Étude des relations structure - fonction des protéines végétales

Frédéric de Lamotte

▶ **To cite this version:**

Frédéric de Lamotte. Étude des relations structure - fonction des protéines végétales. Biochimie [q-bio.BM]. Université Montpellier II - Sciences et Techniques du Languedoc, 2006. tel-00375496

HAL Id: tel-00375496

https://theses.hal.science/tel-00375496

Submitted on 15 Apr 2009

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.

Université Montpellier II

Habilitation à Diriger les Recherches

Frédéric de Lamotte

Chargé de Recherches

UMR Polymorphismes d'Intérêt Agronomique

Équipe Gènes, protéines du grain et qualité des blés

INRA - Bât 31, 2 place Viala

34 060 Montpellier

Tél. : 04 99 61 27 29

Fax : 04 99 61 23 48

lamotte@ensam.inra.fr

Table des matières

CURRICULUM VITAE.....3

ÉTAT CIVIL..... 3

ÉTUDES SUPÉRIEURES.....3

FORMATIONS COMPLÉMENTAIRES..... 3

EMPLOIS OCCUPÉS..... 4

STAGES..... 4

DIVERS - VIE ASSOCIATIVE.....4

ACTIVITÉS D'ENCADREMENT, D'ENSEIGNEMENT ET D'ANIMATION DE LA RECHERCHE..... 5

A) Encadrement d'étudiants.....5

B) Enseignement.....7

C) Animation de la recherche..... 7

LISTE DES PUBLICATIONS.....11

A) Publications scientifiques..... 11

B) Communications à des congrès..... 13

C) Documents à vocation de transfert..... 16

TRAVAUX DE RECHERCHE..... 18

I Photomodulation des enzymes chloroplastiques.....19

II Relations structure - fonction des protéines du grain de blé..... 30

III Projet de recherche..... 49

Littérature citée.....55

CURRICULUM VITAE

ÉTAT CIVIL

Nom: CHRISTOPHE de LAMOTTE-GUÉRY
Nom d'usage: de LAMOTTE
Prénoms: FRÉDÉRIC, Louis, Robert
né le: 30-10-1963 à PÉRIGUEUX (24)
Nationalité Française Marié, 2 enfants

Adresse personnelle :
La Fontaine St Clément,
13 square Murillo
34 070 Montpellier,
Tel: 04 99 61 10 03

Adresse professionnelle :
UMR 1096 Polymorphismes d'intérêt Agronomique
INRA 2 Place Viala,
34 060 Montpellier cedex 01
Tél.: 04 99 61 27 29 Fax: 04 99 61 23 48
e-mail: lamotte@ensam.inra.fr

ÉTUDES SUPÉRIEURES

(poursuivies à l'Université PARIS XI, Centre d'Orsay)

Licence de Biochimie **1984**
Maîtrise de Génétique **1985** (Mention Bien)
D.E.A. Biologie Moléculaire et Cellulaire Végétale **1986** (mention Bien)

DOCTORAT DE L' UNIVERSITÉ PARIS-XI ORSAY 1987-1990

Caractérisation du système ferrédoxine-thiorédoxine chez *Chlamydomonas reinhardtii*
Étude des relations structure - fonction des thiorédoxines par mutagénèse dirigée.
Mention Très Honorable

FORMATIONS COMPLÉMENTAIRES

- Stages Pédagogiques CIES d'Orsay. Mars et Juin 1990
- Informatique VAX/VMS - Analyse des génomes 10/91 (Université de Genève)
- "Levures, outils génétiques et moléculaires pour les biotechnologies" Stage INSERM. 17-18/5/93 et 24-28/5/93 au laboratoire de génétique (M. Aigle) Université Bordeaux.
- "Spectrométrie de masse des peptides et protéines". 10/93. INRA Versailles.
- "Systèmes moléculaires organisés" école d'été. 22/8 - 3/9/94 - Cargèse.
- En tant que responsable AQR, j'ai suivi différentes formations dans le domaine de l'Assurance Qualité
- Animation d'une équipe de recherche. 19-20/01 et 25-26/2/04. FP INRA Montpellier.

EMPLOIS OCCUPÉS

• Étudiant DEA	Allocataire DEA	1985-86	Orsay
• Scientifique du contingent	Ministère de la Défense	1986-87	Paris
• Moniteur d'enseignement	MEN	1988-89	Orsay
• Doctorant	Allocataire MRT	11/87-12/90	Orsay
• Chercheur post doctoral	Boursier EMBO	02/91-11/92	Genève
• CR2 INRA	LTC	12/92-12/94	Montpellier
• CR2 INRA	UBBMC	depuis 1/95	Montpellier
• CR1 INRA	UMR PIA	depuis 1/01	Montpellier

STAGES

Pré-doctoraux

• Génétique et Amélioration des Plantes INRA, Versailles (Dr. Bannerot).
Travail sur la stérilité géno-cytoplasmique chez *Ph. vulgaris* et *Vigna radiata.* Mai/Juin 1983.
• Physiologie Végétale Moléculaire, PARIS XI, Orsay (J.P. Jacquot) DEA .
Caractérisation du système de photomodulation chez *Ch. reinhardtii*. Janvier/Juin 1986.
• Pharmacologie Institut Pasteur. (G. Filion).
Relations entre système sérotonergique et phénylcyclidine". Septembre 1986/Juillet 1987.

Post-doctoral

• Département de Biologie Moléculaire, Université de Genève (J.D. Rochaix).
Étude des chaperonnes impliquées dans l'assemblage des photosystèmes chez *Ch. reinhardtii*. Boursier EMBO. Février 1991 - Décembre 1992.

DIVERS - VIE ASSOCIATIVE

• B.A.F.A. (Brevet d'Aptitude à la Fonction d'Animateur)
• B.N.S. (Brevet National de Secouriste)
• S.S.T. (Brevet de Sauveteur Secouriste du Travail)
• Président de la Commission Informatique du Campus
• Responsable Assurance Qualité de l'UMR PIA
• Membre du conseil d'administration de la Société de BioChromatographie et Nanséparation

ACTIVITÉS D'ENCADREMENT, D'ENSEIGNEMENT ET D'ANIMATION DE LA RECHERCHE

A) Encadrement d'étudiants

- Université de PARIS XI, ORSAY : encadrement de trois stagiaires: un élève de l'École Polytechnique (3 mois) , une étudiante de Maîtrise de biochimie (4 mois) ainsi qu'une stagiaire Post-doctoral (12 mois).
- Université de GENÈVE : responsable de stage d'un étudiant de 5ème année (10 mois).
- INRA Montpellier : (taux d'encadrement / référence des publications) :

Doctorants

N. Vianey-Liaud, 1993-96 (50% / pub. 10) - Étude de la glutathion réductase du grain de blé dur : aspects biochimiques et implications technologiques. Université Montpellier II, 166 p. (Directeur de thèse : K. Kobrehel).

C. Pruvost, 1993-96 - Thèse effectuée au Centre de Biochimie Structurale (CBS) (50% / pub. 5) - Préparation et étude structurale d'une thiorédoxine h de *T. aestivum* et d'un mutant de la thiorédoxine de *E. coli*. Développement d'outils pour l'étude structurale des protéines par RMN. Université Montpellier I, 185 p. (Directeur : MA Delsuc).

C. Klein, 1995-98 (50% / pub. 7,8,11) - Production de quatre isoformes de protéines de transfert de lipides du blé dans *Pichia pastoris*. Expression des gènes codant ces protéines dans le blé. Université Montpellier II, 161 p. (Directeur : MF Gautier).

M-P Fraignier, 1996-99 (30%) - Étude des peroxydases de blé dur. Implication dans le brunissement des pâtes alimentaires. Université Montpellier II, 192 p. (Directeur : K. Kobrehel).

DEA - Master

J. Chaudoreille, 1994 (100%) - Clonage d'un ADNc codant une protéine de transfert de lipides de 9 kDa du blé dans deux vecteurs navettes *E. Coli* - *S. cerevisiae*; expression chez *S. cerevisiae*. DEA "Bases de la Production Végétale", USTL, Montpellier, 15 p.

C. Blanchard, CBS, 1999 (50%) - Étude par RMN de l'azote 15 de la dynamique d'une LTP de 7 kDa de blé. DEA "Interface chimie biologie : systèmes moléculaires à visée thérapeutique", UM I, UM II, Montpellier, 17 p.

J. Faure, 2000 (100%) - Production de protéines de blé en système eucaryote. Diplôme Inter-Universitaire de Biotechnologie Végétale. ENSAT, Paris VI, Paris XI, 35 p.

F. Vagner, 2001 (60% / pub 12) - Étude dynamique par relaxation de la ns-LTP2 de blé par RMN. DEA "Interface chimie biologie : systèmes moléculaires à visée thérapeutique", UM I, UM II, Montpellier, 22 p.

C. Efayong, 2005 (100%) - Production et purification de puroindolines dans un système bactérien alternatif. Master de Génétique et Physiologie Végétale, Université Clermont II, 30 p.

E. Markides 2006 (33%). Master Biologie Santé, Montpellier. Interaction des LTP avec leurs ligands. Analyse par RMN et Fluorimétrie.

S. Alaoui 2006 (100%). Master Pro Génie protéique Nancy. Production, purification et caractérisation de deux puroindolines recombinantes.

École d'ingénieur **(100%)**

D. Destoumieux, 1993 - Purification de protéines recombinantes. (ENSA Toulouse).

A.S. Mignot, 2001 - Expression d'une thiorédoxine h de blé dans *Pichia pastoris*. Production et purification. (INSA Lyon).

J. Dalle, 2003 - Production et purification de quatre LTP recombinantes dans *P. pastoris*. (INA-PG).

Stage post-doctoral

C. Astier, 1995-96 - Étude du polymorphisme des thiorédoxines h (100%).

T. Mosolova, 1999-2000 - Étude de la thiorédoxine réductase (25%).

M. Runquist, 2000-2001 - Purification des isoformes de thiorédoxines h (100% / pub 9).

BTS **(100%)**

P. Aloin, 1995 - Mise au point d'un schéma de purification d'isoformes de thiorédoxine de blé. BTSA Le Puy.

A. Sellier, 2004 Purification et analyse d'une toxine de champignon. Lycée J. Mermoz, Montpellier.

R. Garrido, 2005 - Production de puroindolines dans un système bactérien alternatif. Lycée Polyvalent L. Lagrange, Decazeville.

M. Faburel, 2005 - Production et purification de puroindolines dans un système bactérien alternatif. Lycée J. Mermoz, Montpellier

Maîtrise **(100%)**

A. Diet, 1999 - Purification d'isoformes de thiorédoxine h de blé tendre (Maîtrise de biologie cellulaire et physiologie, option physiologie végétale, Clermont-Ferrand).

C. Perrin, 1999 - Effet du système thiorédoxine sur l'état d'oxydoréduction des protéines de réserves du blé (Maîtrise de biologie cellulaire et physiologie, option physiologie végétale, Clermont-Ferrand).

C. Fontange, 2000 - Purification d'une thiorédoxine h de blé produite dans *Pichia pastoris* (Maîtrise de biologie cellulaire et physiologie, option physiologie végétale, Clermont-Ferrand).

M.J. Vazeille, 2001 - Etude physico-chimique des interactions de la LTP7 de blé avec différents lipides. (Maîtrise de Biologie Cellulaire et Physiologie, option physiologie végétale, Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand).

E. Ferlay, 2002 - Purification et analyse par spectrométrie de masse des isoformes de thiorédoxines h du grain de blé. (IUP Aix-Marseille).

J. Bunel, 2004 - Utilisation d'un système bactérien alternatif pour la production de protéines de blé riches en cystéine (Université Montpellier II).

B) Enseignement

- Université de PARIS XI, ORSAY : Cours du DEA de Biologie Moléculaire et Cellulaire Végétale en 1988, 89 et 90.

Moniteur d'enseignement (1989 et 1990). Encadrement des TD/TP de biologie en PCEM et des TP de physiologie végétale en 2ème année de DEUG B. J'ai suivi deux stages de formation pédagogique au C.I.E.S. d'Orsay.

- Université de GENÈVE : TP de biologie de 3ème année (5 journées) (1992).

- INRA Montpellier : Dans le cadre d'un stage "Introduction à la biologie moléculaire" organisé par la formation permanente INRA/ENSA-M , j'assure plusieurs cours (3 demi-journées = 10 h) et encadre des travaux pratiques (2 demi-journées = 8 h), chaque année depuis 1996.

- Université de Montpellier : Master Biologie Fonctionnelle des Plantes.

