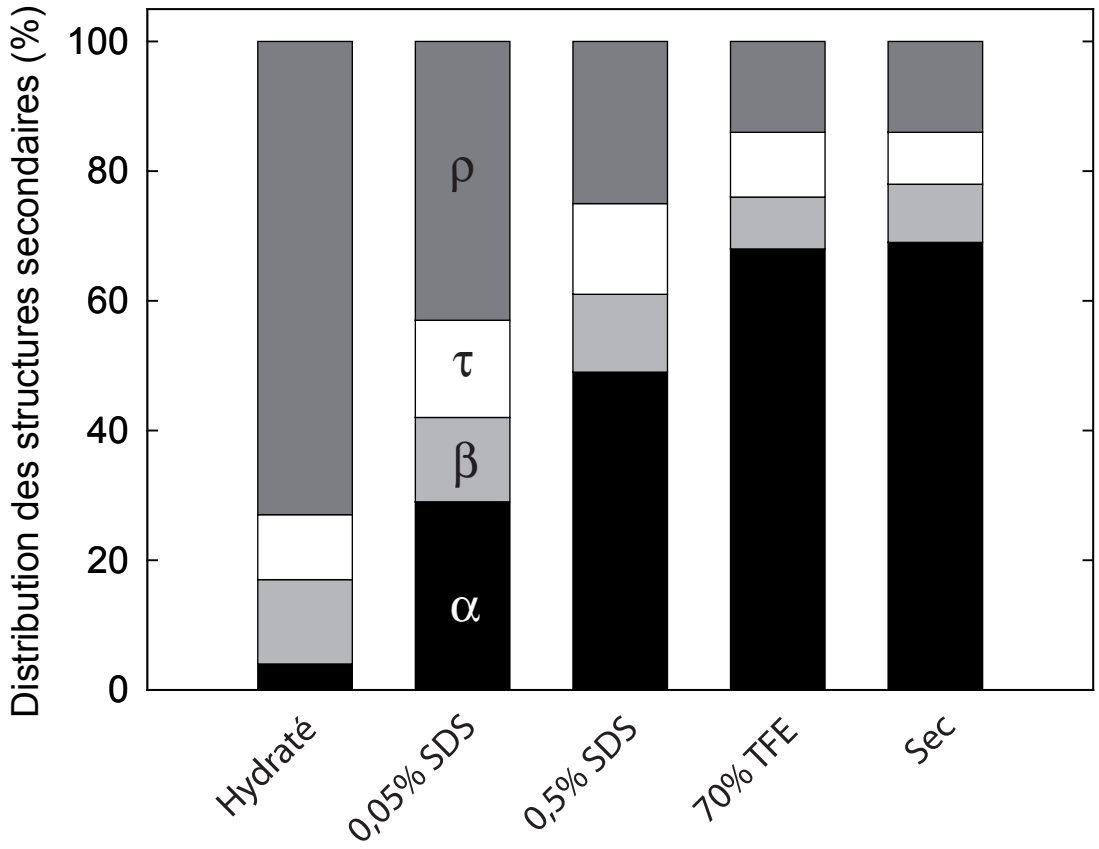


Figure 22 : Spectre en dichroïsme circulaire de LEAM à l'état sec comparé aux spectres de la LEAM hydraté avec ou sans SDS (0,5%) et TFE (70%).

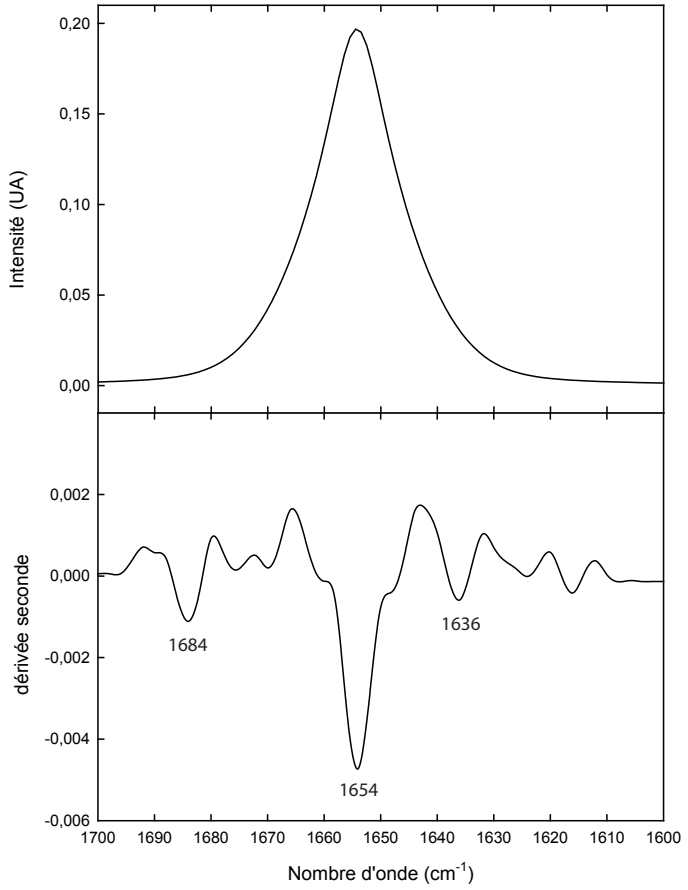


α : Hélice α (helix)
β : Feuillet β (strand)
τ : Coude (turn)
ρ : Désordonné (random coil)

Figure 23 : Prédiction de structures secondaires à partir des données de dichroïsme circulaire.
Le pourcentage de structures désordonnées (random coil) (gris foncé), coudes (turn) (blanc), feuillets bêta (gris clair) et d'hélice α (noir) sont déduits des spectres de dichroïsme circulaire grâce au programme DICHROWEB.

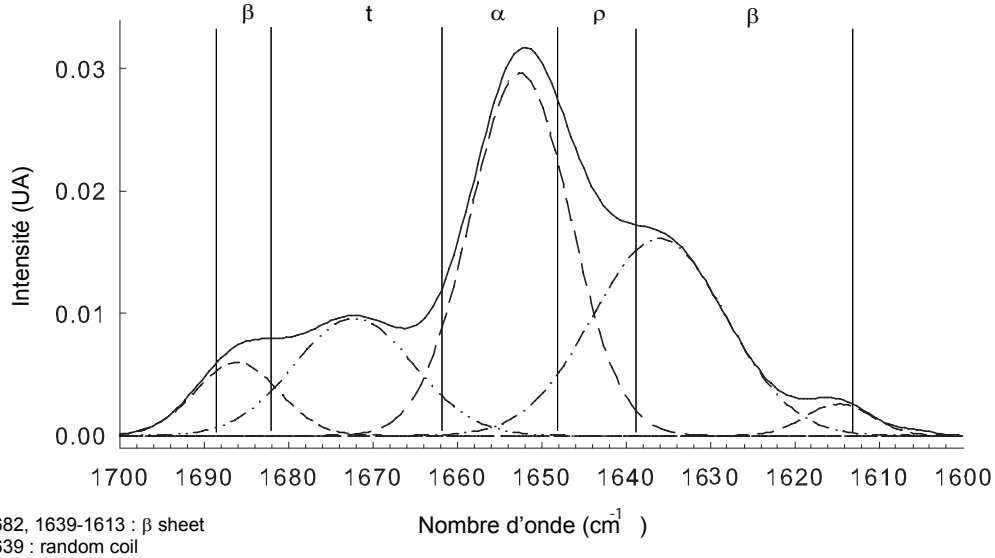
A

Bande Amide I normalisée de la LEAM à sec en spectroscopie FTIR



B

Spectre normalisé déconvolué de LEAM en solution obtenu par spectroscopie FTIR ATR



1689-1682, 1639-1613 : β sheet
1649-1639 : random coil
1662-1649 : α helix
1682-1662 : turn

Figure 24 : Spectres de la bande amide I de LEAM à l'état sec en spectroscopie FTIR.
A. Spectre obtenu en spectroscopie FTIR en transmission, ainsi que sa dérivée seconde mettant en exergue les différentes structures secondaires (hélice α à 1654 cm^{-1}, feuillet β à 1636 et 1684 cm^{-1}) présentes dans la LEAM.
B. Spectre déconvolué et normalisé obtenu en spectroscopie FTIR ATR, puis décomposé en différents pics. L'attribution des pics se fait à partir des données reportées dans Byler & Susi 1986.

d'estimer la proportion de chaque grande classe de structure secondaire composant la LEAM (Figure 23). Ainsi à l'état hydraté, 75% de la protéine est non structurée, 8% en coude, 12% en feuillet β (bêta) et 5% en hélice α. Alors qu'à l'état sec (ou TFE 70% à l'état hydraté), 70% est repliée en hélice α, 8% en feuillet β, 7% en coude et 15% reste non structuré. Ces analyses portent sur un ensemble de molécules, qui peut présenter une hétérogénéité. Il est donc probable que tous les polypeptides ne soient pas exactement dans la même conformation, et qu'il existe une proportion de protéines non structurées. Dans cette hypothèse, des polypeptides structurés pourraient l'être quasi intégralement, en accord avec les prédictions de structures secondaires obtenues (par exemple 96% avec PSIPRED).

Afin de confirmer la structuration de la LEAM en hélice lors de sa déshydratation, des spectres en FTIR et FTIR-ATR ont été acquis à sec. L'absence de pic caractéristique de l'eau, à 3500cm^{-1}, a permis de certifier l'état déshydraté des échantillons (données non montrées). La Figure 24 présente un agrandissement de la bande amide I du spectre (1700-1600cm^{-1}).

En transmission la bande amide I est représentée en un pic unique centré à 1654cm^{-1}, caractéristique des hélices α. (Figure 24A) Grâce au calcul de la dérivée seconde, deux pics supplémentaires sont révélés à 1684cm^{-1} et 1636cm^{-1} (feuillet β) (Figure 24B). L'intégration de l'ensemble des pics permet d'obtenir la répartition de structure suivante : 70% hélice α, 20 % de feuillet β, 10% de coude, ce qui est globalement conforme à ce qui a été trouvé en CD.

Des résultats similaires sont obtenus en spectroscopie FTIR-ATR, avec un déplacement du pic de 1648 cm^{-1} (random coil) à l'état hydraté (pour rappel Figure 13B) vers 1652 cm^{-1} (hélice α) à l'état sec (Figure 24B).

Il n'a malheureusement pas été possible de réhydrater l'échantillon après acquisition des spectres afin de montrer la réversibilité du phénomène. En effet la protéine est en partie adsorbée sur le cristal du spectromètre FTIR ATR, et en transmission le dispositif ne permet pas l'acquisition de spectre à partir d'échantillons hydratés.

Les analyses spectroscopiques (CD, FTIR) démontrent que la LEAM est désordonnée en solution, mais majoritairement structurée en hélice α à sec. Cette dualité explique l'apparente contradiction des prédictions de structures in silico.

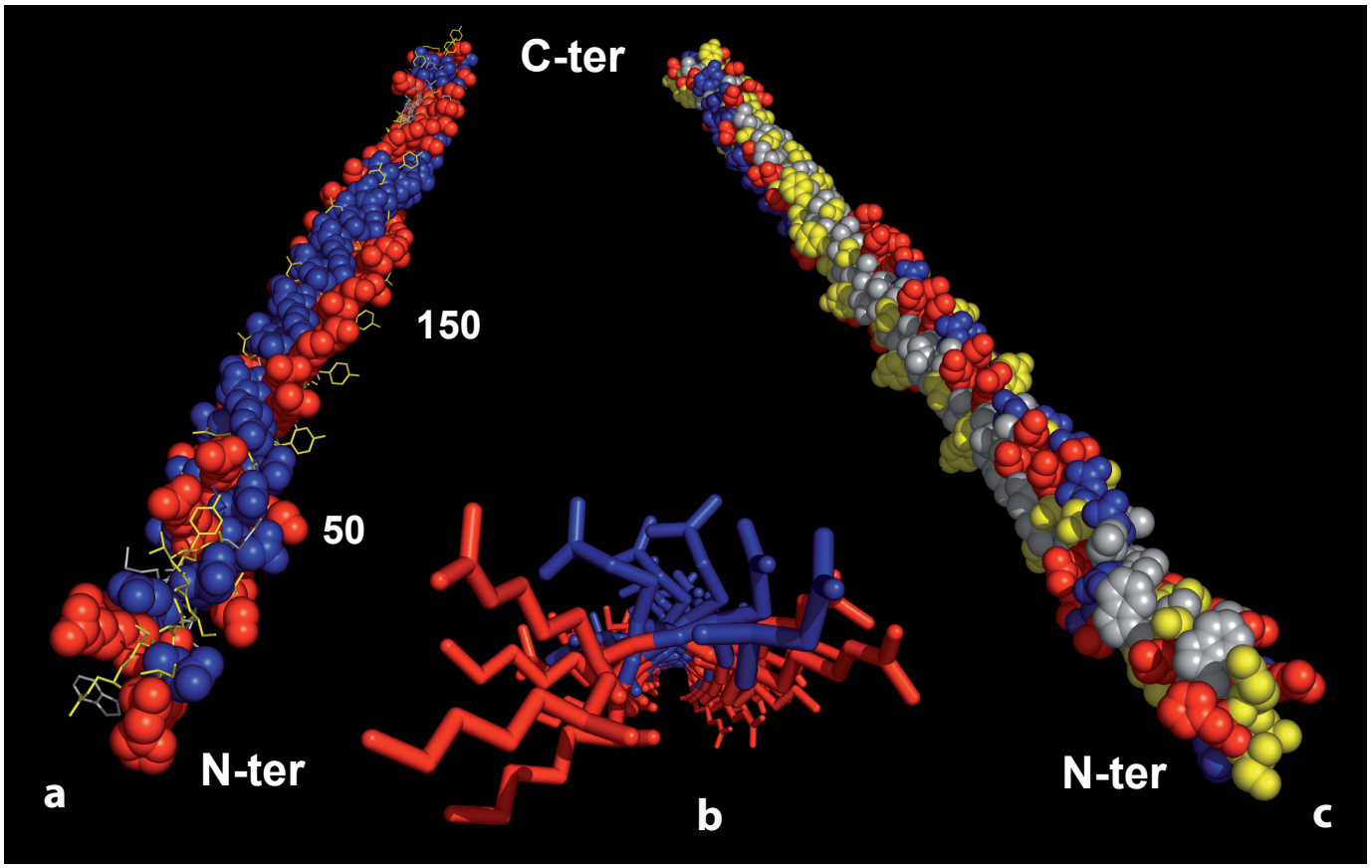
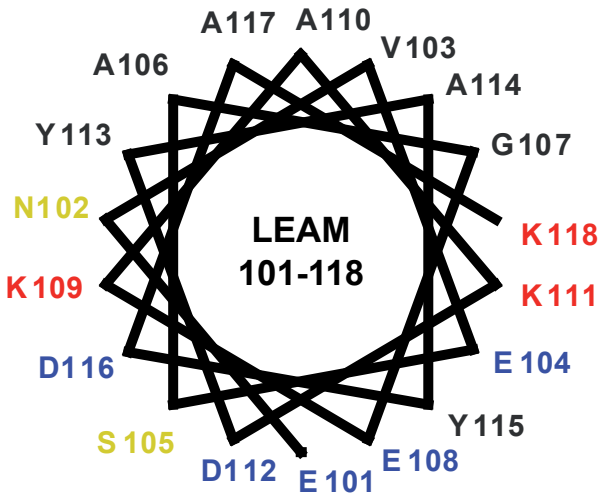


Figure 25 : Modélisation en hélice α de LEAM.
(**a**) **et** (**c**) Modélisation réalisée avec le programme Swiss-PDB Viewer, avec pour référence une filamine (PDB accession 1GK7). Les acides aminés chargés sont en bleu pour les basiques (K,R) ou rouge pour les acides (D,E), les polaires ou hydrophiles (N, S, T, Y, Q) sont en jaune, les non polaires ou hydrophobes (W, A, G, V) sont en gris. Une vue est proposée avec seulement les résidus chargés en mode globulaire (**a**), l'autre avec tous les résidus en mode globulaire (**c**). Une vue de face de l'hélice entre les résidus 50 et 150 est donnée en **b**. Ne sont figurés que les acides aminés chargés avec la même convention que précedemment. Cette image a été créée via PyMol software (DeLano, W.L. The PyMOL Molecular Graphics System (2002), disponible en ligne sur http://www.pymol.org)



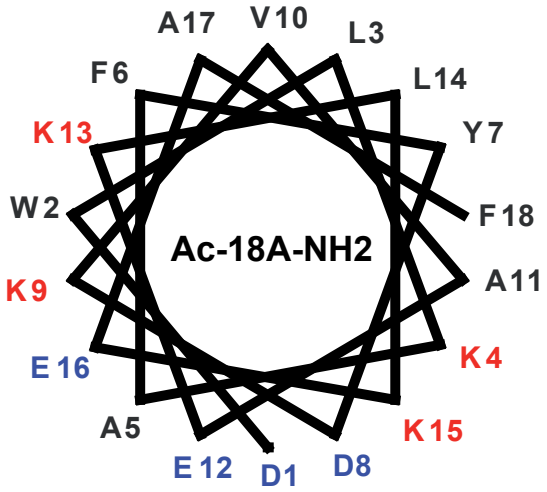


Figure 26 : Projection axiale d'un peptide de LEAM (17 a.a.) et de Ac-18A-NH2 via le programme WinPep (Hennig 1999).
Les codes couleurs sont les suivants : Les résidus chargés sont en rouge et bleu respectivement pour les positifs et les négatifs. Les résidus polaires sont marqués en vert et les résidus non polaires en noir. Ac-18A-NH2 est décrit comme étant un peptide à hélice amphiphile de classe A (Hrsitova et al., 1999)

Modèle structural de la LEAM

Modélisation tridimensionnelle

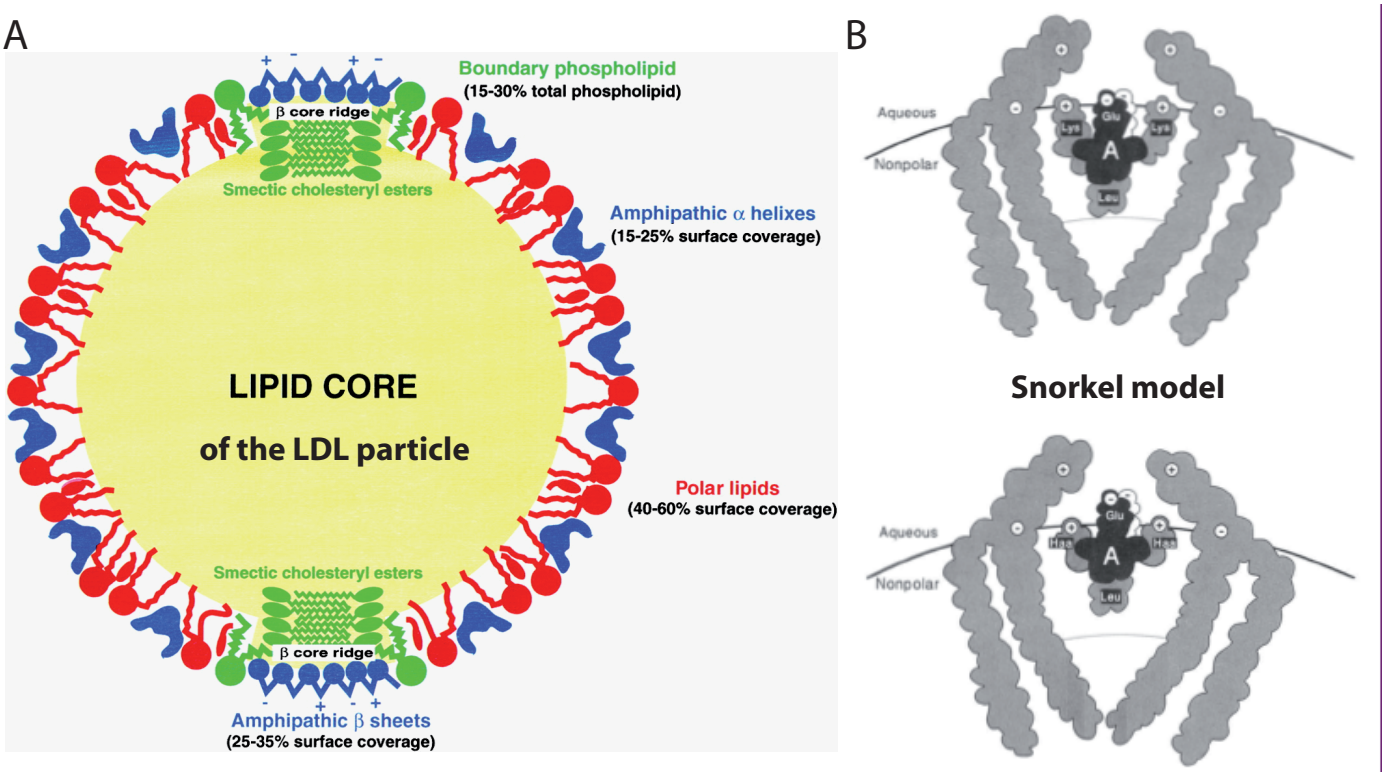
Afin d'appréhender la conformation tridimensionnelle de la LEAM nous avons entrepris de modéliser *in silico* la LEAM à l'aide du programme Swiss-PDB Viewer, en prenant comme référence une protéine composée essentiellement d'hélice α, la filamine (PDB accession 1GK7). La LEAM a été modélisée sous la forme d'une longue hélice amphiphile (Figure 25a, c) présentant une disposition particulière des résidus chargés sur la face hydrophile de l'hélice. En effet, sur ce modèle les résidus chargés négativement forment une crête située perpendiculairement à l'interface hydrophile/hydrophobe de l'hélice (Figure 25a, b, c). Les résidus chargés positivement sont regroupés en deux crêtes situées de part et d'autre de la crête positive », dans le plan de l'interface (Figure 25b). Cet arrangement des résidus chargés est respecté sur toute la longueur de la protéine, avec cependant plusieurs effets de torsion (« twist ») de l'alignement (Figure 25a, c).

La projection axiale d'un segment de cette hélice (ces résidus 101 à 118), grâce au logiciel Winpep (Hennig 1999), permet de mettre en évidence une forte analogie de structure avec les hélices amphiphiles de classe A, représenté ici par Ac-18A-NH2, un peptide canonique (Figure 26)

La LEAM peut donc être modélisée sous la forme d'une hélice amphiphile présentant un arrangement de classe A

Analogie avec les apolipoprotéines

Chez les mammifères, les hélices amphiphiles de classe A sont un motif structural majeur des apolipoprotéines du plasma qui recouvrent les vésicules de LDL (Low Density Lipoprotein). Ces motifs interagissent avec les phospholipides de l'enveloppe des LDLs. Les polypeptides sont encastrés parallèlement au plan de la membrane (Segrest *et al.* 2001, Figure 27A). Les résidus chargés positivement peuvent ainsi interagir avec les groupements phosphate des phospholipides et les résidus chargés négativement avec les têtes polaires chargées positivement (comme la choline), tandis que les résidus apolaires interagissent avec les chaînes



Segrest et al (2001) J. Lipid Res. 42, 1346 1367 Mishra et al. (1994) J. Biol Chem. 269, 7185-7191

Cas des apolipoprotéines de classe A

Figure 27 : Modèle d'interactions d'hélices amphiphiles de classe A avec des phospholipides disposées en mono ou bi-couche.
A. Modèle des apolipoprotéines de classe A des LDL (Low Density Lipoprotein) décrit par Segrest et al. (2001). **B**. Proposition de placement des apolipoprotéines de classe a dans la membrane : le modèle Snorkel montrant une interaction des résidus chargés positivement de la protéine avec les groupements phosphate des phospholipides, et les résidus chargés négativement avec les têtes polaires potentiellement positives.

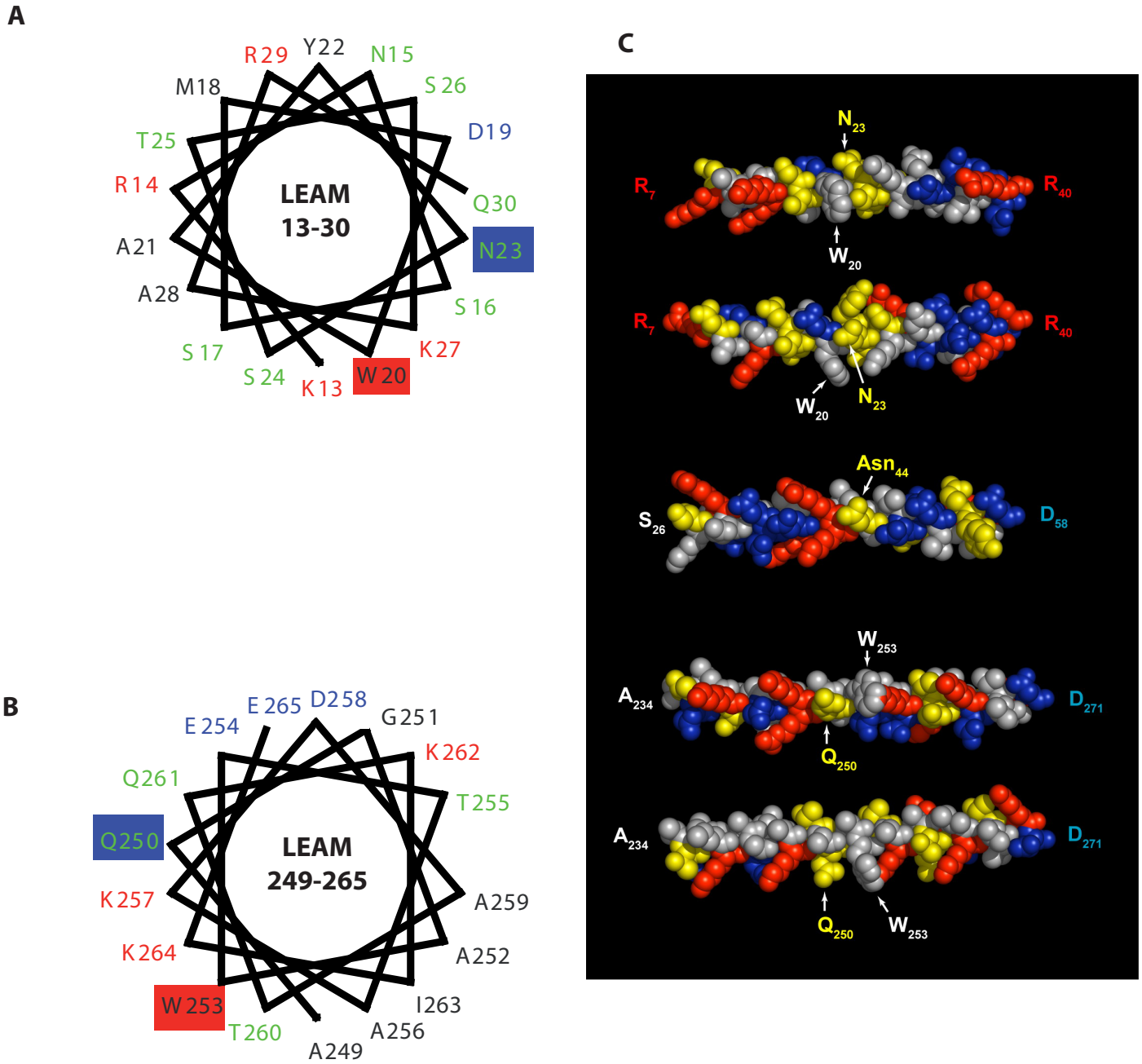


Figure 28 : Impact des modifications post-traductionnelles sur la structures prévisionnelles de la LEAM.

A, B :Projection axiale d'un peptide de LEAM (17 a.a.) et de Ac-18A-NH2 via le programme WinPep (Hennig 1999). Les codes couleurs sont les suivants : Les résidus chargés sont en rouge et bleu respectivement pour les positifs et les négatifs. Les résidus polaires sont marqués en vert et les résidus non polaires en noir. Les cadres bleu et rouge marquent le changement de charge des résidus après modification post-traductionnelle, respectivement en charge négative et positive.

C : Modélisation réalisée avec le programme Swiss-PDB Viewer, en ayant pour référence une filamine (PDB accession 1GK7). Les acides aminés chargés sont en bleu pour les basiques (K,R) ou rouge pour les acides (D,E), les polaires ou hydrophiles (N, S, T, Y, Q) sont en jaune, les non polaires ou hydrophobes (W, A, G, V) sont en gris.

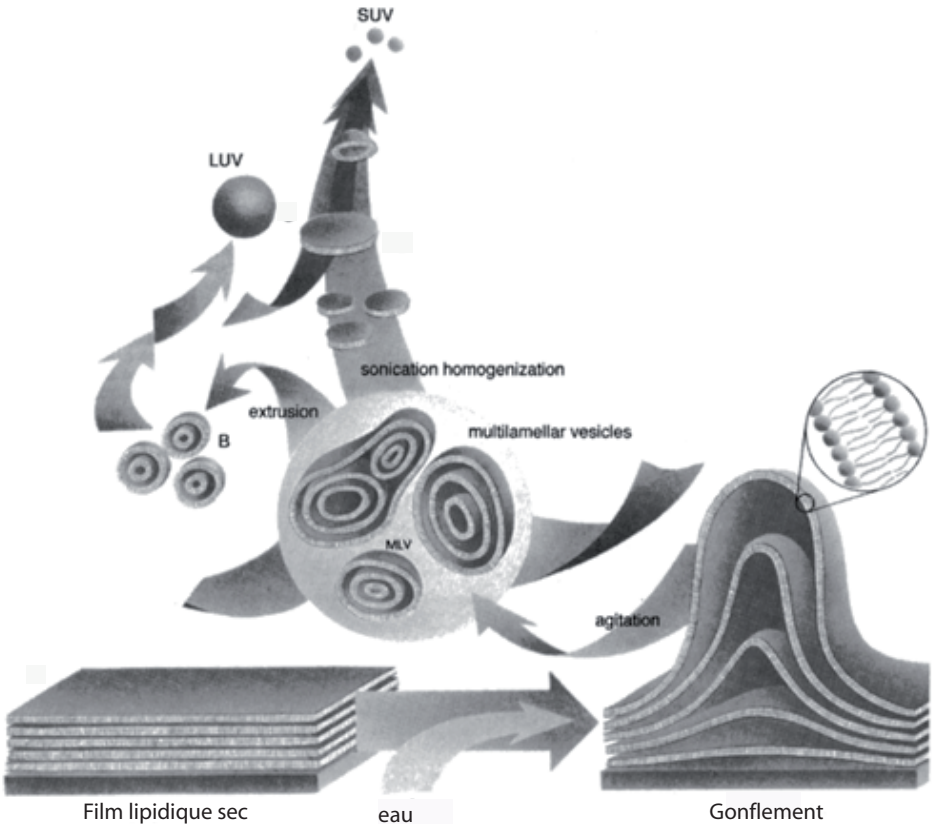
aliphatiques (Figure 27B) (Mishra et al. 1994). Cette complémentarité structurale entre les hélices de classe A et le feuillet lipidique permet de positionner les apolipoprotéines dans les membranes, à une profondeur qui peut dépendre de la longueur des chaînes latérales des résidus chargés positivement (Mishra *et al.* 1994, Figure 27B).

Lorsque la LEAM est structurée, sa structure en hélice rappelle celle des apolipoprotéines (Figure 26) ce qui suggérerait une possible interaction avec les membranes, à l'état déshydraté.

Impact des modifications post-traductionnelles sur la structure

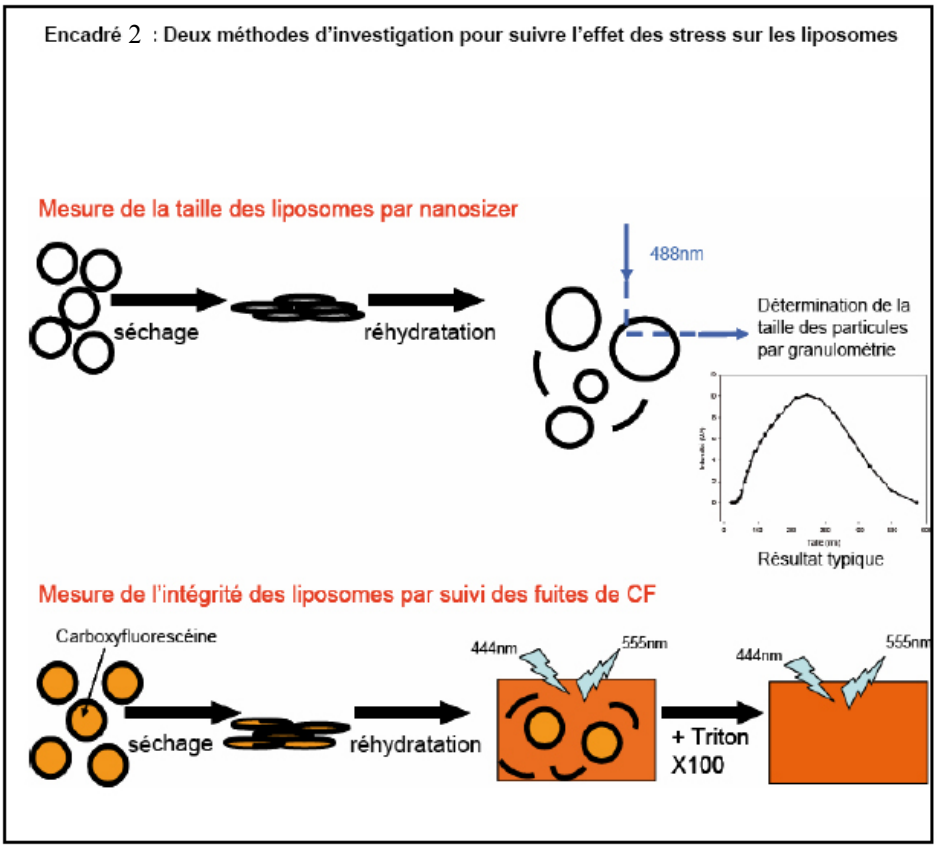
La simulation des modifications post-traductionnelles (qui ont été présentées précédemment) sur le modèle structural de la LEAM permet de mettre en exergue leur impact sur les répartitions de charge et ainsi leurs possibles intérêts fonctionnels. En effet, l'oxydation du Trp20 en kynurenine et la déamidation de l'Asn23 permettent l'introduction respectivement d'une charge positive et d'une charge négative qui viennent renforcer l'alignement de charge (Figure 28A, C). L'alignement de quatre lysines (Lys239, 246, 257, 264), chargées positivement, est perturbé par le résidu Trp253, qui est en fait modifié en kynurenine, restaurant ainsi une charge positive dans l'alignement (Figure 28B, C). La déamidation du résidu Gln250 renforce la séquence négative dans laquelle il se trouve. La modification de l'Asn44 en résidu chargé négativement permet une meilleure intégration dans la série de résidus asparagine (Asp33, 37, 48, 51, 58) (Figure 28C). Il est à noter que les modifications des tryptophanes sont couplées spatialement à la déamidation de résidus se situant à +/- trois résidus particulièrement proches dans l'hélice (Figure 28C).

L'ensemble de ses modifications, intrinsèques et spontanées, pourrait donc contribuer au maintien des propriétés structurales de la LEAM



D'après http://www.avantilipids.com/PreparationOfLiposomes.html

Figure 29 : Schéma de formation des différentes classes de liposomes : MLV (MultiLamellar Vesicles), SUV (Small Unilamellar Vesicles) et LUV (Large Unilamellar Vesicles).



Les interactions de la LEAM avec les membranes et leurs conséquences

Protection des liposomes

Afin d'examiner d'éventuelles interactions entre la LEAM et les membranes, nous avons décidé d'utiliser des liposomes comme modèles de bi-couches lipidiques mimant les membranes biologiques. Les liposomes sont des vésicules sphériques de quelques dizaines à quelques milliers de nm de diamètre. Ces vésicules sont composées d'une ou de plusieurs bicouches lipidiques qui permet(tent) de séparer un milieu intravésiculaire d'un milieu extérieur. Les liposomes sont obtenus par hydratation de films phospholipidiques, suivie d'une sonication pour favoriser la génération de liposomes unilamellaires. On classe les liposomes selon leur taille et leur nombre de bicouches. On distingue les liposomes multilamellaires (MLV), les liposomes unilamellaires de petite taille (SUV) (d'un diamètre inférieur à 200nm) et les liposomes unilamellaires de grande taille (LUV) (d'un diamètre supérieur à 200nm) (Figure 29)

Caractérisation des liposomes formés. Nous avons utilisé pour nos expériences des SUV et des LUV de petite taille, fabriqués à partir d'un mélange de phospholipides, le lipoïd75, composé de 75% de Phosphatidylcholine (PC), de 15% de Phosphatidylethanolamine (PE), et de 10% de phospholipides divers.

Afin de caractériser au mieux les préparations, des observations ont été réalisées en Microscopie Electronique à Transmission (MET), ainsi que des mesures de tailles par diffraction de la lumière grâce à un Nanosizer.