Tronc commun Master Pro / Recherche : cours théorique de biochimie structurale

Master Pro : cours sur les techniques utilisées en biochimie structurale + visite des installations du CBS (plate-forme biochimie + analyse biophysique et structurale).

C) Animation de la recherche

Animation d'une équipe de recherche :

Au sein de l'Équipe "gènes, protéines du grain et qualité des blés" de l'UMR, je suis responsable du groupe de Biochimie Structurale et j'anime la thématique Étude des relations structure-fonction des LTP. Le groupe se compose d'un chargé de recherche, d'une technicienne et d'étudiants, avec l'appui à temps partiel de deux adjoints techniques.

Dans le but d'élucider des lois qui lient la séquence du gène à la structure de la protéine et à sa fonction, j'ai développé une approche "Dynamique - Structure - Fonction" par RMN sur des familles de protéines de blé interagissant avec les lipides et sur des oxydo-réductases

du grain. En plus de la détermination de la structure, nous suivons la dynamique des protéines sur plusieurs échelles de temps afin d'affiner l'analyse fonctionnelle. La forte interaction (tant au niveau du fonctionnement quotidien que dans le choix des thématiques de recherche) qui existe entre notre équipe et l'équipe de génomique de l'unité, permet d'identifier les cibles les plus intéressantes pour l'analyse structurale. Ainsi, la détermination de la fonction des protéines étudiées au sein de l'Unité bénéficie de la synergie des approches Dynamique - Structure - Fonction et *in planta*.

Réseau Montpelliérain Protéines Recombinantes :

Avec Yvan Boublick (CNRS) et Jacky Marie (INSERM), j'ai fondé et j'anime le Réseau Montpelliérain Protéines Recombinantes (RMPR). Ce réseau est né pour faire face au défi qui consiste à développer et maintenir un savoir-faire de haut niveau avec des crédits limités et un nombre de chercheurs statutaires en baisse. Le RMPR fédère une centaine de chercheurs de Montpellier et sa région; il organise la diffusion des connaissances et la mutualisation des moyens. Sa vie est rythmée par des réunions thématiques bi-annuelles et s'appuie sur un site web.

Organisation de manifestations scientifiques :

Membre du comité scientifique du congrès SCBA 2005 (Symposium de Chimie et Biologie Analytique) qui a réunit 650 participants à Montpellier en Septembre 2005.

J'ai organisé un colloque "Problèmes et solutions en purification des protéines" qui a réuni une 100^{aine} de participants, académiques et industriels, à Montpellier en Janvier 2006.

Coordination de contrats :

* J'ai coordonné deux ANS (Action Nouvelle Soutenue) du département TPV de l'INRA. Ces ANS font intervenir différentes équipes de recherche de l'INRA. Les projets retenus sont financés pour une durée de deux ans.

1) Production de protéines de blé dans la levure (1998 - 1999). En collaboration avec l'UFR IR2B, nous avons développé un système de production de protéines dans la levure méthylotrophe *Pichia pastoris*. Ce projet a donné lieu à deux publications et deux posters lors de congrès.

2) Marquage de protéines recombinantes par des isotopes stables (2000-2001). C'est la suite logique de la précédente ANS. Nous avons recherché les conditions nécessaires à l'obtention de protéines marquées ^{13}C et/ou ^{15}N pour les études de structure et de

dynamique par RMN. Ce projet a donné lieu à deux publications et à une conférence plénière lors d'un congrès.

* Géométrie de distance et protéomique structurale à haut débit par RMN (2002-2003). Avec M-A Delsuc (CBS - Montpellier), j'ai coordonné un programme qui se place dans l'ère de la post-génomique et qui fait intervenir, en plus de l'UMR et du CBS, un groupe de mathématiciens de l'INRIA (Sophia-Antipolis), le laboratoire de Biochimie Théorique (CNRS PARIS) et l'unité de Bioinformatique Structurale de l'Institut Pasteur. Notre but est d'accélérer la détermination de structures en développant des méthodes automatiques d'analyse de spectres RMN non interprétés (= données brutes). Ces méthodes sont accessibles sur Internet sous forme d'outils disponibles pour la communauté scientifique.

Action transversale :

AQR (Assurance Qualité en Recherche) : la recherche et l'assurance qualité sont consubstantielles (cf. Déclaration d'engagement de la Direction Générale de l'INRA du 16 Mars 2000). Au sein de l'UMR, j'anime la cellule qualité. Cette cellule est composée de trois personnes : Dominique Desbrosse (Gestionnaire d'Unité), Jean-Pascal Sirven (AJT) et moi-même. Dans le cadre de la mission définie par la Direction Générale de l'Institut, et en accord avec Ph. Joudrier, j'organise le calendrier de progression de l'Unité vers une première étape que constitue la maîtrise de la fiabilité et de la traçabilité des travaux de recherche. Mon engagement dans cette initiative structurante correspond à une conviction personnelle de l'intérêt de cette démarche dont les retombées sont immédiatement perceptibles. Je me suis attaché à ce que tous les membres de l'Unité se trouvent impliqués à différents niveaux et que leurs actions soient valorisées. Ainsi, les impératifs de la démarche AQR ont été débattus en réunion et un premier tableau de marche a été proposé. Des membres de l'Équipe ont suivi les formations nécessaires et des réalisations concrètes ont été obtenues. Nous avons réalisé :

- base de données de l'inventaire complet du matériel du laboratoire, avec localisation de la documentation technique, fiche de vie et calendrier de maintenance préventive.

- base de données des pipettes automatiques, avec fiche de vie, personne responsable, localisation et limite d'utilisation.

- intranet "protocoles" qui permet de consulter les protocoles expérimentaux disponibles à l'Unité. Chaque personne de l'Unité a rédigé quelques protocoles qui ont été mis en forme par la cellule AQR puis validés par les personnes du laboratoire.

A l'échelle du Campus et dans une optique de mutualisation, j'ai organisé un groupe de travail pour définir un cahier des charges d'une base de données pour la gestion des produits chimiques. Cette base a été développée par l'Équipe d'Informatique de Centre pour être utilisable par toutes les unités du Campus. Elle a été mise en service le 19 Juillet 2003, elle comporte déjà plus de mille références. Elle est utilisée par plusieurs unités du centre de Montpellier ainsi que sur d'autres centres INRA. J'ai assuré le retour d'expérience pour faire évoluer cette base et l'adapter aux besoins des autres centres.

Au niveau national, je participe au groupe de travail qui définit les logiciels et bases de données qui seront utilisés pour l'AQR à l'INRA ainsi qu'à la définition du contenu de la formation qualité que reçoit chaque unité de recherche.

Commission Informatique du Campus. J'assure la présidence de la Commission Informatique du Campus (CIC). La CIC a pour mission de piloter et d'assister l'Équipe d'Informatique Collective (EIC) dans le choix de ses orientations stratégiques. Elle facilite la remontée d'informations depuis les utilisateurs et veille à maintenir la cohérence entre l'action de l'EIC et les besoins des utilisateurs. Son fonctionnement est permanent (mailing list) et est rythmé par des réunions trimestrielles. Chaque réunion donne lieu à la rédaction d'un compte rendu disponible sur l'intranet. La performance de la CIC et de l'EIC peut être mesurée par la satisfaction des 2900 utilisateurs du réseau local auxquels sont offerts un service fiable, des logiciels variés, des espaces de stockage sécurisés et une permanence téléphonique.

Jury. Pour la campagne de recrutement 2005, j'ai présidé un jury de concours. Nous avons recruté trois Techniciens de Recherche. L'investissement peut être évalué à deux semaines ETP. J'ai apprécié de réussir à maîtriser les contraintes administratives pour permettre au jury de travailler sereinement à la recherche des candidats les plus adaptés aux trois postes proposés.

Labellisation des fournisseurs scientifiques. La rigueur du processus de commande est très mal vécue par les chercheurs. La direction financière de l'INRA a lancé un chantier visant à simplifier et optimiser les commandes de matériels et consommables de laboratoires. A. Fauré (DIFAC/SA) et A. Demichel (SDAR/SAM) m'ont demandé de les aider à définir les critères de labellisation. Cette réforme, couplée avec le déploiement de la carte d'achat, va réellement améliorer la vie des unités tout en permettant une grande économie par la rationalisation qu'elle induit.

LISTE DES PUBLICATIONS

Synthèse publimétrique

Revue	Nombre d'articles dans la revue	Facteur d'impact*	Rang parmi les auteurs
Eur. J. Biochem.	3	3,35	1/6, 3/5 et 3/7
Planta	1	2,92	2/4
Biochem. Biophys. Res. Comm.	1	3,58	2/7
Prot. Engineering	1	2,95	1/7
Protein Exp. Purif.	2	1,46	1/7 et 2/7
Biotech. Techniques	1	0,7	1/5
Biochimie	1	2,32	3/3
J. Agric. Food Chem.	1	1,57	1/4
C.R. Acad. Sci.	1	0,74	1/6
Biochemistry	1	4,11	11/12
J. Biol Chem.	1	7,26	2/4
J. Chrom. B	1	1,91	1
Acta Cryst. D	1	2,12	4/5
Biotech. Adv.	1	1,57	3/4
Biochem. J.	1	4,28	4/9

(* facteur d'impact de l'année suivant la publication)

A) Publications scientifiques

1) Schmitter, J.M., Jacquot, J.P., de Lamotte, F., Beauvallet, C., Dutka, S., Gadal, P., and Decottignies, P. 1988. "Purification, properties and complete amino acid sequence of the ferredoxin from a green algae, *C. reinhardtii*." **Eur. J. Biochem**. 172, 405-412.

2) Huppe, H.C., de Lamotte, F., Jacquot, J.P. and Buchanan, B.B. 1990. "The ferredoxin-thioredoxin system of a green alga, *C. reinhardtii*." **Planta**. 80 (3), 341-351.

3) Jacquot, J.P., de Lamotte, F., Fontecave, M., Schürmann, P., Decottignies, P., Miginiac-Maslow, M. and Wollman, E. 1991. "Human thioredoxin reactivity. Structure function relationship". **Biochem. Biophys. Res. Comm**. 173, 1375-1381.

4) de Lamotte, F., Miginiac-Maslow, M. Decottignies, P. Stein, M., Minard, P. and Jacquot, J.P. 1991. "Mutation of a negatively charged amino-acid in thioredoxin modifies its reactivity with chloroplastic enzymes". **Eur. J. Biochem**. 196, 287-294.

5) de Lamotte F, Pruvost C, Minard P, Delsuc MA, Miginiac-Maslow M, Schmitter JM, Stein M, Decottignies P. 1997. Structural and functional roles of a conserved proline residue in the alpha-2 helix of *Escherichia coli* thioredoxin. **Prot. Engineering**, 10, 1425-1432.

6) Gautier MF, Lullien V, de Lamotte F, Guirao A, Joudrier P, 1998. Characterization of wheat thioredoxins h : cDNA and production of an active *Triticum aestivum* protein in *E. coli*. **Eur. J. Biochem**., 252, 314-324.

7) Klein C, de Lamotte F, Gautier F, Moulin G, Boze H, Joudrier P, Gautier MF, 1998. High level secretion of a wheat lipid transfer protein in *P. pastoris*. **Protein Exp. Purif**. 13, 73-82.

8) de Lamotte F, Klein C, Issaly N, Gautier MF and Boze H, 1999. Single step purification of a wheat 9 kDa lipid transfer protein secreted by *Pichia pastoris*. **Biotech. Techniques**, 13, 351-354.

9) Runquist M, Kobrehel, K and de Lamotte F. 1999. Wheat seed contains at least four thioredoxins isoforms. **Biochimie** 81, Supplement N° 6. p 293

10) de Lamotte F, Vianey-Liaud N, Duviau MP and Kobrehel K. 2000. Glutathion reductase in wheat grain - Isolation and characterization. **J. Agric. Food Chem**. (48) 4978-4983.

11) de Lamotte F, Boze H, Blanchard C, Klein C, Moulin G, Gautier MF and Delsuc MA. 2001. NMR monitoring of accumulation and folding of 15 N-labeled protein produced in *Pichia pastoris.* **Prot**. **Express. Purif**. 22, 318-324.

12) de Lamotte F, Vagner, Pons JL, Gautier MF, Roumestand C and Delsuc MA, 2001. Protein dynamics studies on a wheat type 2 lipid transfer protein. **C.R. Acad. Sci**. PARIS (Chemistry 4) 839-843.

13) Pons JL, de Lamotte F, Gautier MF and Delsuc MA. 2003. Refined solution structure of a liganded type 2 wheat Lipid Transfer Protein. **J. Biol Chem**. Vol. 278, No. 16, Issue of April 18,. 14249–14256.

14) Setterdahl A. T. , Chivers P. T. , M. Hirasawa, Lemaire S. D. , Keryer E. , Miginiac-Maslow M. , Kim S-K. , Mason J. , Jacquot J-P. , Longbine C. C., de Lamotte F. , and Knaff D. B. 2003. The Effect of pH on the Oxidation-Reduction Properties of Thioredoxins. **Biochemistry**, 42, 14877-14884

15) de Lamotte F. 2005. Single Step Purification of a Series of Wheat Recombinant Proteins With Expanded Bed Absorption Chromatography. **J. Chrom. B.** 818, 1 , 29-33.

16) Hoh F., Pons, J.-L.,Gautier, M.-F., de Lamotte, F. and Dumas, C. 2005 Structure of a liganded type 2 non-specific lipid-transfer protein from wheat and the molecular basis of lipid binding, **Acta Cryst**. D61, 397-406

17) Joudrier P, Gautier M-F, de Lamotte F and Kobrehel K. 2005. The thioredoxin h system : potential applications. **Biotech. Adv.** 23, 81-85

18) Dupuy d'Angeac A, Stefas I, Graafland H, de Lamotte F, Palais C,Eriksonn A-K, Bosc P, Rosé C, Chicheportiche R. 2006. Biotinylation of glycan chains of beta2 glycoprotein I induces the dimerisation of the molecule and its detection by the autoimmune anti-cardiolipin antibody (aCL) EY2C9. 2005. **Biochem J.** 393, 117-127

19) Markidès E, de Lamotte F and Delsuc MA. Toward throughput enhanced NMR spectroscopy : Optimising the sensitivity on biological samples by using capillary tubes on regular probes . Soumis à **Magnetic resonance in chemistry**

20) de Lamotte F, Duviau MP, Sanier C, Poncet J, Breton F, Thai R, Bieysse D, and Pujade-Renaud V. Purification and characterization of cassiicolin, the toxin responsible for the *Corynespora* Leaf Fall disease on rubber tree.. Soumis pour **Journal of Chromatography Special Issue** "Analytical Tools for Proteomics".

Publications dans des revues sans comité de lecture

Joudrier P, Alary R, Lullien V, de Lamotte F, Kobrehel K, Gautier MF, 1998. Apports potentiels de la transgénèse pour l'amélioration de la qualité des blés. Industries des Céréales, 106, 10-14.

Chapîtres d'ouvrage

Joudrier P., Lullien V., de Lamotte F., Alary R., Labhilili M., Kobrehel K., Gautier M-F., 1998. Molecular studies of genes involved in quality and drought tolerance : development of probes. SEWANA : Durum Research Network ; International Center for Agricultural Research in the Dry Areas. Publication Icarda. 1998. 287-295.

B) Communications à des congrès

Communications comme orateur invité

de Lamotte F. 1989. Characterisation of the ferredoxin-thioredoxin system of *C. reinhardtii*. Université de Genève. 18 Novembre.

de Lamotte F. 1990. The light dependent regulation system of C. reinhardtii - role of thioredoxins. Université de Warwick. 25 Septembre.

de Lamotte F, Pruvost C, Lullien V, Gautier MF, Joudrier P, Delsuc MA. 1996. Structural studies on wheat thioredoxins h. Conference on Plant Proteins from European Crops, : Plant Proteins from European crops, Food and Non-Food Applications. Nantes 24-27 Novembre.

de Lamotte F. 1999. Stratégie de purification d'isoformes de thiorédoxines de blé. 1999. Akta User Club, Bordeaux 30 Novembre-1 Octobre.

de Lamotte F. 1999. Purification de protéines recombinantes issues de fermenteurs par chromatographie en lit fluidisé. Chromatographie : journée "changement d'échelle, du laboratoire à l'industrie", Nantes 23 Novembre.

de Lamotte F. 2000. Apport de la chromatographie fluidisée couplée au système de sécrétion de *Pichia pastoris*. Akta User Club, Saclay 24-25 Octobre.

de Lamotte F. 2000. Réflexions sur les stratégies pour la production de protéines eucaryotes en système hétérologue. IBSM-CNRS Marseille 25 Mai.

de Lamotte F, Wagner F, Pons JL, Gautier MF, Delsuc MA, 2001. Apport de la RMN de l'15N dans l'étude de la ligandation de lipides à une LTP de blé. XVIIème Congrés Annuel du GERM, 14-18 mai. La Pommeraye, France.

de Lamotte F . 2001. Changement d'échelle en chromatographie Phase Inverse. Akta User Club, Saclay 14-15 Octobre.

de Lamotte F. 2002. Automatisation en chromatographie à haut débit. Akta User Club, Dourdan 16-17 Octobre.

de Lamotte F, Pons JL, Gautier MF et Delsuc MA 2003. Détermination de la structure et analyse de la dynamique d'une LTP de type 2 du blé. Congrès RMN biologique et les enjeux du vivant. 12-14 Mars. Clermont-Ferrand.

de Lamotte F. 2003. Du gène à la structure, de la structure à la fonction. Akta User Club, Paris 5-11 Novembre.

de Lamotte F, Pons JL, Boutrot F, Gautier MF, Delsuc MA. 2003. Structure - dynamics - function study of a non-specific Lipid Transfer Protein by NMR. Second International Conference on Bio-Spectroscopy. 5-8 Juillet. Londres. Royaume-Uni.

de Lamotte F. 2004. High thoughput chromatography in the post-genomic era. Uppsala - Suède, 15 Janvier.

de Lamotte F and Duviau M-P. 2004. Improving purification scheme with expanded bed chromatography. 9th SBCN meeting. 5-7 Mai, Bordeaux.

de Lamotte F. 2004. Purification de peptide en faible abondance. Akta User Club, Paris 12 Octobre.

de Lamotte F, Duviau MP, Sanier C, Poncet J, Breton F, Thai R, Bieysse D, Barthe Ph, Roumestand C and Pujade-Renaud V. 2006. An highly efficient protocol for the purification of cassiicolin, the toxin produced by a *Corynespora cassiicola* isolate from rubber tree. 11th SBCN meeting. 26-28 Avril, Lille.

Communications écrites (poster et texte intégral)

Huppe,H.C. *et al.*. Texte intégral "The ferredoxin-thioredoxin system of a green alga, *C. reinhardtii*". in Progress in Photosynthesis Research (Biggins Ed.), vol. III n°6, pp. 443-446, 1987.

Sani, J.M. *et al.* Texte intégral "Interaction of phencyclidine and two derivatives with serotonergic receptors". Sigma Opioïd and Phencyclidine-like Compounds as Molecular Probes in Biology. (Edited by E.F. Domino and J.M. Kamenka). NPP Books. An Arbor. Michigan, 1987

de Lamotte, F. *et al.* 1988. Texte intégral "Photorégulation des enzymes chloroplastiques chez *C. reinhardtii*." Plant Physiol. and Biochem., 26 n°2 pp. 219.

Jacquot, J.P. *et al.* Texte intégral . "Relationship between the primary structure of ferredoxin and thioredoxin and their activity". Current Research in Photosynthesis. Vol. IV, pp. 159-162. (M. Baltscheffsky Ed.), Kluwer Academic Publishers, 1990.

Schmitter, J.M *et al.* Texte intégral "Détermination de la structure primaire de protéines par spectrométrie de masse: rôles complémentaires de l'electrospray et de la désorption plasma 252Cf". Acte du congrès de la Société Française de Microbiologie et de la Société Française de Biologie Moléculaire. Palaiseau, 1991.

Dieyck W. *et al.* Poster. Wheat lipid transfer proteins : cDNA cloning and production of recombinant LTPs in *E. coli*. 4Th International Congress of Plant Molecular Biology. Amsterdam, Pays-Bas, 1994.

Gautier MF. *et al.* Molecular studies of cysteine-rich proteins from wheat. Wheat Kernel Proteins : Molecular and Functional Aspects. Viterbo, Italie Texte intégral In Wheat Kernel Proteins, Molecular and Functional Aspects, Consiglio Nazionale delle Ricerche, pp 89-94, 1995

Joudrier P. *et al.* Etudes de gènes impliqués dans la qualité technologique des blés. Séminaire Agrogene "Les biotechnologies et l'amélioration du végétal au service des matières premières et des produits.

Nouvelles Possibilités." Paris. Texte intégral dans Séminaires Agrogene p 63-74, 1995.

Joudrier P. *et al.* Molecular studies of genes involved for quality and drought tolerance: development of probes., Alep, Syrie, Texte intégral SEWANA Durum Network Workshop, 1995

Joudrier P. *et al.* Molecular studies of proteins involved in the technological quality of wheats. INRA/BBSRC Cereals Workshop, Norwich, Angleterre, 1995.

de Lamotte F. *et al.* Poster. Characterization of wheat thioredoxin h produced in *E. coli* and yeast. 4th International Conference on Thioredoxins and related proteins, Kassel, Allemagne, 1995.

Pruvost Ch. *et al.* Poster Structural studies on wheat thioredoxin h. 4th International Conference on Thioredoxins and related proteins, Kassel, Allemagne, 1995.

Ihorai T. *et al.* Poster Étude des gènes codant pour les protéines du système thiorédoxine NADP-dépendant chez les blés. Journées de la formation doctorale BPSI, Montpellier, 1996.

Klein C. *et al.* Poster Sécrétion d'une protéine de transfert de lipides de 9 kDa du blé dans *Pichia pastoris*. XXIIIème Forum des jeunes chercheurs de la Société Française de Biochimie et Biologie Moléculaire, Poitiers 1996.

Klein C. *et al.* Poster Secretion of a wheat 9kDa lipid transfer protein in *Pichia pastoris*. Conference on Plant Proteins from European Crops, Nantes 26-28/11/1996. Texte intégral dans Plant Proteins from European crops, Food and Non-Food Applications, 108-111, eds. Gueguen, M.J et Popineau, Y., Springer and INRA publications.

Pruvost Ch. *et al.* Poster Structural studies on a thioredoxin h. 5th International Perspectives on Protein Engineering Conference. Mai 1996, Montpellier. Texte intégral disponible en ligne à http://www.biodigm.com/pope/cdrom.htm.

Joudrier P. *et al.* Genes and corresponding proteins involved in the technological quality of wheat. Clermont-Ferrand. Rencontres INRA/BBRSC 1998.

Joudrier P. *et al.* Implication des thiorédoxines dans la qualité technologique des céréales. Groupe céréales à pailles. Clermont-Ferrand. 1998.

Joudrier P. *et al.* Apports potentiels de la transgénèse pour l'amélioration de la qualité des blés. Journées Techniques de l'Ecole Française de Meunerie, Paris 1998.

Joudrier P. *et al.* Molecular studies of genes involved in quality and drought tolerance : development of probes 287-295, 1998.

Klein C *et al.* Poster Secretion of a wheat 9kDa lipid transfer protein in *Pichia pastoris*. Protéines recombinantes et leur utilisation dans l'industrie. INA-PG, Paris 1998.

de Lamotte F. *et al.* Structural studies on wheat thioredoxins h. Conference on Plant Proteins from European Crops, Texte intégral dans Plant Proteins from European crops, Food and Non-Food Applications, 52-57, eds. Gueguen, M.J et Popineau, Y., Springer and INRA publications 1998.

Runquist M. *et al.* Wheat seed contains at least four thioredoxin isoforms. FEBS99, Nice, 1999.

de Lamotte F. *et al.* Poster NMR monitoring of 15N labeled protein produced in *Pichia pastoris*. GERM 2000. La Londes les maures. 2000.

Delsuc MA. *et al.* Approaches to automatic assignment of NMR spectra of 15N labelled proteins. CECAM Workshop, "Molecular modeling methods for the development of NMR in structural biology" Lyon 2000.

Jarraud F. *et al.* 2000. Poster Effects of reducing systems on wheat proteins. Congrès "Gluten 2000", Bristol, 2000.

Sanier C *et al.* Poster. Purification and structure analysis of Cassiicolin, primary determinant of Corynespora cassiicola pathogenesis on rubber tree. *In* XII Internationnal Congress

on Molecular Plant-Microbe Interactions (ISMPMI), Poster., Cancun, Mexico 2005.

Sanier C et al. Poster. Purification et analyse de structure de la cassiicoline, déterminant majeur de la pathogénicité de Corynespora cassiicola chez l'hévéa. Poster. In VI^{èmes} Rencontres de Phytopathologie/ Mycologie de la Société Française de Phytopathologie, Aussois, France. 2006.