Les liposomes préparés ont été observés au MET, après une coloration négative à l'acétate d'uranyle. Les particules sphériques ont un diamètre compris entre 100 nm et 400 nm, avec une représentation plus forte des particules d'environ 250 nm de diamètre. Un exemple significatif est donné dans la Figure 30A. Afin de s'assurer que le traitement permettant l'observation au MET n'a pas eu d'incidence sur la taille des liposomes, une expérience en cryomicroscopie a été réalisée avec le concours du Dr Cedric Gaillard de l'INRA de Nantes. La technique de cryoMET permet de figer les objets par une congélation instantanée, et ainsi de conserver les structures initiales lors de l'étape de déshydratation

Image de liposomes aquise aux Microscope Electronique à Transmission (MET)

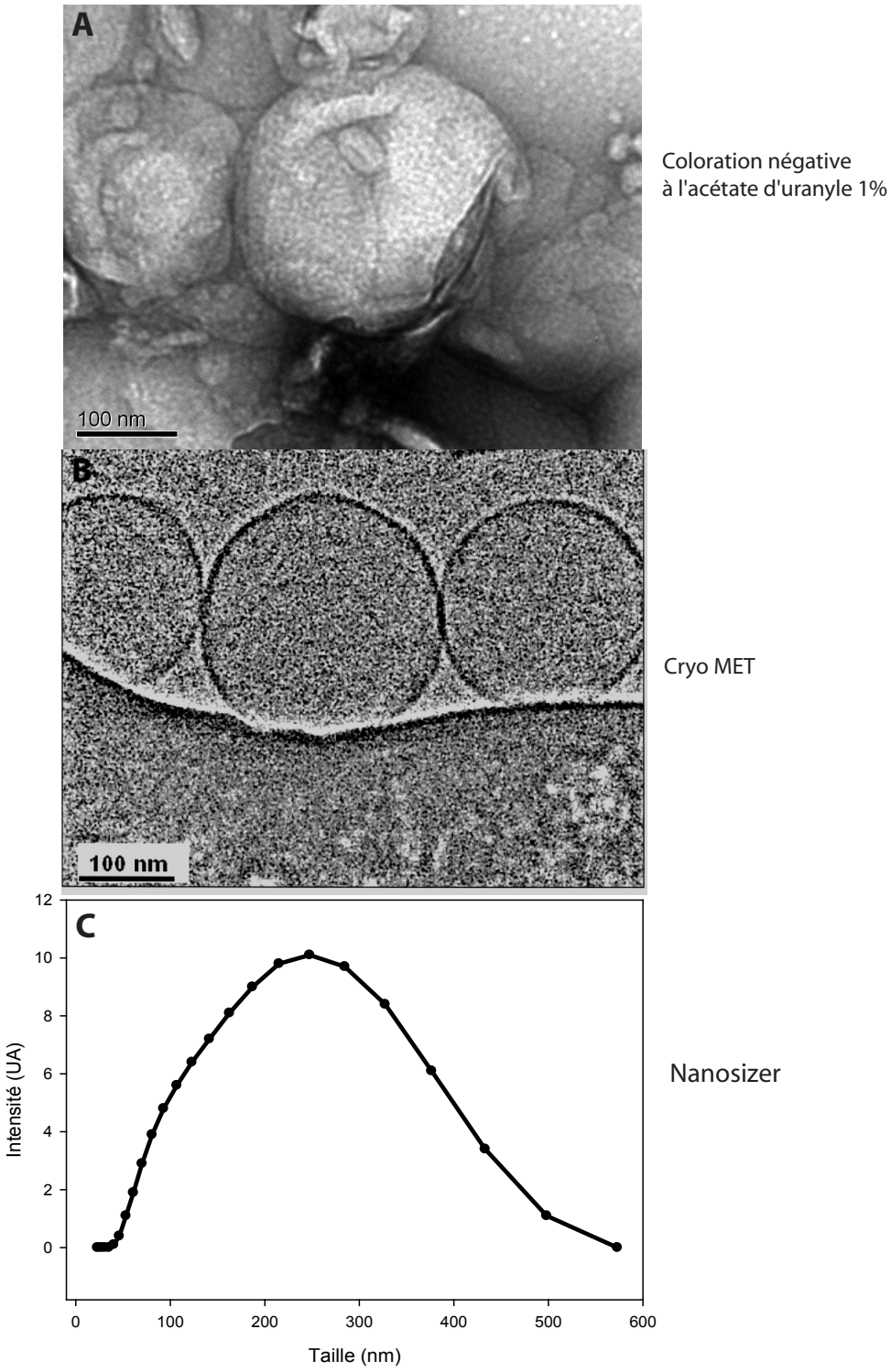


Figure 30 : Détermination de la taille des liposomes composés de lipoid75.
Les deux méthodes de microscopie électronique à transmission (la coloration négative à l'acétate d'uranyle, et la cryoMET) permettent de valider les résultats obtenus avec le Nanosizer (basé sur une méthode de diffraction de la lumière).

nécessaire à l'observation en MET. Cette technique a permis de visualiser également des particules sphériques de 100 à 300 nm, avec une plus forte représentation des vésicules d'environ 200 nm de diamètre (figure 30B).
La mesure de la taille des liposomes au Nanosizer montre une répartition gaussienne centrée sur 250 nm (Figure 30C).
Les résultats obtenus au Nanosizer sont en adéquations avec les observations directes des liposomes faites en microscopie. La population de liposomes est homogène, avec un diamètre moyen de 250 nm.

Effet de la LEAM sur la taille des liposomes lors d'un stress de déshydratation/réhydratation. Le séchage et la réhydratation de liposomes provoquent des réarrangements sous forme de ruptures et de fusions des membranes, ce qui a pour conséquence l'augmentation de leur taille (Hincha et al. 2002).
Lorsque l'on applique un tel traitement (séchage-réhydratation) à nos préparations de liposomes, il y a formation de deux populations, l'une composée de liposomes avec un diamètre de l'ordre du micromètre, et l'autre, de liposomes avec un diamètre de l'ordre de la dizaine de micromètre (Figure 31 ; voir Encadré 2).
Lorsque les liposomes sont desséchés et réhydratés en présence de la LEAM (100µg de protéine/600µg de liposomes), la moitié des vésicules conservent leur taille initiale (200nm), tandis que l'autre moitié voit sa taille augmenter, mais de façon moindre qu'en l'absence de la protéine (Figure 31A). Cet effet est dose-dépendant. En effet 25 µg de LEAM ajouté au 600µg de liposomes de cette expérience (soit un ratio en masse protéine:lipide de 1:24) permet uniquement d'augmenter la proportion de vésicules faiblement endommagées (600 nm de diamètre). Avec un ratio de 1:12 (soit 50µg de protéine), on a clairement trois populations : une intacte (40%), une faiblement endommagée (48%), et une dernière très affectée (12%) (Figure 31A). Afin de vérifier que cet effet protecteur soit bien imputable à la LEAM et non au simple fait de l'ajout d'une macromolécule, la même expérience a été réalisée avec le lysozyme. Cette protéine interagit faiblement avec les membranes, mais uniquement au niveau des phospholipides non chargés (Pap et al. 1996), ce qui n'est pas le cas des

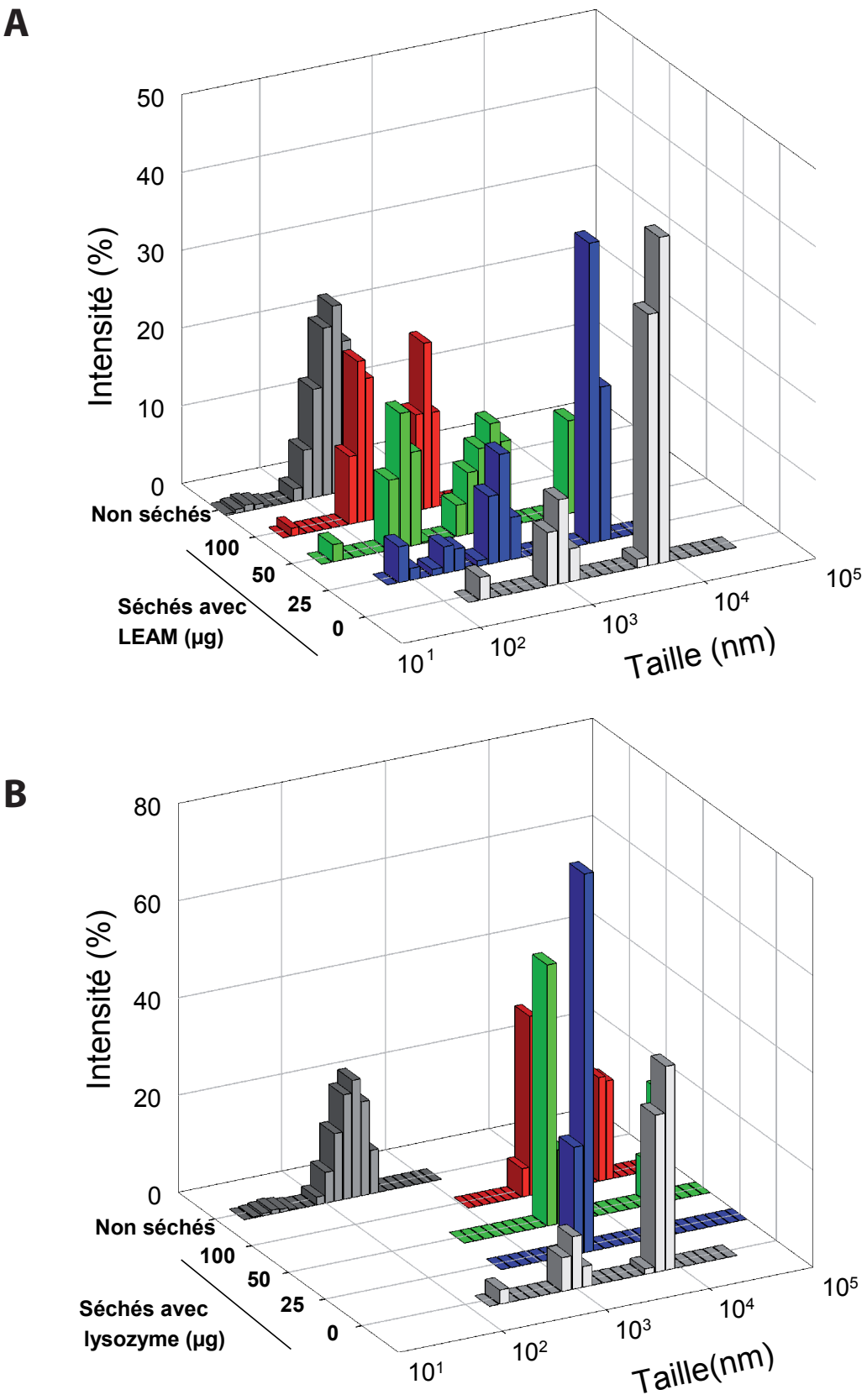


Figure 31 : Protection des liposomes contre les effets de la déshydratation (visualisation par la taille).

Les histogrammes représentent la distribution de taille des liposomes (600 µg) composés de Lipoïd75. En gris sont représentées les tailles de liposomes avant séchage, en blanc, bleu, vert, rouge, les tailles des liposomes après séchage (et réhydratation avec de l'eau pure) avec une quantité croissante (respectivement 0, 25, 50, 100 µg) de LEAM pour le graphe du haut et de lysozyme pour le graphe du bas.

phospholipides composant les liposomes utilisés. En outre, sa structure est peu sensible à la déshydratation (Nagendra et al. 1998). Le lysozyme a donc été retenu comme contrôle négatif dans nos expériences ultérieures. Bien que le lysozyme (14,4 kDa) ait une masse moléculaire plus faible (2,5 fois) que la LEAM, des quantités équivalentes en masse de LEAM et de lysozyme ont été utilisées, car dans ces conditions, le nombre total de résidus est identique pour les deux protéines.

Quelque soit la quantité de lysozyme ajoutée, les liposomes sont endommagés par le séchage et la réhydratation (Figure 31B). Des expériences ont montré que l'ajout de molécules, qui constituent des impuretés, dans une suspension de liposomes induit une fragilisation accrue de ceux-ci lors du séchage (Golovina et al., 1998). Il est donc probable que le lysozyme ajouté dans cette expérience se comporte comme une impureté dans la suspension de liposomes.

Ces expériences montrent que la LEAM, ajoutée dans le milieu extérieur, permet de protéger les liposomes des effets de la déshydratation

Il aurait été intéressant d'introduire la LEAM à l'intérieur des liposomes pour évaluer l'importance de l'effet de la courbure concave ou convexe de la membrane. Cela aurait également permis de voir si une meilleure protection pouvait être obtenue avec la LEAM présente à l'intérieur et à l'extérieur des liposomes. Malheureusement, le rendement d'incorporation des protéines dans les liposomes est trop faible (de l'ordre de 1%) pour que ces expériences soient envisageables compte tenu de nos capacités actuelles de production de la LEAM.

Effet sur le réarrangement des liposomes lors d'un stress de déshydratation/réhydratation. Nous avons cherché à confirmer ces résultats grâce à une méthode de quantification des fuites (« leakage ») du milieu intravésiculaire mis au point par le laboratoire du Dr Dirk Hincha au Max Planck Institute de Golm (Potsdam, Allemagne). Le principe de cette méthode est de suivre le relarguage d'un composé fluorescent, la carboxyfluoresceine (CF), du milieu intravésiculaire (voir Encadré 2). La CF est incorporée dans les liposomes à une concentration telle qu'elle provoque une auto-extinction de sa fluorescence. Si un réarrangement des membranes intervient, la CF va s'échapper de l'intérieur vers

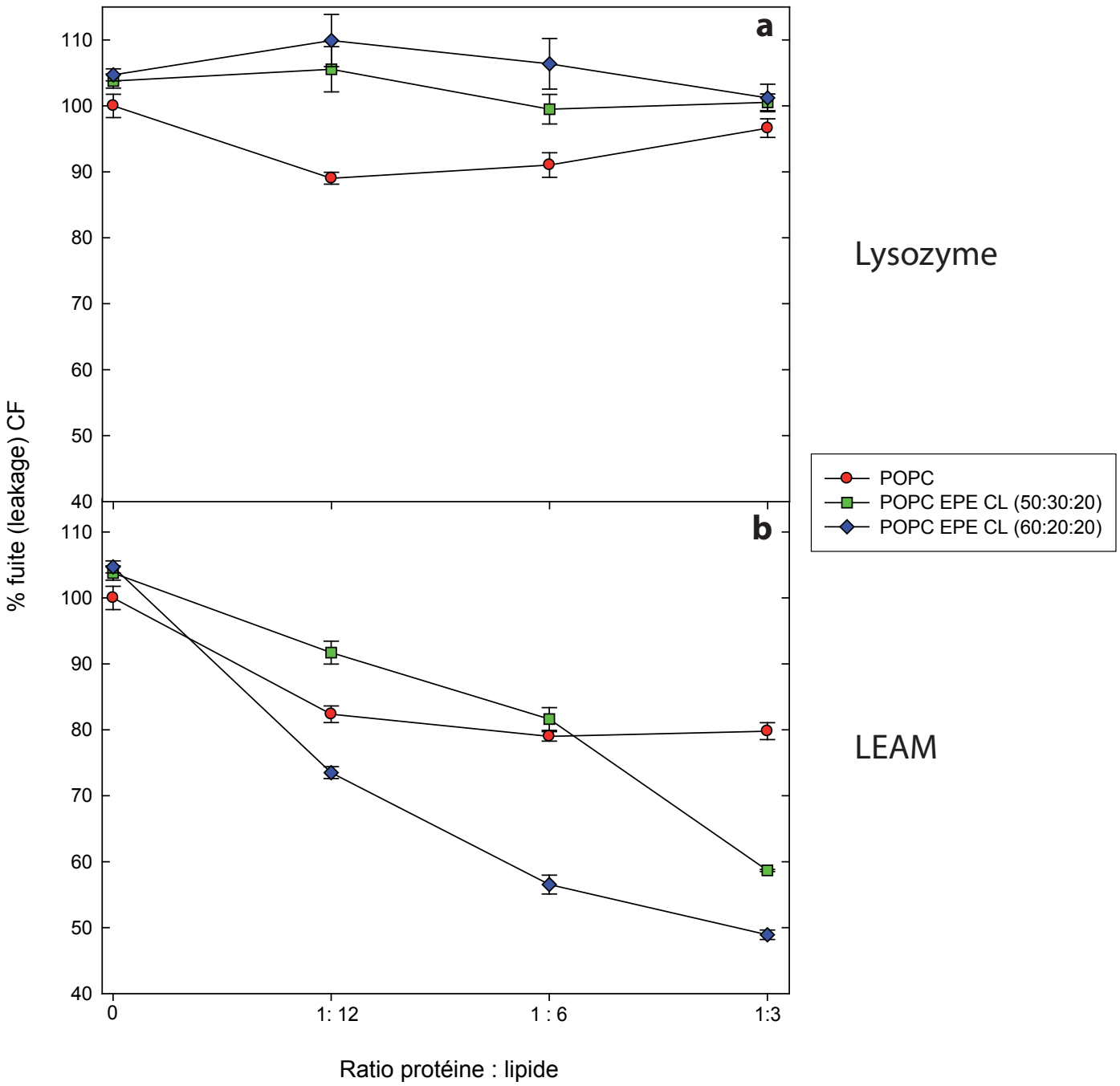


Figure 32 : Protection des liposomes contre les effets de la déshydratation (visualisation par les fuites de fluorophore).
Les fuites de CarboxyFluoresceine (CF) sont déterminées après séchage à l'air puis réhydratation. Les échantillons contiennent les proportions de protéines indiquées sur le graphique (Lysozyme pour le panneau du haut, LEAM pour le panneau du bas). Les liposomes ont différentes compositions lipidiques. Cercle rouge, POPC ; carré vert, POPC EPE CL (50 :30 :20) (composition mimant la mitochondrie d'epicotyle) ; losange bleu, POPC EPE CL (60 :20 :20) (composition mimant la mitochondrie de graine). (POPC : Palmitoyl Oleoyl PhosphatidylCholine ; EPE : egg Phosphatidylethanolamine -mélange d'acide gras- ; CL : Cardiolipide).

le milieu extérieur. Elle est alors facilement détectable et quantifiable par fluorescence dans le milieu extérieur où sa concentration est largement inférieure au seuil d'auto-extinction de la fluorescence. L'incorporation de la CF dans les liposomes lors de leur préparation n'étant pas toujours reproductible, les valeurs de fluorescence sont normalisées par la valeur maximale de fluorescence obtenue en lysant tous les liposomes grâce à un détergent, le Triton X100.

Avec des liposomes composés exclusivement de POPC (palmitoyl-oleyl-sn-phosphatidyl-choline), les fuites de CF en présence de LEAM lors d'une déshydratation-réhydratation sont d'environ 80% alors qu'elles sont de 100% avec le lysozyme (Figure 32). La LEAM est donc capable de protéger 20% des liposomes, ce qui est significatif, mais plus faible que les 50% de protection obtenue avec la méthode de mesure de la taille des liposomes (voir Figure 31). Cette divergence peut probablement s'expliquer par la différence de composition lipidique des liposomes. En effet, les liposomes utilisés pour les expériences au Nanosizer sont constitués d'un mélange de phospholipides (lipoid75), tandis que ceux ayant servi aux expériences de fuite de CF, sont uniquement composés de POPC. La différence de méthode d'étude de l'intégrité des liposomes peut également avoir une influence sur ces résultats.

Les expériences de « leakage » confirment les résultats obtenus grâce aux mesures de la taille des liposomes, à savoir une capacité de protection de la LEAM vis-à-vis de la dessiccation des liposomes..

Les membranes biologiques sont composées de différents phospholipides dont la nature et la composition varie avec le type de membrane. Par exemple la composition lipidique des mitochondries de graines de pois, dans lesquelles s'accumule la LEAM, est différente de celle des mitochondries d'épicotyle, deficientes en LEAM. Si l'on ne s'attache qu'aux différences au niveau des têtes polaires, il y a 50% de PC, 30% de PE, et 20% de DPG (diphosphatidylglycerol ou cardiolipide, CL) dans les membranes de mitochondries d'épicotyle, contre 60% de PC, 20% de PE et 20% de CL pour les membranes de mitochondries de graines (Stupnikova et al. 2006). Des expériences de protection des liposomes contre la dessiccation ont donc été menées avec des vésicules de compositions

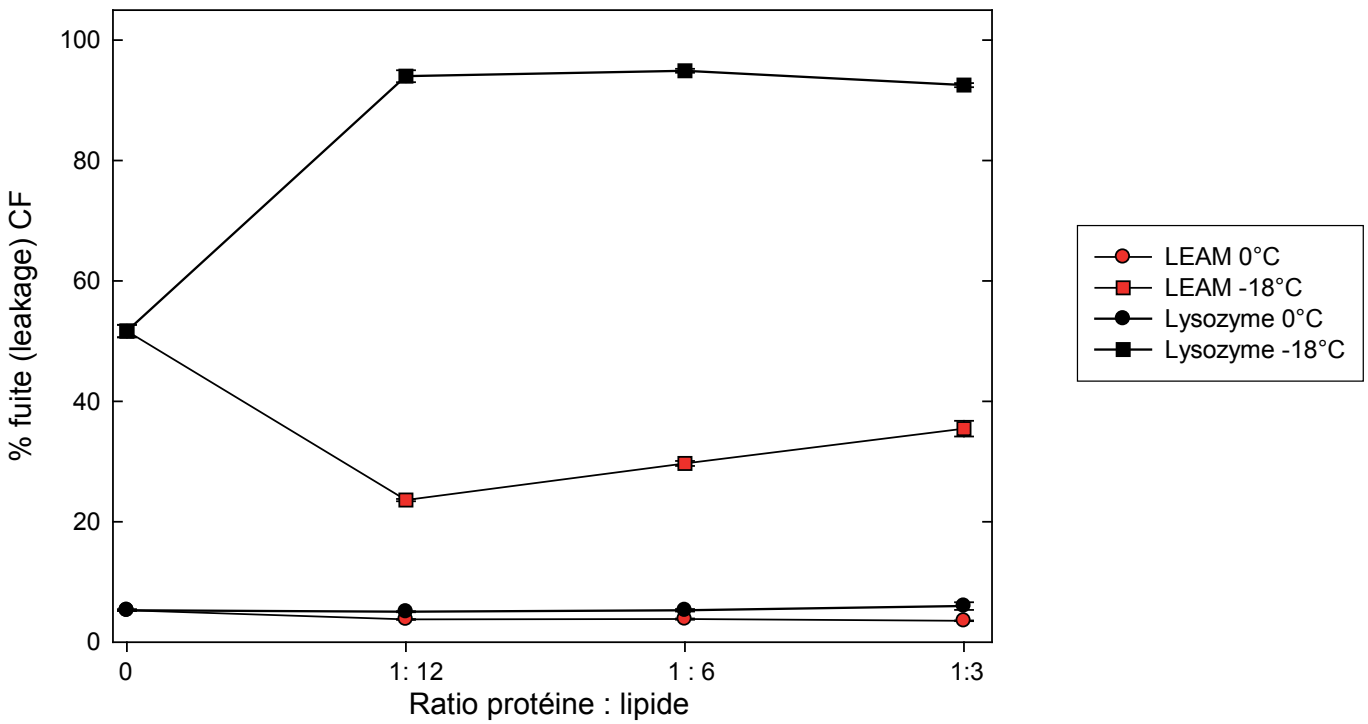


Figure 33 : Protection des liposomes contre les effets de la congélation (visualisation par les fuites de fluorophore).
Les fuites de CarboxyFluoresceine (CF) sont déterminées après passage au froid, 0°C (cercle) ou -18°C (carré) et retour à température ambiante pendant 3h. Les échantillons contiennent les proportions de protéines indiquées sur le graphique (couleur noir pour le Lysozyme, couleur rouge pour la LEAM).

rappelant celle des mitochondries de graine et d'épicotyle. La PC est représentée par un unique phospholipide, le POPC (deux acides gras différents). La PE, issue de la purification de jaune d'œuf (EPE, egg PE), est constituée d'un ensemble de phospholipides dont la tête polaire est identique, mais pour lesquels les acides gras sont totalement variables.

La composition lipidique des liposomes ne modifie pas leur sensibilité à la déshydratation-réhydratation, qu'ils soient en présence ou non de lysozyme (Figure 32a). Par contre, en présence de LEAM, l'indice de protection des liposomes augmente avec la quantité de protéine jusqu'à atteindre 50% de protection avec un ratio massique protéine:lipide de 1:3 (rapport molaire de 1:150). La protection des liposomes de type « graine » (POPC:EPE:CL 60:20:20) est toujours supérieure à celle observée pour les liposomes de type « épicotyle » (POPC:EPE:CL 50:30:20). Cet écart est maximal pour un rapport protéine:lipide de 1:6 (Figure 32b).

Il semble donc que la protection octroyée par la LEAM lors de la déshydratation-réhydratation des liposomes soit meilleure lorsque leur composition lipidique se rapproche de celle des mitochondries de graines.

Effet sur le réarrangement des liposomes lors d'un stress de congélation. Un autre effet protecteur de la LEAM a été observé lors d'expériences de congélation. Lorsque des liposomes sont congelés à -18°C pendant 3h, la moitié d'entre eux subissent des dommages, estimés grâce aux fuites de CF (Figure 33). En présence de lysozyme le pourcentage de fuite est supérieur à 95% quelque soit la quantité de protéine ajoutée. Au contraire, l'ajout de LEAM avec un ratio massique protéine:lipide de 1:12 aboutit à une protection de plus de 75% des liposomes. On constate cependant que le niveau de protection diminue légèrement lorsque la concentration en LEAM augmente fortement (Figure 33). Ce résultat pourrait illustrer le compromis entre l'effet bénéfique de l'ajout d'un agent protecteur, et l'effet néfaste dû au degré d'impureté ainsi augmenté.

En utilisant plusieurs techniques sur différents modèles de liposomes, nous avons pu mettre en évidence un effet protecteur important de la LEAM vis-à-vis de la dessiccation et de la congélation.

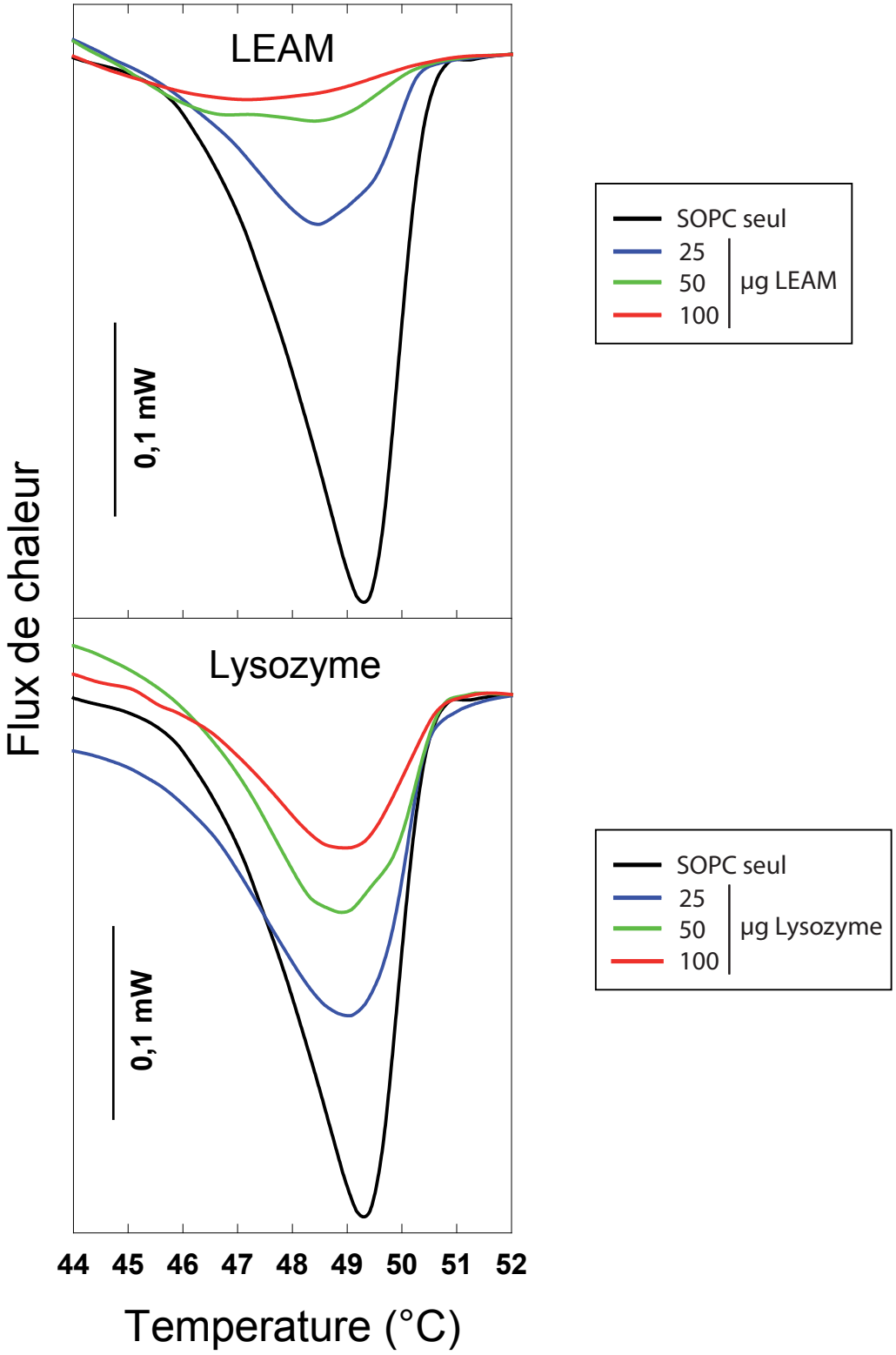


Figure 34 : Interaction avec les phospholipides visualisée en DSC (Differential Scanning Calorimetry).
Thermogramme de 380 µg de liposomes composés de SOPC, séchés avec différentes quantités de LEAM (panneau du haut) ou de Lysozyme (panneau du bas). En noir, sans protéine ; en bleu, 25 µg de protéine ; en vert 50 µg ; en rouge, 100 µg.

Interaction avec les membranes

Analyse global par DSC. Afin de mettre en évidence une interaction de la LEAM avec les membranes à l'état sec qui permettrait d'expliquer la protection par une interaction physique avec les phospholipides, nous avons eu recours à la DSC (Differential Scanning Calorimetry). Ces expériences de DSC ont été menées sur des liposomes composés uniquement de SOPC. Ce choix est justifié par la nécessité d'avoir une transition de phase nette (phospholipide unique) et qui intervienne à une température dans la gamme de mesure de l'appareil utilisé.

La température de transition des liposomes déshydratés est de 49,2°C, ce qui est conforme à ce qui est décrit dans la littérature pour le SOPC (Koster et al., 2000). L'ajout de lysozyme, même en grande quantité (100µg de protéine pour 380µg de liposomes) n'abaisse la température de transition que de 0,2°C, ce qui est négligeable (Figure 34). On constate également une diminution de l'amplitude du flux de chaleur, marquant la transition de phase. Ce phénomène est une réponse à l'augmentation de masse due à l'ajout de lysozyme (impureté) dans la population de liposomes. L'ajout de LEAM a un effet beaucoup plus drastique, décalant de 1°C la température de transition dès 25µg de protéine ajoutée (ratio massique protéine:lipide de 1:24). L'ajout de 100µg de LEAM provoque la quasi disparition du pic de transition de phase. La transition de phase ne se fait donc plus à une température donnée, mais sur une large plage de température, centrée à 47°C.

Ces expériences démontrent une nette interaction de la LEAM avec les membranes des liposomes à l'état sec.

Analyse fine de l'interaction de la LEAM avec les phospholipides. Afin de mieux caractériser les groupements chimiques pouvant intervenir dans l'interaction de la LEAM avec les phospholipides, des expériences en spectroscopie FTIR à sec ont été réalisées en Allemagne, dans l'équipe de Dirk Hincha. Cette approche nécessite de travailler avec des liposomes composés d'un seul type de phospholipide, le POPC, afin de faciliter l'interprétation des spectres.

L'analyse du spectre dans son ensemble permet de suivre l'évolution des différents groupes de liaisons chimiques composant les phospholipides (Figure

FTIR

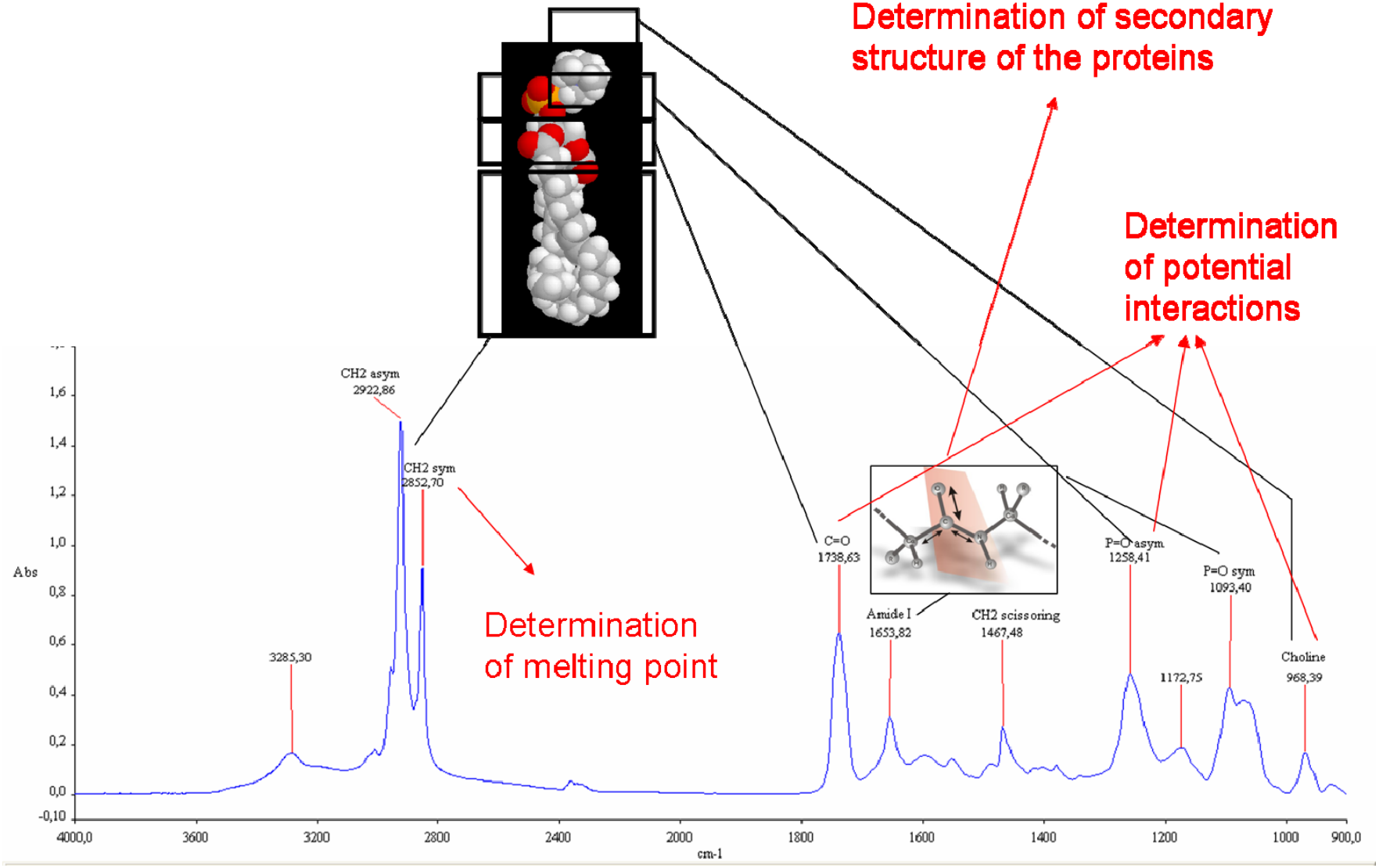


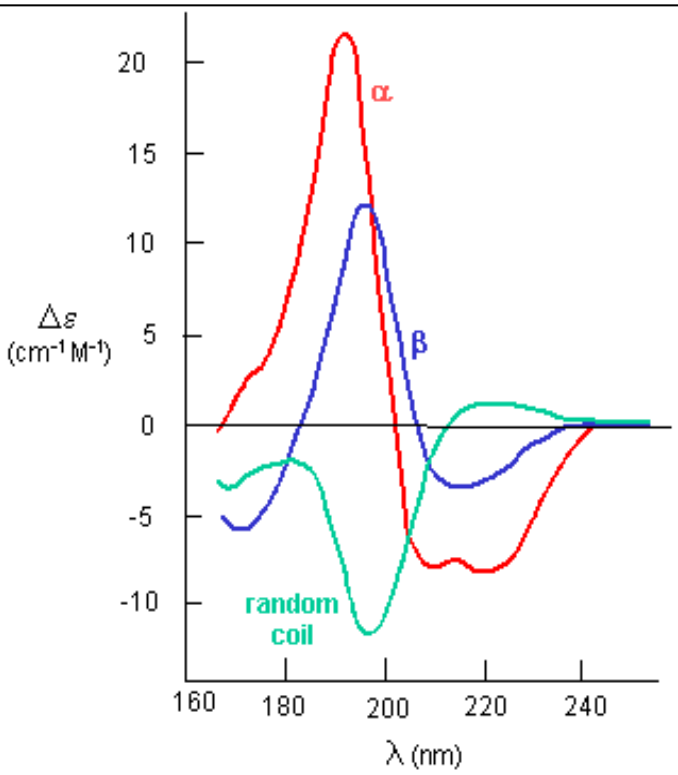
Figure 35 : Spectre commenté, obtenu en spectroscopie FTIR, de liposomes composés de POPC et mélangé à la LEAM.

Encadré 3 : Principe du CD et de la FTIR

Dichroïsme circulaire

Les aa présentent une activité optique, c'est-à-dire qu'elle interagit différemment avec la lumière polarisée circulairement à gauche et à droite. Le signe et l'amplitudede l'activité optique dépendent de l'environnement local. Cette activité est détectée par l'absorption différentielle de deux faisceaux (l'un polarisé circulairement à gauche, l'autre circulairement à droite), c'est le dichroïsme circulaire. Il renseigne sur l'agencement l'agencement local des unités monomériques composant une macromolécule. Dans le cas des protéines et des peptides, les spectres DC permettent de distinguer les différents
types de structures secondaires à partir de courbes DC standards et de déterminer le pourcentage de chacune d'elles (Greenfield, Fasman, 1969)

Remarque : la traduction la plus fidèle du terme anglais, ''random coil'' est '' pelote statistique non périodique'' , mais pour des raisons de simplicité il est aussi traduit par ''désordonné''



Spectre typique en Dichroïsme circulaire (CD) d'hélice α, feuillet β et random coils

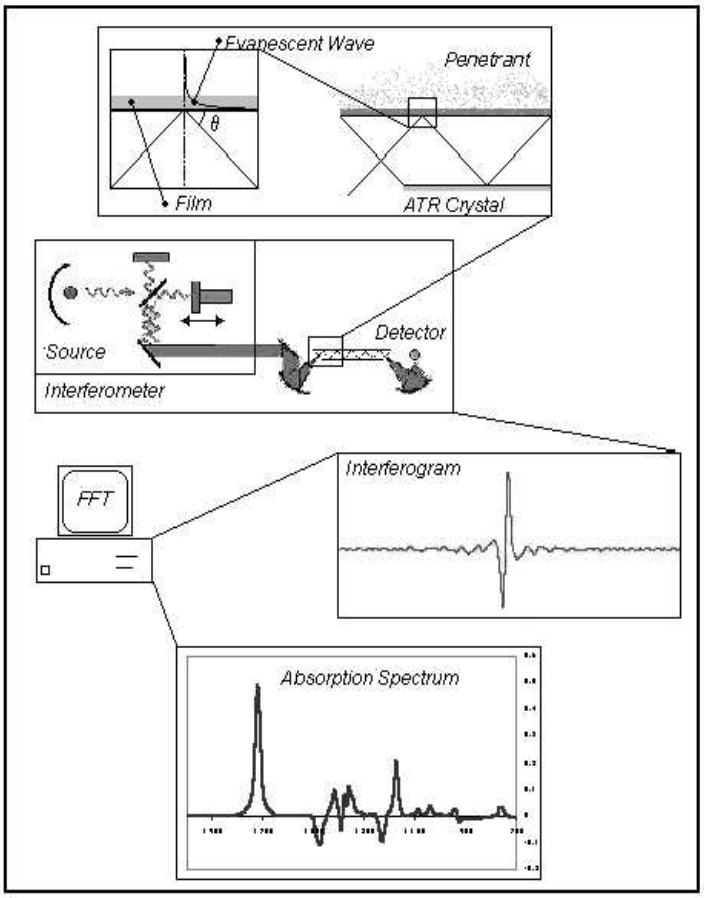
Spectroscopie FTIR (Fourrier Transformed InfraRed)

C'est en 1986 que Byler et Susi propose pour la première fois une alternative à la détermination classique (dichroïsme circulaire) des structures secondaires des protéines, par la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier. Elle est basée sur l'absorption d'un rayonnement infrarouge par le matériau analysé. Elle permet via la détection des vibrations caractéristiques des liaisons chimiques, d'effectuer l'analyse des fonctions chimiques présentes dans le matériau.