C) Documents à vocation de transfert

Brevet

Gautier MF, Lullien-pellerin V, de Lamotte F, Joudrier P, 1994. Thiorédoxines h de blé tendre et de blé dur et protéines présentant des similitudes, fragments d'ADN codant pour ces protéines et procédés d'obtention. 26/7/1994 N°94 09235 FR 55581 E

Transfert vers l'industrie

Compte tenu des travaux que je mène au sein de l'Unité, Pharmacia Biotech (maintenant GE HealthCare) a souhaité que nous établissions un partenariat scientifique et technique. Cette collaboration se poursuit depuis 1998 et porte sur l'amélioration des méthodes de purification et d'analyse des protéines.

L'incubateur d'entreprises du campus accueille Certivin, une entreprise innovante dans le domaine de la traçabilité des produits alimentaires liquides. Dans le cadre d'une collaboration scientifique, nous avons conçu une méthode de purification originale des traces d'ADN contenu dans le vin et dont le brevet est en cours de rédaction avec F. Moreau et JF. Ballester.

Formation Permanente

Joudrier P., de Lamotte F, Gautier M-F, Alary R. Stage de Formation Permanente : Introduction à la biologie moléculaire (5 jours) cours et TP : Campus INRA/ENSA de Montpellier (depuis 1996).

Manifestations de vulgarisation

Science en Fête

1995 - Poster : Amélioration de la qualité des céréales.

1996 - Animation du stand INRA + 2 posters.

Des molécules impliquées dans la qualité des produits céréaliers.

Comparaison des génomes ; différentes façons de représenter les protéines et l'ADN.

1997 - Poster : Développement de méthodes de détection d'OGM.

1998 - Poster : Amélioration de la tolérance à la sécheresse chez les céréales.

Accueil de classes de 1ère et terminale scientifique avec conférence, visite du labo et démonstrations.

"La modélisation numérique", **film de vulgarisation scientifique**. Décembre 2005. Scénario de Marie-Odile Monchicourt, Réalisation D. Avril et A. Lejardinier.

TRAVAUX DE RECHERCHE

Étude des relations structure - fonction des protéines végétales

Avant-propos

Lors de mon cursus universitaire à Orsay, j'ai eu l'opportunité de suivre des enseignements variés, tous (ou presque ...) dispensés avec passion. Ces professeurs m'ont conforté dans mon amour de la Science, avec un intérêt tout particulier pour l'étude des systèmes complexes : la compréhension du fonctionnement de la cellule, de l'organe et de l'individu m'apparaissait alors riche de mille promesses !

J'ai lu avec intérêt les deux volumes du "Heller", captivé par l'ingéniosité de nos aînés pour élucider le fonctionnement des plantes. Toutefois, déjà à l'époque, je ressentais une certaine frustration car l'analyse s'arrêtait à un niveau "descriptif". Je rêvais de pouvoir descendre à un niveau "explicatif" (par la suite, j'ai appris qu'on disait "moléculaire"). Imaginer un instant qu'on puisse un jour visualiser la cascade d'interactions moléculaires qui va de l'application de l'acide abscissique à la chute des feuilles me comblait d'aise.

Comprendre cet enchaînement nécessite d'appréhender le fonctionnement de chacune des protéines impliquées, or ces fonctions sont portées par les structures tridimensionnelles des protéines. C'est là que tout devient plus compliqué ! En effet, il suffit de consulter les bases de données et d'y comparer l'abondance relative des structures primaires de protéines à celle des structures tertiaires pour mesurer la difficulté d'aborder la troisième dimension ! Même avec les progrès réalisés au tournant du millénaire, déterminer toutes les structures 3D de toutes les protéines étudiées semble hors de portée. On réalise alors le grand intérêt de construire une "Pierre de Rosette" qui fera correspondre structures primaires, structures tertiaires et fonctions. De même qu'on sait déjà traduire une séquence de nucléotides en une séquence d'acides aminés, il est primordial de percer les lois qui nous permettront de replier une séquence d'acides aminés en une structure tridimensionnelle. Nous pourrons ainsi, à moindre effort, obtenir les structures 3D in silico, en analyser le fonctionnement et les interactions. Cela est d'autant plus important en cette ère de post-génomique qui voit s'accumuler des milliers de séquences inconnues, issues des programmes de séquençage systématique.

Dans les pages qui suivent, je décris les recherches auxquelles j'ai pris part ces dernières années. Avec le recul, on peut noter qu'à l'exception des deux années passées à Genève, tout ce que j'ai entrepris visait à comprendre, à son niveau le plus fin, comment de l'acide abscissique arrive à faire tomber les feuilles ...

L'étude des relations entre structure et fonction des protéines nécessite des informations sur l'activité biologique et sur la forme de ces protéines. Il faut donc accumuler des données sur les protéines telles qu'elles fonctionnent dans la plante, et déterminer la structure de certaines d'entre elles. Il est rare de pouvoir mener ces actions en parallèle et les pages qui suivent représentent une illustration du type d'approche que j'ai menée. Elles montrent une alternance entre purification, étude physico-chimique, enzymologie, clonage, production en système hétérologue, détermination de structure ... avec comme but affiché de pouvoir relier motif structural et fonction. Mes travaux passés seront présentés en deux chapitres, mon projet de recherche sera décrit dans un troisième chapitre.

I Photomodulation des enzymes chloroplastiques

Ce travail a débuté en 1986, par mon stage de DEA. Nous cherchions à expliquer comment les végétaux régulent leur métabolisme en fonction des conditions d'éclairement. Après avoir isolé et étudié les protéines impliquées dans ce processus, j'ai cherché à comprendre ce qui leur conférait une spécificité. Pour cela, l'étude des relations structure - fonction apparaissait déjà comme nécessaire et primordiale.

I A) Introduction

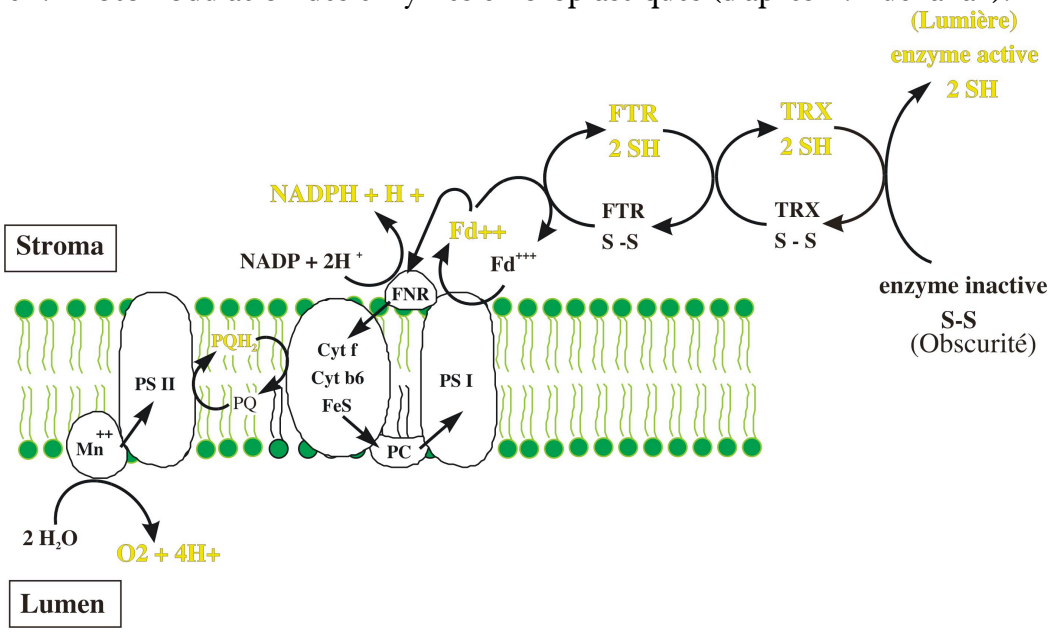
Les végétaux possèdent la faculté d'utiliser directement l'énergie du soleil pour fixer du CO_2 et ainsi produire des composés organiques. La photosynthèse est le moteur essentiel du cycle du carbone et par là même, la source de toute vie sur notre planète. Mais, à l'obscurité, les plantes se comportent comme des êtres hétérotrophes et dégradent des molécules organiques du type sucres en C6. Les cellules chlorophylliennes possèdent ainsi la capacité de réaliser deux types de réactions métaboliques (autotrophe et hétérotrophe) nécessaires au fonctionnement cellulaire tout au long du cycle circadien. On remarque qu'un fonctionnement simultané de ces deux modes conduirait à des cycles futiles au cours desquels les composés néosynthétisés seraient immédiatement dégradés, compromettant le développement de la plante. Deux hypothèses ont été proposées pour expliquer le fonctionnement concerté des deux modes de métabolisme.

- l'activité des enzymes chloroplastiques peut être modulée par des variations du pH, de concentration en magnésium ou en différents substrats dépendants de la lumière. Cependant, les écarts d'activité observés ne rendent pas totalement compte de l'absence de

cycle futile. Des études conduites avec des chloroplastes isolés ont indiqué que la lumière devait contrôler plus directement l'activité de certaines enzymes.

- un modèle représentant un système de photomodulation a été proposé. Il implique la modification post-traductionnelle d'enzymes cibles au niveau de ponts disulfure (figure 1). Ce système dépend de la chaîne de transfert d'électrons photosynthétique et comprend une série de transporteurs rédox stromatiques: la ferrédoxine (Fd), la ferrédoxine-thiorédoxine réductase (FTR) et les thiorédoxines (TRX). La Fd est réduite à la lumière et transmet des électrons à la FTR, qui réduit à son tour les TRX par un échange thiols/ disulfure. Ces dernières activent alors plusieurs enzymes du cycle de Benson-Calvin et inactivent au moins une enzyme du cycle oxydatif des pentoses phosphates (la G6PDH) et une enzyme de la glycolyse (la PRK). Ce mode de régulation constitue un mécanisme de commutation efficace du métabolisme hétérotrophe au métabolisme autotrophe (Buchanan, 1980).

Figure 1: Photomodulation des enzymes chloroplastiques (d'après B. Buchanan).



Sujet de l'étude

Les données de la littérature concernant le système Fd/TRX restaient fragmentaires mais indiquaient que ce système pourrait être présent chez tous les êtres photosynthétiques. Chez les algues vertes, ni la FTR ni l'enzyme cible malate déshydrogénase à NADP (MDH à NADP), n'avaient été mises en évidence. Nous avons donc entrepris la recherche de ces protéines chez l'algue unicellulaire *Chlamydomonas reinhardtii*. Puis nous avons recherché, dans des banques de mutants de *C. reinhardtii*, une souche dépourvue de FTR. Cette recherche ayant été infructueuse, nous avons conclu qu'il serait plus efficace d'utiliser la

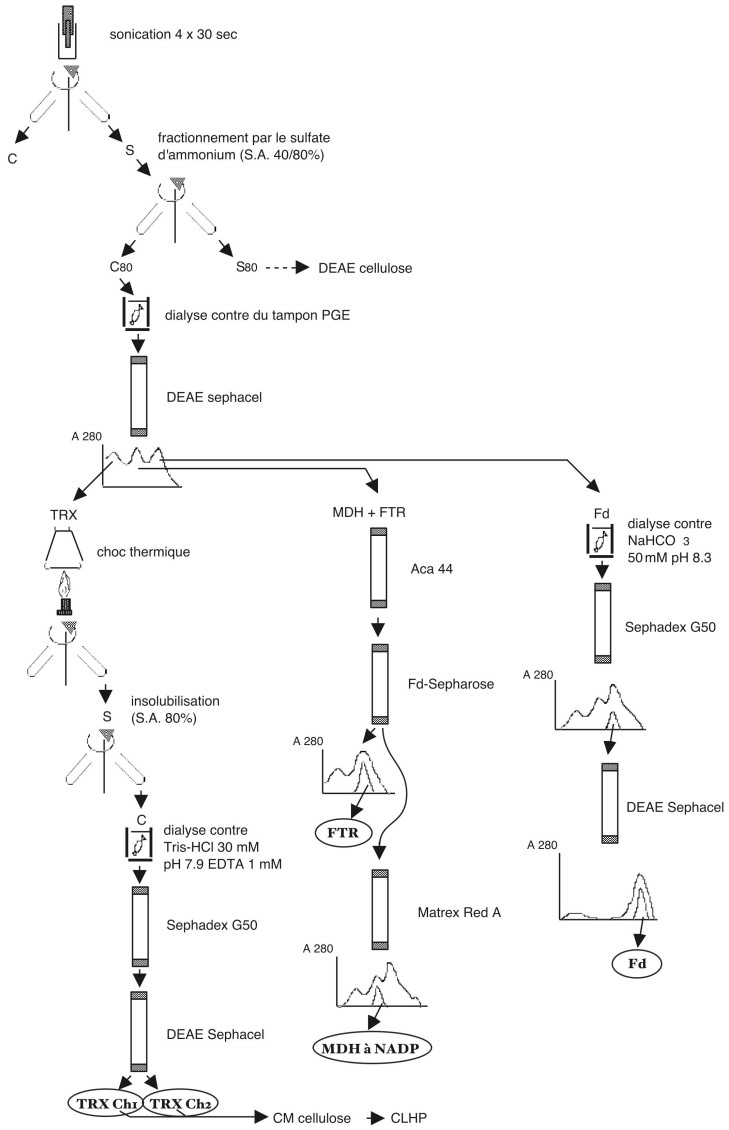
mutagenèse dirigée pour créer des protéines modifiées, afin d'élucider leur spécificité d'action. Nous avons réalisé cette étude sur les TRX, en raison du grand nombre de données biochimiques et de la grande variété de tests enzymatiques disponibles.

I B) Étude du système ferrédoxine-thiorédoxine de C. reinhardtii

I B 1) Extraction, purification et analyse des protéines

J'ai commencé par purifier les protéines du système Fd/TRX de *C. reinhardtii*. Les différentes étapes sont résumées figure 2.

Figure 2 : Purification des protéines du système Fd/TRX de *C. reinhardtii*



La purification des protéines du système Fd-TRX de *C. reinhardtii* a permis d'établir que tous les composants de ce système sont présents dans cette algue verte. La Fd, la FTR et la TRX Ch2 ont pû être purifiées à homogénéité. Les masses moléculaires et les propriétés spectrales de chacun de ces composants sont similaires à celles de leurs homologues des plantes supérieures (Tableau I). Une seconde forme de TRX (Ch1) et une enzyme cible, la MDH à NADP ont pu être mises en évidence. C'était la première fois que la MDH à NADP était mise en évidence chez une algue verte.

Tableau I : Protéines du système Fd-TRX purifiées à homogénéité

Protéine	Taille (kDa)	Absorbance max (nm)
TRX Ch2	12	280
Fd	20	280, 330 ,420, 460
FTR	12 et 14	280, 410

I B 2) Propriétés fonctionnelles des protéines de C. reinhardtii (pub 2)

MDH à NADP : Une activité n'est détectée que si la MDH à NADP est incubée avec du DTT et des TRX. Les Km mesurés sont de 0,2 mM pour l'OAA et de 0,03 mM pour le NADPH.

Système reconstitué de photoactivation : il est composé de membranes de thylakoïdes et de transporteurs rédox stromatiques (Fd, FTR, TRX) ainsi que de Na-ascorbate et de DCPIP comme donneurs d'électrons. Il s'approche de la réalité biologique et représente un excellent test fonctionnel. L' activation est suivie en mesurant l'activité de la MDH à NADP de *C. reinhardtii* (Tableau II). Le système fonctionne *in vitro* avec les protéines de *C. reinhardtii* et montre une certaine spécificité : la substitution de l'une des protéines de *C.reinhardtii* entraîne une chute d'activité de 60 à 90%.

Tableau II : Propriétés du système Fd-TRX

Fd	FTR	TRX	MDH	Activité mesurée (nmol NADPH oxé/min)
C. reinh	*C. reinh*	*C. reinh*	*C. reinh*	330
x	*C. reinh*	*C. reinh*	*C. reinh*	11
C. reinh	x	*C. reinh*	*C. reinh*	12
C. reinh	*C. reinh*	x	*C. reinh*	30
C. reinh	*C. reinh*	*C. reinh*	x	18
Épinard	*C. reinh*	*C. reinh*	*C. reinh*	48
C. reinh	**Épinard**	*C. reinh*	*C. reinh*	29
C. reinh	*C. reinh*	**Épinard**	*C. reinh*	100
C. reinh	*C. reinh*	*C. reinh*	**Maïs**	85

I B 3) Analyse des structures primaires des protéines purifiées (pub 1)

Les structures primaires de la Fd et des TRX Ch1 et Ch2 ont été déterminées. Les séquences sont analysées ci-après. En effet, ces résultats ont conditionné les choix des expériences de mutagenèse dirigée que j'ai menées par la suite.

La ferrédoxine : La Fd est une protéine de faible masse moléculaire à centre fer-soufre, que l'on trouve chez tous les organismes vivants. Elle joue un rôle central comme donneur d'électrons dans de nombreuses réactions. Nous avons déterminé la séquence de la Fd qui se compose de 94 acides aminés.

- Structure primaire de la Fd (avec les 32 résidus du peptide transit) :

```
1   MAMAMRSTFA ARVGAKPAVR GARPASRMSC MAYKVTLKTP SGDKTIECPA DTYILDAAEE
61  AGLDLPYSCR AGACSSCAGK VAAGTVDQSD QSFLDDAQMG NGFVLTCVAY PTSDCTIQTH
121 QEEALY
```

La Fd de *C. reinhardtii* est l'une des plus petites Fd chloroplastiques connues, elle montre une forte homologie avec celles des algues *S. quadricauda* et *D. salina* I et II alors qu'elle est aussi éloignée des végétaux supérieurs que de *B. maxima*. Elle possède 6 résidus cystéine dont 4 sont impliqués dans la liaison avec le centre Fe-S. Aucune structure de Fd de végétaux supérieurs n'est disponible. Une seule structure de Fd de type chloroplastique [2Fe-2S], celle de la cyanobactérie *S. platensis* est disponible. Cette structure en tonneau est très compacte, le centre Fe-S est situé sur un bord de la protéine.

Les thiorédoxines : Deux TRX chloroplastiques ont été décrites chez l'épinard. L'une active préférentiellement la MDH à NADP (TRX m) alors que la fructose bisphosphatase (FBPase) est très sélectivement activée par la TRX f. La TRX f montre peu de similitude avec la TRX m et avec toutes les TRX caractérisées jusqu'à présent. Elle est la seule à former un complexe stable avec son enzyme cible.

Le peu de renseignements disponibles sur les TRX des algues vertes a poussé P. Decottignies à séquencer les deux TRX Ch1 et Ch2. La forme Ch2 est composée de 106 acides aminés et sa masse moléculaire calculée est de 11808 Da. C'est une TRX de type m.

- Structure primaire de la TRX Ch 2 (Les 34 premiers résidus forment le peptide transit) :

```
1   MALVARRAAV PSARSSARPA FARAAPRRSV VVRAEAGAVN DDTFKNVVLE SSVPVLVDFW
61  APWCGPCRII APVVDEIAGE YKDKLKCVKL NTDESPNVAS EYGIRSIPTI MVFKGGKKCE
121 TIIGAVPKAT IVQTVEKYLN
```

La TRX Ch 1 possède 111 acides aminés. Elle n'active pas la FBPase et active la MDH à NADP avec une faible efficacité. Elle possède le site actif caractéristique des TRX (WCGPC) mais montre peu de similarité avec Ch2 (29%) ou les TRX f (31%) et m (26%)

d'épinard. La thiorédoxine Ch1 apparaît comme une thiorédoxine de type h (thiorédoxine impliquée dans des processus hétérotrophes).

- Structure primaire de la TRX Ch 1 :

```
1  GGSVIVIDSK AAWDAQLAKG KEEHKPIVVD FTATWCGPCK MIAPLFETLS NDYAGKVIFL
61 KVDVDAVAAV AEAAGITAMP TFHVYKDGVK ADDLVGASQD KLKALVAKHA AA
```

La première partie de ce travail a permis l'isolement, la caractérisation et le séquençage de plusieurs des protéines du système Fd/TRX de *C. reinhardtii*, confirmant l'existence de ce système de photomodulation chez les algues vertes. Ce travail avait pour but à plus long terme d'obtenir des mutants du système Fd/TRX afin d'en observer l'effet sur la photorégulation du cycle de Benson-Calvin. L'analyse de mutants préexistants s'étant révélée infructueuse, j'ai entamé des expériences de mutagenèse dirigée afin de créer des mutants de l'une des protéines du système. Aucun gène de TRX de *C. reinhardtii* n'était disponible, néanmoins l'étude des propriétés catalytiques et des séquences des TRX permettait de supposer que la TRX d'*E. coli* pouvait fournir un modèle pour l'étude de tels mutants. J'ai donc utilisé le gène *trxA* d'*E. coli* pour des expériences de mutagenèse dirigée. La première étape de ce travail a été la mise au point d'un système de surexpression.

I C) Modification des thiorédoxines par mutagenèse dirigée (pub 3, 4)

En 1988, la mutagenèse dirigée débutait. J'ai eu la chance de rencontrer Ph. Minard, enseignant à Orsay, qui revenait d'un stage dans un laboratoire pionnier dans ce domaine.

I C 1) Le système de surexpression

Pour l'étude de protéines modifiées par mutagenèse dirigée, il est primordial de pouvoir obtenir une grande quantité de protéine homogène. Nous avons construit un vecteur multi-copies, pFP1 (basé sur le vecteur BlueScript, 200 copies/cellule), portant le gène bactérien *trxA*, sous le contrôle de ses séquences de régulation. Ce choix autorisait la production d'une protéine non fusionnée. La souche TG 2 a été transformée avec pFP1 et a permis d'obtenir 60 mg de TRX par litre de culture.

I C 2) Choix des mutations

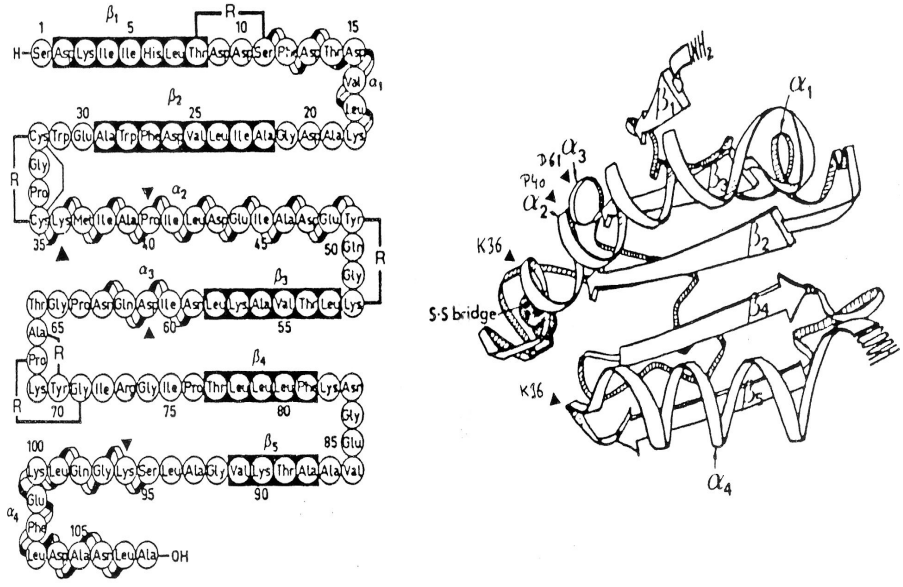
Le choix des acides aminés à modifier a été fait d'après les données biochimiques disponibles et après comparaison des différentes structures primaires publiées. Les mutants se répartissent en trois catégories qui correspondent à la structuration de la protéine, au fonctionnement du site actif et aux interactions avec les protéines cibles. On notera qu'il est très avantageux de disposer de la structure 3D de la TRX d'*E. coli* afin de localiser chaque acide aminé, et donc de pouvoir affiner les choix.

Mutant P40A : remplacement de la proline 40 par une alanine. Cette proline, conservée chez toutes les TRX connues, se situe au milieu de l'hélice α2 (Fig. 3). Cela peut avoir des répercussions importantes sur la structure de la protéine. J'ai remplacé la proline par une alanine, petit résidu compatible avec la structuration habituelle des hélices α.

Mutant K36M : remplacement de la lysine 36 par une méthionine. Il est proposé que cette lysine stabilise l'ion thiolate de la cystéine 32 du site actif. Son remplacement par un résidu neutre et d'encombrement voisin devait permettre d'étayer cette hypothèse.