Lorsque la longueur d'onde (l'énergie) apportée par le faisceau lumineux est voisine de l'énergie de vibration de la molécule, cette dernière va absorber le rayonnement et on enregistrera une diminution de l'intensité réfléchie (pour la FTIR-ATR ; Attenuated Total Reflectance) ou transmise (FTIR en transmission). Grâce à l'interféromètre de Michelson, et au traitement mathématique par transformée de Fourier de l'interférogramme acquis, le spectre d'absorption est obtenu, comme présenté ci contre.

On a alors des informations qualitatives (caractérisation des groupements chimiques présents) et quantitatives (l'intensité de l'absorption à la longueur d'onde caractéristique est reliée à la concentration du groupe chimique responsable de l'absorption.

Par exemple La bande d'absorption amide I (1700–1600 cm^{-1}) est sensible à la force des liaisons hydrogène et, par conséquent, représente un bon moyen pour caractériser la structure secondaire des protéines



Principe de la FTIR-ATR

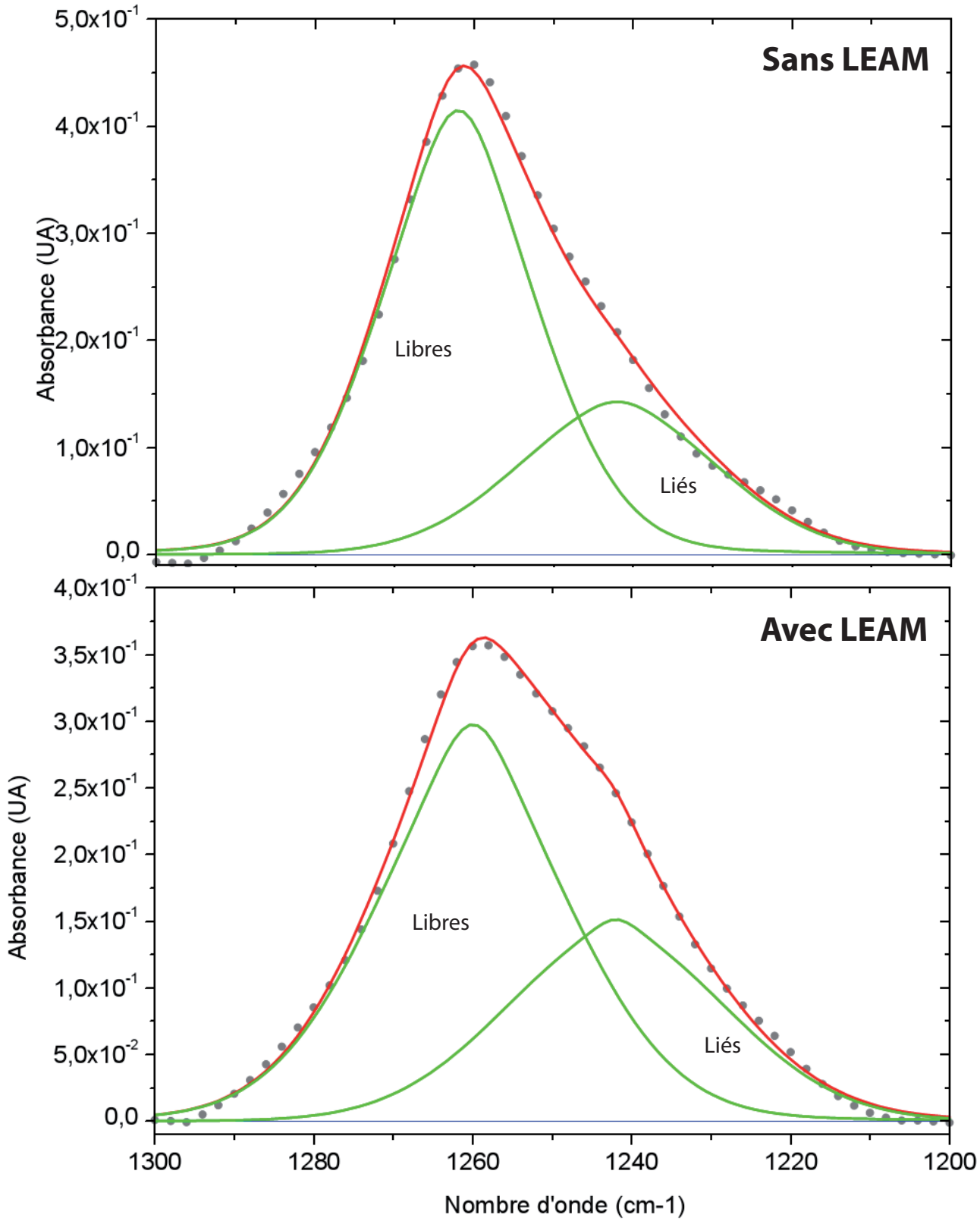


Figure 36 : Spectre Infrarouge correspondant à la zone de vibration des phosphates asymétriques (1300-1200 cm^{-1}) des liposomes composés de POPC (240µg), séchés seuls ou en présence de 30µg de LEAM.

Le spectre a été obtenu à 30°C (phase gel). La courbe en pointillée correspond aux données expérimentales, et la courbe rouge son extrapolation. Cette courbe a été décomposée en deux composantes avec des maxima à 1262 et 1242 cm-1, correspondant respectivement aux liaisons P=O libres et P=O liées. Le coefficient de corrélation des courbes est supérieur à 0,999.

35). Les effets de la LEAM ont ainsi pu être étudiés au niveau du groupement choline, du groupement phosphate, des groupements carbonyles et des CH_2 au niveau des acides gras. Il est possible en plus de suivre la conformation de la protéine via la bande amide I.

Les effets de la protéine LEAM sur les groupements choline sont non significatifs, mais cela ne permet pas d'affirmer l'absence totale d'interaction. En effet, seules des interactions fortes avec des sucres permettent de voir un léger décalage du spectre de la choline (Popova et al. 2005).

Au niveau des groupements phosphate, l'interaction est clairement visible. Le zoom sur la région des vibrations asymétriques des P=O (1300-1200 cm^{-1}) montre un épaulement de la courbe en présence de LEAM (Figure 36). Cet épaulement correspond à la vibration des P=O liés à la protéine, alors que le pic principal correspond à la vibration des P=O libres. Si l'on décompose ce spectre en deux composantes, l'une pour les P=O liées (à 1242cm^{-1}), l'autre pour les P=O libres (à 1260cm^{-1}), et que l'on intègre l'aire composant le pic on obtient 25% de P=O liés pour les liposomes seuls, contre 36% de P=O liés pour les liposomes en présence de LEAM. Sachant que la protéine n'est ajoutée que sur la face externe des liposomes, seule la moitié des phospholipides ont la possibilité d'engager une liaison avec LEAM. Donc sur la face externe environ 50% des P=O sont engagés dans une liaison, dont la moitié avec la LEAM.

D'autres protéines LEA ont également cette capacité d'interagir avec les phospholipides. Par exemple le gène codant pour ArLEA1, une protéine LEA de groupe 3, provenant *d'Adineta ricciae*, un rotifère bdelloïde tolérant à la déshydratation, existe sous la forme de deux allèles. L'un, *Ar-lea-1A,* code pour une protéine capable de protéger des protéines de l'agrégation causée par la déshydratation, tandis que l'autre, *Ar-lea-1B,* code pour une protéine s'agrégeant à sec (Pouchkina *et al.*, soumis). L'étude de leurs interactions avec les groupements phosphates des phospholipides montre que ArLEA1B interagit avec les phospholipides, contrairement à la ArLEA1A (Figure 37). Cette interaction ne confère cependant pas à la ArLEA1B une capacité de protection des liposomes vis-à-vis d'un stress de déshydratation-réhydratation (données non montrées).

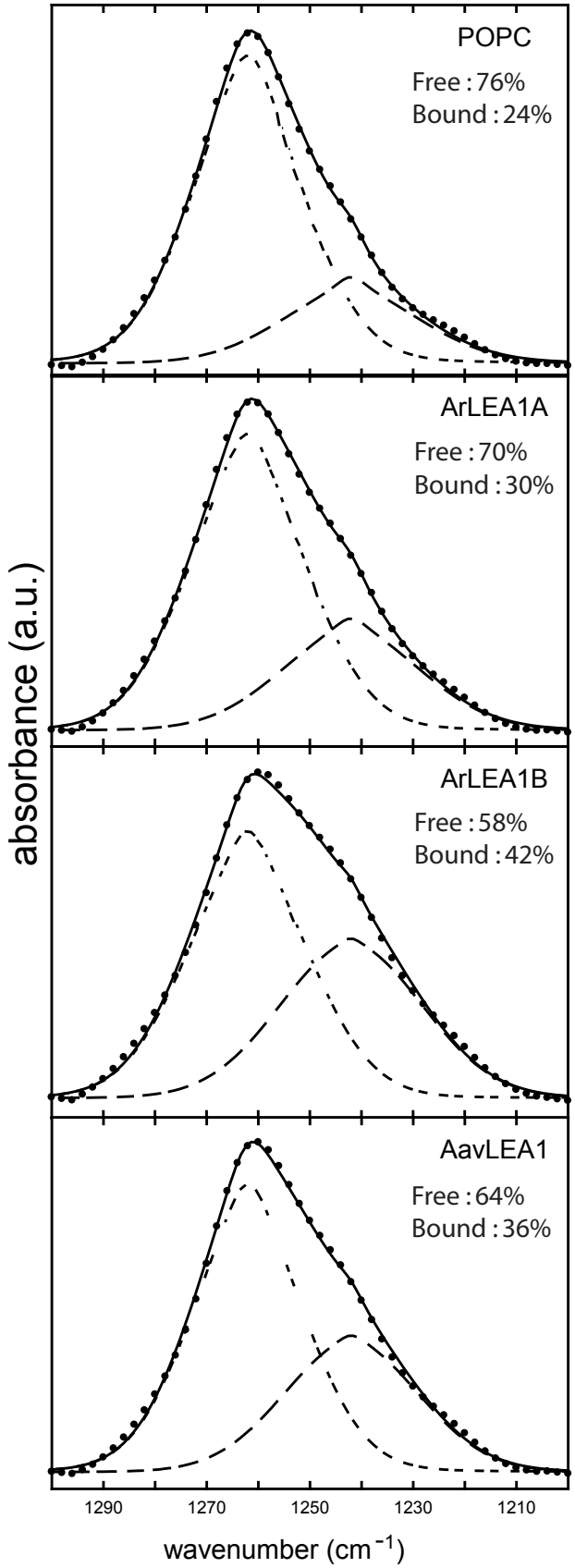


Figure 37 : Spectre Infrarouge correspondant à la zone de vibration des phosphates asymétriques (1300-1200 cm^{-1}) des liposomes composés de POPC (240µg), séchés seuls ou en présence de 30µg de ArLEA1A ou ArLEA1B ou AavLEA1 [protéine LEA du groupe 3 provenant du nématode *Aphelenchus avanae* (Browne et al. 2002 Nature)].
Le spectre a été obtenu à 78°C (phase crystal-liquide). La courbe en pointillée correspond aux données expérimentales, et la courbe en trait plein son extrapolation. Cette courbe a été décomposée en deux composantes avec des maximas à 1262 et 1242 cm-1, correspondant respectivement aux liaisons P=O libres (trait long) et P=O liées (trait court). Le coefficient de corrélation des courbes est supérieur à 0,999.

Les P=O liés intrinsèquement peuvent s'expliquer par les interactions possibles entre les groupements phosphate et le groupement choline. Afin de pouvoir comparer au mieux les P=O liés et libres, avec ou sans LEAM, il a été imposé au logiciel mathématique de trouver une composante à 1242cm^{-1} (P=O liés)pour la décomposition spectrale. Or le « fitting » est tout aussi bon avec un pic unique à 1261cm^{-1} pour le POPC seul. Il est alors difficile d'être certain que le pic trouvé à 1242cm^{-1} pour le POPC soit le reflet d'une réalité physique. Cela pose le problème du traitement mathématique des spectres et des limites de ces méthodes.

En ce qui concerne les groupements C=O, l'étude entre groupements liés et libres a été menée comme décrite par Cacela & Hincha (2006), en examinant le ratio entre la composante à 1740cm^{-1} représentant les C=O libres, et la composante à 1728cm^{-1} représentant les C=O liés. Il n'y a pas de différences significatives en présence de la LEAM (données non montrées). Cette absence de changement peut être due à une absence d'interaction de LEAM avec les groupements carbonyles des phospholipides. Mais on ne peut cependant pas exclure l'hypothèse d'interactions nouvelles avec la LEAM qui remplacent des interactions préexistantes entres phospholipides (communication personnelle avec Dirk Hincha).

L'analyse des spectres au niveau des vibrations symétriques et asymétriques des CH_2 n'a pas permis de visualiser une interaction avec la LEAM.

Pour l'ensemble de ces expériences le lysozyme, qui a été utilisé comme témoin négatif, n'a effectivement montré aucune interaction significative avec les phospholipides (données non montrées).

Ces expériences nous ont permis de démontrer l'existence d'interactions à l'état sec de la LEAM avec les groupements phosphate des phospholipides.

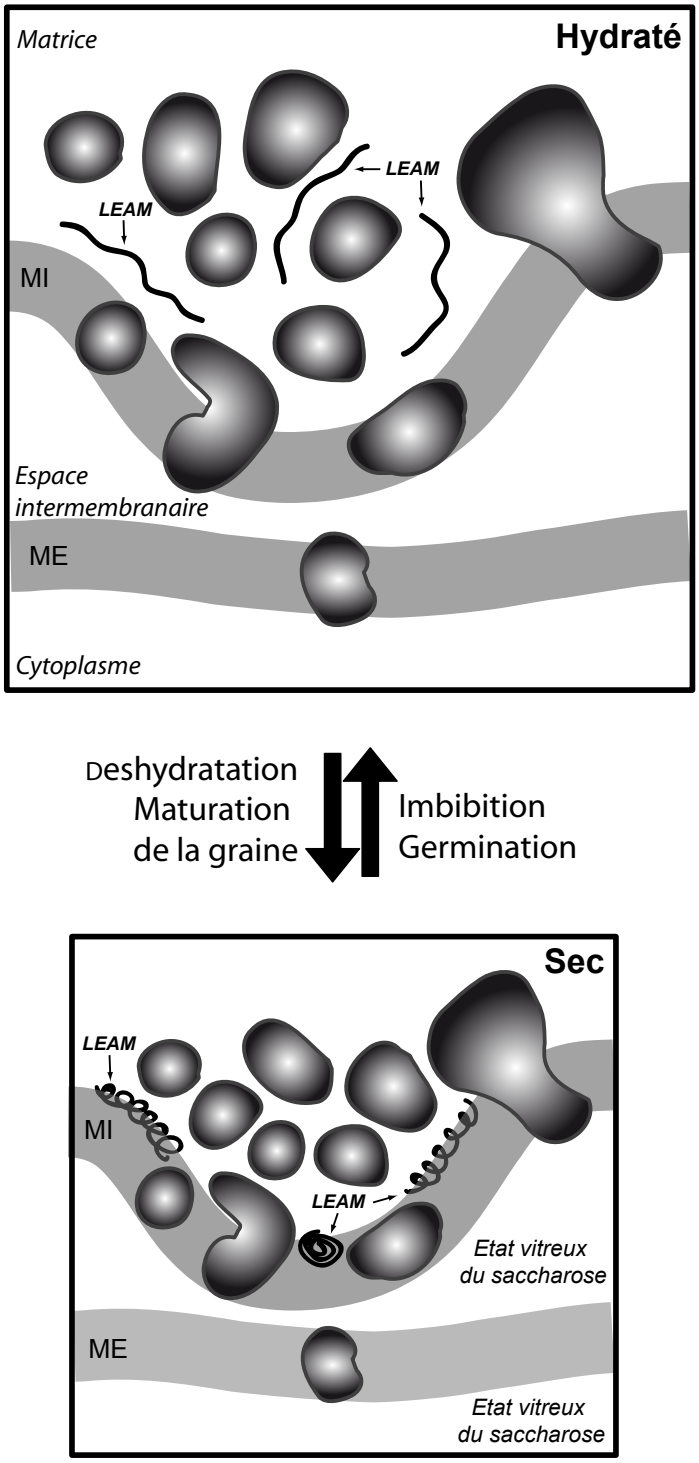


Figure 38 : Modèle du rôle probable de la LEAM dans les mitochondries de graines.

Dans la mitochondrie hydratée la LEAM, qui se trouve dans la matrice, n'a pas de structure propre (« natively unfolded »). Elle ne gène pas le fonctionnement ni des protéines matricielles ni celles de la chaine respiratoire, membranaires. Lors de la phase de déshydratation de la graine, la LEAM passe dans sa conformation en hélice amphiphile, lui permettant d'interagir avec les phospholipides. C'est ainsi qu'elle peut renforcer les régions membranaires dépourvues de protéines. Lors de l'imbibition de la graine, la LEAM reprend sa forme non structurée, retournant donc dans la matrice. La chaine de transporteur d'électrons peut donc fonctionner normalement et ainsi permettre à la mitochondrie de fournir l'énergie nécessaire à la germination.

MI : Membrane Interne ; ME : Membrane Externe

Conclusion

L'ensemble de cette étude a permis de mettre en évidence:

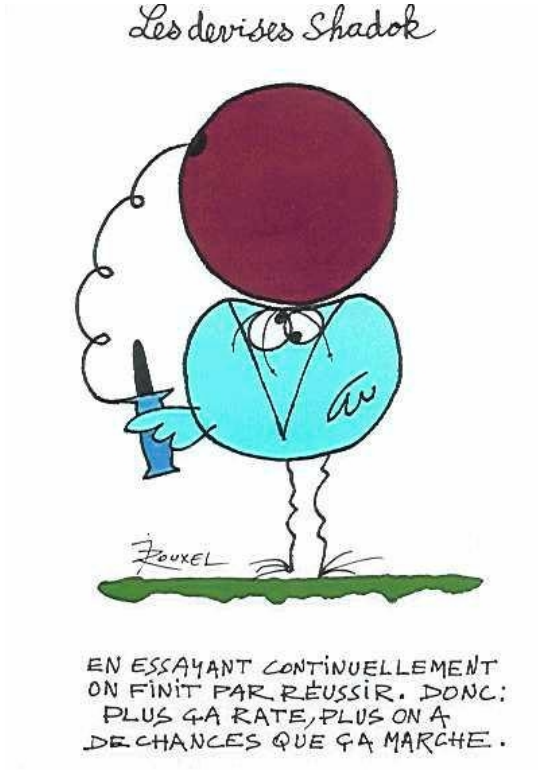
- La structuration à sec de la LEAM sous forme d'hélices amphiphiles de classe A
- L'existence d'interaction de la protéine structurée avec les phospholipides, impliqués dans une membrane, à l'état sec.
- La capacité de la LEAM à protéger des liposomes des effets délétère de la déshydratation-réhydratation.

Ces observations nous ont conduits à formuler une hypothèse sur le rôle de LEAM dans le processus de formation de la graine, sa conservation et sa germination (Figure 38).

La LEAM s'accumule sous sa forme soluble et dépourvue de structure dans la matrice mitochondriale lors de la maturation des graines. Sa présence ne semble pas perturber le fonctionnement mitochondrial comme l'attestent les excellentes performances des mitochondries de graines de pois (Benamar et al., 2003). Lors de la phase ultime de dessiccation des graines, les mitochondries subissent également une forte déshydratation qui conduit la LEAM à se structurer en hélices amphiphiles, et à s'encastrer au niveau des surfaces libres de protéines de la membrane interne, parallèlement à son plan. A l'état sec, LEAM protégerait ainsi et renforcerait la membrane interne dont le maintien de l'intégrité est essentiel dans le cadre de la tolérance à la dessiccation. La surface externe de la membrane interne, ainsi que la membrane externe, sont préservés par l'accumulation de saccharose qui a la capacité de former un état vitreux protecteur (Buitink et Leprince, 2004 ; Crowe et al., 1998 pour revue). L'activité métabolique à l'état sec est ainsi suspendue, et les graines peuvent être conservées très longtemps dans ces conditions. Lors de l'imbibition des graines, la réhydratation des mitochondries provoque le dépliement de LEAM qui quitte alors la membrane interne pour retourner dans la matrice sous sa forme désordonnée. Cette réversibilité de la transition structurale et de l'interaction de la LEAM avec les membranes est indispensable car la présence de la protéine au sein de la membrane interne à l'état hydraté aurait certainement des effets sévères sur son fonctionnement en matière de transduction d'énergie.

Partie 2 :

Initiation de la caractérisation physiologique de la Leam



Introduction

L'essentiel de nos travaux ont porté sur la fonction de la LEAM au niveau moléculaire, en s'appuyant sur des approches biochimiques et biophysiques. Les résultats obtenus indiquent que la LEAM intervient dans la protection de la membrane interne des mitochondries lors du processus de dessiccation des graines. Afin de cerner le rôle de la LEAM au niveau physiologique, nous avons envisagé des approches de génétique inverse. L'objectif était, d'une part, de préciser l'importance de la LEAM pour le développement et la tolérance à la dessiccation des graines, et d'autre part, d'évaluer l'impact éventuel de son expression ectopique sur la tolérance des plantes aux stress abiotiques. Dans cette optique, nous avons initié deux types de stratégies dont les grandes lignes sont présentées ci-dessous.

Gain de fonction(s). Cette première stratégie consiste à mettre en évidence les gains de fonctions (avantages) acquis par la surexpression de la LEAM chez différents organismes qui en sont normalement dépourvus. Ce fut le cas de *Escherichia coli* dans laquelle a été produite la protéine mature mais également *Saccharomyces cerevisiae* où la séquence d'adressage (« peptide transit ») a été conservée dans le vecteur d'expression afin de conserver la localisation mitochondriale. Chez ces deux organismes l'accumulation de protéine s'est avérée bien inférieure à celle obtenue dans les mitochondries de graines de pois (*Pisum sativum*), et semble donc être insuffisante pour mettre en évidence un effet protecteur vis-à-vis de la dessiccation (données non montrées). Il est important également de signaler que la LEAM, comme d'autres protéines LEA, semble être toxique pour les bactéries la produisant (Campos et al., 2006). En collaboration avec l'équipe de Pierre Goloubinoff (Université de Lausanne), nous avons egalement surexprimer la LEAM chez la mousse *Physcomitrella patens*, sous le contrôle d'un promoteur inductible par le choc thermique. Le système est en cours de caractérisation (localisation sub-cellulaire, tolérance aux stress). Enfin, la LEAM a été surexprimée chez *Arabidopsis thaliana* sous le contrôle d'un promoteur constitutif afin d'exprimer la protéine dans les mitochondries de tous les tissus de la plante. Seul ce dernier cas sera illustré dans ce manuscrit.

	BLAST e-value	Taille (en aa) du précurseur	Localisation Subcellulaire	Non structuré (%)	Helice α (%)	Hélice de Classe A	Nombre de Proline (position)
Pisum sativum **Q5NJL5 *(LEAM)***	0	358	Mitoch.	91	65	oui	4 (19-29)
Medicago truncatula **Q1S7M8**	4 e-63	348	Mitoch.	92	64	oui	4 (19-29) 1 (53)
Medicago truncatula **Q1S7M9**	7 e-33	192	Plaste	82	57	oui	4 (19-29)
Arabidopsis thaliana **At5g44310**	4e-27	342	Mitoch.	91	81	oui	2 (19-24) 1 (53)
Oryza sativa **(rice) Q7XPL4**	2e-25	274	Mitoch.	76	74	oui	5 (29-39) 3 (55,65,274)
Caenorhabditis elegans **O16527**	2e-24	733	aucune	90	67	oui	1 (142)
Glycine max **(soybean) Q39873**	3e-21	458	RE ?	93	79	oui	1 (29)
Sporobolus stapfianus **(resurrection grass) Q1JRJ4**	5e-18	246	Mitoch.	87	64	oui	6 (25-38) 1 (50)

Tableau VII : Comparaison *in silico* d'éléments structuraux de protéines apparentées à la LEAM.

Les protéines énumérées (nom d'espèce et numéro d'accession) ont été choisies selon une recherche de BLATP contre les bases de données non redondantes (http://www.ch.embnet.org) en utilisant le séquence du précurseur de la LEAM comme échantillon. La prévision de la localisation sub-cellulaire a été faite en utilisant TargetP (http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/ ; Emanuelsson et al.. (2000) J. mole. Biol., 300:1005 - 1016) et PREDOTAR (http://urgi.infobiogen.fr/predotar/predotar.html ; Small et al. (2004) Proteomics, 4, 1581-1590). La prévision de repliement en hélice α a été faite en utilisant GORIV (Garnier et al., 1996, Méthodes Enzymol 266, 540-553) sur le précurseur des protéines (peptide transit inclus, s'il en existe un). L'evaluation de structure desordonnée a été faite en utilisant le programme FOLDINDEX (http://bioportal.weizmann.ac.il/fldbin/findex ; Prilusky et autres. (2005) Bioinformatics 21:3435 - 3438). La détermination de l'appartenance au groupe des hélices de classe A a été faite grâce à l'observation des projections axiales des hélices (Hennig, 1999). Les prolines sont subdivisées en deux classes. La première, pour les prolines appartenant au peptide transit s'il en existe un, la deuxième appartenant à la protéine mature.

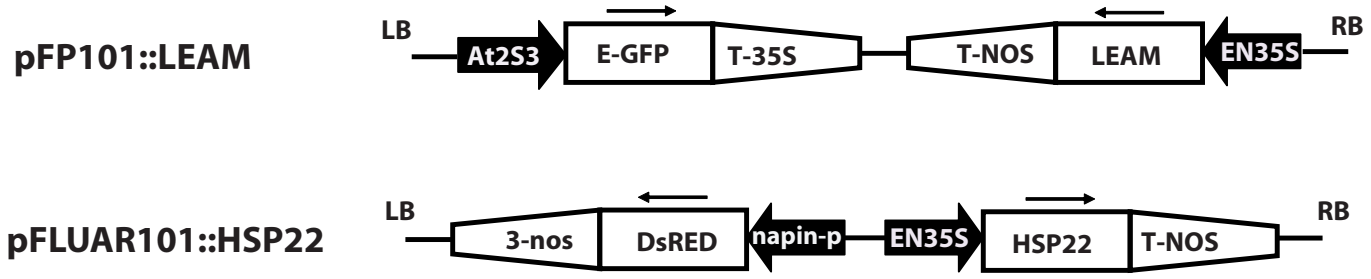
Perte de fonction(s). Cette stratégie consiste à supprimer l'expression de la LEAM au niveau des graines, et en particulier chez le pois qui est notre modèle d'étude. Cependant, malgré l'existence de méthodes de transformation permettant la transformation du pois par *Agrobacterium*, publiées depuis 1997 (Bean et al.), aucune extinction de gène par interférence des ARN (RNAi) n'a été encore rapportée. En ce qui concerne les approches de mutagenèse, il n'existe pas à notre connaissance de banques de mutants d'insertion. Cependant, un programme de TILLING (Targeting Induced Local Lesions In Genomes) sur le pois a été mis en place par l'INRA (URLEG Dijon, URGV Evry), ce qui nous a permis de sélectionner plusieurs mutants affectés dans le gène de la LEAM.

Nous avons également envisagé des approches de type KO (knock-out) sur des plantes modèles, qui nécessitent cependant l'identification certaine des orthologues de la LEAM. Le recensement des principaux orthologues, obtenus par analogie de séquence protéique, est donné dans le Tableau VII. La protéine la plus proche de la LEAM est Q1S7M8 de *Medicago truncatula* (pourcentage d'identité 59% et de similarité 71%). Malheureusement cette protéine n'a été disponible dans les banques de données que courant 2006. Nous n'avons donc pas été en mesure d'initier une stratégie de RNAi pour ce gène bien que cette stratégie soit développée au laboratoire. L'existence de plusieurs banques annotées de mutants d'insertion chez *Arabidopsis thaliana*, nous a orientés dans notre choix d'études de lignées d'insertions issues du Salk Institute (San Diego, California, USA) et du RIKEN Institute (Japan). Ces études seront détaillées ultérieurement.

Les surexpresseurs chez *Arabidopsis thaliana*

Obtention des lignées surexprimant la LEAM

Les surexpresseurs de la LEAM chez *A. thaliana* ont été obtenus par transformation avec *Agrobacterium*. Le plasmide transfecté contient l'ADNc complet de la LEAM (région codante pour le « peptide transit » incluse) sous le contrôle d'un promoteur, fort, constitutif, à savoir le *2X35S* (issu du virus CaMV). Le gène de sélection est ici celui codant pour la GFP (Green Fluorescent Protein),



LB, RB : bordures droite et gauche du T-DNA
EN35S : promoteur 2x35S
3-nos et T-NOS : terminateur de la Nopaline synthase
T-35S : terminateur du 35S

Figure 39 : Carte du vecteur pFP101::LEAM.
Les promoteurs constitutif (2x35S) et graine spécifique (At2S3) sont figurés par une flèche pleine noire. Le sens d'expression des gènes sous leur contrôle est marqué par une flèche fine. Leur terminateur respectif est figuré par un trapèze.
(Remarque : la construction permettant la surexpression de la HSP22 est donnée ici à titre indicatif.)

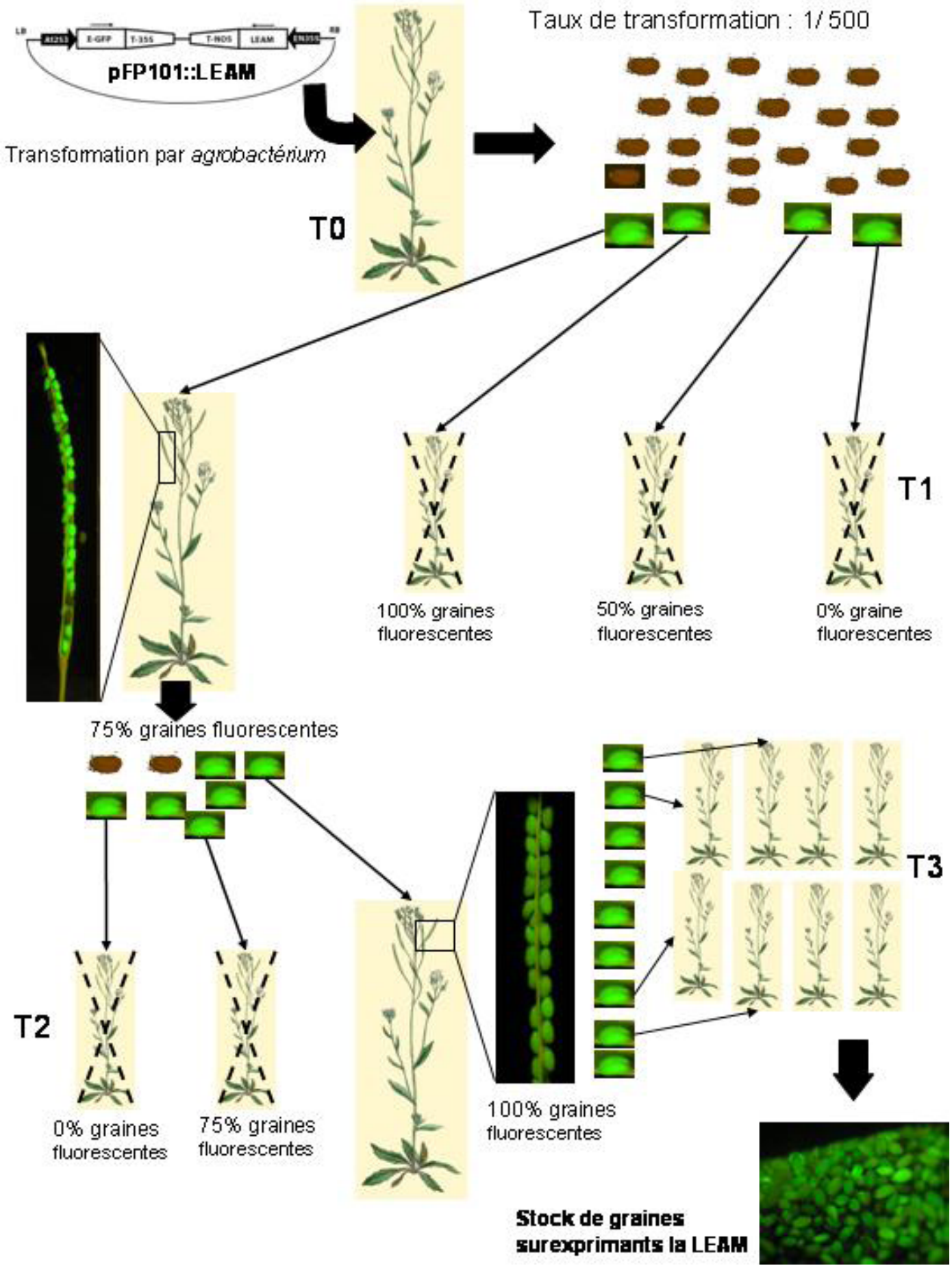


Figure 40 : Schéma de sélection des *Arabidopsis thaliana* surexprimant le LEAM.

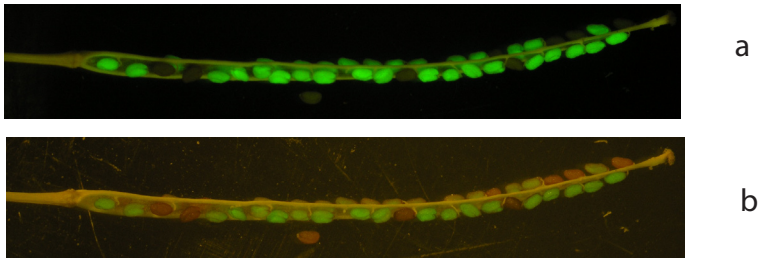


Figure 41 : Photographie d'une silique d'*Arabidopsis* surexprimant la GFP, et donc la LEAM, au niveau de ses graines.
Observations faites avec une excitation à 460-480nm et un filtre d'émission à 495-540nm (a). La photographie du bas (b) été réalisée avec un complément en lumière blanche. Les graines ayant le transgène fluorescent en vert, les non transformées ont une couleur marron.

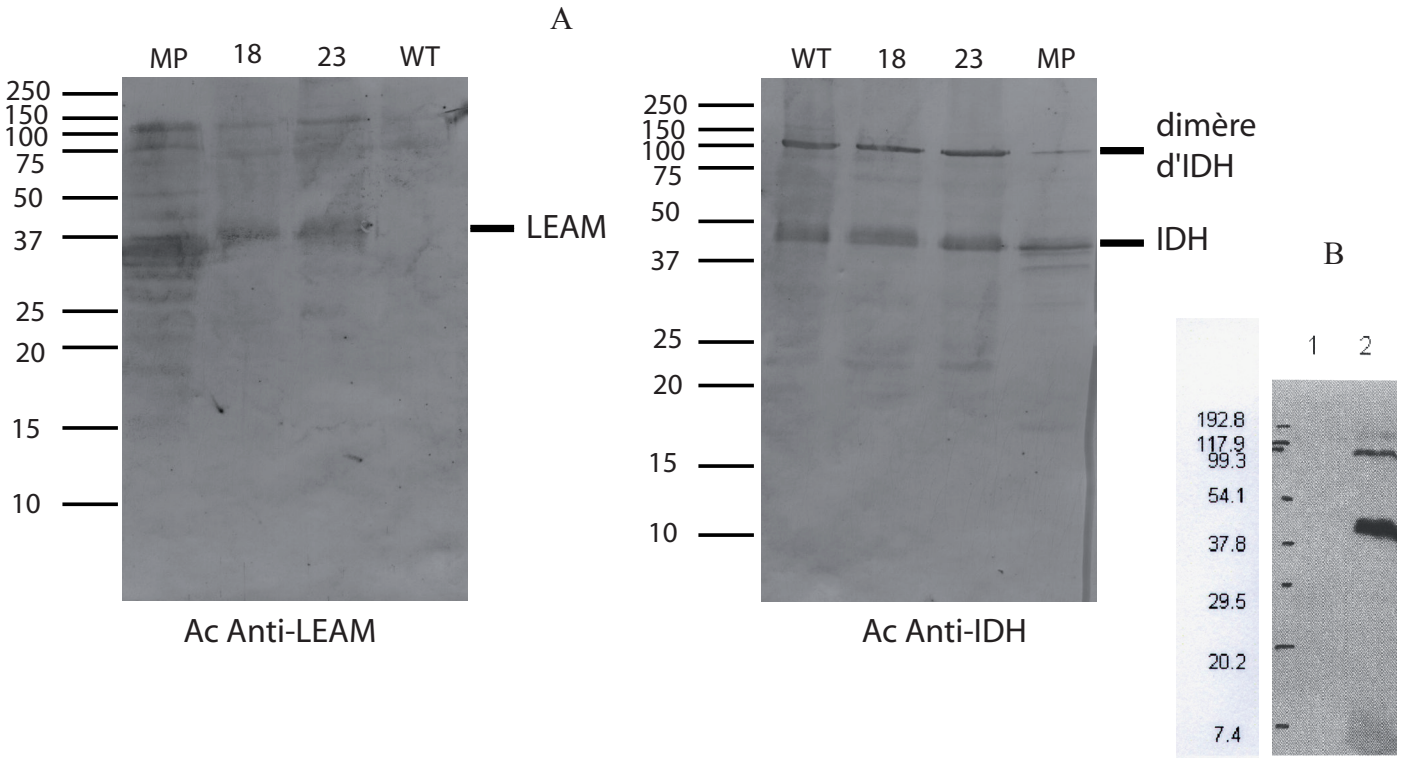


Figure 42 : Analyse électrophorétique de la présence de la LEAM dans les feuilles d'*Arabidopsis* surexprimant la LEAM.
A. L'électrophorèse est réalisée sur gel de polyacrylamide 13,5% avec la nomenclature suivante : MP pour les mitochondries de graines de pois (20µg), 18 et 23 pour les mitochondries brutes isolées à partir de feuilles des deux lignées correspondantes (40µg) et WT pour la lignée sauvage (Col0) (40µg). Il est suivi d'un western blot avec un anticorps anti-LEAM ou anti-IDH (Agrisera).
B. Résultats obtenus par Agrisera sur un extrait total d'*Arabidopsis* (1) (200µg) et sur une fraction enrichie en mitochondries (2) avec l'anticorps IDH et une révélation ECL (GE Healthcare) (méthode plus sensible).

adressée au reticulum endoplasmique, sous le contrôle d'un promoteur graine spécifique *At2S3* (Benmihen et al. 2004). (Figure 39 ; Remarque : la construction permettant la surexpression de la HSP22 est également donnée) Ce gène de sélection, remplaçant les traditionnelles résistances aux antibiotiques ou aux herbicides, permet une procédure de sélection très commode (Figure 40). En effet la présence du transgène est visible directement au niveau des graines grâce à la fluorescence de la GFP (Figure 41). Il est ainsi possible d'obtenir des lignées homozygotes après deux générations en utilisant des méthodes mendéliennes classiques.