Mutants D61N et K96M : remplacement de l'aspartate 61 par une asparagine et de la lysine 96 par une méthionine. À l'exception de la TRX f, toutes les TRX possèdent un résidu chargé en position 61 et 96. Or, la TRX f est la seule à former un complexe stable avec son enzyme cible.

Figure 3 : Structure tridimensionnelle de la TRX d' *E.coli*. (d'après Holmgren).



On notera l'aspect "rustique" de cette vue. À cette époque, l'accès à l'information tridimensionnelle était très difficile.

I C 3) Production et purification de la protéine mutée D61N

La TRX recombinante est obtenue par extraction à la presse de French, sonication, choc thermique, fractionnement par le sulfate d'ammonium puis deux étapes de chromatographie. Ce protocole a permis d'obtenir 120 mg de thiorédoxine pour deux litres de culture bactérienne. Cette préparation a été utilisée pour une étude comparative avec la protéine sauvage (WT) obtenue dans les mêmes conditions.

I C 4) Caractérisation du mutant D61N

- Caractérisation physico-chimique : elle consiste en une vérification de la mutation et une première analyse de son impact sur la protéine. Les analyses en CLHP, IEF et l'électrophorèse en conditions non dénaturantes confirment la différence de charge.

- Caractérisation biophysique : l'impact de la modification a été analysé par fluorescence et dichroïsme circulaire. La fluorimétrie ne révèle aucune différence, suggérant qu'il n'y a pas de modification importante dans l'environnement du Trp 28, responsable de l'émission de fluorescence. Par dichroïsme circulaire, aucune différence significative n'a été observée, suggérant que la substitution de l'Asp 61 n'a pas modifié les structures II^{aires}.

- Propriétés catalytiques : j'ai utilisé trois types de réduction : le DTT, le NADPH avec la NADPH-TRX réductase (NTR) d'*E. coli*, et la FTR d'épinard. Les TRX ainsi réduites ont été utilisées pour réduire quatre cibles: le DTNB, l'insuline, la MDH à NADP de maïs (cible de la TRX m) et la FBPase d'épinard (cible de la TRX f). Ces tests ont révélé des différences d'efficacité en faveur du mutant pour l'activation de la FBPase quand le DTT fournit le pouvoir réducteur (Tableau III). Ceci confirme l'hypothèse de départ d'un rôle néfaste de la charge portée par l'Asp61 pour l'interaction avec la FBPase. Un résultat moins prévisible est la meilleure efficacité du mutant dans l'activation des enzymes chloroplastiques (MDH à NADP et FBPase) dans le système reconstitué. Cette meilleure efficacité s'explique par une amélioration de l'interaction entre TRX et FTR.

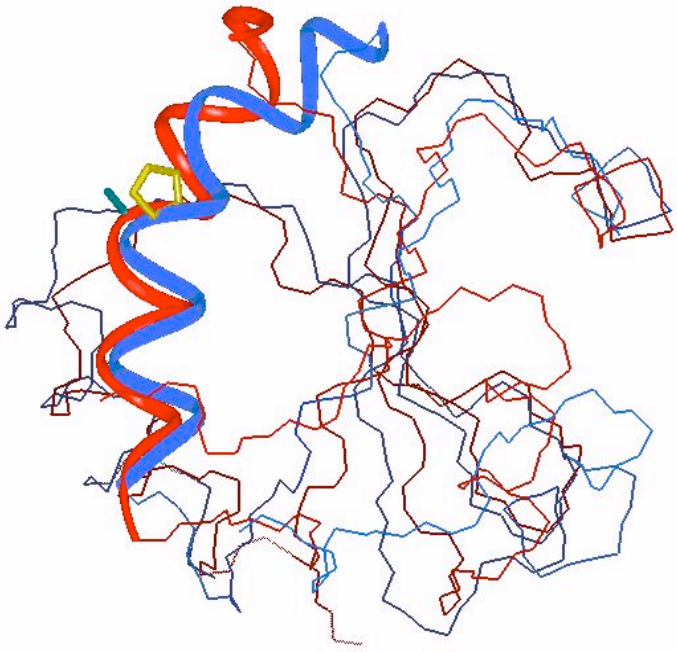
Tableau III : Effet de la mutation D61N

Réducteur	Cible	Effet	Conclusion
DTT	MDH	o	Interaction TRX/FBPase
DTT	FBPase	+	
FTR	MDH	+	Interaction TRX/FTR
DTT	MDH	o	

I C 5) Caractérisation du mutant P40A (pub 5)

Pour ce mutant, la proline située dans l'hélice α2 avait été remplacée par une alanine. Je souhaitais analyser l'impact sur la structure de l'hélice et sur le fonctionnement de la protéine. Or les comportements enzymatiques de P40A et de la protéine sauvage étaient identiques. J'avais réalisé les mêmes tests que pour D61N, seule l'analyse en fluorescence faisait apparaître une différence. Il nous avait été impossible d'interpréter ces résultats. Ainsi, lorsque j'eus l'opportunité de collaborer avec le Centre de Biochimie Structurale (cf. II A) pour l'étude des TRX de blé, je leur proposais de résoudre ce mystère. Avec C. Pruvost, nous avons modélisé la structure de P40 A (fig. 4) afin de pouvoir donner un sens à mes observations. La modélisation consiste en un remplacement des atomes de la proline par ceux de l'alanine, suivi par une phase de calcul de minimisation d'énergie.

Figure 4 : Structure modélisée de P40A en rouge (chaîne latérale de l'Ala 40 en cyan) et structure de la TRX sauvage en bleu (chaîne latérale de la Pro 40 en jaune).



P40A diffère peu de WT, le rmsd est de 1.5 Å. La différence majeure est l'hélice α2 qui est plus rectiligne, l'angle formé par cette hélice passant de 59° à 13°. Ce redressement induit un déplacement du site actif de 6 Å sans en modifier la structure interne. Les contacts hydrophobes impliquant le tryptophane 31 et la boucle entre ß2 et α3 ont été supprimés. W31 devient accessible au solvant, ceci explique les résultats de fluorimètrie. Ces calculs permettent également de prédire que P40A sera moins stable et plus hydrophobe que WT. Ceci a été vérifié par chromatographie d'interaction hydrophobe et par dénaturation ménagée par le chlorure de Guanidine suivie par fluorescence à 340 nm; le ΔGo passe de 8.9 à 6 kcal / mol.

Ainsi, contrairement à notre hypothèse, la proline qui courbe l'hélice α2 n'a pas d'effet déstabilisant global. Cela peut s'expliquer par un effet local défavorable sur l'hélice et un effet favorable plus important par optimisation des contacts hydrophobes. On voit bien ici qu'une réponse plus précise et mieux argumentée a été apportée par un travail pluridisciplinaire.

I D) Discussion

Ce travail a permis l'isolement et la caractérisation des différents composants du système ferrédoxine-thiorédoxine chez *C. reinhardtii*, et donc de faire le lien entre les résultats obtenus chez les cyanobactéries et chez les végétaux supérieurs. Il étaye la thèse de l'universalité de ce système au sein du règne chlorophyllien. Les possibilités d'études génétiques et les techniques de transformation disponibles désignent *C. reinhardtii* comme un organisme particulièrement intéressant pour une étude moléculaire de ce système.

L'une des composantes du système de photomodulation, la thiorédoxine, est une protéine ubiquiste impliquée dans une grande variété de processus biologiques. Nous avons abordé l'étude des relations structure-fonction de cette protéine par des expériences de mutagenèse dirigée. Un système de surexpression très efficace a été développé.

L'analyse fonctionnelle de D61N permet d'affirmer que le modèle choisi est satisfaisant, dans le sens où la mutation analysée se conforme à l'hypothèse posée pour son choix. De plus, la modification effectuée affecte la réactivité avec la réductase de plante (FTR) mais pas avec celle de bactérie (NTR), renforçant ainsi la portée de nos observations. La mise en évidence de l'importance du résidu 61 dans l'interaction de la TRX avec deux enzymes du chloroplaste est un apport incontestable de la mutagénèse dirigée dans l'étude de la photomodulation. Elle pourra être complétée par des études biochimiques plus directes de l'interaction TRX - FTR et par l'analyse des autres mutants.

L'analyse de P40A a nécessité d'élargir encore le cercle des collaborations. L'effet sur la fonction reste faible voir nul, alors que la structure est modifiée, au moins localement. On voit ici la plasticité de la structure d'une protéine comme la thiorédoxine. On note également la nécessité d'avoir accès à des données structurales précises.

L'analyse entreprise ici a été étendue aux autres protéines du système. Ainsi, les structures des différentes protéines du système ont été déterminées et les variations de la structure de la MDH à NADP lors de son activation ont été détaillées.

Encadrement : Cette période de ma vie de (jeune) chercheur est plus propice à être encadré qu'encadrant, cependant, vers la fin de ma thèse, j'ai eu la chance de participer aux premières expériences de mutagenèse dirigée en France. Ceci m'a amené à transmettre ce savoir faire naissant, soit à des stagiaires au laboratoire (une post-doc Argentine qui a intégré l'équipe comme maître de conférence, un élève de l'École Polytechnique et une étudiante de DEA qui a poursuivi mon travail en thèse), soit sous forme de cours (DEA) ou de conférences.

Collaborations : Ce travail a nécessité de faire appel à des compétences extérieures. Cela fut donc l'occasion de créer ou de renforcer des collaborations avec, notamment le laboratoire de biochimie de l'École Polytechnique et le laboratoire d'enzymologie physico-chimique et moléculaire d'Orsay.

L'approche pluridisciplinaire requise pour l'étude des relations structure - fonction s'est amplifiée après mon arrivée à l'INRA de Montpellier, au sein de l'Unité de Biochimie et Biologie Moléculaire des Céréales. Ce laboratoire a pour mission d'améliorer la qualité des produits à base de céréales et étudie notamment les systèmes d'oxydo-réduction du grain de blé et une famille de protéines interagissant avec les lipides : les LTP (Lipid Transfer Protein).

II Relations structure - fonction des protéines du grain de blé

Notre équipe a pour mission d'étudier les bases de la qualité des produits issus de céréales. Les propriétés de ces produits dépendent de la quantité et de la qualité des fractions protéiques du gluten ou de celles des lipides ou des polysacharrides présents dans la matière première. La qualité du produit dépendra des interactions entre ces différents constituants.

II A) Introduction

Nos programmes de recherche s'articulent autour de deux approches principales :

Génomique fonctionnelle, avec l'analyse du transcriptome du grain en cours de développement et la recherche des gènes candidats impliqués dans la qualité.

Étude des relations structure - fonction des protéines du grain.

Pour cette seconde approche, les études se focalisent sur des cibles identifiées lors de tests technologiques ou lors de l'étude génomique et se répartissent comme suit :

Les interactions protéines/protéines. Les systèmes enzymatiques qui régissent les échanges thiol / disulfure sont étudiés : notamment le système glutathion réductase (GR) et le système thiorédoxine NADP-dépendant (NTS). Le NTS est le seul système connu capable de réduire significativement les sous-unités gluténine de haut poids moléculaire. Lors de précédents travaux, l'impact du NTS sur la qualité des produits à base de céréales ou sur la neutralisation d'allergènes alimentaires a été démontré (Kobrehel *et al.* 1992).

Les interactions protéines/lipides. Étude de petites protéines riches en cystéine (PPRC) qui interagissent avec des lipides, notamment les LTP (Lipid Transfer Protein) de 7 et 9 kDa. Parmi les composants de la pâte qui interagissent avec les lipides, les LTP non spécifiques ont un rôle important. Leur pouvoir de stabilisation des interfaces air/eau leur

confère un rôle potentiel important en technologie (Douliez *et al.* 2000). Les résultats d'un grand nombre d'expériences réalisées *in planta* et la démonstration *in vitro* de leur capacité à interagir avec un large spectre de lipides et d'acides gras en ont fait de bons candidats pour expliquer des phénomènes aussi variés que la synthèse de la cutine et de la subérine, la résistance aux pathogènes ou la mobilisation des lipides. Si les LTP semblent impliquées dans de nombreuses réactions, l'explication détaillée de leur mode d'action reste à établir. Il nous a donc semblé judicieux d'entamer des études de relations structure - fonction sur les LTP de blé. Nous avons étudié préférentiellement les LTP de 7 kDa (LTP de type 2) pour lesquelles aucune structure n'était disponible.

Il est important de souligner que les PPRC et les protéines de réserve sont réduites par le NTS et qu'elles deviennent alors susceptibles d'interagir entre elles par cascade rédox pour participer à la formation du réseau protéique que constitue une pâte. Les études du NTS et des PPRC sont donc complémentaires.