Vérification de l'expression de la LEAM

Nous avons sélectionné deux lignées homozygotes (18 et 23) ayant un phénotype semblable à l'écotype sauvage (col0) dans des conditions de culture habituelles. Des mitochondries d'*Arabidopsis* ont été purifiées à partir de plantes de la troisième génération, en suivant le protocole publié par l'équipe de Per Gardeström (Keech et al. 2005). La LEAM y est bien présente (Figure 42A). Le western blot révélant la présence, dans la préparation réalisée, de l'isocitrate déshydrogenase (IDH), protéine matricielle, permet d'assurer que les extraits protéiques sont bien enrichis en protéines mitochondriales. Conformément aux données du fournisseur de l'anticorps, l'IDH n'est pas détectable sur un extrait total de feuille d'*Arabidopsis* (Figure 42B).

Ces mitochondries présentent un taux d'intégrité de 90% environ. Mais leur contrôle respiratoire en présence de NADH est faible, seulement 1,7 dans les cas les plus favorables (Pour mémoire les CR obtenu dans la publication de Keech et al. 2005 est de 2,1, et il est en général supérieur à 3 chez les mitochondries de graines de pois (Stupnikova et al. 2006)). Les préparations sont contaminées par des thylakoïdes (ratio chlorophylle (µg) : protéine (mg) = 110, conforme aux résultats de Keech et al. (2005) obtenus sur des mitochondries brutes). Malgré de nombreuses tentatives et la collaboration active d'Olivier Keech, nous n'avons pas encore réussi à obtenir des mitochondries de qualité suffisante pour envisager des analyses physiologiques détaillées.

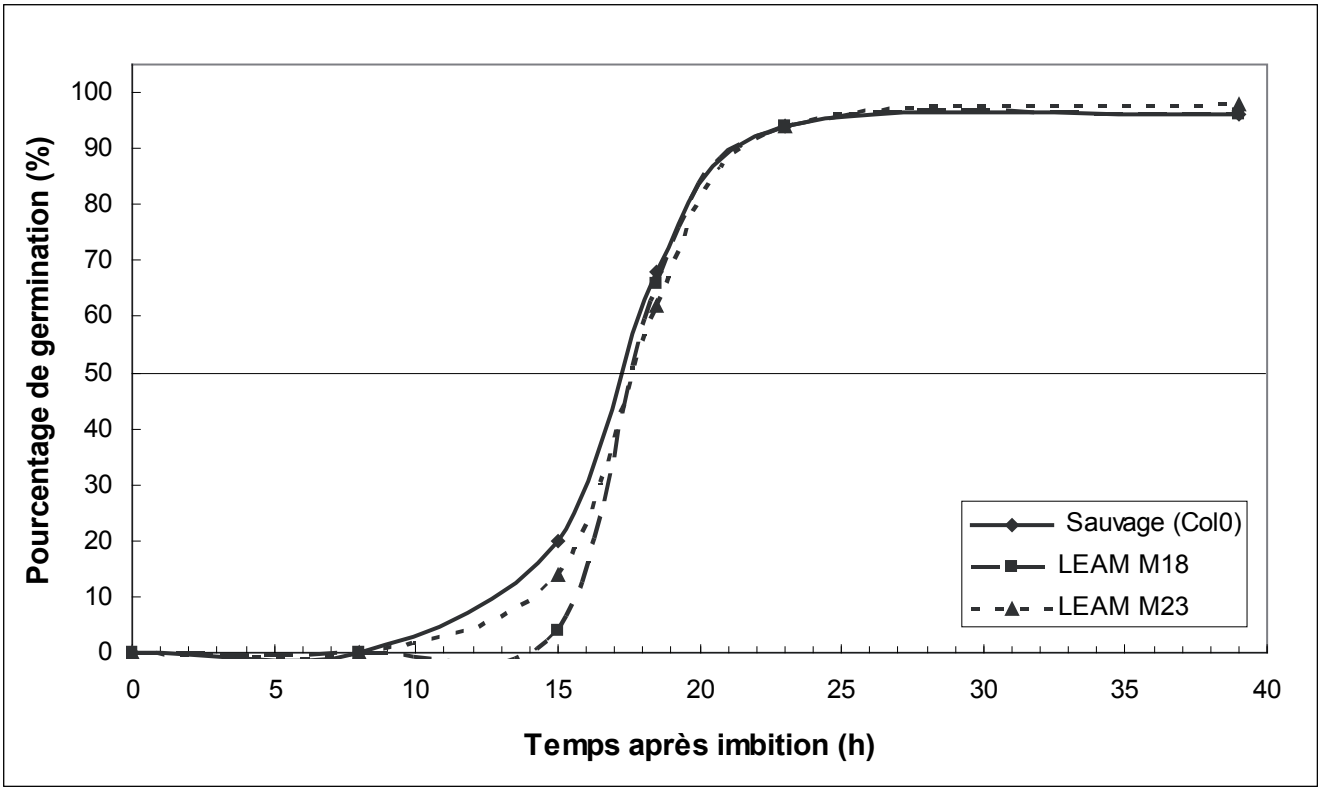


Figure 43 : Courbe de germination des semences d'*Arabidopsis thaliana* sauvage (col0), ou surexprimant la LEAM (LEAM M18 et LEAM M23). La germination a été menée à l'obscurité à 20°C.

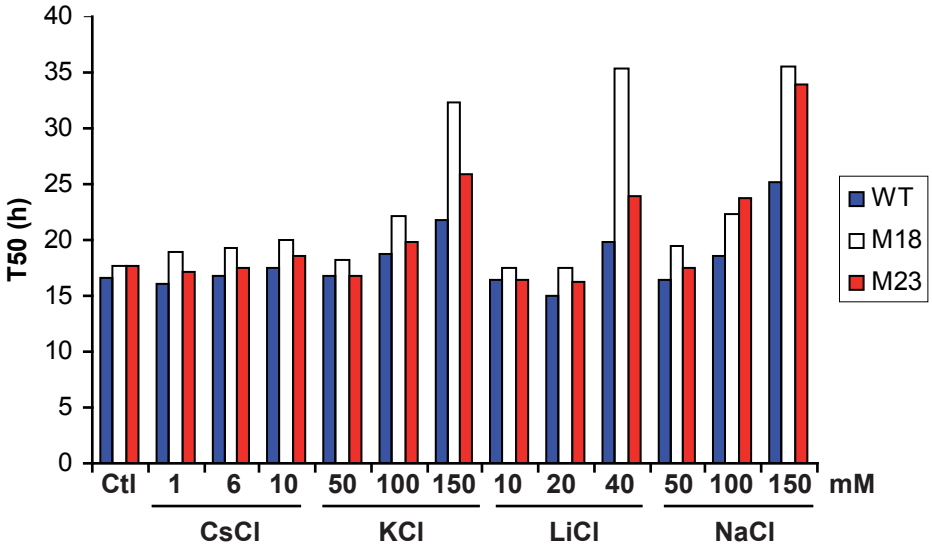


Figure 44 : Effet de stress salins sur la germination des graines d'*Arabidopsis thaliana* sauvage (col0 ; WT), ou surexprimant la LEAM (M18 et M23).
Le T50 est reporté pour chacune des germinations réalisées à 20°C et à l'obscurité.

Phénotypages des surexpresseurs chez *Arabidopsis thaliana*

Germination des graines. Des tests ont été menés au sein de l'équipe, par Johann Grelet et Abdelilah Benamar, sur les capacités germinatives des graines issues de plantes surexprimant la LEAM. Dans des conditions optimales de germination il n'y a pas de différences (Figure 43). La germination des graines en présence de PEG (-0,5 et -1,2 MPa) n'est pas affectée significativement par la présence de la LEAM. De même lors de stress salins modérés avec du CsCL, KCl ou LiCl, la présence de LEAM ne confère pas un avantage aux graines (Figure 44). Lors de stress plus prononcés comme avec 150mM de KCl ou 40mM de LiCl, les graines surexprimant la LEAM sont défavorisées, et plus particulièrement celles de la lignée 18. Cet handicap est également révélé avec un traitement au NaCl. Il semblerait donc que dans des cas extrêmes la présence de la LEAM soit défavorable pour la germination des graines. Il est à noter que les gènes des orthologues de la LEAM chez *Arabidopsis* sont fortement exprimés lors de la formation de la graine (Macherel et al. 2006). Il est donc très vraisemblable que les orthologues de la LEAM soient présents dans les mitochondries de graines, et puissent jouer un rôle dans la tolérance au stress. Dans ces conditions un excès de LEAM, dû à l'expression du transgène, pourrait venir déstabiliser les mitochondries. Un effet dû au site d'insertion du transgène dans le génome ne peut toutefois pas être exclu. Il serait intéressant d'étudier si l'expression du transgène LEAM influe sur celle de ses orthologues, au niveau transcriptionnel ou protéique. Il est à noter que l'expression de la HSP22 mitochondriale de maïs chez *A. thaliana* sous le contrôle du promoteur 35S stimule considérablement l'expression du gène endogène lors d'un choc thermique (Rhoads et al. 2005).

Tolérance aux stress de jeunes plantes. Des stress sur jeunes plantes (4 jours après imbibition), ayant poussé sur milieu gélosé ont également été menés. Ces stress ont consisté en des traitements au froid, à divers sels, et à des déshydratations. Ces résultats ne sont pas présentés par manque de reproductibilité. Ces expériences nous ont néanmoins sensibilisés au problème, trivial mais essentiel, lié à l'utilisation de jeunes plantes : le stade de développement de la plante est primordial dans sa réponse à un stress. La

difficulté est de faire subir un stress identique à des plantules toutes équivalentes sur le plan physiologique. Malgré une bonne synchronisation de la germination grâce à la stratification, les plantes au début de leur croissance ne sont pas homogènes. En conséquence, nous n'avons pas pu discriminer l'effet éventuel de la présence de la LEAM des effets liés à des états physiologiques différents.

Tolérance aux stress de plantes matures. Nous avons donc réalisé des stress sur plantes matures, juste avant leur montaison (environ trois semaines après semis). A ce stade, les différences de développement entre plantes ne sont plus visibles. Des stress de sécheresse ont été d'abord menés de manière similaire à ceux décrit par Puhakainen et al. (2004). Les plantes (sauvages et mutantes) sont mises en culture sur un terreau homogène par groupe d'une demi-douzaine de plantes. Le stress de sécheresse consiste à interrompre l'arrosage, puis à le reprendre lorsque les signes de sécheresse sont présents (terre craquelée, feuilles perdant leur turgescence ; dans l'article de Puhakainen et al. (2004) l'arrosage est repris lorsque « des symptômes **sévères** de la sécheresse sont visibles sur **toutes** les plantes »). Le taux de survie suite à ce traitement a été évalué pour les plantes sauvages ainsi que pour les plantes surexprimant la LEAM. Nous n'avons malheureusement pas obtenu de résultats reproductibles (données non montrées), tout comme Puhakainen et al. (2004). Plusieurs raisons peuvent expliquer cet écueil. Tout d'abord, même si les plantes semblent toutes identiques au moment du stress, rien ne garanti qu'elles sont dans un état physiologique comparable. Le substrat étant complexe, il est plus difficile d'une expérience à l'autre de reproduire des conditions identiques, même si un effort particulier a été porté sur la qualité du terreau, tant sur son homogénéité que sur sa quantité, contrôlée par pesée.

Une autre difficulté est de définir à quel stade de déshydratation l'arrosage doit être repris. Imposer une durée fixe de sécheresse pose le problème de l'hétérogénéité des conditions de cultures, du substrat et sûrement des plantes, ce qui n'a pas permis d'avoir des résultats satisfaisants dans ces conditions.

(Remarque : Même si nos installations sont dans les normes actuelles de standardisation des conditions de culture, des variations d'hygrométries sont observables, ainsi que de

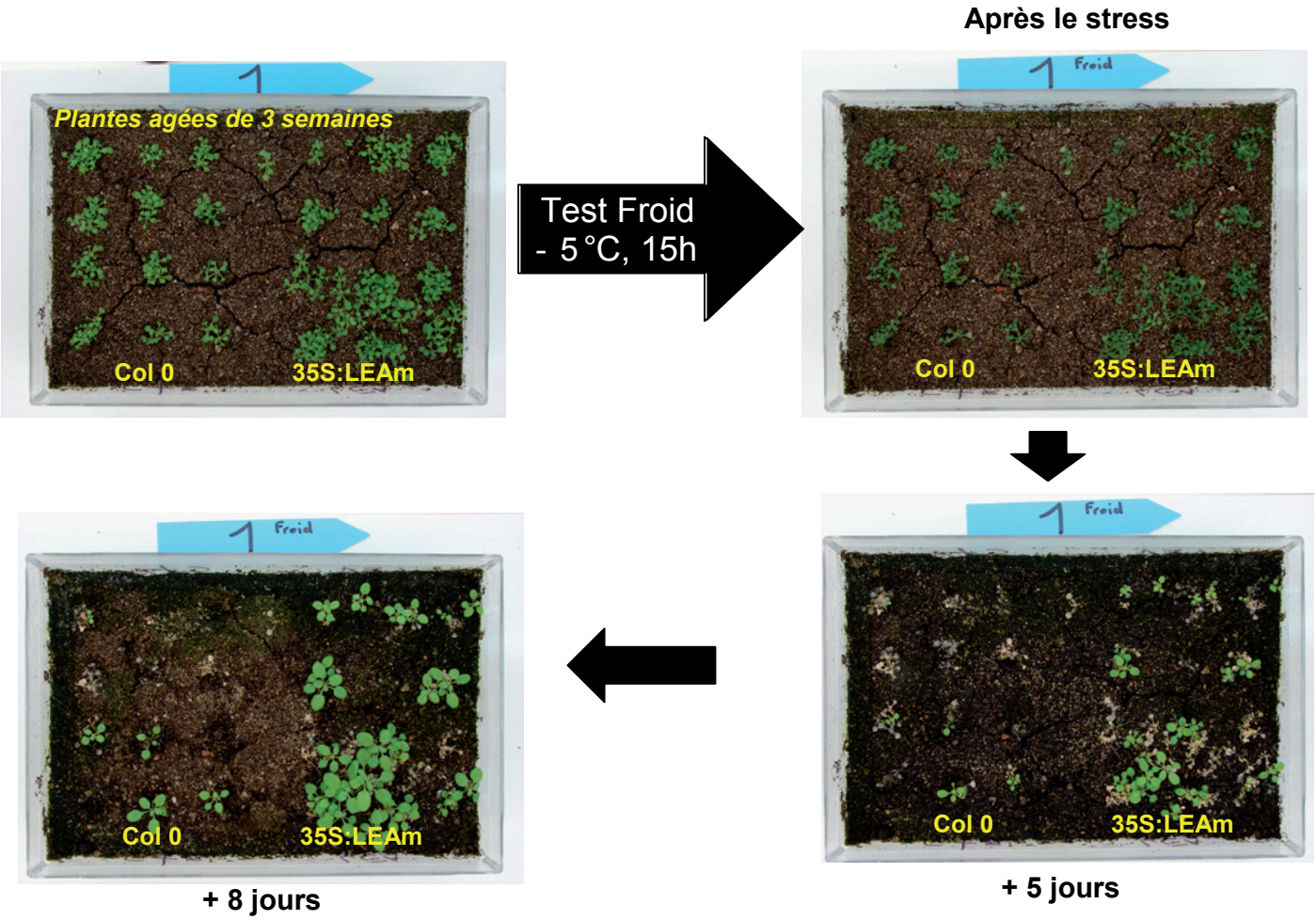


Figure 45 : Résistance au stress froid des plants d'*Arabidopsis* surexprimant la LEAM (lignée 23). Des plantes âgées de trois semaines sont maintenue pendant 15h à une température de -5°C. Leur survie est suivie après les avoir placé dans des conditions normales de culture (23°C, 70% d'humidité relative, jour long)

légères variations de températures. Ces variations n'affectent pas la visualisation d'un phénotype mutant fort, mais peuvent perturber la détection de phénotypes plus subtils,)

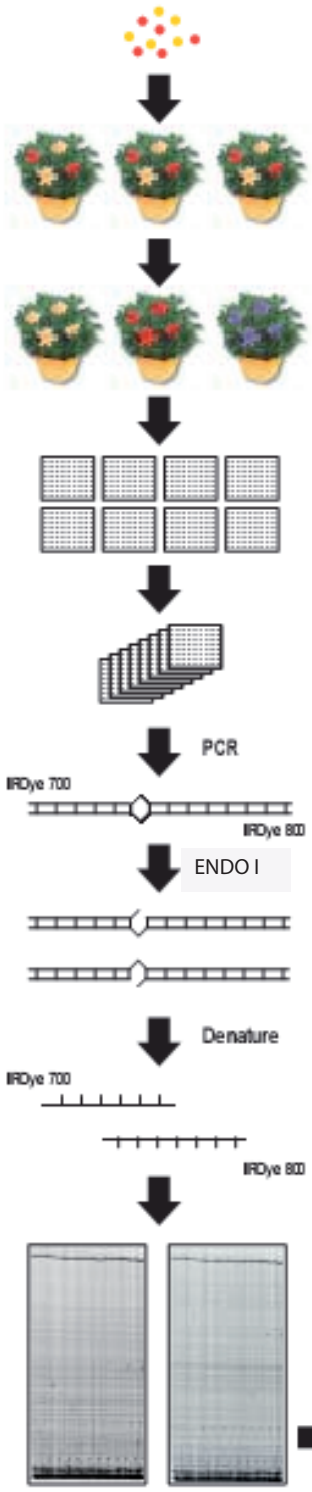
Il a donc été convenu que la réhydratation se ferait à un « état » de déshydratation donnée (perte de turgescence des plantes). N'ayant, au laboratoire, aucun moyen de le mesurer directement nous avons suivi des paramètres connexes : le poids du terreau (et des plantes) reflétant la déshydratation subie par le système, et également la consignation visuelle, par photographie, de l'état de sécheresse des plantes, afin de valider le même état global de sécheresse d'une expérience à une autre.

Dans l'ensemble, les résultats obtenus sur la tolérance des plantes à la sécheresse sont trop hétérogènes pour être significatifs.

De la même manière, des tests de résistance au froid ont été menés. Des plantes âgées de trois semaines sont placées dans un environnement dont la température est de -5°C, pendant 15 heures. Les *Arabidopsis* sont ensuite remis en culture à 23°C. Des résultats homogènes ont été obtenus, avec une survie préférentielle des plantes surexprimants la LEAM (Figure 45). Il a malheureusement été impossible de reproduire fidèlement de telles conditions de culture (comme il a déjà été mentionné pour les stress de déshydratation), empêchant ainsi la validation de ce résultat.

Ainsi, nous avons également été confrontés au problème de reproductibilité des expériences physiologiques avec les plantes matures. Nous avons cependant acquis la conviction que la fenêtre physiologique pendant laquelle la LEAM pourrait avoir un effet lors de tels tests est étroite. La surexpression, en supposant qu'elle soit suffisante, ne se traduit pour les plantes que par l'accumulation d'une protéine supplémentaire dans la mitochondrie. Cet organite a certes un rôle primordial, mais si le reste de la cellule subit de forts dommages lors d'un stress, la mitochondrie seule ne peut la préserver. Ceci étant, il convient de rechercher des conditions de stress où la mitochondrie serait le « talon d'Achille » de la cellule, et où la présence de la LEAM permettrait d'avoir un bonus pour les mitochondries, donc pour les cellules et la plantes toute entière.

Dans cette optique, nous avons transformé des plantes (*A. thaliana*) surexprimant la LEAM avec le gène codant pour la protéine HSP22, qui s'accumule également



1) Les graines sont mises en contact avec de l'EMS afin de produire des mutations ponctuelles dans l'ensemble du génome

2) Une population "parent" est mis en culture à partir de ces graines

3) Une nouvelle génération est produite par autofécondation

4) Les graines issus d'une nouvelle autofécondation sont conservées, et l'ADN génomique est collecté en plaque 96 puits

5) L'ADN est alors "poolé" par lot de huit, et est ensuite amplifié par PCR en utilisant deux primers spécifiques du gène étudié. Une seconde PCR permet d'amplifier un fragment interne grâce à des primers marqués avec différents IRDyes

6) L'amplifiat est chauffé puis refroidi formant ainsi des hétéroduplexes entre les échantillons sauvages et mutants.

7) La nucléase ENDO I est utilisée pour couper l'ADN au niveau des bases mésappariées

8) Les échantillons sont dénaturés et l'electrophorèse est effectué dans un système d'analyse d'ADN LI-COR 4300

9) Dans les pistes où il y a une mutation, une bande de taille inférieur à la bande du sauvage est visible sur l'image du IRDye700. Une bande de taille inférieure à la bande du sauvage est également visible sur l'image du IRDye800. Cette bande correspond au produit de clivage complémentaire de celui visualisé avec l'IRDye700. La somme de ces deux bandes doit donner la taille de l'amplicon. C'est ce qui permet de distinguer facilement les mutations des artefacts d'amplification.

10) Après la detection d'une mutation dans un pool (donc une ligne), les ADN individuels le composant sont "screenés" selon le même processus.

Figure 46 : Schéma du principe du TILLING (d'après la documentation de LI-COR Biosciences)

dans les mitochondries de graines de pois (Bardel et al. 2002). La sélection est maintenant terminée (obtention en quantité de graines de lignées homozygotes), et les tests physiologiques seront très prochainement engagés.
L'approche du gain de fonction n'a pas encore produit de résultats significatifs, mais l'expertise acquise devrait permettre d'effectuer des criblages pertinents..

Mutants de pois sélectionnés par TILLING

Afin d'évaluer l'effet d'une perte de fonction, nous avons eu recours à la sélection de mutants de LEAM chez le pois par la méthode du TILLING. Ces expériences ont été réalisées au sein de l'Unité de Recherche en Génomique Végétale à Evry, dans l'équipe d'Abdelhafid Bendahmane. Ce laboratoire a généré une collection des ADN génomiques de la deuxième génération (M2) des lignées de mutants, obtenus après mutagenèse à l'EMS du cultivar *Cameor*. Cette banque comprend plus de 4800 lignées indépendantes. La mutagénèse avec l'EMS (Ethyl-Methyl-Sulfate) est connue pour générer des mutations de façon aléatoire environ tous les 300 kb.

La méthode du TILLING

La méthode du TILLING repose sur la capacité des endonucléases ENDO-1 ou CEL1 à cliver l'ADN double brin à l'endroit de mésappariement, ce qui permet ainsi de révéler une mutation ponctuelle au niveau d'un couple de bases (Henikoff & Comai, 2003). Le principe de la méthode est résumé dans la Figure 46.
Les ADNs génomiques sont rassemblés par « pool » de huit. Pour chaque pool le gène de la LEAM est amplifié à partir du mélange d'ADN génomique. Le premier produit PCR est réamplifié grâce à des amorces internes, marquées par un fluorochrome, vert en 5' (IRDye 800) et rouge en 3' (IRDye 700). Cette méthode permet d'avoir une quantité suffisante d'ADN marqué, avec un bon degré de spécificité, pour la suite de l'expérience. Le produits de PCR ainsi obtenu est chauffé à 95°C pendant 5 minutes afin de séparer les brins d'ADN, puis refroidi lentement afin de réapparier les brins de façon aléatoire, faisant ainsi apparaître

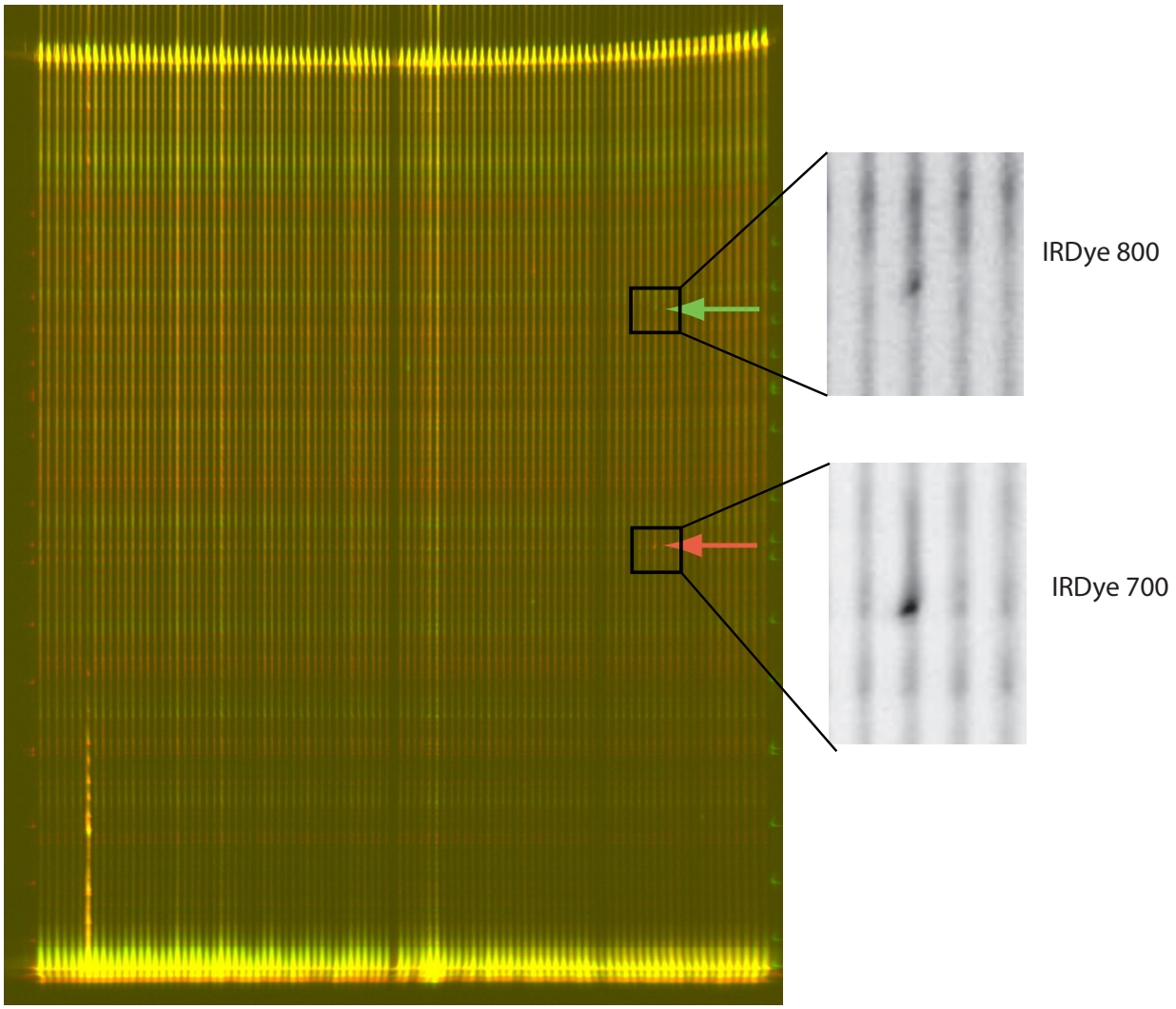


Figure 47 : Détection de la mutation du mutant 1556 dans son pool d'ADN. Un agrandissement est fait, canal par canal, de la piste correspondante.

ATGGCAGCAATGTTCACCACCAGAAACGCTATCTTCCGCTTCTCAAAGTCTTTTCCTAACGTCCCTTCACTCTCC
CTTCCTAAACCCTCCAGAGTATTCGTCGCTTCTGCTTCCCACCAATCCGAC**gtaagataatggtcgcagaaacag**
taatttaggatattaaataatctcaagagtcacattttcaattttattagtatcatataactttctttttggata
ttgtttattttcagTGGAGAAATGCAGCAGATGGAAAGAGAAATTCTTCAATGGATTGGGCTTATAATTCTACGT
CGAAGGCAAGACAGGATGCAGATGAAATAGCCGACAGAGAAAGAAAAACGTTAAACGGCGATGTAGATTCAGAGG
ACGTGAAACAATACGTGCGTGATGCGAAAGAGAGGACTAAGGAGGCTGCAAATAGGGCTGCAGAGAATGCTGATA
GTGCTGGAGTGAAATCAAGAGATTATGCTTATGATGCAAAAGAGAAGACCAAGGATGCTGCAAATAGGGCTGCAG
AGAATGTTGAAAGTGCTGGAGAGAAAGCAAAAGACTATGCTTATGATGCAAAAGAGAGGACAAAGGATGCTGCAA
ATAGGGCTGCAGAGAATGCTGAAAGTGTTGGAGAGAAAGCAAGAGACTATGCTTATGATGCAAAGGAAAGAACCA
AGGAAGCAGCACAGAATGCCGGAGAGACTGCTAAAGATTATGCTTATGGTGCAAAAGAGAGAACCAAGGAAGCAG
CAGAGAGTGCTGGAGAGACGGCTAGAGATTATGCTTATGATGCAACGGATAAAACGAAAGAAGCAGTGGGTACTG
TGGCTGATAAGACAAAGGAAGGTGCTAAGAAAACAGCGGAGATGACAAAGGAAGGGGCTGAGAAAACGGCGGAGA
CTACCGGAGAGGTTGCTGGGGCGGCGACTGAGGCTCTGAAGAGTGCAGGAGAGATGGCGAAGCGTACGGCCCAGG
GGGCATGGGAGACGGCCAAGGATGCTACACAGAAGATTAAGGAGACGGTTGTTGGGAAGGATGATGACGATAATG
ATCGTGGTGGCGGTGTTGGTGCTGTTGTTGATGAGTATGATGTTGAATTGAAAAGGAAGGGTTATGGTGAGAGTA
AAGGTTATGATAAGAGTAAGGGTTATGGTGAGAATAAAGGTTATGATCAGAATAGGGGTTATTGA

Figure 47bis : Séquence nucléotidique génomique de LEAM. L'intron unique de 113 pb est figuré en minuscule bleu.

des homo- et des hétéroduplexes. Etant donné que l'on analyse des « pools » d'ADN, les séquences *LEAM* de type sauvage sont également amplifiées. Si l'un des amplicons porte une mutation, il va pouvoir former des hétéroduplexes après réappariement. La digestion par EndoI permet alors d'obtenir deux sous-fragments d'ADN liés à des fluorochromes différents par coupure aux endroits des mésappariements. Lors de la séparation par électrophorèse sur gel d'acrylamide (sur LI-COR 4300), les fragments issus de la coupure par EndoI sont détectés par la présence d'un point rouge et d'un point vert sur la même piste. La taille additionnée des deux fragments fluorescents correspond à la taille du fragment non clivé (Figure 47). Quand une mutation est détectée dans un pool, une « déconvolution » est nécessaire. Il s'agit de suivre la même procédure que celle venant d'être décrite non plus sur le « pool » mais sur chaque lignée le composant. Il convient de veiller à maintenir la formation des éventuels hétéroduplexes en ajoutant à quantité égale des amplicons provenant de lignée sauvage, pour le gène recherché.

TILLING sur LEAM

En préalable au criblage de la collection d'ADN génomique "TILLING", il a été nécessaire de caractériser la séquence génomique correspondant à l'ADNc de LEAM, chez la variété *Cameor* (cultivar de la banque TILLING de Dijon). Les séquences correspondantes ont egalement été determinées pour *Thérèse* (cultivar de la banque TILLING de Versailles), *Baccara* (cultivar à partir duquel l'ADNc de LEAM a été cloné), et *Douce Provence* (cultivar utilisé pour l'identification préliminaire de LEAM ; Bardel et al., 2002). *LEAM* a été amplifié grâce au couple d'amorces ayant servis au clonage de l'ADNc pleine longueur (allant de l'ATG au codon stop). Le produit de PCR brut a été séquencé dans les deux sens, ce qui a permis d'obtenir la séquence génomique de *LEAM*. Pour tous les cultivars Le séquençage n'a révélé l'existence que d'une seule séquence dans le produit de PCR. Cette séquence est identique (à la base près) pour les différents cultivars. Elle se caractérise par la présence d'un intron unique de 113pb situé 125pb après le A de l'ATG (Figure 47bis).

Acide aminé dans la séquence sauvage	Emplacement dans la protéine mature	Acide aminé dans la séquence du mutant	N° de la lignée
Proline (P)	Peptide transit	Leucine (L)	905 *
Arginine (R)	14	Lysine (K)	3473
Aspartate (D)	19	Asparagine (N)	4136
Aspartate (D)	37	Asparagine (N)	1395
Aspartate (D)	46	Asparagine (N)	2934
Glycine (G)	136	Glutamate (E)	2689
Glutamate (E)	137	Lysine (K)	1556 *
Alanine (A)	154	Tyrosine (Y)	1407
Glycine (G)	181	Glutamate (E)	1773 *
Aspartate (D)	192	Asparagine (N)	3042
Glutamate (E)	218	Lysine (K)	3397
Glycine (G)	219	Glutamate (E)	3786 *

```
>LEAM TILLING

SHQSDWRNAA DGKRNSSMDW AYNSTSKARQ DADEIADRER KTLNGDVDSE
DVKQYVRDAK ERTKEAANRA AENADSAGVK SRDYAYDAKE KTKDAANRAA
ENVESAGEKA KDYAYDAKER TKDAANRAAE NAESVGEKAR DYAYDAKERT
KEAAQNAGET AKDYAYGAKE RTKEAAESAG GTARDYAYDA TDKTKEAVGT
VADKTKEGAK KTAEMTKEGA EKTAETTGEV AGAATEALKS AGEMAKRTAQ
GAWETAKDAT QKIKETVVGK DDDDNDRGGG VGAVVDEYDV ELKRKGYGES
KGYDMSKGYG ENKGYDQNRGY
```

Figure 48 : Positionnement des mutations non silencieuses affectant la *LEAM* chez les mutants issus de la collection de TILLING.

Les mutants faisant l'objet d'une étude de phénotype sont marqués d'un astérisque. La séquence de la protéine mature est donnée avec le positionnement des acides aminés mutés en bleu.

Pour plusieurs raisons, il semblerait que la LEAM soit codée par un gène unique chez le pois. En effet, les multiples PCR "génomique" réalisées avec plusieurs jeux d'amorces, nécessitant des conditions d'hybridations peu stringentes, aboutissent systématiquement à l'amplification d'une seule séquence. Par ailleurs les analyses de spectrométrie de masse sur la LEAM mitochondriale n'ont jamais mis en évidence un mélange de polypeptides (Bardel et al., 2002 ; résultats du laboratoire).

La recherche des mutants s'est effectuée sur une région d'environ 950pb du gène codant pour la LEAM. 23 mutants ont pu ainsi être identifiés. Pour chaque mutant, la séquence du gène de la LEAM a été établie pour confirmer la mutation et pour déterminer son éventuelle présence sur les deux brins d'ADN.

Aucun des individus de la collection de 4800 lignées issues de la population mutagenisée à l'EMS (mutagénèse aléatoire) ne présente de mutation induisant un arrêt prématuré de la traduction (introduction d'un codon Stop). Cette observation pourrait signifier que le gène de la LEAM est essentiel et que les mutant KO sont létaux ; mais ceci reste une hypothèse.

Les 11 individus exhibant des mutations silencieuses ont été naturellement écartés. Parmi les 12 mutants traductionnels, seuls ont été retenus les individus ayant des mutations pouvant déstabiliser l'hélice amphiphile, caractéristique de la LEAM ou pouvant modifier son adressage à la mitochondrie (Figure 48). Par exemple a été sélectionnée la lignée 905 présentant la disparition de la proline 21, au profit d'une leucine, dans la séquence du peptide d'adressage. La proline introduisant un coude dans la structure secondaire du peptide, son absence est susceptible d'affecter l'adressage de la protéine.

Phénotypage des mutants affectés dans la LEAM

Au moins quatre graines (de génération M3 ou M4 ; fournies par l'INRA deDijon) des quatre lignées retenues ont été semées. Les plantes mutantes n'ont pas présenté un développement végétatif particulier par rapport aux plantes sauvages cultivées dans les mêmes conditions. La LEAM étant une protéine qui s'accumule fortement dans la graine au cours de la maturation, nous avons plus particulièrement observé les gousses et les graines. Il faut préciser que la culture

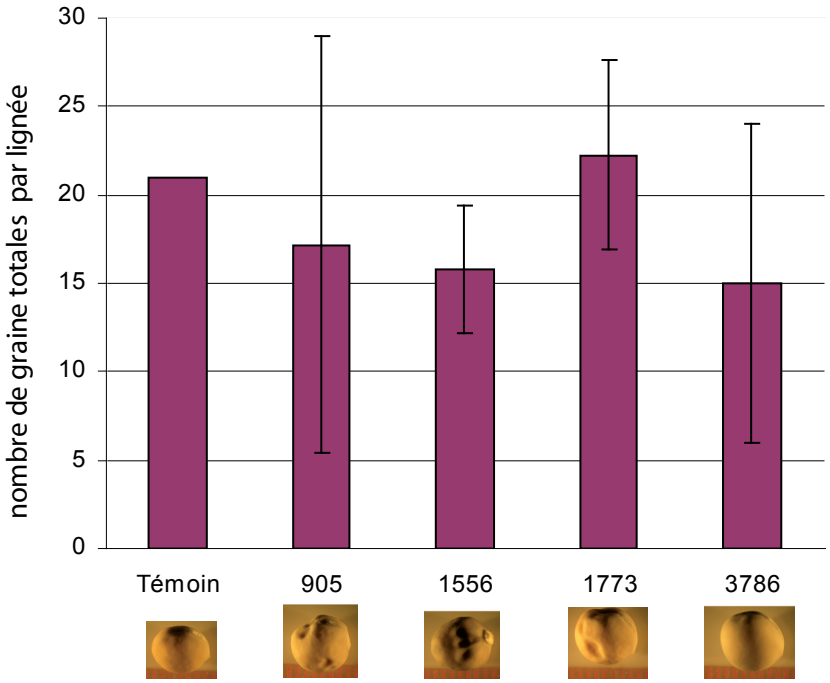


Figure 49 : Comparaison de la production moyenne de graines par mutants de chaque lignée.
La photographie d'une graine représentative de chaque lignée est donnée sous chaque histogramme correspondant.

des plantes a été effectuée en serre (INH) cet automne, donc à contre saison pour notre variété de pois, et la production de graines n'a donc pas été optimale.

Les observations ont été réalisées pour chaque plante de chaque lignée puis rassemblées pour une même lignée, afin de pouvoir comparer les lignées entre elles. Aucune différence significative n'a été observée dans le nombre de graines par gousse ou par plante (Figure 49). Il faut souligner que l'hétérogénéité au sein d'une même lignée est forte, ce qui se traduit par des écarts-type importants. Les lignées homozygotes 1556 et 1773, sont en général plus homogènes pour les caractères étudiées (Figure 50)

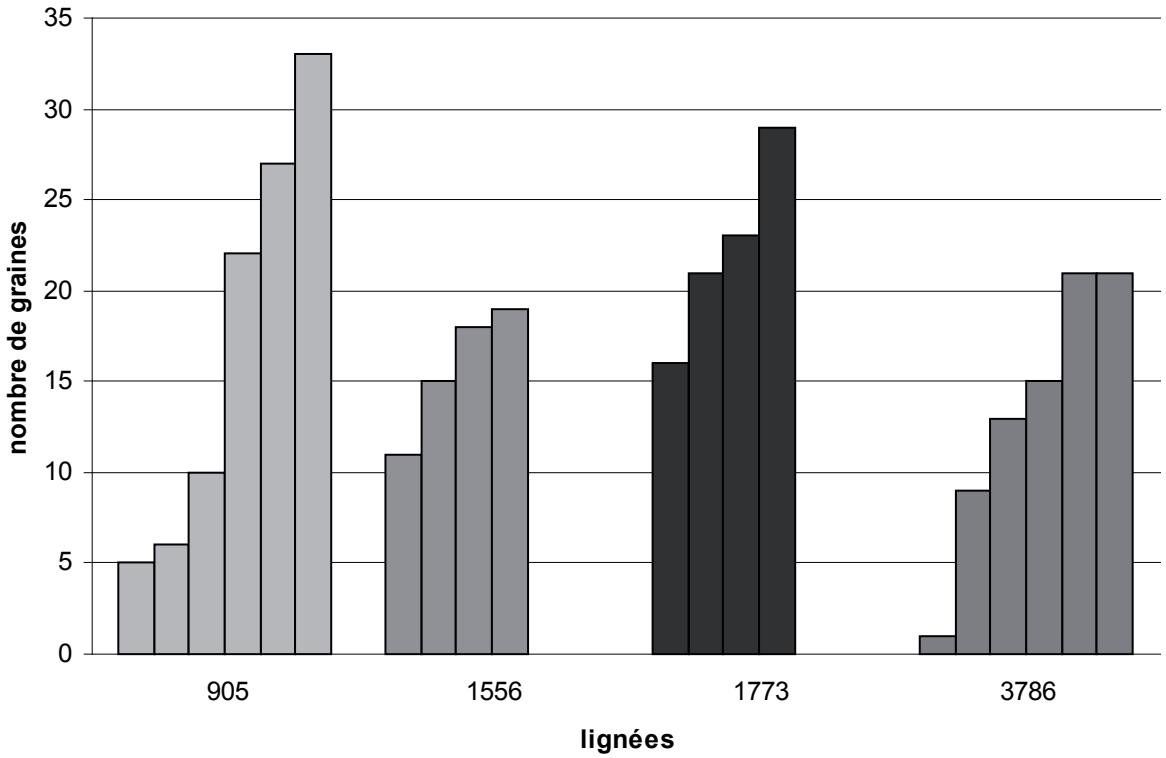
La morphologie des graines a été également observée dans chaque gousse récoltée. Le nombre de graines avortées (non remplies), de petites graines (diamètre inférieur à 5 mm), de graines normales (voir photo) ont été répertoriées par gousse et par plante. La lignée 1556 présente une forte proportion de petites graines (82% contre 24 % pour le témoin). Les autres lignées ont un pourcentage de petites graines comparable au témoin, 25 % pour la lignée 3786, 32% pour la lignée 905 ou légèrement plus élevé, 44% pour la lignée 1773.

Le pourcentage de graines avortées est de 42 % pour la lignée 905, 38% pour 1556, 31% pour 1773, 58% pour 3786. Ces résultats sont proches de celui du témoin (42%).

Nous avons de plus observé quelques graines avec un tégument fendu uniquement dans la lignée 905.

Suite à ces premières observations, des graines issues des lignées 905 et 1556 ont été plantées afin d'obtenir un stock de semences suffisante pour une caractérisation fine de la germination. La lignée 1556 a été choisie à cause du fort pourcentage de petites graines. La lignée 905 bien que ne présentant pas un phénotype contrasté a été conservée en raison de sa mutation dans le peptide transit. Nous envisageons de vérifier rapidement la localisation mitochondriale de la LEAM dans cette lignée. L'état de zygotie pour la mutation sera déterminé par séquençage pour chaque plante et à chaque génération.

Un inconvénient du TILLING est lié à la mutagenèse chimique qui introduit de multiples mutations dans l'ensemble du génome, pouvant engendrer des



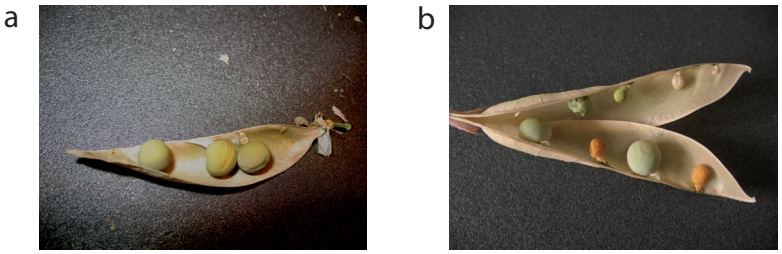


Figure 50 : Détail de la production de graines par mutant. Un exemple de gousses ayant leur tégument craqué est présenté en **a**. En **b**. est présenté des graines normales, petites et avortées dans une même gousse.

phénotypes très forts. Il devient donc impossible de discriminer l'effet de la mutation dans le gène d'intérêt, des autres mutations. Pour pallier ce problème, il faut d'abord obtenir des mutants homozygotes pour une mutation LEAM puis effectuer un nettoyage du fond génétique par des « backcross » (croisement avec des plantes sauvages) successifs. Ainsi, les mutations autres que celles situées dans le gène LEAM sont progressivement éliminées. Il est communément admis que cinq backcross minimum sont nécessaires pour nettoyer le fond génétique (96,8% d'homozygotie). Sachant que chez le pois, le cycle de graine à graine dure environ quatre mois, il faudra deux ans pour obtenir des plantes homozygotes pour une mutation unique dans LEAM. Enfin, dans l'hypothèse où les graines des mutants homozygotes auraient un développement normal, plusieurs centaines de graines seront nécessaires pour des études physiologiques sur les mitochondries isolées.

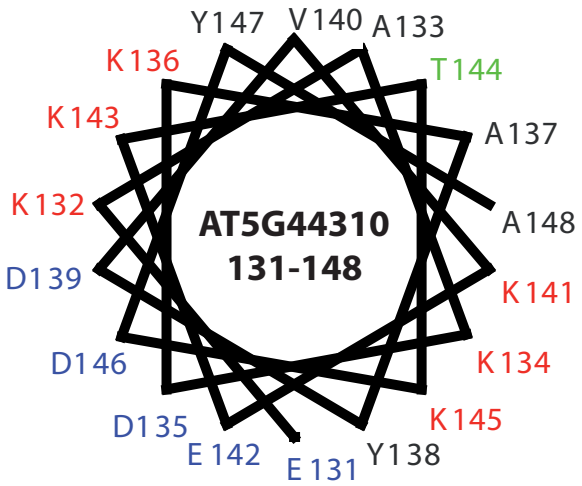


Figure 51 : Projection axiale d'un peptide de AT5G44310 (17 a.a.) via le programme WinPep (Hennig 1999). Les résidus positifs et négatifs sont colorés respectivement en rouge et en bleu.

Mutants d'insertion chez *Arabidopsis thaliana*

Choix des orthologues

Lorsque l'on cherche la séquence protéique la plus proche de celle de la LEAM dans les bases de données d'*Arabidopsis*, le meilleur score d'alignement ($6e^{-28}$ par BLASTP) est obtenu pour la traduction de l'ADNc de At5g44310. Cette accession qui montre un profil d'hydropathie très similaire à celui de la LEAM (données non montrées) est prédite comme étant mitochondriale (par TargetP), et tout comme LEAM, l'expression de son messager est spécifique des graines (données provenant de la base de données Genevestigator ; Macherel et al., 2007). Les logiciels de prédictions de structure comme PSIPRED prédisent AT5G44310 comme étant structurée à 91% en hélice α (pour mémoire, 90% pour LEAM), et qu'elle présente le même paradoxe que la LEAM, à savoir être également prédite comme non structurée (91% pour les deux avec le logiciel FOLDINDEX). Comme le montre la projection d'un de ses motifs représentatifs, réalisée par le programme WinPep, AT5G44310 possède des hélices α de classe A (Figure 51). L'ensemble de ces observations nous ont mené à considérer AT5G44310 comme étant un orthologue très probable de la LEAM. Un second gène At4g21020 code pour une protéine avec un score élevé (BLASTP e-value=$3e^{-22}$) et qui présente globalement les mêmes caractéristiques (localisation mitochondriale, expression, prédictions structurales) peut, de ce fait, être considéré comme un autre orthologue potentiel.

Le choix des lignées d'insertion

Les lignées de mutants d'insertion ont été recherchées dans la base de donnée FLAGdb++ (http://urgv.evry.inra.fr/projects/FLAGdb++/HTML/index.shtml , URGV, Evry), celle du SALK : SIGnaL "T-DNA Express" Arabidopsis Gene Mapping Tool (http://signal.salk.edu/cgi-bin/tdnaexpress), et celle du Riken (http://www.brc.riken.jp/lab/epd/Eng/species/arabidopsis.shtml).

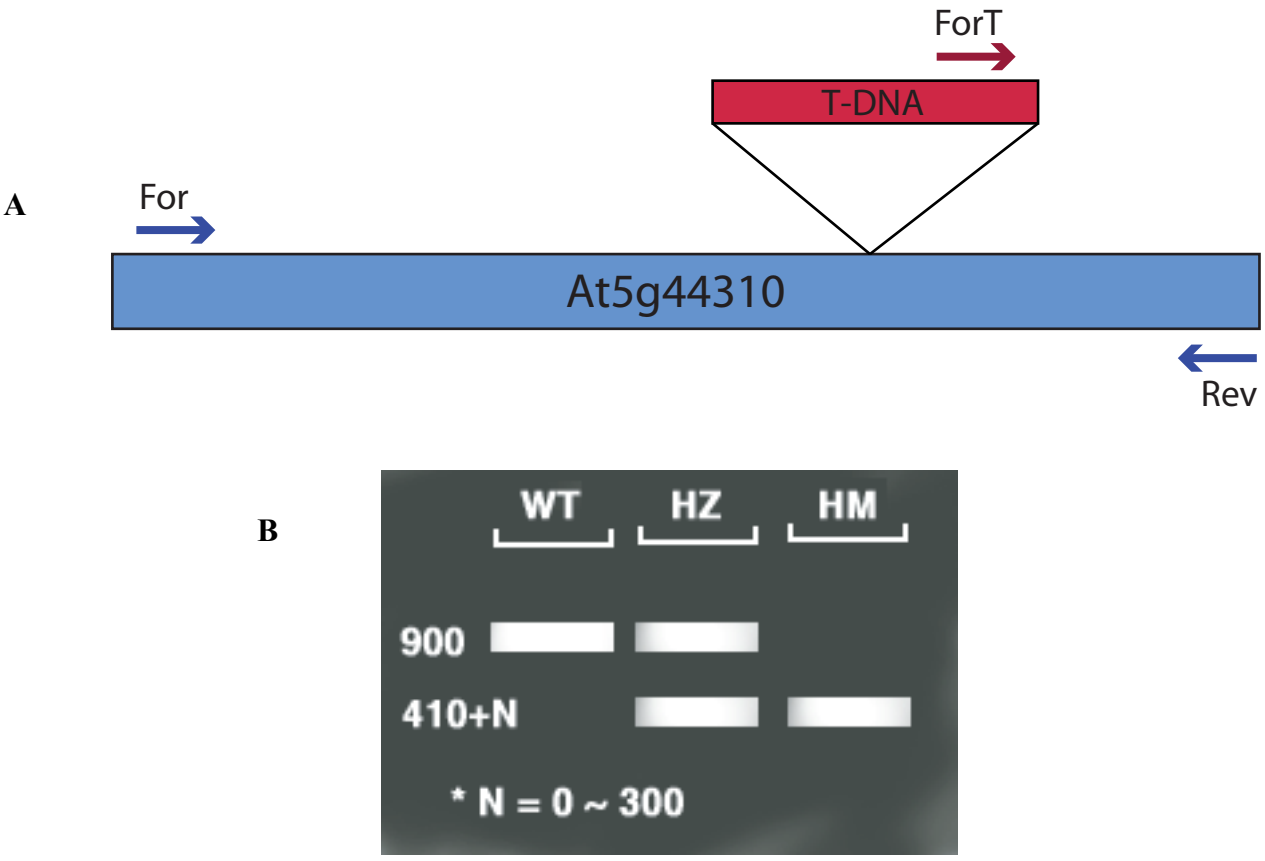


Figure 52 : Protocole de vérification de l'insertion du T-DNA, ainsi que de sa zygotie.
A. Les amorces spécifiques (For et Rev), necessaire à la PCR de test, du gène cible, ici At5g44310, sont symbolisées par une flèche bleue. L'amorce spécifique du T-DNA est figurée par une flèche rouge (ForT). Le gel résultant de l'analyse de la PCR réalisée avec ces trois amorces simultanément est donné en **B**.

Trois lignées de mutants d'insertions pour At5g44310 (Salk_062453, Salk_062455, et pst01932 provenant du Riken), et seulement une seule pour At4g21020 (pst 17706 provenant du Riken) ont été identifiées et commandées.

Principe de sélection

A partir des graines fournies par les centres de ressources précités, la sélection en cours a pour objectif d'obtenir des lignées homozygotes pour le T-DNA, et donc dans lesquelles les gènes orthologues de *LEAM* ne devraient plus être exprimés.

Pour chaque lignée, 16 graines de 3ème génération de chaque lignée sont semées, puis leur génotype au niveau du gène d'intérêt est révélé par PCR, en utilisant simultanément trois amorces: Un couple d'amorce spécifique du gène et un troisième du T-DNA ; selon l'état de zygotie le résultat de l'amplification sera différent (figure 52). Au moment de l'écriture de ce manuscrit, la 3ème génération de plante est en court de caractérisation moléculaire.

Conclusion

Nous avons initié différentes approches de génétique reverse (surexpression de LEAM chez *A.th*, mutant KO chez *A.th*, TILLING sur le pois) afin d'appréhender le rôle physiologique de la LEAM. Lors d'études que nous qualifierons de préliminaires, nous avons pu acquérir une expertise dans la conduite de culture d'*Arabidopsis thaliana*, qui nous permettra de caractériser au mieux la collection de mutants que nous sommes en train de constituer. Malgré l'hétérogénéité que nous avons observée dans beaucoup de nos expériences, un avantage de la surexpression de LEAM dans le cas d'un stress à la congélation, semble prometteur.

Discussion et Perspectives

« L'insatisfaction est le premier pas vers le progrès »

Oscar Wilde

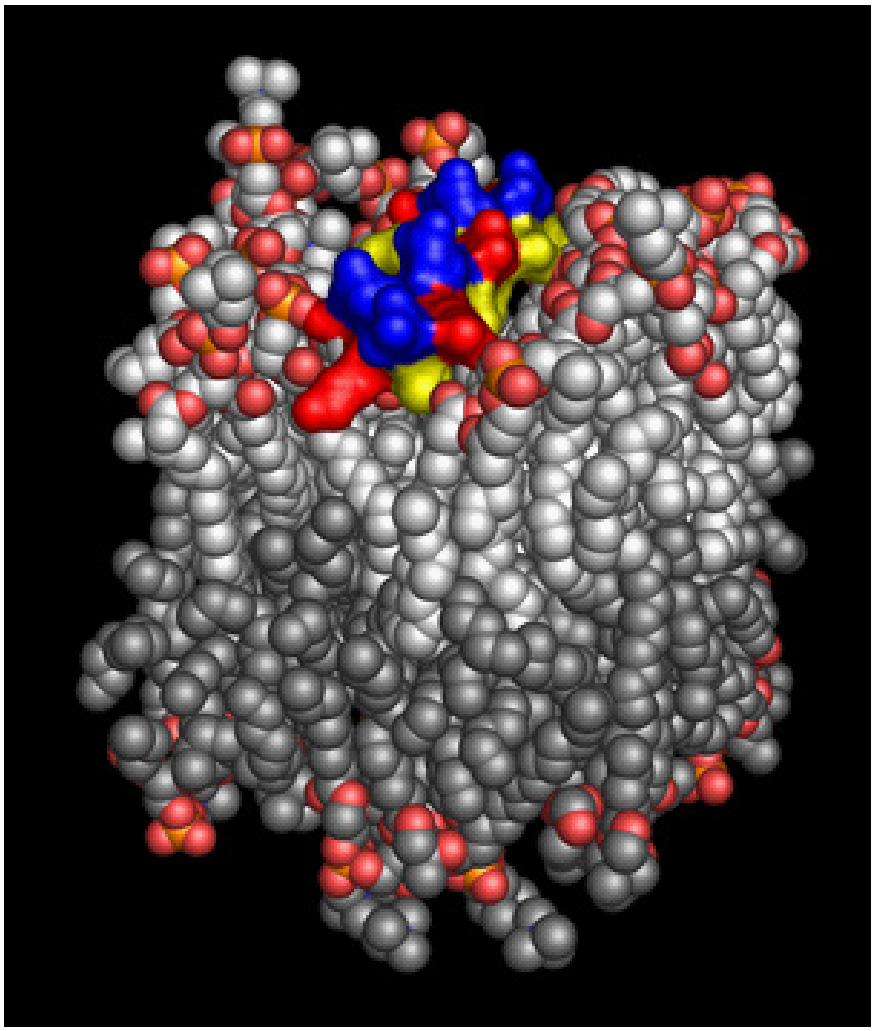


Figure 53 : Simulation d'insertion d'un peptide (motif répété de la LEAM) au niveau de la membrane interne mitochondriale (à l'état sec), en gris clair les phospholipides de l'hémi-membrane en contact avec la matrice mitochondriale, et en gris foncé les phospholipides de hémi-membrane en contact avec l'espace intermembranaire. (En rouge et orange les groupements phosphate des phospholipides. Pour la protéine, même code couleur que la figure 20. Il n'est représenté ici qu'un peptide de 20aa).

Discussion

Ce travail de thèse a porté sur la caractérisation structurale et fonctionnelle de LEAM, une protéine LEA mitochondriale préalablement identifiée au laboratoire dans le cadre de la thèse de Johann Grelet (2001-2004 ; Grelet et al., 2005). L'ensemble des résultats biochimiques et biophysiques nous ont amené à proposer un modèle fonctionnel basé sur une transition structurale réversible de LEAM induite par la déshydratation (voir Figure 28; Tolleter et al., 2007). Ainsi, à l'état sec, la LEAM, repliée en hélice α amphiphile, viendrait s'insérer dans le feuillet interne de la membrane interne mitochondriale, parallèlement à son plan, dans une configuration qui rappelle celle des apolipoprotéines recouvrant les vésicule de LDL humaine. Une modélisation de l'interaction d'un peptide caractéristique de LEAM avec une bicouche lipidique est proposée dans la Figure 53. Dans cette configuration la LEAM pourrait renforcer la membrane interne aux faibles teneurs hydriques, comme le suggère les expériences de protections des liposomes. En revanche à l'état hydraté, la LEAM est localisée dans la matrice sous une forme désordonnée, lui permettant ainsi de ne pas interférer avec le fonctionnement de la mitochondrie.

Il est important d'estimer si les quantités de LEAM contenues dans la mitochondrie sont suffisantes pour assurer une telle protection membranaire. Pour cela nous avons estimé le nombre de LEAM qui seraient requises pour couvrir les surfaces libres de protéines de la membrane interne des mitochondries (Figure 54). Cette approximation indique que quelques dizaines de milliers de polypeptides suffiraient à assurer la couverture nécessaire. Ce nombre est en accord avec la représentation de LEAM dans le protéome mitochondrial (1-3% des protéines solubles ; Bardel et al., 2002). Sur la base de ces estimations, le modèle apparaît donc plausible.

Etant donné que les protéines LEA sont très hydrophiles, leur association avec des membranes semble à priori peu probable, et a rarement été décrite dans la littérature. Il semble même extrêmement improbable que des protéines LEA puissent être transmembranaires (Tunnacliffe and Wise, 2007). Pourtant les

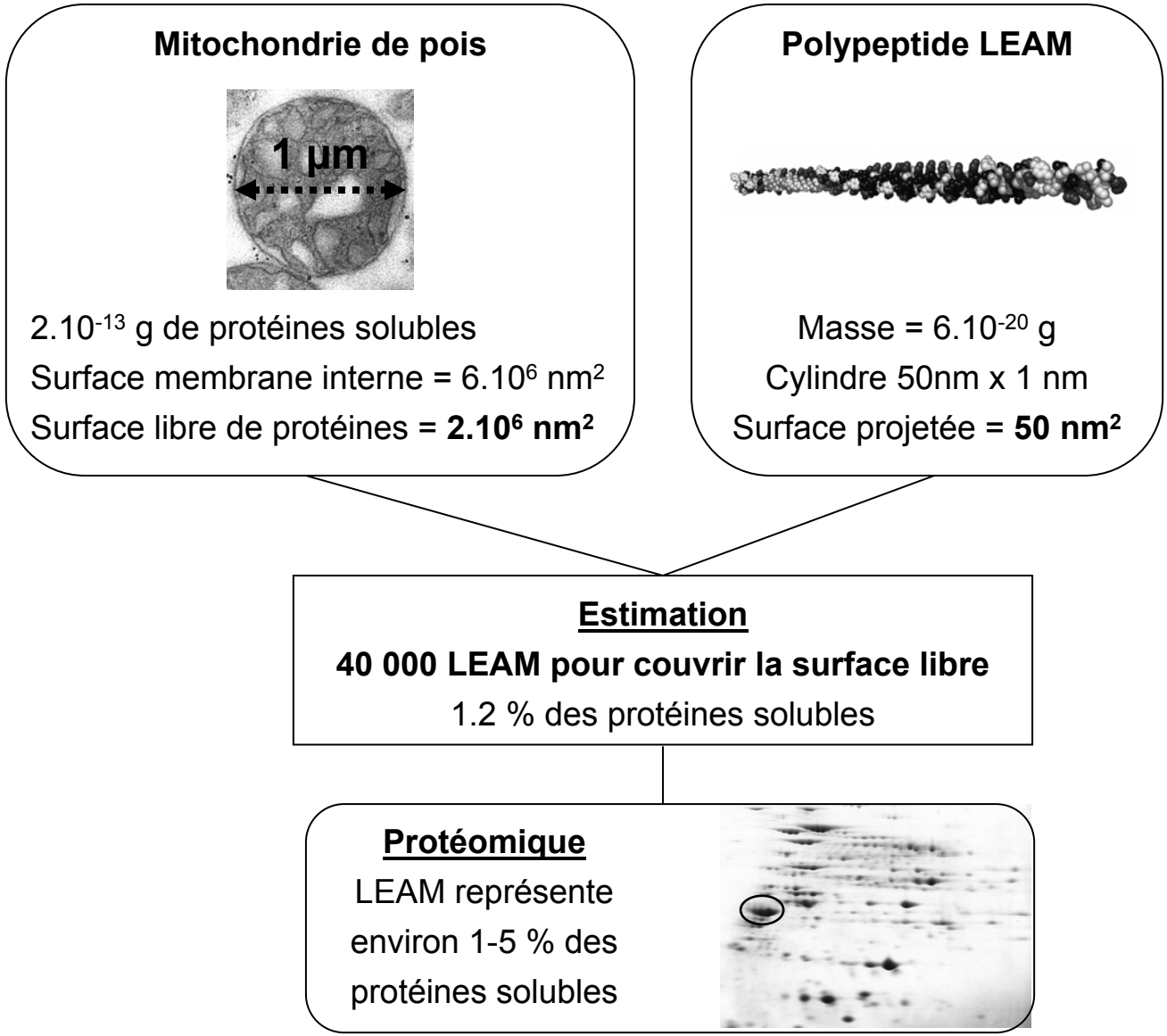


Figure 54 : Estimation de la quantité de LEAM nécessaire pour protéger la membrane interne.
Pour les mitochondries, les organites ont été assimilés à des sphères de 1 µm de diamètre, avec une surface de membrane interne doublée par la présence des crêtes (Benamar et al., 2003). La surface libre de protéines a été arbitrairement estimée à 1/3 de la surface de la membrane, et la quantité de protéine par la mitochondrie a été déduite de la teneur en protéine matricielle estimée à 400g.L^{-1} (Douce, 1985). Les estimations des proportions de LEAM dans le protéome mitochondrial soluble proviennent de l'analyse de Bardel et al. (2002).

travaux de Danyluk et al. (1998) montrent que la protéine WCOR410, une déhydrine de blé, s'accumulerait préférentiellement à proximité de la membrane plasmique dans les tissus particulièrement exposés à un risque de déshydratation lors de stress à basse température. Une autre déhydrine, la DHN1 de maïs, qui est désordonnée en solution, se structure très partiellement en hélice α (1-9%) au contact de liposomes de petite taille (Koag et al., 2003). Dans le cas de la LEAM, sa propension à se structurer semble indépendante de la présence des liposomes, mais est très fortement liée à l'état hydrique, comme cela a été montré pour plusieurs protéines LEA n'interagissant pas avec les membranes (Goyal et al., 2003 ; Wolkers et al., 2001 Shih et al., 2004). La LEAM est ainsi la première protéine LEA pour laquelle une interaction avec les membranes à l'état sec a été démontrée (Tolleter et al., 2007)

Lors de la caractérisation initiale de la LEAM, un effet protecteur avait été mis en évidence lors de tests de dessiccation *in vitro* réalisés sur deux enzymes mitochondriales, la fumarase et la rhodanèse (Grelet et al., 2005). Cette protection, bien qu'efficace, nécessite des quantités importantes de LEAM, équivalentes à celles des protéines cibles. Les autres études ayant rapportées des effets protecteurs de macromolécules par des protéines LEA font également appel à des quantités considérables de protéines protectrices (exemple Goyal et al, 2005 ; Honjoh et al. 2000), ce qui suggère que les mécanismes sous-jacents font intervenir des interactions protéine/protéine. Dans le cas de la matrice mitochondriale la protection efficace de nombreuses protéines par la LEAM nécessiterait sans doute des quantités très importantes. Bien que la LEAM soit la protéine la plus représentée dans l'analyse du protéome soluble des mitochondries de graines (Bardel et al. 2002), il semble peu probable qu'elle soit en mesure d'interagir avec l'ensemble des protéines. L'intervention de la LEAM dans la protection des membranes apparaît donc comme un scénario plus pertinent. On ne peut cependant pas exclure un double rôle de la LEAM, qui protégerait à la fois la membrane ainsi qu'un nombre limité de protéines matricielles des effets de la dessiccation,

Bien que l'expression des protéines LEA soit très fortement corrélée avec la tolérance aux stress abiotiques, en particulier la dessiccation et le froid, leur rôle physiologique est encore énigmatique. A notre connaissance, aucune étude portant sur des mutants déficients dans une protéine LEA de plante supérieure n'a été rapportée. D'une manière générale, des approches de type KO sont plus aléatoires pour des protéines faisant parties de familles complexes, comme les LEA qui comportent une cinquantaine de gènes chez *Arabidopsis thaliana* (Hundertmark and Hincha, 2007). Chez la mousse *Physcomitrella patens*, l'inactivation d'un gène de déhydrine s'est traduite par un affaiblissement de la capacité de récupération après un stress salin ou osmotique (Saavedra et al., 2006). Chez d'autres organismes tels que la bactérie *Deinococcus radiodurans* et le nématode *Caenorhabditis elegans* l'inactivation de gènes codant des protéines LEA a amoindri la tolérance à la dessiccation (Battista et al., 2001 ; Gal et al., 2004). De nombreuses études ont concerné la surexpression de protéines LEA chez différents microorganismes (bactéries, levures, algues) et chez les plantes, avec des effets très variables en ce qui concerne la tolérance aux stress (voir introduction).

La fonction supposée de la LEAM étant la protection des mitochondries contre les effets délétères de la dessiccation, on peut s'interroger sur l'impact de la protéine au niveau de la physiologie des plantes. Nous avons initié une approche perte de fonction par la stratégie de TILLING chez le pois, en espérant isoler des mutants déficients en LEAM. Sur les 23 mutants de LEAM sélectionnés à partir de la collection de 4800 individus, aucun n'a présenté d'interruption de traduction, ce qui pourrait laisser supposer que le gène est essentiel. Nous continuerons cependant à caractériser des mutants qui pourrait être affectés dans l'adressage ou la structure de la protéine. Des lignées de mutants d'insertion chez *Arabidopsis* sont en cours de sélection et devrait permettre de préciser l'importance de la protéine pour la survie de la graine, avec la possibilité de maintenir l'hétérozygotie si les mutations s'avéraient létales.

De nombreuses approches de type "gain de fonction" ont été réalisées en surexprimant des protéines LEA chez différents organismes. Les résultats obtenus

ont été disparates, notamment chez les microorganismes, et peu concluant, en terme de résistance au stress, chez les plantes supérieures (voir introduction). Nous avons surexprimé la LEAM sous le contrôle d'un promoteur constitutif fort chez Arabidopsis et les lignées obtenues accumulent effectivement la protéine qui est à priori localisée dans les mitochondries. Nous n'avons pas observé de phénotype particulier dans des conditions de culture normales. Malgré de nombreux essais en situation de stress (hydrique, osmotique, froid, gel), nous ne sommes pas parvenus à mettre en évidence une tolérance au stress, dans les conditions étudiées, pour les lignées transgéniques. Au niveau des graines, l'absence de phénotype remarquable pourrait être imputée à la forte expression des deux orthologues d'Arabidopsis. Il serait cependant intéressant d'étudier l'influence de l'expression du transgène sur celle des gènes endogènes pour mettre en évidence une éventuelle signalisation rétrograde (Rhoads et al., 2005 ; Rhoads et Subbaiah, 2007).

Plusieurs hypothèses peuvent être émises pour expliquer les résultats négatifs en matière de tolérance au stress abiotique des lignées transgéniques. Tout d'abord comme nous l'avons montré ci dessus, le mécanisme de protection des mitochondries contre la dessiccation nécessite la présence d'une quantité suffisante de LEAM pour recouvrir les surfaces accessibles de la membrane interne. Cette quantité minimum n'est peut être pas atteinte dans les mitochondries des lignées transgéniques, qui ne peuvent accéder ainsi au seuil de tolérance requis. Bien que nous n'ayons pas encore effectué de mesures précises de l'accumulation de la LEAM dans les mitochondries de feuilles d'Arabidopsis transgénique, celle-ci nous apparait cependant inférieure à celle des mitochondries de graines de pois. Une autre hypothèse est que l'expression d'une seule protéine de stress mitochondriale, comme la LEAM, ne suffise pas à conférer une tolérance mitochondriale d'une part, et à des stress dont l'impact n'est pas limité à la mitochondrie, d'autre part. La remarquable tolérance au stress thermique des mitochondries de graines par rapport aux mitochondries d'épicotyle de pois, suggère que d'autres facteurs (HSP22, composition lipidique) que la LEAM sont impliqués dans la protection des organites (Stupnikova et al., 2006). Dans cet esprit, nous avons généré des plantes transgéniques surexprimant simultanément

la LEAM et la HSP22 en vu d'une caractérisation phénotypique approfondie. La complexité et la multifactorialité des mécanismes de tolérance au stress explique sans doute nos difficultés, ainsi que celles rencontrées lors de la surexpression de protéines LEA individuelles chez les plantes, qui n'a jamais donné de résultats prodigieux (Tunnacliffe et Wise, 2007). Enfin, comme nous l'avons évoqué précédemment, la mise en place de tests de stress abiotique soulève de nombreux problèmes au niveau de la reproductibilité des conditions expérimentales et de l'état physiologique des plantes.

Les travaux de Stupnikova et al. (2006) ont mis en exergue la capacité des mitochondries isolées de graines de pois à fonctionner à des températures physiologiques extrêmes (jusqu'à –3,5°C). Ceci suggère que les mécanismes de protection des mitochondries contre la dessiccation autorisent une tolérance "croisée" à d'autres stress. Etant donné que les gènes codant pour des protéines LEA ressortent fréquemment dans les analyses transcriptomiques à grande échelle portant sur la réponse au froid (Thomashow, 1999), la LEAM pourrait donc également intervenir dans la tolérance au froid au niveau des graines. Dans plusieurs cas, l'expression ectopique de protéines LEA a permis d'augmenter la tolérance au froid et/ou au gel chez la levure (Honjoh et al., 1999), chez le tabac (Hara et al., 2003), et chez *Arabidopsis* (Puhakainen et al., 2004).
L'hypothèse d'un rôle de la LEAM dans la tolérance aux basses températures pourra être éprouvée au travers des analyses de phénotypages des mutants de perte ou de gain de fonction. A ce jour nous disposons de deux indices encourageant qui sont respectivement, la survie préférentielle des lignées de surexpression à un stress froid (voir Figure 45) et la capacité de la LEAM à protéger des liposomes des effets délétères de la congélation (voir Figure 33).

Le fait que LEAM ne possède pas de structure tridimensionnelle définie en solution la situe sans ambiguïté dans la famille émergente des "natively unfolded proteins". Il s'agit de protéines (ou de domaines) qui se distinguent par l'absence de structure tertiaire définie dans des conditions physiologiques. Ces protéines

NUF (pour natively unfolded) sont passées du statut de curiosité à celui d'objets de grand intérêt quand il est apparu que plus d'un quart des protéines répertoriées comportaient des séquences probablement désordonnées (Romero et al., 2001). Les protéines NUF égratignent le dogme structure-fonction des protéines, car en dépit de leur absence de structure définie, elles interviennent dans des fonctions cellulaires cruciales et des pathologies très diverses (Pour revue voir: Wright and Dyson, 1999; Dunker et al., 2001; Uversky 2000; Fink 2005). Plusieurs protéines LEA sont apparues dépourvues de structure à l'état natif (Mc Cubbin et al., 1985; Russouw et al., 1995; Lisse et al., 1996; Wolkers et al., 2001; Soulages et al., 2002; Goyal et al., 2003; Soulages et al., 2003; Shih et al., 2004; Mouillon et al., 2006), et il est probable que l'absence de structure tertiaire à l'état natif soit une caractéristique majeure des protéines LEA (Tunnacliffe et Wise, 2007). En solution, LEAM se comporte comme un monomère complètement dépourvu de structure secondaire, et qui occupe un volume hydrodynamique élevé. D'un point de vue thermodynamique, il s'agit d'un état stable, qui est probablement inscrit dans l'agencement de la séquence primaire de la protéine, comme l'est la structure tertiaire pour les protéines structurées (Anfinsen, 1973). Les séquences désordonnées se distinguent par un certain nombre de critères qui ont été exploités pour alimenter des logiciels de prédiction des séquences désordonnées: faible complexité, faible hydrophobicité combinée avec une forte charge nette, flexibilité, absence dans les structures tridimensionnelles établies…(Uversky et al., 2000; Dunker et al., 2001; Romero et al., 2001; Linding et al., 2003, 2003b; Vucetic et al., 2003; Ward et al., 2004; Coyteaux and Poupon, 2005; Dosztányi et al., 2005b; Prilusky et al., 2005; Yang et al., 2005; Vullo et al., 2006). La LEAM, qui obtient des scores très élevés avec tous ces programmes, apparaît donc comme un modèle idéal de protéine désordonnée. D'une manière générale, les NUF sont plutôt appauvries en W, C, F, I, Y, V, L ,N et enrichies en résidus A, R, G, Q, S, P, E, K (Dunker et al., 2001). La LEAM ne comporte effectivement que 16.2 % du premier groupe de résidus, malgré une relative abondance de Tyr (5,6 %) et Val (4.7%). Le second groupe totalise 63,5 % des résidus, mais curieusement la LEAM mature ne contient aucune proline. Cette particularité pourrait être liée au fait que la proline perturbe la formation des hélices α, ce qui interférerait avec la

structuration de la LEAM à l'état sec. Cette hypothèse est renforcée par le fait que les orthologues et les protéines apparentées à LEAM dans les banques de données ne comportent pas ou très peu de résidus Pro, qui sont alors localisées au début (séquence d'adressage) ou bien à la fin des polypeptides (Tableau VII).
Les protéines NUF peuvent être classées en deux types différant par leur compacité et leur volume hydrodynamique (Uversky 2002). Le premier cas correspond aux polypeptides désordonnés qui adoptent alors des conformations complètement relaxées (intrinsic coil). Le second cas correspond à des polypeptides qui adoptent une conformation un peu plus compacte du type "premolten globule" qui comporte une proportion de structures secondaires. Les données de dichroïsme circulaire indiquent que la LEAM est très certainement dans une conformation de "premolten globule" en solution. Une telle disposition confère peut-être une stabilité particulière à la LEAM, qui s'avère être une protéine particulièrement robuste, notamment face aux mécanismes de protéolyse *in vivo*. En effet, la LEAM, qui est synthétisée uniquement lors du développement des graines, peut persister plusieurs jours dans les cotylédons des graines germées, sans signe de dégradation (Grelet et al., 2005). Une autre protéine LEA, la AavLEA1 du nématode *Aphelanchus avenae*, est clairement apparue du type "intrinsic coil" sur la base des mêmes critères spectroscopiques (Goyal et al., 2003). Cependant, il faut signaler le fait que lors de la déshydratation des nématodes, AavLEA1 est soumise à une forte protéolyse, les peptides libérés ayant un rôle protecteur (Goyal et al., 2005). Ces observations suggèrent que la conformation des protéines LEA dans leur état désordonné pourrait être un élément important vis-à-vis de leur stabilité, voir d'un rôle à découvrir, mais cela reste cependant à démontrer avec certitude.