II B) Étude des thiorédoxines h de Triticum aestivum (pub 6, brevet)

À mon arrivée à Montpellier en 1993, j'ai repris l'étude des thiorédoxines. Le Centre de Biochimie Structurale (CBS) venait d'être créé à la Faculté de Pharmacie de Montpellier et ses chercheurs, à l'image de Marc André Delsuc et Thérèse Malliavin, recherchaient des protéines à étudier. Je leur proposais d'étudier les thiorédoxines cytoplasmiques du blé (TRX h). C'est ainsi que débuta une collaboration fructueuse qui continue encore maintenant.

II B 1) Caractérisation de la TRX h de Triticum aestivum

La production de la TRX h de blé (TrxTa) a été entreprise dans *E. coli* (vecteur pET). La protéine recombinante obtenue a révélé un comportement particulier de la thiorédoxine de blé par rapport aux thiorédoxines précédemment étudiées. TrxTa ne montre pas la même thermostabilité que la plupart des thiorédoxines; de plus, elle tend à s'agréger avec d'autres protéines de la bactérie lors de la purification. Ces différences pourraient s'expliquer par le fait que TrxTa diffère de la plupart des thiorédoxines connues par une extension N-terminale d'une vingtaine de résidus.

J'ai réalisé l'analyse du comportement enzymatique de TrxTa et de son interaction avec la NADPH Thiorédoxine Réductase ou de protéines cibles. La purification de la protéine recombinante a permis de générer un anticorps spécifique permettant de suivre l'évolution de la thiorédoxine h lors de la maturation et la germination du grain et d'étudier son polymorphisme dans divers cultivars.

II B 2) Analyse structurale de la TRX h de T. aestivum

Ma collaboration avec le CBS avait comme but affiché de déterminer la structure de la thiorédoxine h du blé. TrxTa se compose de 127 résidus et apparaît comme l'une des plus grande TRX étudiée jusqu'ici. Elle possède 19 résidus de plus que la TRX de *E. coli*. Une comparaison de séquence montre que les résidus supplémentaires de TrxTa sont situés en partie N-terminale. Le reste de la séquence (résidus 20 à 127) montre une forte similitude avec les TRX h connues (37% de similarité avec la TRX humaine). L'intérêt de cette étude réside dans le positionnement dans l'espace de cette extension N-terminale. Hélas, bien que le gène de TrxTa ait été cloné et la protéine produite dans *E. coli*, la production de la protéine homogène pour les expériences de RMN s'est avérée difficile. J'ai réussi à purifier suffisamment de TRX de blé pour débuter des expériences de détermination de structure. C. Pruvost a pû attribuer 30% des systèmes de spin. La détermination de la structure de cette protéine nécessitait la production d'une protéine marquée par des isotopes stables. Ceci nous a poussé à adopter d'autres méthodes de production et de purification des protéines recombinantes qui sont décrites en IID. Parallèlement, C. Pruvost a poursuivi sa thèse avec la modélisation de TrxTa.

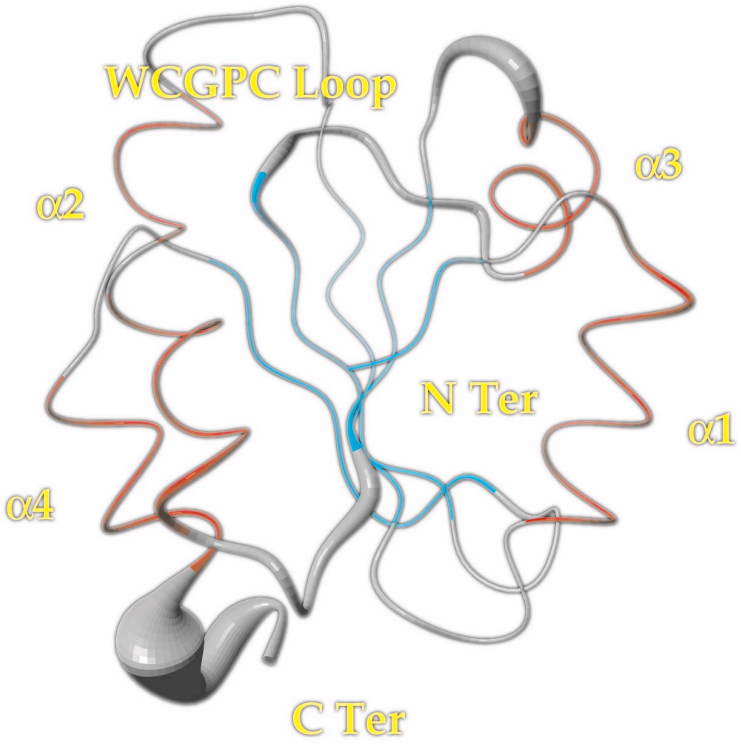
Construction du modèle

Deux possibilités pour la construction du modèle ont été retenues :

- Construction par prédiction de structure II^{aire}. La séquence de TrxTa est traitée selon la méthode SOPM (Self Optimized Prediction Method) qui fait correspondre la séquence à une structure probable par un traitement statistique des bases de données de structure. Cette méthode permet de retrouver les structures II^{aires} des TRX h pour les résidus de 20 à 106. Les parties terminales sont mal définies, notamment la région 1-26 qui nous intéresse.

- Construction par homologie de structure. Cette méthode se rapproche de la recherche d'homologie de séquence au détail près que l'alignement est réalisé en trois dimensions. On cherche à plaquer la séquence de TrxTa sur une structure 3D de TRX h déjà connue (ici, la TRX humaine). La première phase est un alignement des séquences primaires. La seconde phase est le positionnement du squelette de TrxTa sur la structure 3D connue. Dans un troisième temps, les calculs sont menés avec l'application des contraintes de distances pour tous les atomes. Les structures possibles sont ensuite soumises à une étape de minimisation d'énergie. La structure retenue est montrée figure 5.

Figure 5 : Structure modélisée de la thiorédoxine h de blé.
Le diamètre du tube reflète le degré d'incertitude de la structure.



Cette structure n'est qu'un modèle, mais elle pourra être utilisée lors de l'étape d'attribution des données de RMN. On note ici les limites des méthodes disponibles dans la première partie des années 1990. Les recherches menées dans des programmes comme le CASP (Computer Assisted Structure Prediction) ont, depuis, permis d'énormes progrès.

II B 3) Étude du polymorphisme des TRX h de T.aestivum.

Des travaux menés au laboratoire ont montré qu'il existe plusieurs isoformes de thiorédoxine h et que celles-ci sont réparties différemment selon les variétés de blé.

Avec M. Runquist, stagiaire post-doctoral, nous avons entrepris de mieux appréhender la variabilité des thiorédoxines cytosoliques. Cette étude s'intègre aux études structure - fonction, en effet, on peut s'attendre à ce que les isoformes présentent des variations de structure, même faibles, que l'on pourra tenter de relier à des variations de fonction.

Nous avons d'abord mis au point une méthode permettant de séparer les différentes isoformes par électrophorèse en conditions non dénaturantes. La détection est réalisée par immuno-empreinte avec l'anticorps dirigé contre TrxTa (cf. IIB1). Lors du stage post-doctoral de C. Astier, nous avions montré qu'il existait une forte variabilité dans le nombre et dans le profil d'expression des formes de TRX h. Il semblait intéressant de faire le lien entre ces différences d'expression et la qualité des blés (qualité agronomique et technologique). Nous avons développé un protocole de purification de ces différentes isoformes. Les isoformes sont co-purifiées par choc thermique, fractionnement par le sulfate d'ammonium, chromatographies de filtration sur gel et d'échange d'anions puis sont séparées

par échange de cations. Cinq isoformes de thiorédoxine h ont été isolées. L'une correspond à TrxTa. En raison de la faible quantité de thiorédoxines présente dans le matériel de départ et de la dégradation par des protéases, les quantités d'isoformes obtenues se sont révélées très faibles. De ce fait, la caractérisation n'a pas été menée à terme. La réussite de ce programme nécessite d'améliorer le schéma de purification.

L'obtention de la séquence peptidique des isoformes devrait permettre leur clonage par le groupe de M-F Gautier. Les ADNc obtenus pourraient êtres utilisés pour la production des isoformes recombinantes. Nous souhaitons disposer d'un système reconstitué *in vitro* pour analyser la spécificité des isoformes comme il fut fait pour le système FTR décrit en I.

II C) Étude de la glutathion réductase du grain de blé (pub 10)

Il était connu depuis quelques dizaines d'années que le glutathion change les propriétés rhéologiques des pâtes, cependant, l'enzyme qui maintient le glutathion sous forme réduite, la glutathion réductase (GR) avait été peu étudiée. Avec N. Vianey-Liaud, en thèse au laboratoire, nous avons purifié et caractérisé la GR de blé. Nous avons démontré que l'enzyme est homo-dimérique (2 x 60 kDa) et que son pHi est de 4,5. Son pH optimum d'activité se situe entre 7,5 et 8 et ses constantes d'affinité pour le glutathion et le NADPH ont été déterminées. L'obtention d'une enzyme homogène nous a permis d'obtenir des anticorps spécifiques avec lesquels nous avons pû étudier la variabilité de la GR dans le genre *Triticum* et sa répartition dans les différents organes du grain. Nous avons détecté trois isoformes de GR. Leur expression varie au cours du développement du grain. Il serait intéressant d'analyser le lien entre ces variations et des phénomènes physiologiques liés à la maturation. La nécessité de recentrer mon activité m'a conduit à arrêter les études sur la GR.

II D) Étude des relations structure - fonction des LTP de blé

Tous les êtres vivants possèdent des protéines qui interagissent avec les lipides. Ces interactions peuvent être une simple liaison temporaire, un transfert ou une catalyse. Elles influent sur divers processus biologiques en modifiant la composition des lipides ou en modulant leur disponibilité. Les protéines impliquées dans ces processus peuvent être classées en deux grandes catégories: celles spécifiques d'un lipide et celles capables d'interagir avec de nombreux substrats; on parle alors de protéines non spécifiques.

II D 1) Les protéines de transfert de lipides animales

Chez les mammifères, il existe une grande variété de protéines interagissant avec les lipides. La plupart de ces protéines sont spécifiques d'un ou de quelques lipides. Elles ont des masses moléculaires variant de 13 à 75 kDa et sont impliquées dans de nombreuses facettes du fonctionnement cellulaire (transport de lipides dans le plasma, signalisation cellulaire, activation de facteurs de transcription, synthèse des lipides).

Les bactéries possèdent des "acyl carrier proteins" qui sont des protéines de masse inférieure à 10 kDa, spécialisées dans la prise en charge des acides gras lors de leur synthèse puis dans leur transport jusqu'à leur site d'utilisation.

II D 2) Les protéines de transfert de lipides spécifiques des levures, champignons et plantes

Les levures La protéine SEC14 de la levure *Saccharomyces cerevisiae* est la protéine de transfert de lipides de la levure la mieux caractérisée. Elle est capable d'assurer un transfert inter membranaire de Phosphatidyl Inositol (PI) ou de Phosphatidyl Choline (PC) et joue un rôle essentiel dans le fonctionnement de l'appareil de Golgi.

Les champignons Des protéines spécifiques du transfert de phospholipides ont été identifiées chez les champignons filamenteux. *Neurospora crassa* possède une protéine de 38 kDa capable de transférer PI et PC et *Aspergillus oryzae* possède une protéine cytosolique de 19 kDa capable de transférer PI et PC. Chez les Oomycètes, les champignons pathogènes du genre *Phytophtora* et *Pythium* sont incapables de synthétiser leurs propres stérols. Ils les prélèvent chez leur plante hôte par l'intermédiaire de protéines qu'ils sécrètent. Ces protéines de 10 kDa sont les élicitines.

Les plantes Les plantes possèdent aussi des protéines assurant un transfert spécifique de certains phospholipides. Ce sont des protéines acides de 11 à 90 kDa qui ont été très peu étudiées. L'existence de protéines spécifiques du transport de PC a été démontrée chez la pomme de terre (Kader, 1975) et le ricin (Tanaka et Yamada, 1982). Les protéines de soja Ssh1p et Ssh2p (Kearns *et al.*, 1998) et la protéine AtSEC14 d'*Arabidopsis* (Jouannic *et al.*, 1998) transportent spécifiquement le PI. Chez les végétaux, le PI est impliqué dans la transduction de signaux induits par une multitude de stimuli (Stevenson *et al.*, 2000).