A notre connaissance, toutes les protéines NUF dont la fonction est établie (ou pressentie) se caractérisent par leur capacité à se replier, voire à s'agréger, sous l'influence de facteurs du milieux (stress, ligands). La plupart des fonctions décrites concernent des mécanismes de régulation qui exploitent cette capacité de transition structurale (voir revues: Wright and Dyson 1999; Dunker et al., 2001; Fink 2005). Un exemple spectaculaire est fourni par le répresseur lac dont la

fixation sur l'ADN dépend du repliement d'un domaine NUF (Slijper et al., 1997). La LEAM possède une capacité remarquable à se replier en fonction des conditions du milieu (TFE, SDS, déshydratation). GmPM16, une protéine LEA de soja pressentie pour participer à la formation de l'état vitreux cytosolique, présente un comportement similaire (Shih et al., 2004). Plusieurs autres protéines LEA ont démontré une capacité à se structurer, au moins partiellement, en fonction de la température (Soulages et al., 2002; 2003), de la force ionique (Russouw et al. 1995), de la dessiccation (Wolkers et al., 2001; Goyal et al., 2003) ou du TFE (Lisse et al., 1996; Soulages et al., 2002, 2003). Il est donc vraisemblable que la majorité des protéines LEA possèdent une capacité à se structurer, notamment lors de la déshydratation, un phénomène intimement associé à la physiologie des semences. Il est à noter que la LEAM n'est pas capable de se structurer à l'issue de la lyophilisation, certainement parce que la congélation rapide fige les polypeptides dans leur conformation désordonnée.

La LEAM est sans doute la première protéine NUF mitochondriale caractérisée à ce jour, ce qui soulève des questions. La résistance aux protéases, notamment mitochondriales, est un premier point qui a été évoqué ci-dessus. La problématique du mécanisme d'import de la LEAM dans les mitochondries est un autre aspect d'intérêt majeur. En effet, les protéines importées dans les mitochondries doivent en général être dépliées ou étirées préalablement à l'importation, ce qui fait appel à des chaperons moléculaires, ainsi qu'au potentiel de membrane mitochondrial (Huang et al., 2002; Pfanner and Truscott, 2002). Les mécanismes d'importation, étroitement liés aux problèmes de dépliement et de repliement des protéines, font l'objet d'études extrêmement détaillées au niveau moléculaire et thermodynamique par plusieurs équipes internationales, avec des controverses portant sur la nature exacte et sur la contribution des forces impliquées (De Los Rios et al., 2006). La LEAM, en tant que protéine désordonnée, est donc un outil de grand intérêt pour disséquer l'importance de la contribution du dépliement du précurseur sur l'importation, et une collaboration a été engagée sur cet aspect avec l'équipe de Pierre Goloubinoff à Lausanne.

La remarquable similarité du profil en 2D-PAGE de la LEAM produite dans des organismes différents, et même *in vitro*, a permis de mettre en évidence une panoplie de modifications post-traductionnelles intrinsèques, et spontanées. Des expériences bien antérieures avaient mis en évidence la présence de plusieurs spots en 2D-PAGE pour deux protéines LEA cytosoliques de coton, mais ce profil avait été attribué à un artefact (carbamylation) engendré par le traitement des échantillons à l'urée (Roberts et al., 1993). Dans le cas de la LEAM, cette hypothèse a pu être écartée car des modifications post-traductionnelles pouvant expliquer ces profils ont été identifiées à la fois au niveau des spots excisés des gels et au sein de la protéine recombinante purifiée.

Ces modifications, essentiellement des déamidations (Gln, Asn) et des oxidations (Trp), interviennent sans doute très rapidement lors de la synthèse de la protéine comme l'indique la production *in vitro* et la stabilité des profils en 2D-PAGE qui ne varient jamais. La déamidation chimique des résidus Asn et Gln est habituellement considérée comme un processus lent, qui peut nécessiter des jours, voire des mois ou des années en conditions physiologique, et pour lequel un rôle d'horloge moléculaire est considéré (Robinson 2002; Reissner and Aswad, 2003). La déamidation chez la LEAM est donc inhabituelle par sa rapidité, bien qu'elle soit certainement favorisée par la présence de résidus Gly ou Ser directement en aval des résidus modifiés, ainsi que par la probable flexibilité du polypeptide (Kosky et al., 1999; Robinson 2002), en liaison avec sa structure désordonnée. Une enzyme ubiquiste impliquée dans la restauration des résidus déamidés, la protein-L-isoaspartyl O-methyltransferase (PIAMT), a été identifiée comme un acteur important des mécanismes de réparations des protéines dans des modèles aussi divers que les neurones (Kim et al., 1997; Yamamoto et al., 1998) et les graines de blé, d'orge et d'*Arabidopsis* (Mudgett et Clarke 1993, 1996; Mudgett et al., 1997). Nos résultats suggèrent soit que la PIAMT n'est présente ni dans les mitochondries (plante, levure), ni dans les bactéries *E. coli*, soit que la LEAM n'est pas un substrat adéquat pour cette enzyme, entre autres hypothèses. Des informations complémentaires sur la localisation subcellulaire de la PIAMT ainsi que des essais *in vitro* seraient nécessaires pour élucider ces aspects.

L'oxydation des tryptophanes est fréquemment rencontrée dans le cadre des analyses protéomiques des mitochondries, à la fois chez les animaux et les plantes, cette modification étant probablement liée à a production mitochondriale d'espèces activées de l'oxygène (Taylor et al., 2003; Møller and Kristensen, 2006). La déamidation et l'oxydation des protéines sont généralement considérés comme étant liés à la dégradation des protéines au cours du vieillissement et en relation avec le stress oxydatif (Berlett and Stadtman 1997; Reissner and Aswad, 2003). Dans le cas de la LEAM, ces modifications sont intrinsèques à la protéine dès sa synthèse, et sur la base des modélisations effectuées, il semble qu'elles puissent restaurer des imperfections dans les motifs structuraux de la forme en hélice de la LEAM. Nous proposons donc que ces modifications chimiques ne sont liées ni aux conditions de stress, ni au processus de vieillissement, mais plutôt qu'elles soient impliquées dans la biogenèse de la protéine. De telles modifications chimiques qui résultent sans doute de l'environnement chimique immédiat des résidus modifiés ne devraient pas engendrer de pression évolutive étant donné que le résidu considéré est ainsi parfaitement fonctionnel. Il sera très intéressant de savoir si d'autres protéines LEA sont soumises à des modifications de ce type. On peut suspecter que ce soit le cas pour les protéines de coton évoquées précédemment (Roberts et al., 1993)

L'ensemble de nos travaux portant sur l'identification et la caractérisation structurale et fonctionnelle d'une protéine LEA exprimée dans les mitochondries de graines de pois a permis de mettre en évidence un nouveau mécanisme de protection contre la dessiccation (Thèse de doctorat Johann Grelet 2004 ; Thèse Dimitri Tolleter 2007 ; Grelet et al., 2005 ; Tolleter et al., 2007). Une question importante concerne l'universalité, d'une part, de la protection des mitochondries, et d'autre part du mécanisme de protection des membranes, chez les organismes anhydrobiotes.

Une étude en cours au laboratoire, réalisée en collaboration avec l'URLEG (INRA-Dijon), indique que la LEAM, détectée par western blot, est présente chez 93 cultivars contrastés de pois. Les profils d'expression révèlent une variabilité au

niveau de la taille de la protéine, avec deux groupes différant de quelques kDa. L'abondance de la LEAM est par contre similaire chez tous les cultivars, à l'exception d'un seul pour lequel elle est réduite. La LEAM est donc très certainement exprimée chez tous les cultivars de pois.

Des orthologues très probables ont été identifiés chez *M. truncatula* et *A. thaliana*, et l'exploration du protéome des mitochondries d'embryons de riz a également mis en évidence une protéine LEA apparentée chez cette espèce (Howell et al., 2006). L'identification des orthologues de la LEAM reste délicate car elle doit aller au-delà des similarités de séquences, souvent faibles, pour prendre en compte outre la probabilité d'adressage mitochondrial, des paramètres structuraux (profil d'hydropathie, motifs de classe A). Un orthologue putatif a ainsi été repéré chez *Sporobolus stapfianus*, une plante de résurrection (voir Tableau VII). Sur la base de ces observations, et compte tenu du rôle primordial des mitochondries, il parait raisonnable d'émettre l'hypothèse que la LEAM est présente chez toutes les semences orthodoxes (tolérantes à la dessiccation). Il serait intéressant d'étudier la situation dans le cas des graines récalcitrantes, et de confirmer une éventuelle expression dans le cas de la dessiccation des plantes de résurrection. Chez des anhydrobiotes animaux comme les crevettes *Artemia fransiscana* (Clegg, 2005), des nématodes (Treonis et Wall, 2005) ou des rotifères bdelloïdes (Ricci et Caprioli, 2005), la question est totalement ouverte car des protéines LEA sont impliquées mais les données de séquences très limitées ou inexistantes. On peut cependant supposer que la protection des mitochondries est également une nécessité chez ces organismes, ce qui pourrait impliquer des protéines apparentées à la LEAM. La tolérance à la dessiccation est un caractère complexe, présent dans de nombreux clades des différents domaines et règnes du vivant, et qui est apparu à plusieurs reprises lors de l'évolution des plantes (Oliver et al., 2000). La tolérance à la dessiccation se décline sous plusieurs formes, avec par exemple un fort accent sur les mécanismes de réparation chez les organismes subissant des deshydratations soudaines (mousses, lichens, plantes de résurrection), et une stratégie plus orientée vers des systèmes de protection des chez les graines ou la déshydratation est plus lente et programmée au cours du développement. Cependant la protection des membranes reste une constante et le mécanisme décrit

pour la LEAM pourrait s'appliquer pour d'autres types de membranes. Ainsi, parmi plusieurs protéines putatives apparentées à la LEAM et susceptibles d'exhiber des structures en hélices alpha de classe A, plusieurs pourraient avoir une localisation plastidiale, dans le réticulum ou bien cytosolique, dans le cas d'une protéine de *C. elegans* (voir Tableau VII). Ceci suggère que le mécanisme fonctionnel de la LEAM pourrait être employé dans d'autres compartiments cellulaires et chez des organismes très éloignés sur le plan évolutif.
Comme le souligne une revue récente (Tunnacliffe et Wise, 2007), après plus de vingt ans d'investigation sur ces protéines LEA énigmatiques, le voile commence à se lever, et leur contribution à la tolérance au stress hydrique, à la dessiccation et au froid devrait être bientôt élucidée.

Perspectives

Nos objectifs sont à présent (i) de confirmer le modèle proposé au niveau structural d'une part (ii) de cerner la contribution de la LEAM dans la tolérance au stress abiotique des végétaux. La partie structurale se heurte, d'une part, au facteur limitant de la production en masse de la LEAM recombinante, et d'autre part, au challenge que représentent des études de biochimie structurale avec des membranes à l'état sec. En ce qui concerne la production de protéine recombinante nous fondons quelques espoirs grâce à la surexpression chez la mousse *P. patens* chez laquelle nous arrivons à des niveaux d'expression de l'ordre de 1% des protéines totales. D'autres alternatives comme l'expression plastidiale sont également envisagées. En collaboration avec Lilian Jaquamet (Groupe Synchrotron, IBS-Grenoble), nous avions tenté sans succès en 2005 de cristalliser la LEAM recombinante (1500 conditions testées). Compte tenu du modèle que nous proposons à présent, il convient certainement d'imaginer d'autres stratégies permettant d'établir la structure de la LEAM dans un contexte membranaire et en principe à l'état sec. Une technique envisageable au premier abord pourrait être la microscopie à force atomique (AFM) qui devrait permettre d'examiner la structure de bicouches lipidiques incorporant la LEAM. Des

collaborations avec des spécialistes de la structure des protéines et des membranes seront indispensables pour résoudre au niveau moléculaire les interactions entre la LEAM et les membranes.

Sur le plan des approches fonctionnelles que nous avons abordées par des stratégies de génétique inverse, nous souhaitons poursuivre la caractérisation moléculaire et phénotypique des mutants de pois obtenus par TILLING et des lignées KO d'Arabidopsis. Il pourra être envisagé de rechercher de nouveaux mutants de pois dans la deuxième banque TILLING de pois, générés par Versailles. Les mitochondries de graines se distinguant par la présence simultanée de la LEAM et de l'HSP22, nous avons construit des lignées d'*Arabidopsis* surexprimant les deux protéines, et qui seront analysées prochainement. Dans le même esprit, nous disposerons bientôt de souches de levures ayant intégré dans leur génome des vecteurs optimisés (choix des codons et structure secondaire ARN) pour la surexpression individuelle ou simultanée des deux protéines. Nous espérons ainsi atteindre des niveaux d'expression comparables de ceux observés pour les mitochondries de graines, afin de pouvoir étudier l'impact spécifique des protéines LEAM et HSP22 sur la tolérance au stress des mitochondries et des cellules.

Procédures expérimentales

Matériel végétal et conditions de culture

Conditions normales de culture

Les *Arabidopsis thaliana* sont cultivées dans une chambre de culture à 23 °C et 70 % d'humidité relative. Une photopériode (16 h de jour, 8 h de nuit) est appliquée pour accélérer la floraison (*Arabidopsis* est une plante de jours longs). L'intensité lumineuse reçue par les plantes est de 100 µmoles de photons/m^2/s dans la gamme de longueur d'onde PAR (Photosynthetically Active Radiation). Le support de culture est un terreau de semis fourni par la SNES, conforme aux normes ISTA, sur lequel les graines sont déposées à l'aide d'un cure-dent. Certaines expériences (tests de germination, stress sur jeunes plantes) sont réalisées dans des boîtes de Petri sur un milieu ½ MS (Murashige and Skoog basal medium, Sigma-Aldrich, St Louis, USA) : 2.2g/L poudre MS Sigma, pH ajusté à 5.9, 0.7% Agar. Ce mode de culture nécessite une désinfection préalable des graines. Elles sont incubées deux minutes dans l'éthanol à 70 %, 10 minutes dans l'eau de Javel 0.5%, puis rincées trois fois cinq minutes dans l'eau distillée stérile. Les graines sont placées sur un papier Whatman imbibé, posé sur le milieu gélosé. Elles sont placées trois jours à l'obscurité et à 4°c (stratification) afin d'homogéneiser la germination. Les boîtes sont ensuite placées dans un phytotron, à 22 °C, et sous un éclairement de 300 µmoles de photons /m^2/s (PAR)

Les pois sont cultivés dans une serre (Institut National d'Horticulture, Angers) à 20 °C. Ils sont plantés individuellement dans des pots de 15 cm de diamètre contenant du terreau Klassman 15. Un éclairage photosynthétique est en fonctionnement sur une période de 16h (de 3h à 19h), lorsque l'ensoleillement extérieur est inférieur à 200W/m^2. Une solution fertilisante diluée (N/P/K: 3/2/6, oligoéléments et fer) est utilisée pour l'irrigation en goutte à goutte (100ml/jour en une fois).

Tests de germination

Des graines préalablement désinfectées *d'Arabidopsis thaliana* sont placées sur un papier Whatman imbibé posé sur du milieu ½ MS 0.7% Agar. Après trois jours à l'obscurité et à 4°c, les boîtes sont placées dans un phytotron, à 22°c, et sous un éclairement de 300 µmoles de photons /m^2/s (PAR). Pour les stress salins,

différentes quantités de sels (NaCl, KCl, LiCl, CsCl) sont rajoutées dans le milieu 1/2MS agar avant autoclave. Pour les stress PEG, les boîtes 1/2MS Agar sont incubées une nuit à température ambiante avec 30 ml d'une solution de PEG 8000 (Sigma). 250 g/L de PEG ou 550 g/L sont dissous dans du ½ MS, MES 2 mM pour obtenir respectivement un potentiel hydrique de -0,5 MPa et de -1,2 MPa (Verslues et al., 2006)

Test de tolérance aux stress abiotiques

Stress sur jeunes plantes. Les graines désinfectées sont déposées sur un papier Whatman imbibé, placé sur du milieu ½ MS contenant 0.7% Agar. Elles sont ensuite incubées 3 jours à 4 °C (stratification) puis placées à 22 °C sous un éclairement de 300 µmoles de photons /m^2/s (PAR).

Stress salins : après quatre jours à 22°C et à la lumière, le papier Whatman avec les jeunes germinations, est transféré sur des boîtes 1/2MS agar contenant differents sels.

*Stress PEG***.** Après quatre jours à 22°C et à la lumière, les jeunes plantes sont transférées sur une boîte ½ MS Agar préincubée pendant une nuit avec 30 ml d'une solution de PEG 8000 permettant d'obtenir des potentiels hydriques de -0.5 et -1.2 MPa (voir paragraphe Tests de germination).

Stress froid. Les boîtes contenant les plantules de quatre jours sont placées dans un cryostat. Différentes températures négatives et différents temps d'exposition sont testés. Les plantes sur leur papier Watman sont transférées sur une boîte ½ MS Agar froide, laissées 24 h à 4°C et à l'obscurité avant d'être replacées à la lumière et à 22 °C.

Stress hydrique. Le papier Whatman avec les plantules de quatre jours est retiré de la boîte et mis à sécher à l'air. Il est replacé après différents temps de séchage sur une boîte ½ MS Agar et réhydraté jusqu'à saturation. La culture est poursuivie à 22°C et à la lumière.

Stress sur plantes matures. Les plantes sont semées dans un terreau homogène (SNES) par groupe d'une demi douzaine. Trois semaines après le semis (juste avant la montaison), les stress abiotiques sont appliqués.

Stress hydrique. Il consiste à arrêter l'arrosage et à le reprendre lorsque toutes les plantes présentent des symptômes sévères de déshydratation. Le taux de récupération est mesuré après plusieurs semaines.

Stress froid. Des plantes de trois semaines cultivées dans du terreau, dont l'arrosage a été stoppé 24h auparavant, sont placées pendant 15h à -5°C et à l'obscurité (la terre est gelée à la fin de cette période). Après ce traitement, elles sont immédiatement remises dans des conditions normales de culture (voir ci-dessus). L'arrosage est repris lorsque le substrat est à température ambiante. La capacité de survie des plantes est mesurée après une semaine.

Surexpression de la LEAM

Surexpression dans *Escherichia coli*

L'ADNc correspondant à la séquence codante de LEAM mature (sans séquence d'adressage) a été cloné sous le contrôle du promoteur de la T7 ARN polymérase dans le vecteur pET3AY (Grelet et al. , 2005). Ce vecteur possède le gène *DnaY* codant pour les ARNt-Arg (AGG/AGA) codon rare chez *E. coli* (Sauge-Merle *et al*., 1999) et un gène de résistance à la carbenicilline. Le plasmide recombinant a été introduit dans la souche d'*Escherichia coli* BL21-AI fréquemment utilisée pour exprimer les gènes qui présentent une toxicité. Dans cette souche le promoteur de la T7 ARN polymérase est régulé de façon positive par le L-arabinose et réprimé par le glucose (Lee *et al*., 1987). Afin d'éviter une expression basale de la LEAM avant l'induction par l'arabinose, tous les milieux de culture sont additionnés de glucose 0,1 % (m/v).

Des colonies isolées sont inoculées dans 75 mL de milieu LBGC (LB additionné de glucose 0,1 % (m/v) et carbenicilline 200 µg/mL). L'incubation est réalisée à 37°C avec une agitation de 200 rpm. Lorsque l'absorbance mesurée à 600 nm atteint une valeur comprise entre 0,6 et 1 les précultures sont concentrées 5 fois par centrifugation, reprises dans du milieu LBGC et stockées à 4°C. 800 mL de milieu LBGC sont ensemencés le lendemain avec 3,2 mL de la préculture concentrée. Les cultures sont incubées à 37°C sous agitation (200 rpm) jusqu'à une absorbance à 600 nm de 0.5. L'expression de la protéine recombinante est

alors déclenchée par l'ajout de L-arabinose 0,2 % (m/v) (Sigma) dans le milieu de culture.

Surexpression dans la levure *Saccharomyces cerevisiae*

La séquence codante de LEAM incluant le peptide d'adressage, a été clonée dans le vecteur pYes2/CT (Invitrogen) sous le contrôle du promoteur Gal4. Le plasmide recombinant a été introduit dans une souche de *Saccharomyces cerevisiae* W303-1A prototrophe pour l'uracyle (souche *ura3*). La transformation par pYes2/CT porteur du gène *Ura3* permet de sélectionner les levures sur un milieu dépourvu d'uracyle.

Les levures sont cultivées à 30 °C, avec une agitation de 300 rpm, dans un milieu YNB (composition par litre : 1,7 g de Yeast Nitrogen Base, 5g de sulfate d'ammonium, 1,3 g cocktail d'acides aminés, 1g KH2PO4). 2% final de lactate, un substrat favorisant le métabolisme respiratoire des levures et la biosynthèse de mitochondries, sont ajoutés et le pH est ajusté à 5,5.

L'expression de LEAM est induite par l'ajout de galactose à 2% (m/v) final.

Surexpression dans *Arabidopsis thaliana*

La séquence codante de LEAM incluant le peptide d'adressage, a été clonée dans le vecteur pFP101 (fourni par François Parcy, UMR 5168 PCV CEA, Grenoble) sous le contrôle du promoteur constitutif 2X35S. Le plasmide porte un gène de résistance à la spectinomycine et un marqueur de sélection, la GFP (Green Fluorescent Protein), sous contrôle du promoteur graine-spécifique At2S3.

Le plasmide recombinant est introduit dans la souche C58 d'*Agrobacterium tumefaciens* (résistante à la rifampicine et à la carbenicilline).

Le protocole de transformation est adapté de Höfgen et Willmitzer (1988). 1 µg de plasmide est mis en présence de 200 µL de bactéries compétentes. L'incubation dure 5 minutes dans la glace. La suspension bactérienne est ensuite placée 5 min dans l'azote liquide puis 5 min à 37 °C**.** Les bactéries transformantes sont sélectionnées à 28 °C sur un milieu LB contenant 100 µg/L de carbenicilline, 50 µg/L de rifampicine et 100 µg/L de spectinomycine.

Les *Arabidopsis thaliana* sont cultivées en jours longs (16 h jour- 8 h de nuit) à 23°C jusqu'à floraison. Des bactéries, en milieu de phase exponentielle de croissance, sont utilisées pour transformer les cellules florales. La suspension bactérienne est centrifugée et resuspendue dans une solution de saccharose à 0.5 % (m/v). Un agent tensio-actif, le Silwet L-77 est ajouté à raison de 0.035% (v/v) juste avant le contact avec les inflorescences. Ce contact se fait par trempage pendant 2 minutes en agitant de temps en temps. Les plantes sont alors couvertes d'un sac plastique pendant 24 heures pour maintenir l'humidité.

Après 2 mois de culture, les semences (T0) sont récoltées et observées en fluorescence avec une loupe binoculaire Olympus SZX12 (photographies prises à l'aide d'un Olympus Camedia C50-60). Les filtres d'excitation utilisés pour la GFP ont une bande passante de 460-480nm, et ceux d'émission 495-540nm. Les graines exprimant la GFP sont semées pour produire des plantes T1. Les semences issues de l'autofécondation des plantes T1 sont analysées pour chaque plante. Seules les plantes produisant des lots de semences composés de 75% (+/- 5%) de graines fluorescentes sont perpétuées. Ces plantes sont hétérozygotes pour le gène codant pour la GFP et donc du gène codant pour la LEAM qui lui est lié. Les lots contenant 85 % ou plus de semences fluorescentes sont écartés, car ils correspondent vraisemblablement à des insertions multiples de la construction GFP-LEAM dans le génome de la plante. Les semences sélectionnées sont plantées pour produire les plantes T2. La ségrégation des semences T2 issues de l'autofécondation des plantes T1 est analysée pour sélectionner les plantes T1 homozygotes pour l'insertion GFP-LEAM. Les semences de ces plantes homozygotes, qui sont toutes fluorescentes, sont récoltées et conservées au sec, à température ambiante et à l'obscurité (voir schéma de sélection, Figure 40). Des feuilles de plantes T2 sont prélevées pour vérifier la présence du gène de la LEAM par PCR et de la protéine par western blot. La localisation mitochondriale de LEAM a été confirmée par immunodétection dans une fraction enrichie en mitochondries.

Par ailleurs, des plantes homozygotes pour LEAM ont été transformées avec un vecteur pFluar101 gracieusement fourni par le Dr Toon Stuitje (Department of Genetics, Institute for Molecular Celbiology, Amsterdam, Hollande) dans lequel a

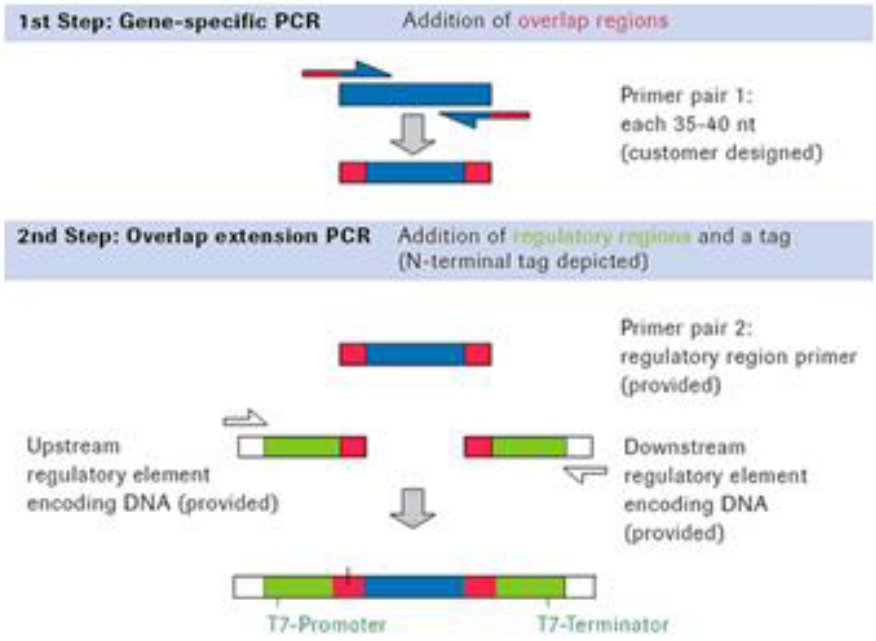
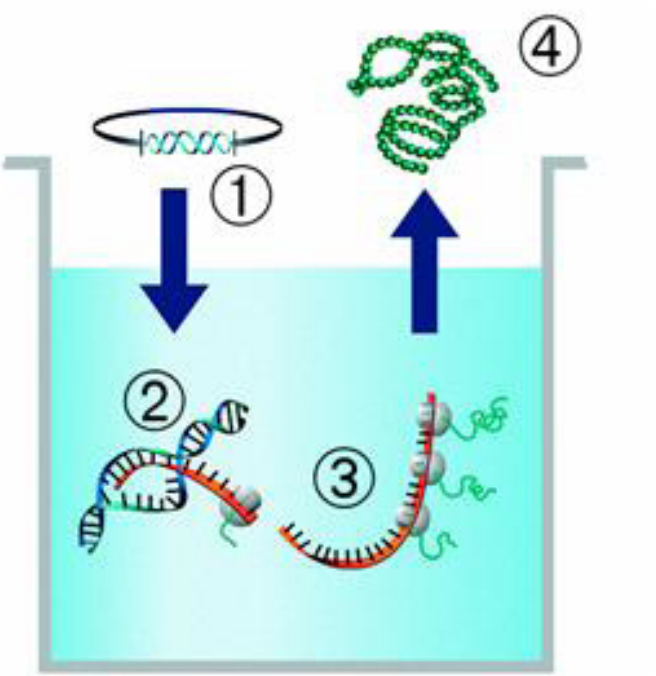


Figure 55 : Obtention de la construction nucléotidique permettant la synthèse protéique avec le RTS

Les premiers primers sont composés de 15 à 20 nucléotides spécifique du gène à exprimer (avec la possibilité de faire de la mutagenèse dirigée afin d'introduire des mutations silencieuse facilitant la traduction par un système bactérien) et 20 nucléotides composant un adaptateur recouvrant la séquence d'élément régulateur de la T7, donné dans le kit. Pour la deuxième réaction de PCR, le produit de la première est mélangé avec le fragment d'ADN portant le promoteur de la T7 et celui portant le terminateur de la T7. Le recouvrement de certaines séquences, permet la formation d'une construction linéaire d'expression, en grande quantité. Cette méthode évite le clonage du gène dans un plasmide d'expression.



Step	Description
1	To a gene of interest, the regulatory elements like T7 promoter, ribosomal binding site and T7 terminator are added by PCR or by cloning it into a pIVEX vector. The template DNA is added to the Reaction Solution.
2 and 3	In a coupled *in vitro* reaction, the template DNA is first transcribed into mRNA by T7 RNA polymerase, followed by translation into protein by the ribosomal machinery present in the *E. coli* lysate.
4	Expressed protein accumulates during the reaction and is harvested after 1–6 hours.

Figure 56 : Principe général de fonctionnement du RTS

été inséré l'ADNc codant la HSP22 mitochondriale de pois. Le transgène est sous le contrôle du promoteur constitutif 2X35S, et le marqueur de sélection RFP (Red Fluorescent Protein) est sous le contrôle du promoteur graine spécifique At2S3. Les filtres utilisés pour la détection des graines contenant la RFP ont une bande d'excitation de 530-555 nm et d'émission 570-625 nm .
Des plantes homozygotes pour LEAM et l'HSP22 ont été obtenues avec le même protocole de sélection que décrit précédemment.

Production de la LEAM *in vitro*

La LEAM a été produite *in vitro* (sans cellule) en utilisant le Rapid Translation system (RTS 100) (Roche Diagnostics).
Une matrice linéaire d'ADN est synthétisée afin d'être transcrite et traduite par le système issu de lysat d'*E.coli*. Le principe de fabrication de cette matrice est donné dans la figure 55. Pour la PCR1 le primer sens est (5' CTTTAAGAAGGAGATATACCATGAGTCATCAATCAGACTGGAGAAATGCA 3') et le primer antisens est (5' TGATGATGAGAACCCCCCCCTTAATAACCCCTATTCTGAT 3') . L'amplification a comporté 20 cycles avec une dénaturation à 94°C pendant 30 secondes, une hybridation à 50°C pendant 30 secondes et une élongation à 73°C pendant 90 s. Pour la deuxième PCR ont été utilisés le T7 promoter primer (5' TAATACGACTCACTATA 3'), et le T7 terminator primer (5' GCTAGTTATTGCTCAGCGG 3').
La transcription-traduction s'effectue pendant 6h à 30°C avec une agitation de 350rpm dans un Proteomaster (Roche Diagnostics) (figure 56).

Préparation d'organites

Préparation de mitochondries de levure

Les mitochondries de levure sont purifiées selon le protocole modifié de Guérin et *al.* 1979.

Une préculture de 50 mL est réalisée en milieu YNB lactate sans uracyle (voir paragraphe Surexpression dans la levure *Saccharomyces cerevisiae*) à partir d'une boîte fraîche YNB glucose sans uracyle. Après 24 h à 30 °C et agitation de 300 rpm, 22mL de préculture (densité optique à 600 nm entre 1 et 1.5) sont dilués dans 500 mL de YNB lactate sans uracyle en présence de l'inducteur (galactose 2% final). La culture est ensuite incubée à 30°C (300 rpm) jusqu'à ce que la densité optique atteigne à 600 nm une valeur entre 2 et 3. Les étapes suivantes sont réalisées à température ambiante. Les cellules sont sédimentés à 3000 g 10 min (JA10 Beckman), le culot est repris avec de l'eau distillée et recentrifugé. Le culot est repris dans un tampon Tris 0.1 M pH 9.3 contenant 0.5 M de βmercaptoéthanol et la suspension est incubée 10 min à 30 °C avec une faible agitation. Les levures sont lavées trois fois par centrifugation 3000g, 10 min (JA10 Beckman) dans un milieu Tris 10 mM pH 7, KCl 0.5 M. Le culot final est repris dans le tampon de digestion : phosphate de sodium 30 mM pH 7.5, EGTA 1mM, sorbitol 1.35 M. De la zymolyase (Seikagaku corporation, Japon) est alors ajoutée à raison de 10 mg pour 1 g de matière sèche de levure. L'incubation dure 1 heure maximum à 30 °C sous faible agitation, l'apparition des sphéroplastes (levures dépourvues de parois) étant suivie régulièrement au microscope.

Toutes les étapes suivantes sont réalisées à 4 °C. Les sphéroplastes sont centrifugés à 1500 g 10 min dans un rotor oscillant (A-4-44, Eppendorf). Le culot est lavé 2 fois avec un milieu de lavage Tris maléate 10 mM pH 6.8, mannitol 0.4 M, sorbitol 0.75 M, BSA 0.1 % (m/v). Les sphéroplastes sont homogénéisés dans un tampon Tris maléate 10 mM pH 6.8, mannitol 0.6 M, EGTA 2mM, BSA 0.1 % (m/v) contenant un coktail antiprotéase (Complete free EDTA, Roche Diagnostics) et broyés brièvement à basse vitesse dans un Waring blendor (3 fois 5 secondes). La suspension est centrifugée à 1500 g 10 minutes (JA20 Beckman). Le surnageant est recentrifugé à basse vitesse pour éliminer les débris restant puis 20 minutes à 12 000 g (JA20 Beckman). Le culot qui contient les mitochondries est lavé par centrifugation 20 minutes à 12 000 g (JA20 Beckman) et repris dans 200 µL de tampon Tris maléate 10 mM pH 6.8, mannitol 0.6 M, EGTA 2mM.

Préparation de mitochondries d'*Arabidopsis thaliana*

Une fraction enrichie en mitochondries est obtenue à partir de feuilles d'*Arabidopsis thaliana* selon le protocole décrit dans Keech et al. (2005).

Toutes les opérations sont réalisées à froid. 5 grammes de rosettes issues de plantes agées de 3 semaines, sont broyées dans un mortier avec 20 mL de milieu de broyage (tampon TES 60 mM, EDTA 10 mM, KH2PO4 10 mM, pyrophosphate de tétrasodium 25 mM, saccharose 0.3 M, BSA 1% (m/v), Ascorbate de sodium 50 mM et cystéine 20 mM, pH 8) et 2g de sable de Fontainebleau ; Le broyat est filtré sur une toile à bluter de 20 µm, puis centrifugé à 2500 g, 5 min 20 minutes à 12 000 g (JA20 Beckman). Le surnageant est centrifugé 15 min à 15000g (JA20 Beckman). Le culot enrichi en mitochondries est resuspendu dans le milieu de lavage (tampon TES 10 mM, EDTA 2 mM, KH2PO4 10 mM, saccharose 0.3 M, BSA 1% (m/v), pH 8) puis centrifugé 15 min à 15000 g (JA20 Beckman). Le culot final est repris dans un volume minimum (200 µL) de milieu de lavage sans BSA.

Purification des mitochondries de graine de pois

Les mitochondries sont extraites et purifiées selon la méthode de Benamar *et al*. (2003). Les graines de pois imbibées 22 h (400 graines) sont broyées (10 s à basse vitesse et 20 s à vitesse élevée) à l'aide d'un broyeur à hélice "Waring Blendor" dans le tampon de broyage glacé (mannitol 0,6 M, pyrophosphate de sodium 30 mM pH 7,5, EDTA 1 mM, β-mercaptoéthanol 3 mM, polyvinylpyrolidone-40 3 mM, BSA 0,4 % (m/v)). Le broyat est filtré sur 8 épaisseurs de gaze et une épaisseur de toile à bluter de 20 µm de vide de maille. Le filtrat est recueilli sur la glace et toutes les opérations ultérieures sont réalisées sur la glace ou à 4°C (centrifugation). Le filtrat est centrifugé pendant 10 min à 1500*g*. Les culots contenant les noyaux et les débris cellulaires sont éliminés et le surnageant centrifugé 20 min à 10 500*g*. Après élimination du surnageant, les culots contenant les mitochondries sont remis en suspension dans du tampon de lavage (mannitol 0,6 M, KH_2PO_4 20 mM pH 7,2, EDTA 1 mM, BSA 0,2 % (m/v)) à l'aide d'un homogénéisateur de Potter. La suspension est centrifugée pendant 15 min à 1 500*g* à 4°C afin d'éliminer les contaminants lourds. Le surnageant

récupéré est centrifugé à 10500 *g* pendant 20 min afin de sédimenter les mitochondries brutes.

Le culot est repris dans 4 mL de tampon de lavage. Les mitochondries sont purifiées par centrifugation à travers un gradient de Percoll discontinu (GE Healthcare) formé de 16 mL de milieu A (Sucrose 0,6 M, Percoll 22 % (v/v), KH_2PO_4 10 mM pH 7,2, KCl 10 mM, $MgCl_2$ 5 mM, BSA 0,2 % (m/v)) et 8 mL de milieu B (Sucrose 0,6 M, Percoll 30 % (v/v), KH_2PO_4 10 mM pH 7,2, KCl 10 mM, $MgCl_2$ 5 mM, BSA 0,2 % (m/v)). Les mitochondries brutes sont déposées au sommet du gradient (milieu A). A l'issue d'une centrifugation de 20 min à 10500*g* (JA20 Beckman)à 4°C, les mitochondries se situent à l'interface des milieux de Percoll 22/30 % (v/v). Les mitochondries sont recueillies par aspiration puis progressivement diluées 10 fois dans du tampon de lavage et centrifugées pendant 15 min à 13 500 *g* à 4°C. Le culot est repris dans 2 de tampon de lavage. La suspension de mitochondries est à nouveau purifiée dans un gradient exponentiel auto-généré de Percoll (36 mL) de composition suivante : sucrose 0,6 M, Percoll 27 % (v/v), KH_2PO_4 10 mM pH 7,2, KCl 10 mM, $MgCl_2$ 5 mM, BSA 0,2 % (m/v). Suite à une centrifugation de 45 min à 40 000 *g* (JA20 Beckman), les mitochondries qui forment un nuage opaque dans le tiers inférieur du gradient sont récupérées et lavées 2 fois dans 10 volumes de tampon de lavage sans BSA, par centrifugation 15 min à 13 500*g*. Le culot final de mitochondries est repris dans 0,5 mL de milieu de lavage sans BSA.

Pour le fractionnement des mitochondries, la suspension est diluée 20 fois dans un tampon MOPS 50 mM pH 7.5 , EDTA 2 mM, DTT 1mM, contenant un coktail antiprotéase (Complete Free EDTA, Roche Diagnostics). Les mitochondries sont lysées par plusieurs cycles de congélation-décongélation. Les fractions matricielles et membranaires sont séparées par ultracentrifugation 1 h à 100 000 g (SW28, Beckman L-60). Le culot membranaire est resuspendu dans du désoxycholate 0.4 % (m/v). La fraction matricielle est précipitée avec 10 % (m/v) d'acide trichloroacétique, pendant 30 minutes dans la glace. Après centrifugation 20 minutes à 14 000 g (F45-30-11, Eppendorf) et à 4 °c, le culot protéique est lavé à l'acétone, séché à l'air puis repris dans un tampon de dépôt pour électrophorèse ou dans un tampon de solubilisation pour isoélectrofocalisation (I.E.F.)

Intégrité et contrôle respiratoire

L'intégrité des mitochondries et leur capacité à oxyder des substrats tels que le NADH ou l'éthanol (mitochondries de levure) sont testées à 25°C à l'aide d'une électrode à oxygène (Oxytherm, Hansatech, King's Lynn, UK). Le milieu d'électrode pour chaque mesure est composé de 1 mL de tampon de milieu d'électrode (mannitol 0,6 M, MOPS 20 mM pH 7,5, KH_2PO_4 10 mM, KCl 10 mM, $MgCl_2$ 5 mM et BSA 0,1 % (m/v)) additionné de mitochondries purifiées. Le test d'intégrité de la membrane externe mitochondriale consiste à mesurer dans un premier temps la consommation initiale d'oxygène (Ci) déclenchée par l'ajout de cytochrome *c* 32 µM (Sigma-Aldrich, St Louis, USA) réduit par l'addition d'ascorbate 8 mM et qui correspondant à l'activité des mitochondries dont la membrane externe est endommagée. Ensuite, la consommation maximale (Cm) des mitochondries est obtenue par la rupture des membranes externes grâce à l'ajout de Triton X-100 0,03 % (v/v). Enfin, l'ajout de cyanure 1 mM permet de mesurer la consommation de l'oxygène due à l'oxydation non-enzymatique du cytochrome *c* (Cc). Le pourcentage d'intégrité est calculé selon le rapport suivant : % intégrité = 100 – [(Ci – Cc / Cm – Cc) X 100].

Techniques biochimiques

Dosage de protéines

Les protéines sont dosées par la méthode de Bradford (1976) en utilisant comme référence l'albumine sérique bovine (Sigma).

Pour le dosage des protéines mitochondriales, les préparations sont au préalables lysées dans du Triton X100 (5% v/v final) puis diluées 200 fois avant dosage.

Dosage des chlorophylles

Les pigments photosynthétiques sont extraits dans l'acétone à une concentration finale de 80% (v/v). Après centrifugation, l'absorbance du surnageant est mesurée

à 652 nm permettant une estimation de la teneur en chlorophylles selon Lichtenthaler (1987).

Extraction des protéines

Les protéines sont extraites dans le tampon suivant : $NaPO_4$ 50 mM pH 8, EDTA 10 mM, Triton-X 100 0.1% v/v, Sarcosyl 0.1% m/v, βmercaptoethanol 10 mM.
L'extrait est ensuite centrifugé 15 minutes à 14000g (F45-30-11, Eppendorf) .
Pour l'isoélectrofocalisation (IEF), les protéines sont extraites au phénol et précipitées à l'acétate d'ammonium méthanolique selon la méthode de Hurkman et Tanaka (1986). Cette méthode permet d'éliminer les molécules chargées non protéiques susceptibles d'interférer avec l'IEF.

Electrophorèses de protéines

Les échantillons sont repris dans un tampon de dépôt (Tris 12 mM pH 6,8, glycérol 10 % (v/v), SDS 0,4 % (m/v), bleu de bromophénol 0,02 % (m/v), DTT 0,8 mM) puis chauffés 5 min à 100°C avant dépôt sur le gel.
Les électrophorèses sont réalisées sur gel de polyacrylamide 13,5 % en présence de 0,1 % SDS (SDSPAGE).
Les gels sont formés de deux phases distinctes:

- une phase supérieure de concentration : acrylamide (Biorad) 4,2 % (m/v), bisacrylamide 0,1 % (m/v), Tris-HCl 0,125 M pH 6,8, SDS 0,1 % (m/v), persulfate d'ammonium 0,06 % (m/v), N,N,N',N'-Tétraméthylethylènediamine 0,16 % (v/v).
- une phase inférieure permettant la séparation des protéines : acrylamide 13,5 % (m/v), bisacrylamide 0,35 % (m/v), glycérol 10 % (v/v), Tris-HCl 0,375 M pH 8,6, SDS 0,1 % (m/v), persulfate d'ammonium 0,05 % (m/v), et N,N,N',N'-Tétraméthylethylènediamine 0,15 % (v/v).

L'électrophorèse est conduite à température ambiante et à voltage constant (200 V ; système MiniProtean, Biorad) dans le tampon de migration (Tris 15,6 mM et glycine 120 mM pH 8) additionné de SDS 0,1 % (m/v).

Les électrophorèses natives sont réalisées de la même manière que les SDS PAGE mais en absence de SDS et avec un gel de polyacrylamide à 12%.

Pour les électrophorèses bidimensionnelles, les protéines sont précipitées avec 10 % (v/v) d'acide trichloroacétique et lavées à l'acétone. Après séchage, les culots protéiques sont repris dans 200 µL de tampon de solubilisation (Urée 8M, thiourée 2M, Chaps 4%, DTT 20mM, ampholytes (Biolytes 3-10) 0.2%). Une bandelette Readystrip™ IPG strips 11cm (Biorad) comportant un gradient préformé de pH (4,7-5,9) est imbibée 30 minutes avec l'échantillon protéique. L'isoélectrofocalisation est réalisée dans le Protean IEF CELL à 20 °C avec une étape de réhydratation active : 50 V, 12 h et une focalisation en trois étapes : 250 V 30min ; augmentation progressive 250 V à 8000 V pendant 4h, 8000 V jusqu'à accumuler 32000 VH.

La bandelette est ensuite déposée sur un gel SDSPAGE Criterion precast System (gradient 10,5-14 %) pour la deuxième dimension.

Après électrophorèse, les gels sont colorés au Coomassie Brilliant blue R-250 ou Simply blue – colloïdal blue G250- (In Vitrogen) ou bien transférés sur membrane de nitrocellulose pour immunodétection.

Immunodétection

Les polypeptides séparés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes sont transférés électriquement sur une membrane de nitrocellulose (Schleicher et Schuell – Dassel, Allemagne) en utilisant un appareil de transfert liquide (trans-Blot Electrophoretic Transfer cell - Biorad). Les gels sont préalablement équilibrés pendant 20 min dans le tampon de transfert (Tris 15, 6 mM et glycine 120 mM pH 8 additionné de méthanol 20 % (v/v)). Le transfert est effectué durant 1 h sous voltage constant (100 V) dans le tampon de transfert supplémenté en SDS 0,01 % (m/v) (Towbin et al., 1979).

Après transfert, la membrane est colorée par immersion dans une solution de Rouge Ponceau-S 1 % (m/v) et acide acétique 5 % (v/v) qui colore de façon réversible les protéines.

La saturation des sites de fixation libres de la membrane de nitrocellulose est effectuée par incubation pendant 1 h à température ambiante dans du TBS (Tris

10 mM pH 7,5 et NaCl 9 g/L) additionné de Tween-20 1,5 % (v/v) (USB Corporation, Cleveland OH, USA).

Afin de maintenir le Tween-20 fixé sur les sites libres de la membrane, les lavages et les dilutions d'anticorps sont réalisés dans une solution de TBS-Tween 0,05 % (v/v). Après deux rinçages rapides, la membrane est incubée 1 h ou toute la nuit à 4°C avec l'anticorps primaire dirigé contre LEAM dilué au 1/20 000ème. Cet anticorps a été produit, par la société Neosystem (Neosystem S.A., Strasbourg - France), en injectant chez le lapin un peptide synthétique correspond à la séquence d'acides aminés CKGYGENKGYDQNRGY situé dans la partie Cterminale de LEAM. La membrane est ensuite rincée 3 x 10 min afin d'éliminer l'excès d'anticorps primaire. La membrane est ensuite incubée pendant 1 h à l'obscurité à température ambiante avec l'anticorps secondaire : anticorps de chèvre dirigé contre les immunoglobulines G de lapin et couplé à la phosphatase alcaline (Sigma-Aldrich, St Louis, USA) dilué au 1/20 000ème. La membrane est ensuite rincée 3 x 10 min sous agitation pour éliminer l'excès d'anticorps secondaire.

Afin de révéler le marquage immunologique, la membrane est incubée 2 à 5 min dans une solution de NBT/BCIP -Blue liquid substrate System for membrane (Sigma-Aldrich, St Louis, USA).

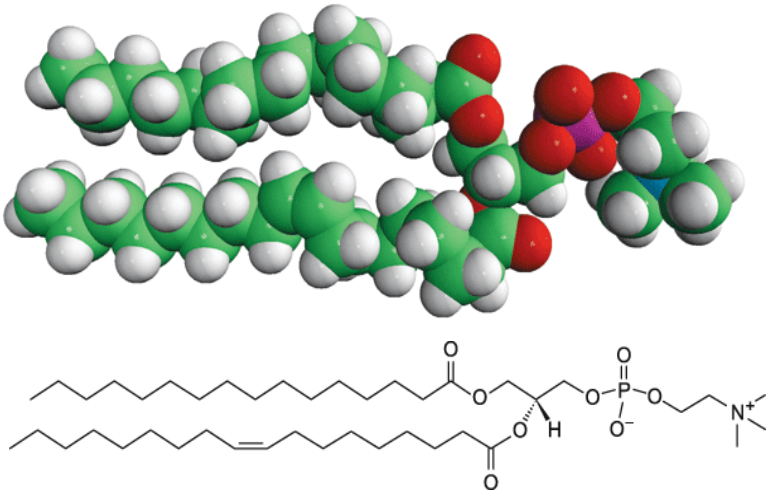
L'immunodétection de l'IDH (isocitrate déshydrogénase) est réalisée selon le même protocole avec un anticorps anti-IDH (Agrisera) diluée au 1000ème .

<u>Purification de la LEAM recombinante bactérienne</u>

Après 2h d'induction, les bactéries sont centrifugées à 3000 g pendant 15 min à 4°C. Les culots bactériens sont resuspendues dans 20 mL de TE (tampon Tris 20 mM, EDTA 1 mM, pH 8) puis congelées dans l'azote liquide. Trois cycles de congélation-décongélation (-176°c ; 37°c), en présence d'antiprotéase (PMSF 1 mM final) permettent de lyser les bactéries. Le lysat bactérien est centrifugé à 5000g (JA10 Beckman) pendant 20 min à 4°C. Le surnageant protéique contenant LEAM est soumis à une clarification par ultracentrifugation à 100 000g (SW28, Beckman L-60) pendant 1 heure à 4°C.

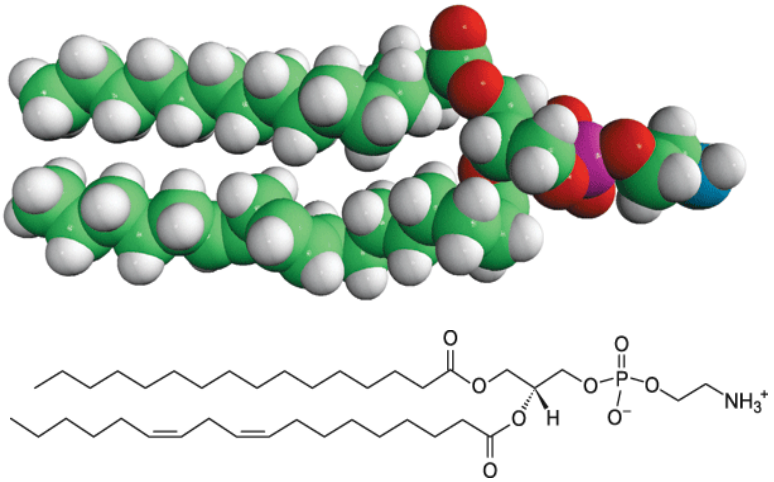
Le surnageant est filtré sur une membrane d'ultrafiltration (45 µm, Amicon) avant d'être injecté sur une colonne échangeuse d'anions de type préparative HiTrapQ

Encadré 4 : Structure chimique des phospholipides utilisés



POPC

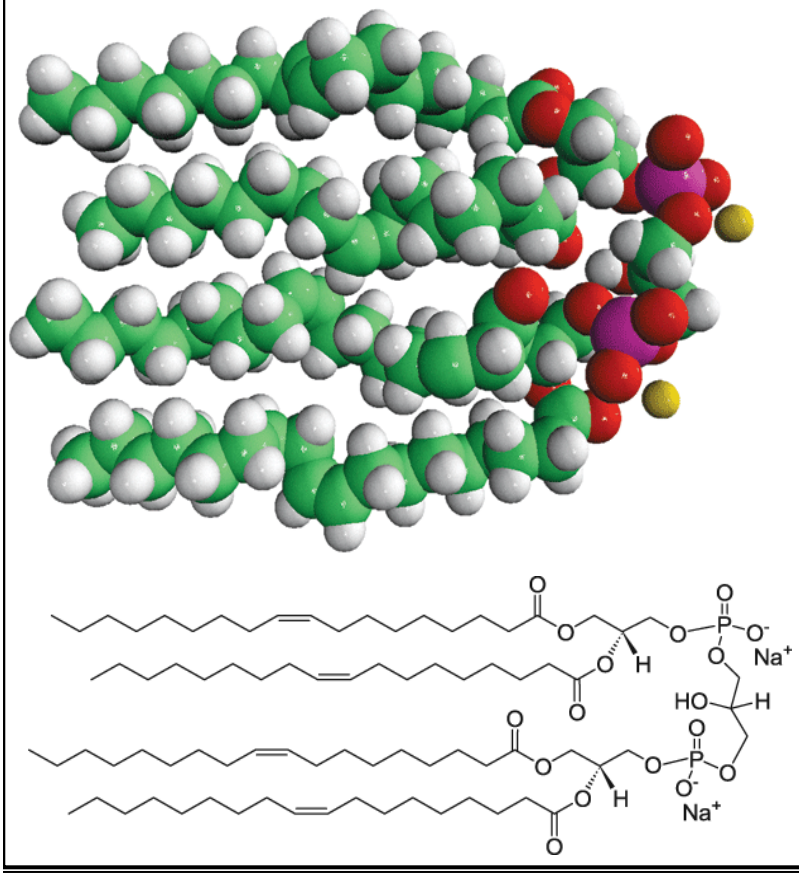
16:0-18:1 PC
1-Palmitoyl-2-Oleoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphocholine



PLPE

Exemple d'un phospholipide composant le EPE

16:0-18:2 PE
1-Palmitoyl-2-Linoleoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphoethanolamine



Cardiolipide ou DPG (diphosphatidyl glycérol)

18:1 CA 1,1'2,2'-Tetraoleoyl Cardiolipin

HP (GE Healthcare). L'élution des protéines fixéees sur la colonne se fait dans un tampon TE pH 7.4 en augmentant par palier la concentration en NaCl (5- 40 -200 mM). Les fractions contenant LEAM sont concentrées 40 fois par centrifugation sur membrane d'ultrafiltration Ultracell 5 K (Amicon). Les échantillons concentrés sont chauffés à 90 °c pendant 10 min puis centrifugés 15 min à 14 000g (JA20 Beckman) et à 4°C. Le surnageant contenant les protéines solubles à la chaleur est injecté sur une colonne d'exclusion analytique Superdex GL/200 (GE Healthcare). L'élution est réalisée en tampon TE pH 7.4 en présence de 100 mM de NaCl. ou sans sel.

Les fractions contenant la LEAM purifiée sont identifiées par SDS-PAGE suivie d'une coloration au bleu de Coomassie. Elles sont ensuite regroupées et eventuellement concentrées par ultrafiltration.

Crosslinking

L'incubation avec l'agent pontant, le glutaraldéhyde, est réalisée à 37°C, dans un volume réactionnel de 18 µl, contenant : 5 à 10 µg de LEAM purifiée, tampon TAE 0.1 M pH 7.5, glutaraldéhyde 0.25 % (m/v) final. La réaction est arrêtée après 0, 1, 10 minutes, avec de la glycine 400 mM finale. Les échantillons sont analysés par SDS PAGE sur un gel gradient 8-20 %.

10 µg de malate déshydrogènase mitochondriale porcine (Roche), dont la structure quaternaire homodimèrique est établie est utilisée comme témoin.

Préparation de liposomes

Les liposomes ont été fabriqués à partir de lipides commerciaux de chez AVENTI Polar Lipids et Sigma. Le lipoïd75 (lipoid S75-3,soybean lecithin) quant à lui a été fourni par la société Lipoïd (Ludwigshafen, Germany). La composition chimique et la structure spatiale des différents phospholipides utilisés sont précisées dans l'encadré 4. Les lipides sont dissouts dans le chloroforme methanol (9 :1), évaporés à sec au Rotavapor (Heidolph) et repris dans l'eau. L'émulsion est soniquée, 1 min dans un bain ou 5sec avec une sonde à ultrasons, puis extrudée à travers une membrane de polycarbonate possédant des pores de 100 nm (Avanti

Polar Lipids) pour obtenir des vésicules possédant une monocouche de phospholipides, les SUV et les LUV.

Techniques de biologie moléculaire

Extraction d'ADN génomique

L'ADN génomique est extrait de feuilles congelées à -80°c.

Pour *Arabidopsis thaliana*, la méthode utilisée est « Quick DNA Prep for PCR » issue de « *Arabidopsis : a laboratory manual* », aux éditions "Cold Spring Harbor Laboratory Press". Les tissus sont broyés à l'aide d'un micropiston dans un microtube de 1,5 mL, en présence de tampon Tris 200 mM pH 7.5, NaCl 250 mM, EDTA 25 mm, 0.5 % SDS. Le broyat est centrifugé pendant 5 minutes à 14000 g (F45-30-11, Eppendorf). Le surnageant est ensuite précipité avec un volume égal d'isopropanol. Une centrifugation pendant 5 minutes à 14000 g (F45-30-11, Eppendorf) permet de récupérer le culot d'acides nucléiques qui est rincé une fois avec 70 % (v/v) d'éthanol, séché et finalement repris par 100 µl de TE.

Pour le pois, le protocole d'extraction suivi est celui de Doyle and Doyle (1987). Les feuilles (5-10) sont broyées dans un mortier avec de l'azote liquide. La poudre est incubée 20 min à 65 °C, avec 600 µl de tampon de lyse (Tris 0.1 M pH 8, CTAB (Cetyl TrimethylAmmonium Bromide) 2 %, EDTA 20 mM, NaCl 1.4 M et β-Mercaptoethanol 0.5 M) préchauffé. 600 µl de chloroforme : isoamylalcool (24 :1) sont ajoutés à la suspension. Après 15 minutes d'homogénéisation par inversion, le mélange est centrifugé pendant 10 minutes à 14000g. La phase aqueuse est récupérée, mélangée avec un volume égal d'isopropanol, et centrifugée immédiatement 10 minutes à 14000 rpm (F45-30-11, Eppendorf). Le culot d'acides nucléiques est rincé avec 500 µL d'éthanol à 70 % (v/v) puis séché environ 5 minutes. Le culot est resuspendu dans 50 µl d'eau stérile.

Electrophorèse d'acides nucléiques

Les acides nucléiques (ADN génomique, produits de PCR) sont séparés sur des gels d'agarose (1 ou 1,5 % (m/v) préparé dans du TAE 0,5X (20mM Tris acetate,

1mM EDTA pH8.0). Le fluorochrome SybrSafe (Invitrogen) est incorporé au 1/10000ème avant le coulage du gel. La migration est réalisée à 100 V dans le tampon TAE 0,5X. L'ADN est visualisé sous UV à 312 nm.

Amplification d'ADN génomique (Polymerase Chain Reaction)

5 µl d'ADN génomique sont utilisés pour les PCRs. Le volume réactionnel de 20 µL contient 10 pmoles des amorces suivantes:

GenLEAMfor 5'ACAAATAACACACACACATTAAC3'

GenLEAMrev 5'TACATACATACACCATATCATAGTA3'

10 µmoles de chaque dNTP, 2 µl de tampon B (Promega) 10 X , 1 unité de Taq polymérase Promega (rajoutée après le premier cycle de dénaturation).

L'amplification (Ramp PCR)est réalisée dans le thermocycler iCycler Biorad avec le programme suivant : 1 cycle [95 °C 7 min ; 45°C infini (rajout de la Taq polymérase) ;72°C 3 min] ; 10 cycles [95°C 45'; 45°C 45' avec incrément de 0.5°C à chaque cycle ; 72°C 2min] ; 25 cycles [95°C 30'; 50°C 30' ; 72°C 2 min] ; 1 cycle [72°C 5 min].

Les produits de PCR ont été réamplifiés avec des amorces plus internes :

TiLEAMfor 5'ATGGCAGCAATGTTCACCACC3'

TiLEAMrev 5'TCTCCTGCACTCTTCAGAGC3'

avec le programme suivant : 94 °c 2 min ; 35 cycles (94 °C 30' ; 55 °C 45' ; 72°C 1 min) ; 72 °C 10 min.

TILLING

Ces expériences ont été réalisées au sein de l'Unité de Recherche en Génomique Végétale à Evry, dans l'équipe d'Abdelhafid Bendahmane. Les protocoles qui ont été suivis ont été mis au point par cette équipe et ne sont pas encore publiés. Les conditions expérimentales ne seront donc pas détaillées ci-dessous. Le gène de la LEAM a été amplifié avec les amorces GenLEAMfor et rev (voir paragraphe Amplification d'ADN génomique) à partir de pools d'ADNs génomiques extraits de mutants de pois (mutagénèse à l'EMS). Le produit de PCR obtenu a été réamplifié avec les amorces TiLEAMfor et rev (voir paragraphe précédent)

marquées respectivement avec les fluorochromes IRDye 700 (rouge) et 800 (vert). Les produits de PCR sont chauffés à 95 °C pendant 5 minutes pour séparer les brins d'ADN puis refroidis lentement pour réapparier les brins d'ADN de façon aléatoire. L'enzyme EndoI est ajoutée pour détecter les hétéroduplexes éventuels et les cliver au niveau des mésappariements. Les fragments d'ADN sont séparés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (LI-COR 4300) et la fluorescence (verte et rouge) est détectée pendant la migration (figure 46).

Techniques biophysiques

Dichroïsme circulaire

Les expériences de dichroïsme circulaire ont été réalisées au sein de l'unité BIA (INRA, Nantes) avec un dichrographe Jobin-Yvon CD6, en utilisant une cellule de mesure avec un trajet optique de 0,2mm, à 20°C. Les expériences ont été réalisées à une concentration de protéines de 1,2mg/mL, dans un tampon phosphate de sodium 5 mM pH 7.5, qui a l'avantage de ne pas absorber dans la gamme de longueur d'onde UV utilisée pour les mesures. Les spectres obtenus ont été analysés par la méthode CDSTR développée par Sreerama et Woody (2000) en utilisant le programme DICHROWEB (Lobley et al., 2002).

FTIR-ATR

La LEAM purifiée a été lyophilisée puis reprise dans l'eau deutériée. Cette opération a été renouvelée une seconde fois pour maximiser l'incorporation du deuterium. Les mesures en réflexion totale atténuée (ATR) ont été réalisées avec un spectrophotomètre Nicolet Magna IR 550 équipé d'un détecteur mercure-cadmium-telluride refroidi à l'azote liquide. L'échantillon est déposé sur un cristal de diamant. La lumière qui traverse le cristal est réfléchie par l'échantillon puis analysée. Les spectres infrarouges, issus d'un cumul de 250 scans, ont été enregistrés avec une résolution de 2 cm^{-1}. Les données ont été analysées avec le programme Grams/32 (Galactic Corporation). Les spectres ont été déconvolués en choisissant des paramètres mathématiques qui permettent de distinguer les pics de la région amide I sans pour autant faire apparaître des pics artéfactuels. La zone

1690-1720 cm^{-1} sert de témoin pour les traitements mathématiques car elle ne présente pas de vibration due à des protéines.

FTIR en transmission

Des liposomes constitués de POPC ont été mélangés avec une protéine LEA ou du lysozyme,dans un rapport massique lipide /protéine de 1:8. Les protéines LEA testées ont été LEAM, AavLEA1(nématode) et deux protéines de rotifères ArLEA1A et ArLEA1B. Les échantillons ont été appliqués sur des lames de fluorure de calcium et séchés dans un dessicateur (28°C , 0 % d'humidité relative) pendant 24 h à l'obscurité. La lame a été alors placée dans un portoir relié à une unité de control de la température (Specac Eurotherm, Worthington, R-U). Ce portoir a été ensuite placé dans une chambre à vide possédant deux fenêtres de bromure de potassium (KBr) sur ses faces opposées. Ce dispositif a été introduit dans un spectromètre GX 2000 FTIR (Perkin-Elmer,Foster City, CA). Le faisceau infrarouge traverse perpendiculairement la chambre à vide par les fenêtres de KBr. La température de la chambre à vide a été régulée par un réservoir d'azote liquide et un système de chauffage électrique. Un thermocouple attaché au portoir contenant l'échantillon permet de mesurer la température à ce niveau. L'échantillon a été d'abord chauffé à 30°C pendant une heure sous vide pour enlever l'humidité résiduelle puis refroidi à -30°C. Après 20 minutes d'équilibration, la température a été augmentée de façon constante (1 °C par minute) jusqu'à 120°C. Les interactions entre les lipides et les protéines ont été étudiées en analysant les vibrations (« strenching ») de certaines liaisons chimiques. Les données expérimentales ont été traitées par le programme OriginPro 7.0. L'identification des différents pics et la construction de la courbe spectrale résultante a été réalisée en utilisant la fonction PsVoid2. La position des deux pics a été fixée. Tous les autres paramètres ont été optimisés par le logiciel lui-même qui par un processus itératif peut déterminer le meilleur ajustement de courbe.

Nanosizer

Le volume et le diamètre des liposomes a été déterminé à l'aide d'un Autosizer 4700 (Malvern Instruments S.A.) Cet appareil est muni d'un faisceau laser (488 nm) qui vient frapper l'échantillon. La lumière réfléchie perpendiculairement à l'incidence du faisceau est analysée et le programme informatique intégré détermine la taille des vésicules.

Calorimétrie différentielle

30 µl (380µg) de liposomes constitués de SOPC sont déposés dans une cupule métallique pour calorimètrie différentielle, et séchés toute la nuit dans une boîte hermétique contenant du silicagel. La cupule est scellée et placée dans un calorimètre DSC 822c (Mettler) calibrer avec de l'indium. Une cupule vide sert de référence pour la manipulation. Les échantillons sont refroidis à 10°C, puis la température est augmentée de 5°C par minute jusqu'à atteindre 80°C. Le flux absorbé à chaque température est mesurée.

Leakage

Des lipides sont hydratés dans un volume final de 250µl en présence de 100µM de carboxyfluoresceine (CF), 10 mM TES, 0.1 mM EDTA, pH 7.4. Après extrusion, les vésicules sont passées sur une colonne NAP-5 (Sephadex G-25, Pharmacia) équilibrée avec du tampon TES-EDTA-NaCl (10mM TES pH 7.4 , 0.1 mM EDTA, 50mM NaCl) pour retirer le fluorochrome non incorporé. L'éluat est dilué avec du TEN jusqu'à obtenir une concentration en liposomes d'environ 10mg/mL . 20 µL de liposomes avec ou sans protéines (LEA, lysozyme) sont placés dans des microplaques 60 puits. Les plaques sont mises à sécher 24 heures, à l'obscurité, dans un dessiccateur à 28 °c, 0% d'humidité relative. Les liposomes sont ensuite réhydratés avec 20 µl de TEN. 10 µl sont dilués dans 300 µl de TEN puis déposés dans une plaque 96 puits. La fluorescence est mesurée avec un spectrofluorimètre Fluoroskan Ascent (Labsystems, Helsinki, finland) réglée sur une longueur d'onde d'excitation de 444 nm et une longueur d'onde d'emission de 555 nm. Lorsque le fluorochrome est concentré à l'intérieur des liposomes, la fluorescence est faible en raison d'un phénomène d'autoextinction (les molécules sont très proches). La fluorescence augmente proportionellement à la fuite du

fluorochrome hors des liposomes et à sa dilution dans le milieu. L'ajout de Triton X100 à 0.015 (v/v) permet de lyser tous les liposomes et ainsi d'obtenir la fluorescence maximale.

Microscopie électronique

Une goutte de 20µL d'une solution de liposomes est déposée sur une grille de cuivre carbonée. Elle est séchée à l'air libre. 20µL de contrastant, l'acétate d'uranyle 1% dans l'eau, est ajouté pendant 5 minutes. L'excédent est enlevé par 3 lavages successifs dans l'eau. L'échantillon est séché à nouveau et est ensuite observé avec un microscope JEOl JEM-1230 à 80kV.

L'analyse en cryo-MET a été réalisée par Cedric Gaillard du laboratoire de Microscopie de la Plate-forme RIO BIBS de l'INRA de Nantes. L'echantillon après traitement classique pour le cryo-MET a été déposé sur une grille de cuivre carbonée et observé avec un microscope JEOl JEM-1230 à 80kV.

Spectromètrie de masse

La spectrométrie de masse a été réalisée par Michel Jacquinod au Laboratoire d'Etude de la Dynamique des Protéomes (CEA, IRTSV, INSERM) de Grenoble

Les spots excisés des gels 2D, réalisés à partir d'un échantillon de LEAM recombinante purifiée, sont soumis à une digestion par la trypsine d'après les procédures décrites par Wilm et al. (1996). Cette enzyme protéolytique, catalyse spécifiquement le clivage des liaisons peptidiques du coté carboxylique des résidus arginine (Arg – R) et lysine (Lys – K). Brièvement, les morceaux de gel de polyacrylamide sont lavés avec 100 µL de NH_4HCO_3 25 mM, puis déshydratés avec 100 µL d'acétonitrile 50% (v/v) dans une solution NH_4HCO_3 25 mM. Les protéines sont réduites et alkylées par incubation dans du DTT 10 mM pendant 1 h à 57°C, puis dans du iodoacétamide 55 mM pendant 45 min à température ambiante. Les morceaux de gels sont ensuite lavés avec du NH_4HCO_3 et déshydratés comme décrit ci-dessus. Puis, ils sont lyophilisés, et remis en suspension dans 10 µL d'une solution contenant de la Trypsine [12,5 ng/µL, Modified Trypsin, Sequencing grade, Promega, Madison, WI USA] et NH_4HCO_3 25 mM pH 7,9. La digestion totale se déroule pendant 4h à 37°C avec un ratio

enzyme : protéine de 1 : 40. L'analyse LC-MS/MS est effectuée par une nanoscale HPLC (Famos-Switchos-Ultimate system, LC Packings-Dionex, Pays-Bas) couplée à un spectromètre de masse Q-TOF (Q-TOF Global, Micromass-Waters, UK). La séparation chromatographique de 0,15µg de ces peptides est réalisée sur une colonne capillaire C18 à phase inverse (75 µm de diamètre interne, pores de 100 Å, 360µm de diamètre externe, Dionex) avec un flux de 200 à 300 nL/min. Le gradient consiste en une augmentation linéaire de 10 à 40% dans un solvant B (CH_3CN:H2O, 90:10 [v/v] et acide formique 0,1%) en 40 min, suivie d'une augmentation jusqu'à 90% du solvant B en 5 min. L'acquisition des données de masse est pilotée par le logiciel Masslynx (Micromass-Waters). Les données sont enregistrées toutes les secondes entre une gamme de masses de 400 à 1400 m/z, après quoi les deux ions les plus intenses sont sélectionnés et fragmentés dans la cellule de collision. Les profils d'énergie de collision sont optimisés en variant les gammes de masses et d'états de charge des ions précurseurs.

L'identification des modifications post-traductionnelles de la LEAM s'est faite manuellement en examinant les spectres de MS/MS à l'aide du programme PEAKS studio (http://www.bioinformatics-solutions.com/). L'algorithme peut efficacement choisir la meilleure séquence en acides aminés, pour l'ensemble des combinaisons d'acides aminés, pour interpréter les spectres de MS/MS.

Références Bibliographiques

Alban C., Job D., Douce R. (2000) Biotin metabolism in plants. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 51:17–47

Alsheikh M.K., Heyen B.J., Randall S.K. (2003) Ion binding properties of the dehydrin ERD14 are dependent upon phosphorylation. J Biol Chem 278:40882–40889

Alsheikh M.K., Svensson J.T., Randall S.K. (2005) Phosphorylation regulated ion-binding is a property shared by the acidic subclass dehydrins. Plant Cell Environ 28:1114–1122

Anfinsen,C.B. (1973) Principles that govern the folding of protein chains. Science 181 : 223–230.

Artus N.N., Uemura M., Steponkus P.L., Gilmour S.J., Lin C., Thomashow M.F. (1996) Constitutive expression of the cold-regulated Arabidopsis thaliana COR15a gene affects both chloroplast and protoplast freezing tolerance. Proc Natl Acad Sci USA 93:13404–13409

Attucci S., Carde J.P., Raymond P., Saint-Gès V., Spiteri A. and Pradet A. (1991) Oxidative phosphorylation by mitochondria extracted from dry sunflower seeds. Plant Physiol. 95 : 390-398.

Bain J.M. and Mercer F.V. (1966) Subcellular organization of the developing cotyledons of *Pisum sativum* L.. Australian Journal of Biological Sciences 19 : 49-67.

Baker J., Steele C. and Dure III L. (1988) Sequence and characterization of 6 *Lea* proteins and their genes from cotton. Plant Mol. Biol. 11 : 277-291.

Baldet P., Alban C. and Douce R. (1997) Biotin synthesis in higher plants: purification and characterization of *bioB* gene product equivalent from *Arabidopsis thaliana* over-expressed in *Escherichia coli* and its subcellular localization in pea leaf cells. FEBS Lett. 419 : 206-210.

Banzet N., Richaud C., Deveaux Y., Kazmaier M., Gagnon J. and Triantaphylidès C. (1998) Accumulation of small heat shock proteins, including mitochondrial HSP22, induced by oxidative stress and adaptive response in tomato cells. Plant J. 13 : 519-527.

Bardel J., Louwagie M., Jaquinod M., Jourdain A., Luche S., Rabilloud T., Macherel D., Garin J. and Bourguignon J. (2002) A survey of the plant mitochondrial proteome in relation to development. Proteomics 2: 880-898.

Bateman A, Coin L, Durbin R, Finn RD, Hollich V, Griffiths-Jones S, Khanna A, Marshall M, Moxon S, Sonnhammer EL *et al* (2004) The Pfam protein families database. Nucleic Acids Res 32 (Database issue):D138–D141

Bateman A., Birney E., Durbin R., Eddy S.R., Howe K.L. and Sonnhammer E.L.L. (2000) The Pfam protein families database. Nucleic Acids Res. 28 : 263-266.

Battista J.R., Park M.-J. and McLemore A.E. (2001) Inactivation of two homologues of proteins presumed to be involved in the desiccation tolerance of plants sensitizes *Deinococcus radiodurans* R1 to desiccation. Cryobiology 43 : 133-139.

Bean S.J., Gooding P.S., Mullineaux P.M., Davies D.R. (1997) A simple system for pea transformation. Plant Cell Reports 16: 513-519

Benamar A., Tallon C. and Macherel D. (2003) Membrane integrity and oxidative properties of mitochondria isolated from imbibing pea seeds after priming or accelerated ageing. Seed Sci. Res. **13** : 35-45.

Bensmihen S, To A, Lambert G, Kroj T, Giraudat J, Parcy F. (2004) Analysis of an activated ABI5 allele using a new selection method for transgenic Arabidopsis seeds. FEBS Lett. 561(1-3):127-31

Berlett BS, Stadtman ER. (1997) Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. J Biol Chem. 272(33):20313-6

Bewley D.J. and Black. M. (1994) *Seeds physiology of development and germination*. Deuxième edition, Plenum Press, New-York, 276p.

Bewley J.D. (1997) Seed germination and dormancy. Plant Cell 9 : 1055-1066.

Borisjuk L, Rolletschek H, Walenta S, Panitz R, Wobus U, Weber H (2003) Energy status and its control on embryogenesis of legumes: ATP distribution within Vicia faba embryos is developmentally regulated and correlated with photosynthetic capacity. Plant J. 36 : 318-29

Borrell A, Cutanda MC, Lumbreras V, Pujal J, Goday A, Culianez-Macia FA, Pagès M (2002) *Arabidopsis thaliana* Atrab28: a nuclear targeted protein related to germination and toxic cation tolerance. Plant Molecular Biology 50 : 249-259.

Botha F.C. Potgieter G.P. and Botha A.M. (1992) Respiratory metabolism and gene expression during seed germination. Plant Growth Regulation 11 : 211-224.

Boudet J., Buitink J., Hoekstra F.A, Rogniaux H., Larré C., Satour P. and Leprince O. (2006) Comparative analysis of the heat stable proteome of radicles of Medicago trunculata seeds during germination identifies late embryogenesis abundant proteins associated with desiccation tolerance. Plant Physiol 140: 1418–1436

Bradford M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantity of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72 : 248-254.

Branca C., Faraone A., Magazù S., Maisano G., Migliardo P., Villari, V. (1999) Suspended life in biological systems fragility and complexity. Annals of the New York Academy of Sciences 879 (1) : 224-227

Bravo L.A., Gallardo J., Navarrete A., Olave N., Martínez J., Alberdi M., Close T.J. and Corcuera L.J. (2003) Cryoprotective activity of a cold-induced dehydrin purified from barley. Physiol. Plant. 118, 262-269.

Bray EA (1993) Molecular responses to water deficit. Plant Physiol 103 : 1035–1040

Browne J., Tunnacliffe A. and Burnell A. (2002) Plant desiccation gene found in a nematode. Nature 416 : 38.

Browne J.A., Dolan K.M., Tyson T., Goyal K., Tunnacliffe A., Burnell A.M. (2004) Dehydration-specific induction of hydrophilic protein genes in the anhydrobiotic nematode *Aphelenchus avenae*. Eukaryot Cell 3:966–975

Buitink J. and Leprince O. (2004). Glass formation in plant anhydrobiotes : survival in the dry state. Cryobiology. 48:215-228

Byler DM., Susi H. (1986). Examination of the secondary structure of proteins by deconvolved FTIR spectra. Biopolymers 25, p. 469–487.

Cammers-Goodwin A, Allen TJ, Oslick SL, McClure KF, Lee J.H., and Kemp D.S. (1994) Mechanism of stabilization of helical conformations of polypeptides by water containing trifluoroethanol. J. Am. Chem. Soc 118(13):3082-3090

Campbell S.A., Close T.J. (1997) Dehydrins: genes, proteins, and associations with phenotypic traits. New Phytologist 137 : 61-74.

Campos F., Zamudio F., Covarrubias A.A. (2006) Two different late embryogenesis abundant proteins from Arabidopsis thaliana contain specific domains that inhibit Escherichia coli growth. Biochem Biophys Res Comm 342:406–413

Ceccardi T.L., Meyer N.C., Close T.J. (1994) Purification of a maize dehydrin. Protein Expr Purif 5:266–269

Cheng Z., Targolli J., Huang X., Wu R. (2002) Wheat LEA genes, PMA80 and PMA1959, enhance dehydration tolerance of transgenic rice (Oryza sativa L.). Mol Breed 10:71–82

Clegg J (2005) Desiccation tolerance in encysted embryos of the animal extremophile, artemia. Integr. Comp. Biol. 45:715–724.

Crowe JH, Oliver AE, Hoekstra FA, Crowe LM (1997) Stabilization of dry membranes by mixtures of hydroxyethyl starch and glucose: the role of vitrification. Cryobiology 3:20–30

Crowe, J.H., Carpenter J.F., Crowe L.M. (1998). The role of vitrification in anhydrobiosis. Annu. Rev. Physiol.60:73-103.

Cuming A.C. (1999) LEA proteins. Dans *Seed proteins*. Shewry P.R. and Casey R. éds, Kluwer Academic Publishers, Netherlands, 753-780.

Danyluk J., Perron A., Houde M., Limin A., Fowler B., Benhamou N. and Sarhan F. (1998) Accumulation of an acidic dehydrin in the vicinity of the plasma membrane during cold acclimation of wheat. Plant Cell 10 : 623-638.

De Los Rios P., Ben-Zvi A., Slutsky O., Azem A., Goloubinoff P. (2006) Hsp70 chaperones accelerate protein translocation and the unfolding of stable protein aggregates by entropic pulling. Proc Natl Acad Sci U.S.A. 103 : 6166-71

Doolittle W.F. (1999) Phylogenetic Classification and the Universal Tree. Science 284 : 2125-2128.

Dosztanyi Z, Csizmok V, Tompa P, Simon I. (2005) The pairwise energy content estimated from amino acid composition discriminates between folded and intrinsically unstructured proteins. J Mol Biol. 347(4):827-39.

Douce R (1985) Mitochondria in higher plants structure, function, and biogenesis. Ed. Academic Press

Douce R. and Neuburger M. (1989) The uniqueness of plant mitochondria. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 40 : 371-414.

Douce R., Bourguignon J., Neuburger M. and Rébeillé F. (2001) The glycine decarboxylase system: a fascinating complex. Trends Plant Sci. 6 : 167-176.

Doyle J.J. and Doyle J.L. (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochemical Bulletin

Dunker, A.K., et al. (2001). Intrinsically disordered protein. J. Mol.Graph. Model. 19: 26–59.

Dure III L., Greenway S.C., Galau G.A. (1981) Developmental biochemistry of cottonseed embryogenesis and germination: changing messenger ribonucleic acid populations as shown by in vitro and in vivo protein synthesis. Biochemistry 20:4162–4168

Dure III L., Crouch M., Harada J., Ho T.-H. D., Mundy J., Quatrano R., Thomas T. and Sung Z.R. (1989) Common amino acid sequence domains among the LEA proteins of higher plants. Plant Mol. Biol. 12 : 475-486.

Dure III L. (1993) A repeating 11-mer amino acid motif and plant desiccation. Plant J. 3, 363-369.

Ehrenshaft M., Brambl R. (1990) Respiration and mitochondrial biogenesis in germinating embryos of maize. Plant Physiol 93: 295-304

Ellis RJ, Vandervies S.M. (1991) Molecular chaperones. Annu Rev. Biochem 60:321–347

Emanuelsson O., Nielsen H., Brunak S., von Heijne G. (2000) Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. J Mol Biol. 300(4):1005-16.

Eom J., Baker W.R., Kintanar A., Wurtele E.S. (1996) The embryo-specific EMB-1 protein of Daucus carota is flexible and unstructured in solution. Plant Sci 115:17–24

Fink A.L. (2005) Natively unfolded proteins. Curr Opin Struct Biol. 15(1):35-41

Franz G., Hatzopoulos P., Jones T.J., Krauss M., Sung Z.R. (1989) Molecular and genetic analysis of an embryonic gene, DC 8, from Daucus carota L. Mol Gen Genet 218:143–151

Gal T.Z., Glazer I., Koltai H. (2004) An LEA group 3 family member is involved in survival of C. elegans during exposure to stress. FEBS Lett 577:21–26

Galau G.A., Hughes D.W. and Dure III L. (1986) Abscisic acid induction of cloned cotton late embryogenesis-abundant (*Lea*) mRNAs. Plant Mol. Biol. **7**, 155-170.

Garay-Arroyo A., Colmenero-Flores J.M., Garciarrubio A., Covarrubias A.A. (2000) Highly hydrophilic proteins in prokaryotes and eukaryotes are common during conditions of water deficit. J Biol Chem 275:5668–5674

Garnier J., Gibrat J.F., Robson B. (1996) GOR method for predicting protein secondary structure from amino acid sequence. Methods Enzymol. 266:540-53.

Gething M.J., Sambrook J. (1992) Protein folding in the cell. Nature 355:33–45

Goday A., Jensen A.B., Culiáñez-Macià F.A., Albà M.M., Figueras M., Serratosa J., Torrent M. and Pagès M. (1994) The maize abscisic acid-responsive protein Rab17 is located in the nucleus and interacts with nuclear localization signals. Plant Cell 6 : 351-360.

Godoy J.A., Lunar R., Torres-Schumann S., Moreno J., Rodrigo R.M. and Pintor-Toro J.A. (1994) Expression, tissue distribution and subcellular localization of dehydrin TAS14 in salt-stressed tomato plants. Plant Mol. Biol. 26 : 1921-1934.

Golovina E.A., Hoekstra F.A.,and Hemminga M.A. (1998). Drying increase intracellular partitioning of amphiphilic substances into the lipid phase. Plant Physiol 118 : 975-86

Goyal K., Pinelli C., Maslen S.L., Rastogi R.K., Stephens E., Tunnacliffe A. (2005b) Dehydration-regulated processing of late embryogenesis abundant protein in a desiccation-tolerant nematode. FEBS Lett 579:4093–4098

Goyal K., Tisi L., Basran A., Browne J., Burnell A., Zurdo J. and Tunnacliffe A. (2003) Transition from natively unfolded to folded state induced by desiccation in an anhydrobiotic nematode protein. J. Biol. Chem. 278, 12977-12984.

Goyal K., Walton L.J., Tunnacliffe A. (2005) LEA proteins prevent protein aggregation due to water stress. Biochem J 388:151–157

Greenfield N., Fasman GD. (1969). Computed circular dichroism spectra for the evaluation of protein conformation. Biochemistry 8 (10), p. 4108–4116.

Grelet Johann, (2004) Identification et caractérisation moléculaire d'une protéine LEA mitochondriale exprimée dans les semences de pois. Th : Biologie cellulaire et moléculaire végétale, Université d'Angers 175p

Grelet J., Benamar A., Teyssier E., Avelange-Macherel M.-H., Grunwald D., Macherel D. (2005) Identification in pea seed mitochondria of a late embryogenesis abundant (LEA) protein able to protect enzymes from drying. Plant Physiol 137: 157-167

Gueguen V., Macherel D., Jaquinod M., Douce R. and Bourguignon J. (2000) Fatty acid and lipoic acid biosynthesis in higher plant mitochondria. J. Biol. Chem. 275 : 5016-5025.

Guerin B, Labbe P, Somlo M. (1979) Preparation of yeast mitochondria (Saccharomyces cerevisiae) with good P/O and respiratory control ratios. Methods Enzymol. 1979;55:149-59.

Hara M, Fujinaga M, Kuboi T (2004) Radical scavenging activity and oxidative modification of citrus dehydrin. Plant Physiology and Biochemistry 42 : 657-662.

Hara M, Terashima S, Fukaya T, Kuboi T (2003) Enhancement of cold tolerance and inhibition of lipid peroxidation by citrus dehydrin in transgenic tobacco. *Planta* 217 **:** 290-298.

Hara M., Terashima S., Kuboi T. (2001) Characterization and cryoprotective activity of cold-responsive dehydrin from *Citrus unshiu*. J Plant Physiol 158:1333–1339

Heazlewood JL, Tonti-Filippini J, Verboom RE, Millar AH (2005) Combining experimental and predicted datasets for determination of the subcellular location of proteins in arabidopsis. Plant Physiol 139: 598-609

Heazlewood JL, Millar AH (2006) AMPDB: the arabidopsis mitochondrial protein database. Nucleic Acids Res 33: D605-D610

Heazlewood J.L., Verboom R., Tonti-Filippini J., Small I. and Millar A.H. (2006) SUBA : the Arabidopsis Subcellular Database

Henikoff S, Comai L. (2003) Single-nucleotide mutations for plant functional genomics. Annu Rev Plant Biol. 2003;54:375-401

Hennig L., (1999) WinGene/ WinPep: User-friendly software for the analysis of aminoacid sequences. Biotechniques 26: 1170–1172.

Heyen B.J., Alsheikh M.K., Smith E.A., Torvik C.F., Seals D.F. and Randall S.K. (2002) The calcium-binding activity of a vacuole-associated, dehydrin-like protein is regulated by phosphorylation. Plant Physiol. 130 : 675-687.

Hincha D.K., Zuther E., Hellwege E.M., Heyer A.G. (2002) Specific effects of fructo- and gluco-oligosaccharides in the preservation of liposomes during drying. Glycobiology. 12(2):103-10.

Hoefnagel M.H. and Wiskich J.T. (1998) Activation of the plant alternative oxidase by high reduction levels of the Q-pool and pyruvate. Arch Biochem Biophys. 355 : 262-70

Hoekstra F.A., Golovina E.A., Buitink J. (2001) Mechanisms of desiccation tolerance. Trends Plant Sci. 6 : 431-438

Hofgen R, Willmitzer L. (1988) Storage of competent cells for Agrobacterium transformation. Nucleic Acids Res. 25;16(20):9877

Honjoh K.-I., Oda Y., Takata R., Miyamoto T., Hatano S. (1999) Introduction of the hiC6 gene, which encodes a homologue of a late embryogenesis abundant (LEA) protein, enhances freezing tolerance of yeast. J Plant Physiol 155:509–512

Honjoh K.-I., Matsumoto H., Shimizu H., Ooyama K., Tanaka K., Oda Y., Takata R., Joh T., Suga K., Miyamoto T., Iio M. and Hatano S. (2000) Cryoprotective activities of group 3 late embryogenesis abundant proteins from *Chlorella vulgaris* C-27. Biosci. Biotechnol. Biochem. 64, 1656-1663.

Houde M., Daniel C., Lachapelle M., Allard F., Laliberté S. and Sarhan F. (1995) Immunolocalization of freezing-tolerance-associated proteins in the cytoplasm and nucleoplasm of wheat crown tissues. Plant J. 8 : 583-593

Houde M., Dallaire S., N'Dong D., Sarhan F. (2004) Overexpression of the acidic dehydrin WCOR410 improves freezing tolerance in transgenic strawberry leaves. Plant Biotech J 2:381–387

Howell K.A., Millar A.H., Whelan J. (2006) Ordered assembly of mitochondria during rice germination begins with promitochondrial structures rich in components of the protein mport apparatus. Plant Mol Biol 60:201-223

Hsing Y.C., Chen Z.Y., Shih M.D., Hsieh J.S., Chow T.Y. (1995) Unusual sequences of group 3 LEA mRNA inducible by maturation or drying in soybean seeds. Plant Mol Biol 29:863–868

Huang S., Ratliff K.S., Matouschek A. (2002) Protein unfolding by the mitochondrial membrane potential. Nat Struct Biol 9 : 301-307.

Hundertmark M, Hincha DK (2007) LEA (late embryogenesis abundant) proteins and their encoding genes in Arabidopsis thaliana. Plant Physiol (in press)

Hurkman W.J., Tanaka C.K. (1986) Solubilization of plant membrane proteins for analysis by two-dimensional gel electrophoresis. Plant Physiol. 81 : 802-806

Imai R., Chang L., Ohta A., Bray E.A., Takagi M. (1996) A lea-class gene of tomato confers salt and freezing tolerance when expressed in Saccharomyces cerevisiae. Gene 170:243–248

Ismail A.M., Hall A.E. and Close T.J. (1999) Purification and partial characterization of a dehydrin involved in chilling tolerance during seedling emergence of cowpea. Plant Physiol. 120, 237-244.

Iturriaga G, Schneider K, Salamini F, Bartels D. (1992) Expression of desiccation-related proteins from the resurrection plant Craterostigma plantagineum in transgenic tobacco. Plant Mol Biol. 20(3):555-8.

Jasanoff A., Fersht A.R. (1994) Quantitative determination of helical propensities from trifluoroethanol titration curves. Biochemistry. 33(8):2129-35.

Jepson S.G. and Close T.J. (1995) Purification of a maize dehydrin protein expressed in *Escherichia coli*. Protein Expr. Purif. 6 : 632-636.

Kaye C., Neven L., Hofig A., Li Q.B., Haskell D., Guy C. (1998) Characterization of a gene for spinach CAP160 and expression of two spinach cold-acclimation proteins in tobacco. Plant Physiol. 116(4):1367-77.

Keech O., Dizengremel P., Gardeström P. (2005) Preparation of leaf mitochondria from Arabidopsis thaliana. Phys. Plant. 124(4) : 403-409

Kermode A.R. and Bewley J.D. (1987) Regulatory processes involved in the switch from seed development to germination: possible roles for desiccation and ABA. Dans *Drought resistance in plants, physiological and genetic aspects.* Monti L. and Proceddu E. éds, Bruxelles, 59-76.

Kim, E., Lowenson, J.D., MacLaren, D.C., Clarke, S., and Young, S.G. (1997). Deficiency of a protein-repair enzyme results in the accumulation of altered proteins, retardation of growth, and fatal seizures in mice. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 6132–6137.

Koag M.-C., Fenton R.D., Wilkens S. and Close T.J. (2003) The binding of maize DHN1 to lipid vesicles. Gain of structure and lipid specificity. Plant Physiol. 131 : 309-316

Kosky, A.A., Razzaq, U.O., Treuheit, M.J., and Brems, D.N. (1999). The effects of a-helix on the stability of Asn residues: Deamidation rates in peptides of varying helicity. Protein Sci. 8: 2519–2523.

Koster K.L., Lei Y.P., Anderson M., Martin S. ans Bryant G. (2000) Effects of vitrified and non vitrified sugars on phosphatidylcholine fluid-to-gel phase transitions. Biophys. J. 78 : 1932-1946

Krüger C., Berkowitz O., Stephan U.W. and Hell R. (2002) A metal-binding member of the late embryogenesis abundant protein family transports iron in the phloem of *Ricinus communis* L. J. Biol. Chem. 277 : 25062-25069.

Lee N., Francklyn C. and Hamilton E.P. (1987) Arabinose-induced binding of AraC protein to *ara*I_2 activates the *araBAD* operon promoter. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84 : 8814-8818.

Lenne C. and Douce R. (1994) A low molecular mass Heat-Shock Protein is localized to higher plant mitochondria. Plant Physiol. 105 : 1255-1261.

Leprince O., Harren F.J.M., Buitink J., Alberda M. and Hoekstra F.A. (2000) Metabolic dysfunction and unabated respiration precede the loss of membrane integrity during dehydration of germinating radicles. Plant Physiol. 122 : 597-608.

Lichtenthaler H.K. (1987) Chlorophylls and carotenoids : pigments of photosynthetic biomembranes. Methods Enzymol

Lin C., Thomashow M.F. (1992) A cold-regulated Arabidopsis gene encodes a polypeptide having potent cryoprotective activity. Biochem Biophys Res Commun 183:1103–1108

Lin C., Thomashow M.F. (1992b) DNA sequence analysis of a complementary DNA for cold-regulated Arabidopsis gene cor15 and characterization of the COR15 polypeptide. Plant Physiol 99:519–525

Linding R, Russell RB, Neduva V, Gibson TJ. (2003) GlobPlot: Exploring protein sequences for globularity and disorder. Nucleic Acids Res. 31(13):3701-8.

Linding R, Jensen LJ, Diella F, Bork P, Gibson TJ, Russell RB. (2003b) Protein disorder prediction: implications for structural proteomics.Structure. 2003 Nov;11(11):1453-9.

Lindquist S. (1986) The heat-shock response. Annu Rev Biochem 55:1151–1191

Lisse T., Bartels D., Kalbitzer H.R., Jaenicke R. (1996) The recombinant dehydrin-like desiccation stress protein from the resurrection plant Craterostigma plantagineum displays no defined three-dimensional structure in its native state. Biol Chem 377:555–561

Lobley, A., Whitmore, L., and Wallace, B.A. (2002). DICHROWEB: An interactive website for the analysis of protein secondary structure from circular dichroism data. Bioinformatics 18: 211–212.

Logan D.C., Millar A.H., Sweetlove L.J., Hill S.A. and Leaver C.J. (2001) Mitochondrial biogenesis during germination in maize embryos. Plant Physiol. 125 : 662-672.

Luo P, Baldwin RL. (1997) Mechanism of helix induction by trifluoroethanol: a framework for extrapolating the helix-forming properties of peptides from trifluoroethanol/water mixtures back to water. Biochemistry. 36(27):8413-21.

Macherel D., Benamar A., Avelange-Macherel M.H., Tolleter D. (2007) Function and stress tolerance of seed mitochondria. Physiol. Plant. 129 : 233-241

Manfre A.J., Lanni L.M., Marcotte W.R. Jr (2006) The Arabidopsis Group 1 late embryogenesis abundant protein ATEM6 is required for normal seed development. Plant Physiol 140:140–149

Marttila S., Tenhola T., Mikkonen A. (1996) A barley (Hordeum vulgare L) LEA3 protein, HVA1, is abundant in protein storage vacuoles. Planta 199:602–611

McCubbin WD, Kay CM, Lane BG (1985) Hydrodynamic and optical properties of the wheat germ Em protein. Can J Biochem Cell Biol 63:803–811.

Millar A.H., Heazlewood J.L., Kristensen B.K., Braun H.P., Moller I.M. (2005) The plant mitochondrial proteome. Trends Plant Sci 10: 36–43

Mishra, V.K., Palgunachari, M.N., Segrest, J.P., and Anantharamaiah, G.M. (1994). Interactions of synthetic peptide analogs of the class A amphipathic helix with lipids. Evidence for the snorkel hypothesis. J. Biol. Chem. 269: 7185–7191.

Møller, I.M., and Kristensen, B.K. (2006). Protein oxidation in plant mitochondria detected as oxidized tryptophan. Free Radic. Biol. Med. 40: 430–435.

Morohashi Y. (1986) Patterns of mitochondrial development in reserve tissues of germinated seeds: a survey. Physiol. Plant. 66 : 653-658.

Mouillon J-M, Gustafsson P, Harryson P (2006) Structural investigation of disordered stress proteins. Comparison of full-length dehydrins with isolated peptides of their conserved segments. Plant Physiol 141:638–650

Mudgett M.B., Clarke S. (1993) Characterization of plant L-isoaspartylmethyltransferases that may be involved in seed survival: purification, cloning, and sequence analysis of the wheat germ enzyme. Biochemistry 32: 11100-11111

Mudgett M.B., Clarke S. (1996) A distinctly regulated protein repair L-isoaspartyl methyltransferase from Arabidopsis thaliana. Plant Mo1 Biol 30: 723-737

Mudgett M.B., Lowenson J.D., Clarke S. (1997) Protein Repair i-lsoaspartyl Methyltransferase in Plants. Phylogenetic Distribution and the Accumulation of Substrate Proteins in Aged Barley Seeds. Plant Physiol. 115: 1481-1489

Mundy J., Chua N.-H. (1988) Abscisic acid and water-stress induce the expression of a novel rice gene. EMBO J 7:2279–2286

Nagendra, H.G., Sukumar, N., and Vijayan, M. (1998). Role of water in plasticity, stability, and action of proteins: The crystal structures of lysozyme at very low levels of hydration. Proteins 32: 229–240

Nawa Y. and Asahi T. (1971) Rapid development of mitochondria in pea cotyledons during the early stage of germination. Plant Physiol. 48 : 671-674.

NDong C., Danyluk J., Wilson K.E., Pocock T., Huner N.P.A. and Sarhan F. (2002) Cold-regulated cereal chloroplast late embryogenesis abundant-like proteins. Molecular characterization and functional analyses. Plant Physiol. 129 : 1368-1381. Nucleic Acids Res. 2006 Jul 1;34(Web Server issue):W164-8

Nylander M., Svensson J., Palva E.T., Welin B.V. (2001) Stress-induced accumulation and tissue-specific localization of dehydrins in Arabidopsis thaliana. Plant Mol Biol 45:263–279

Oliver M.J., Tuba Z., Mishler B.D. (2000) The evolution of vegetative desiccation tolerance in land plants. Plant Ecology 151: 85–100

Pap, E.H.W., Houbiers, M.C., Santema, J.S., van Hoek, A., and Visser, A.J.W.G. (1996). Quantitative fluorescence analysis of the adsorption of lysozyme to phospholipid vesicles. Eur. Biophys. J. 24:223–231.

Parrish D.J., Leopold A.C. (1977) Transient changes during soybean imbibition. Plant Physiol 59: 1111-1115

Pfanner N. and Truscott K.N. (2002) Powering mitochondrial protein import. Nat Struct Biol 9, 234-236.

Popova A.V., Hincha D.K. (2005) Effects of the sugar headgroup of a glycoglycerolipid on the phase behavior of phospholipid model membranes in the dry state. Glycobiology. 15(11):1150-5.

Pouchkina-Stantcheva N.N., McGee B.M., Boschetti C., Tolleter D., Chakrabortee S., Popova A.V., Meersman F., Macherel D., Hincha D.K. and Tunnacliffe A. (soumis) Functional divergence of former alleles encoding LEA proteins in a desiccation-tolerant, ancient asexual invertebrate

Prilusky J, Felder CE, Zeev-Ben-Mordehai T, Rydberg EH, Man O, Beckmann JS, Silman I, Sussman JL. (2005) FoldIndex: a simple tool to predict whether a given protein sequence is intrinsically unfolded. Bioinformatics. 21(16):3435-8.

Prilusky J., Felder C.E., Zeev-Ben-Mordehai T., Rydberg E.H., Man O., Beckmann J.S., Silman I., Sussman J.L. (2005) FoldIndex: a simple tool to predict whether a given protein sequence is intrinsically unfolded. Bioinformatics 21:3435–3438

Puhakainen T., Hess M.W., Mäkelä P., Svensson J., Heino P., Palva E.T. (2004) Overexpression of multiple dehydrin genes enhances tolerance to freezing stress in Arabidopsis. Plant Mol Biol 54:743–753

Rajjou L., Gallardo K., Debeaujon I., Vandekerckhove J., Job C., Job D. (2004) The effect of alpha-amanitin on the *Arabidopsis* seed proteome highlights the distinct roles of stored and neosynthesized mRNAs during germination. Plant Physiol 134: 1598-1613

Rasmusson A.G., Moller I.M. (1990) NADP-Utilizing Enzymes in the Matrix of Plant Mitochondria. Plant Physiol. 94 : 1012-1018

Rébeillé F., Macherel D., Mouillon J.M., Garin J. and Douce R. (1997) Folate biosynthesis in higher plants: purification and molecular cloning of a bifunctional 6-hydroxymethyl-7,8-dihydropterin pyrophosphokinase/7,8-dihydropteroate synthase localized in mitochondria. EMBO J. 16 : 947-957.

Reissner K.J., Aswad D.W. (2003) Deamidation and isoaspartate formation in proteins: unwanted alterations or surreptitious signals? Cell Mol Life Sci. 60(7):1281-95

Reyes JL, Rodrigo M-J, Colmenero-Flores JM, Gil J-V, Garay-Arroyo A, Campos F, Salamini F., Bartels D., Covarrubias A.A. (2005) Hydrophilins from distant organisms can protect enzymatic activities from water limitation effects in vitro. Plant Cell Environ 28:709–718

Rhoads D.M., Subbaiah C.C. (2007) Mitochondrial retrograde regulation in plants. Mitochondrion. 2007 May;7(3):177-94

Rhoads D.M., White S.J., Zhou Y., Muralidharan M., Thomas E. and Elthon T.E. (2005) Altered gene expression in plants with constitutive expression of a mitochondrial small heat shock protein suggests the involvement of retrograde regulation in the heat stress response. Physiol Plant 123: 435-444

Ricci C., Caprioli M. (2005) Anhydrobiosis in bdelloid species, populations and individuals. Integr. Comp. Biol. 45:759–763.

Rinne P.L.H., Kaikuranta P.L.M., van der Plas L.H.W. and van der Schoot C. (1999) Dehydrins in cold-acclimated apices of birch (*Betula pubescens* Ehrh.): production, localization and potential role in rescuing enzyme function during dehydration. Planta, 209, 377-388.

Roberts J.K., DeSimone N.A., Lingle W.L. et Dure III L. (1993) Cellular concentrations and uniformity of cell-type accumulation of two Lea proteins in cotton embryos. Plant Cell 5 : 769-780.

Robinson, N.E. (2002). Protein deamidation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99: 5283–5288.

Rodriguez EM, Svensson JT, Malatrasi M, Choi D-W, Close TJ (2005) Barley Dhn13 encodes a KS-type dehydrin with constitutive and stress responsive expression. *Theoretical and Applied Genetics* 110 **:** 852-858

Rolletschek H., Borisjuk L., Koschorreck M., Wobus U., Weber H. (2002) Legume embryos develop in a hypoxic environment. J Exp Bot 53: 1099-1107

Rolletschek H., Weschke W., Weber H., Wobus U., Borisjuk L. (2004) Energy state and its control on seed development: starch accumulation is associated with high ATP and steep oxygen gradients within barley grains. J Exp Bot 55: 1351-1359

Romero, P., Obradovic, Z., Li, X., Garner, E.C., Brown, C.J., and Dunker, A.K. (2001). Sequence complexity of disordered protein. Proteins 42: 38–48.

Russouw P.S., Farrant J., Brandt W., Maeder D., Lindsey G.G. (1995) Isolation and characterization of a heat-soluble protein from pea (Pisum sativum) embryos. Seed Sci Res 5:137–144

Russouw PS, Farrant J, Brandt W, Lindsey GG (1997) The most prevalent protein in a heat-treated extract of pea (Pisum sativum) embryos is an LEA group 1 protein; its conformation is not affected by exposure to high temperature. Seed Sci Res 7:117–123

Rustin P., Moreau F. and Lance C. (1980) Malate oxydation in plant mitochondria via malic enzyme and cyanide-insensitive electron transport pathway. Plant Physiol 66 : 457-462.

Saavedra L., Svensson J., Carballo V., Izmendi D., Welin B., Vidal S. (2006) A dehydrin gene in Physcomitrella patens is required for salt and osmotic stress tolerance. Plant J 45:237–249

Sales K., Brandt W., Rumbak E., Lindsey G. (2000) The LEA-like protein HSP12 in Saccharomyces cerevisiae has a plasma membrane location and protects membranes against desiccation and ethanol-induced stress. Biochim Biophys Acta 1463:267–278

Sanchez-Ballesta M.T., Rodrigo M.J., Lafuente M.T., Granell A., Zacarias L. (2004) Dehydrin from Citrus, which confers in vitro dehydration and freezing protection activity, is constitutive and highly expressed in the flavedo of fruit but responsive to cold and water stress in leaves. J Agric Food Chem 52:1950–1957

Samson F, Brunaud V, Duchene S, De Oliveira Y, Caboche M, Lecharny A, Aubourg S. (2004) FLAGdb++: a database for the functional analysis of the Arabidopsis genome. Nucleic Acids Res. 1;32 Database issue:D347-50.

Sato S. and Asahi T. (1975) Biochemical properties of mitochondrial membrane from dry pea seeds and changes in the properties during imbibition. Plant Physiol. 56 : 816-820.

Sauge-Merle S., Falconet D. and Fontecave M. (1999) An active ribonucleotide reductase from *Arabidopsis thaliana* cloning, expression and characterization of the large subunit. Eur. J. Biochem. 266 : 62-69.

Shih M.D., Lin S.C., Hsieh J.S., Tsou C.H., Chow T.Y., Lin T.P., Hsing Y.I. (2004) Gene cloning and characterization of a soybean (*Glycine max* L.) LEA protein, GmPM16. Plant Molecular Biology 56 **:** 689-703.

Siendones E., González-Reyes J.A., Santos-Ocaña C., Navas P. and Córdoba F. (1999) Biosynthesis of ascorbic acid in kidney bean. L-galactono-gamma-lactone dehydrogenase is an intrinsic protein located at the mitochondrial inner membrane. Plant Physiol. 120 : 907-912.

Singh S., Cornilescu C.C., Tyler R.C., Cornilescu G., Tonelli M., Lee M.S., Markley J.L. (2005) Solution structure of a late embryogenesis abundant protein (LEA14) from Arabidopsis thaliana, a cellular stress-related protein. Protein Sci 14:2601–2609

Sivamani E., Bahieldin A., Wraith J.M., Al-Niemi T., Dyer W.E., Ho T-H.D., Qu R. (2000) Improved biomass productivity and water use efficiency under water deficit conditions in transgenic wheat constitutively expressing the barley HVA1 gene. Plant Sci 155:1–9

Slijper M, Boelens R, Davis AL, Konings RN, van der Marel GA, van Boom JH, Kaptein R. (1997) Backbone and side chain dynamics of lac repressor headpiece (1-56) and its complex with DNA. Biochemistry. 36(1):249-54.

Sluse F.E., Jarmuszkiewicz W. (1998) Alternative oxydase in the branched mitochondrial respiratory network: an overview on structure, function, regulation, and role. Braz J Med Biol Res. 31(6) : 733-47. Review

Small I, Peeters N, Legeai F, Lurin C. (2004) Predotar: A tool for rapidly screening proteomes for N-terminal targeting sequences. Proteomics. 4(6):1581-90.

Soulages J.L., Kim K., Arrese E.L., Walters C. and Cushman J.C. (2003) Conformation of a group 2 late embryogenesis abundant protein from soybean. Evidence of poly(L-Proline)-type II structure. Plant Physiol. 131 : 963-975.

Soulages J.L., Kim K., Walters C. and Cushman J.C. (2002) Temperature-induced extended helix/random coil transitions in a group 1 late embryogenesis-abundant protein from soybean. Plant Physiol. 128 : 822-832.

Sreerama, N., and Woody, R.W. (2000). Estimation of protein secondary structure from CD spectra: Comparison of CONTIN, SELCON and CDSSTR methods with an expanded reference set. Anal. Biochem. 287: 252–260.

Stupnikova I., Benamar A., Tolleter D., Grelet J., Borovskii G., Dorne A.-J., Macherel D. (2006) Pea seed mitochondria are endowed with a remarkable tolerance to extreme physiological temperatures. Plant Physiol, 140: 326-335

Suzuki M. (1994). Circular dichroism. In Kendrew J., Lawrence E., eds. The Encyclopedia of Molecular Biology B. Oxford, UK: Blackwell Science, p. 206–209.

Svensson J., Palva E.T. and Welin B. (2000) Purification of recombinant *Arabidopsis thaliana* dehydrins by metal ion affinity chromatography. Protein Expr. Purif. 20 : 169-178.

Swire-Clark G.A., Marcotte W.R. Jr (1999) The wheat LEA protein Em functions as an osmoprotective moledule in Saccharomyces cerevisiae. Plant Mol Biol 39:117–128

Taylor, S.W., Fahy, E., Murray, J., Capaldi, R.A., and Ghosh, S.S. (2003). Oxidative post-translational modification of tryptophan residues in cardiac mitochondrial proteins. J. Biol. Chem. 278: 19587–19590.

Thomashow M.F. (1999) Plant cold acclimation, freezing tolerance genes and regulatory mechanisms. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 50:571–599

Tolleter D., Jaquinod M., Mangavel C., Passirani C., Saulnier P., Manon S., Teyssier E., Payet N., Avelange-Macherel M.-H. and Macherel D. (2007) Structure and function of a mitochondrial Late Embryogenesis Abundant protein are revealed by desiccation. Plant Cell 19:1580-1589

Towbin H., Staehelin T. et Gordon J. (1979) Electrophoretic transfert of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76 : 4350-4354.

Treonis AM, Wall (2005) Soil nematodes and desiccation survival in the extreme arid environment of the antarctic dry valleys. Integr. Comp. Biol 45:741–750.

Tunnacliffe A., Wise M.J. (2007) The continuing conundrum of the LEA proteins. Naturwissenschaften. 2007 May 4; [Epub ahead of print]

Ukaji N., Kuwabara C., Takezawa D., Arakawa K. and Fujikawa S. (2001) Cold acclimation-induced WAP27 localized in endoplasmic reticulum in cortical parenchyma cells of mulberry tree was homologous to group 3 late-embryogenesis abundant proteins. Plant Physiol. 126 : 1588-1597.

Uversky, V.N., Gillespie, J.R., and Fink, A.L. (2000). Why are ‘‘natively unfolded’’ proteins unstructured under physiologic conditions? Proteins 41: 415–427

Van den Brink-Van der Laan E., Killian J.A., de Kruijff B. (2004) Nonbilayer lipids affect peripheral and integral membrane proteins via changes in the lateral pressure profile. Biochim Biophys Acta 1666: 275-288

Verslues PE, Agarwal M, Katiyar-Agarwal S, Zhu J, Zhu JK. (2006) Methods and concepts in quantifying resistance to drought, salt and freezing, abiotic stresses that affect plant water status. Plant J. 45(4):523-39. Erratum in: Plant J. 2006 Jun;46(6):1092.

Vertucci C.W. and Leopold A.C. (1986) Physiological activities associated with hydration level in seeds. Dans *Membranes, metabolism, and dry organisms*. Leopold A.C. eds., Cornell university press, Ithaca, 35-49.

Vertucci C.W. and Farrant J.M. (1995) Acquisition and loss of desiccation tolerance. Dans *Seed development and germination*, Kigel J. and Galili G. éds, Marcel Dekker, New York, 237–271.

Vucetic S., Brown C.J., Dunker A.K., Obradovic Z. (2003) Flavors of protein disorder. Proteins 52(4):573-584

Vullo A, Bortolami O, Pollastri G, Tosatto SC. (2006) Spritz: a server for the prediction of intrinsically disordered regions in protein sequences using kernel machines.

Walters C., Wheeler L.M., Grotenhuis J.M. (2005) Longevity of seeds stored in a genebank: species characteristics. Seed Sci Res 15: 1-20

Ward JJ, Sodhi JS, McGuffin LJ, Buxton BF, Jones DT. (2004) Prediction and functional analysis of native disorder in proteins from the three kingdoms of life. J Mol Biol. 337(3):635-45.

Wilson S.B. and Bonner W.D. (1971) Studies of electron transport in dry and imbibed peanut embryos. Plant Physiol. 48 : 340-344.

Wise M.J. (2003) LEAping to conclusions: a computational reanalysis of late embryogenesis abundant proteins and their possible roles. BMC Bioinformatics 4 : 52-71.

Wise M.J., Tunnacliffe A. (2004) POPP the question: what do LEA proteins do? Trends Plant Sci 9:13–17

Wisniewski M., Webb R., Balsamo R., Close T.J., Yu X.-M. and Griffith M. (1999) Purification, immunolocalization, cryoprotective, and antifreeze activity of PCA60: a dehydrin from peach (*Prunus persica*). Physiol. Plant. 105, 600-608.

Wolkers W.F., Tetteroo F.A.A., Alberda M., Hoekstra F.A. (1999) Changed properties of the cytoplasmic matrix associated with desiccation tolerance of dried carrot somatic embryos. An *in situ* Fourier transform infrared spectroscopic study. *Plant Physiology* 120 **:** 153-164.

Wolkers W.F., McCready S., Brandt W.F., Lindsey G.G., Hoekstra F.A. (2001) Isolation and characterization of a D-7 LEA protein from pollen that stabilizes glasses in vitro. Biochim Biophys Acta 1544:196–206

Wright P.E., and Dyson H.J. (1999). Intrinsically unstructured proteins: Re-assessing the protein structure-function paradigm. J. Mol. Biol. 293: 321–331.

Xu D, Duan X, Wang B, Hong B, Ho THD, Wu R (1996) Expression of a late embryogenesis abundant protein gene, HVA1, from barley confers tolerance to water deficit and salt stress in transgenic rice. Plant Physiology 110 : 249-257.

Yamamoto, A., et al. (1998). Deficiency in protein L-isoaspartyl methyltransferase results in a fatal progressive epilepsy. J. Neurosci. 18:2063–2074.

Yang J.J., Buck M., Pitkeathly M., Kotik M., Haynie D.T., Dobson C.M., Radford S.E. (1995) Conformational properties of four peptides spanning the sequence of hen lysozyme. J Mol Biol. 252(4):483-91

Zhang L., Ohta A., Takagi M. and Imai R. (2000) Expression of plant group 2 and group 3 *lea* genes in *Saccharomyces cerevisiae* revealed functional divergence among LEA proteins. J. Biochem. 127 : 611-616.

Zhang Y., Li J., Yu F., Cong L., Wang L., Burkard G., Chai T. (2006) Cloning and expression analysis of SKn-type dehydrin gene from bean in response to heavy metals. Mol Biotechnol 32:205–217

A l'exception des graines de plantes supérieures, peu d'organismes sont capables de résister à la dessiccation. La survie à l'état sec est un phénomène multifactoriel impliquant notamment l'accumulation de protéines LEA (Late Embryogenesis Abundant). Nous avons montré que la LEAM, une protéine LEA mitochondriale exprimée dans les graines, est dépliée à l'état natif, mais peut se structurer réversiblement en hélice α sous l'effet de la dessiccation. La LEAM interagit avec les membranes à l'état sec, et plus précisément avec les groupements phosphate des phospholipides. Ces interactions, qui dépendent de la composition lipidique, permettent de protéger les liposomes des effets destructeurs de la dessiccation et de la congélation. L'ensemble de ces résultats indique que la LEAM protège la membrane interne mitochondriale pendant la dessiccation. Des approches de génétique inverse ont été initiées afin de confirmer cet axiome et de préciser le rôle physiologique de la LEAM.

Structural and functional analysis of a mitochondrial LEA (Late Embryogenesis Abundant) protein expressed in pea seeds

Although few organisms are desiccation tolerant, this remarkable property is widespread among plant seeds. Survival without water relies on an array of mechanisms, including the accumulation of stress proteins such as the late embryogenesis abundant (LEA) proteins. We show here that LEAM, a mitochondrial LEA protein expressed in seeds, is a natively unfolded protein, which reversibly folds into alpha-helices upon desiccation. LEAM interacts with membranes in the dry state, especially at the level of the phosphate group of phospholipids. These interactions, which are dependent upon lipid composition, provide a protection to liposomes, against desiccation and freezing. The overall results provide strong evidence that LEAM protects the inner mitochondrial membrane during desiccation. A reverse genetic approach was engaged to confirm this axiom and precise the physiological role of LEAM.

Mots clés:
Graine, dessiccation, membrane, tolérance au stress, protéine LEA, structuration réversible

Dimitri TOLLETER - Thèse de Doctorat, spécialité : Biologie Cellulaire et Moléculaire Végétale
UMR Physiologie Moléculaire des Semences (Université d'Angers, INH, INRA) 16 bd Lavoisier 49045 Angers CEDEX 01