II D 3) Les protéines de transfert de lipides non spécifiques (nsLTP) des végétaux

Les protéines de transfert de lipides non spécifiques (nsLTP) ont été initialement définies par leur capacité à transférer, *in vitro*, divers lipides entre deux membranes cellulaires (Kader *et al.*, 1984). Elles sont désormais définies sur la base de la conservation de leur structure primaire et notamment au niveau des résidus cystéine. Les nsLTP appartiennent à la grande famille des protéines contenant le motif 8CM (eight-cysteine motif) caractérisé par la présence de 8 résidus cystéine dont les positions sont conservées.

Les régions entre les résidus cystéine ont évolué indépendamment pour aboutir à des protéines de différentes fonctions (José-Estanyol *et al.*, 2004). On note ainsi la présence d'une cavité hydrophobe chez les nsLTP, l'insertion d'éléments inhibiteurs chez les inhibiteurs de protéases, l'insertion d'éléments induisant le clivage protéolytique chez les albumine-2S, l'addition d'un domaine amino-terminal riche en résidus proline conduit aux protéines hybrides riches en proline (HyPRP) ou l'addition d'un domaine carboxy-terminal qui permet un ancrage membranaire par l'intermédiaire du glycosylphosphatidyl inositol.

II D 3 a) Les différents types de nsLTP

Les nsLTP correspondent à la structure de base des protéines 8CM et sont classées en trois types (nsLTP 1 à 3) en fonction de leur structure primaire. Les deux familles les mieux caractérisées sont les nsLTP de type 1 et 2 qui se différencient notamment par leur masse moléculaire. Un arbre phylogénétique permet de distinguer clairement les trois types de nsLTP parmi les Poacées (Boutrot *et al.*, 2005).

Les nsLTP de type 1 Les nsLTP de type 1 sont les LTP végétales les plus étudiées. Ce sont des protéines d'environ 9 kDa. Ce sont des protéines basiques dont le point isoélectrique se situe entre 10 et 11. Elles sont synthétisées sous forme d'une pré-protéine avec un peptide signal qui dirige les protéines vers la lumière du réticulum endoplasmique (Madrid, 1991). L'ensemble des résidus cystéine est impliqué dans la formation de 4 ponts disulfure.

Les nsLTP de type 2 Les nsLTP de type 2 se distinguent de celles de type 1 par une plus faible masse moléculaire (7 kDa). La première nsLTP de type 2 a été découverte lors de l'isolement et la caractérisation d'un ADNc d'orge. Elle est spécifiquement exprimée dans la couche à aleurone de grains immatures (Jakobsen *et al.*, 1989). Des protéines ont également été purifiées à partir de blé (Monnet, 1990 ; Monnet *et al.*, 2001 ; Douliez *et al.*, 2001c), d'abricot (Conti *et al.*, 2001), de riz (Liu *et al.*, 2002), de maïs (Castro *et al.*, 2003). Les nsLTP de type 2 sont synthétisées sous la forme de pré-protéines. Elles sont aussi capables de

transférer des lipides. Chez le blé et le riz, les protéines étudiées possèdent un niveau de transfert plus élevé que les protéines nsLTP de type 1 de la même plante.

Les nsLTP de type 3 L'étude phylogénétique réalisée par Boutrot et *al.* montre que certaines nsLTP constituent un troisième type de nsLTP. Au moins dix-sept séquences protéiques correspondant à des nsLTP de type 3 sont disponibles dans la base de données GenBank Protein Database. L'ensemble des séquences protéiques provient de l'analyse de transcrits ou de séquences génomiques. Après clivage de leur peptide signal, les protéines matures ont une masse moléculaire comprise entre 6,45 et 7,92 kDa. Comme pour les nsLTP de type 1 et 2, la fonction physiologique des nsLTP de type 3 est inconnue. Cependant, comme tous les transcrits ont été isolés à partir des anthères de différents végétaux, les nsLTP de type 3 pourraient posséder une fonction spécialisée au niveau des tissus reproducteurs mâles.

II D 3 b) Les lipides transportés ou fixés in vitro

La capacité des nsLTP à transférer des acides gras et des phospholipides sans spécificité de ligand a été découverte en 1985 par Rickers *et al*. Les nsLTP végétales ont la capacité de lier une grande variété de composés lipidiques *in vitro*. Parmi ceux-ci, on trouve des acides gras, des phospholipides et des sphingolipides (pour revue voir Kader, 1996). De plus, pour un même composé lipidique, des capacités de fixation variables sont observées selon les nsLTP. Du fait de la nature non covalente des liaisons qui existent entre les nsLTP et les composés lipidiques, le partenaire lipidique est perdu lors de la purification des nsLTP. La nature des lipides transportés *in planta* est à ce jour inconnue.

II D 4) La structure tridimensionnelle des nsLTP

Les huit résidus cystéine sont impliqués dans la formation de 4 ponts disulfure. Les connections entre résidus cystéine sont cependant différentes entre les deux types de nsLTP.

Quatre hélices α sont présentes chez les nsLTP de type 1 et cinq chez les nsLTP de type 2. Ces hélices α s'enroulent pour former une structure en super-hélice. Chez les nsLTP de type 2, l'axe de cette super-hélice définit une cavité hydrophobe capable de prendre en charge un composé lipidique. La chaîne lipidique est ainsi orthogonale à l'axe des hélices α. Au contraire, la plupart des cavités des nsLTP de type 1 présente un axe parallèle à celui des hélices α. Tout en permettant une plasticité de la cavité hydrophobe, les ponts disulfure assurent une grande stabilité à la protéine face à des agents dénaturants, la chaleur ou des protéases (Lindorff-Larsen et Winther, 2001).

Plasticité de la cavité hydrophobe

De nombreuses structures de nsLTP de type 1, complexées ou non à une ou plusieurs molécules hydrophobes ont été déterminées. Si la structure générale est bien conservée, on peut noter des différences importantes, tant dans la taille de la cavité hydrophobe que dans la nature du composé qui s'y cache (1,2-dimyristoylphosphatidyl-glycérol (DMPG), prostaglandine B2, lyso-myristoyl-phosphadidylcholine (LMPC), acide palmitique, acide caprique et l'acide oléique).

En absence de ligand, la taille de la cavité hydrophobe des nsLTP1 présente une forte variabilité qui dépend de la protéine. Le volume des cavités varie de 39 Å^3 pour une nsLTP d'orge à 408 Å^3 pour la LTP de maïs (Lee *et al.*, 1998). Plusieurs études montrent que la taille de la cavité hydrophobe des nsLTP est modifiée lors de la prise en charge des molécules hydrophobes volumineuses ou possédant des longues chaînes acylées. Ainsi, le volume de la cavité de la protéine nsLTP1 de blé passe de 300 Å^3 dans sa forme libre à 750 Å^3 lors de la fixation de DMPG (Sodano *et al.*, 1997) ou à 780 Å^3 lors de la fixation de la prostaglandine B2 (Tassin-Moindrot *et al.*, 2000). La déformation la plus importante est observée avec la ns-LTP1 d'orge pour laquelle le volume de la cavité passe de 39 Å^3 dans sa forme libre à 620 Å^3 lors de la fixation de palmitoyl-CoA (Lerche *et al.*, 1997). Seule une augmentation de 36 Å^3 est observée lorsque l'acide linolénique remplace l'acide caprique dans la cavité de la protéine PLPT de maïs (Han *et al.*, 2001).

Peu de nsLTP de type 2 ont été isolées et caractérisées, et seules trois structures tridimensionnelles ont été déterminées à partir de deux nsLTP2 de riz (Samuel *et al.*, 2002) et de blé (Pons *et al.*, 2003 ; Hoh *et al.*, 2005). La structure secondaire est caractérisée par la présence de cinq hélices α qui définissent une structure tertiaire en super-hélice (Pons *et al.*, 2003). Comme chez les nsLTP de type 1, quatre ponts disulfure stabilisent la structure.

Les nsLTP de type 2 sont des protéines plus compactes que celles de type 1, mais elles possèdent une cavité hydrophobe dont le volume est du même ordre que celui des nsLTP de type 1 (341 Å^3 pour la protéine recombinante nsLTP2 de blé complexée avec un lyso-PG (Pons *et al.*, 2003)). Les données fournies par Hoh *et al.* (2005) indiquent que la nsLTP2 est capable de charger un second lipide dans une cavité hydrophobe de taille plus réduite. Cette cavité de 130 Å^3 se situe dans le prolongement de la cavité principale et les deux cavités sont séparées par trois résidus leucine. Comme les nsLTP de type 1, les nsLTP2 de blé présente une plasticité qui permet de moduler la taille de la cavité hydrophobe.

En absence de données biochimique ou structurale, il est impossible de déterminer si les nsLTP de type 3 peuvent transférer des lipides et si elles présentent une cavité hydrophobe comme les nsLTP de type 1 et 2.

II D 5) Les gènes nsLtp

L'étude des génomes végétaux indique qu'ils contiennent de nombreux gènes *nsLtp*. Même si la fonctionnalité de tous les gènes n'a pas été démontrée, l'étude du génome de la plante modèle *Arabidopsis thaliana* indique la présence de onze gènes codant des nsLTP de type 1, dix-sept de type 2 et trois de type 3. L'analyse des séquences génomiques disponibles pour le génome du riz indique que treize gènes codent des nsLTP de type 1 et douze des nsLTP de type 2. Chez le blé tendre, des transcrits provenant de dix groupes de gènes homologues codant des nsLTP de type 1 et six groupes codant des nsLTP de type 2 ont été caractérisés (Boutrot *et al.*, 2005; Gautier *et al.*, non publié). La complexité des familles de gènes *nsLtp* soulève la question de savoir si chaque membre possède une spécificité d'expression spatio-temporelle et si la fonction physiologique des nsLTP est différente.

Les gènes *nsLtp* présentent un large spectre d'expression spatiale. Certains gènes présentent une expression spatio-temporelle très limitée alors que d'autres sont exprimés lors de tous les processus de développement et au sein de nombreux tissus. La diversité des profils d'expression des gènes *nsLtp* au sein d'une même plante soutient ainsi l'hypothèse que les différentes nsLTP auraient des fonctions physiologiques distinctes au sein d'une même plante voire d'un même organe.

Sujet de l'étude

Les nsLTP végétales apparaissent comme un sujet idéal pour l'étude des relations structure - fonction. A partir d'un motif structural commun relativement simple, elles offrent un polymorphisme important. La diversité des structures, la complexité des profils d'expression ainsi que la variété des gènes nsLtp suggèrent que chaque membre de la famille multigénique pourrait être impliqué dans une fonction biologique distincte. Les fonctions biologiques proposées ne sont cependant pas clairement démontrées et restent du domaine des hypothèses. Ce polymorphisme soulève plusieurs questions : pourquoi autant de gènes différents sont-ils exprimés dans le grain pendant son développement? Quelle est la fonction des différentes nsLTP? Est-ce que les nsLTP ont des fonctions spécifiques selon le stade de développement et/ou leur localisation tissulaire?

Nous tenterons de répondre à ces questions en développant des synergies entre génomique fonctionnelle et biochimie. Nous déterminerons la structure tridimensionnelle de plusieurs nsLTP. L'étude de ces structures, en parallèle aux études de génomique, servira à fournir des hypothèses pour expliquer ce polymorphisme

Tant la détermination de la structure III^{aire} que l'analyse des propriétés fonctionnelles requièrent de grandes quantités de protéines. Nos expériences précédentes avaient révélé des lacunes dans le système de production employé. Nous avons donc entrepris de nous doter d'un système de production plus performant.

II E) Définition d'un système de production et d'analyse adapté aux protéines du blé (pub 7, 8)

La production de protéines riches en cystéine dans *E. coli* pose deux problèmes. Le cytoplasme bactérien n'est pas un environnement favorable pour leur repliement de par son potentiel réducteur. Il ne dispose pas d'enzyme facilitant l'isomérisation des prolines ou le réarrangement des ponts disulfures.

J'ai donc envisagé la production de protéines recombinantes dans la levure, eucaryote largement utilisé dans l'industrie alimentaire et qui devrait permettre un repliement correct des protéines de blé. Après des premiers essais décevants avec *Saccharomyces cerevisiae*, notre choix s'est porté sur *Pichia pastoris* qui offre de nombreux avantages.

- Le gène d'intérêt est intégré dans le chromosome, il ne nécessite donc pas de maintenir une pression de sélection et sa ségrégation est mendélienne.
- Le gène est placé sous le contrôle d'un promoteur fort et inductible. Quand bien même la protéine surproduite serait toxique, il est possible de découpler la production de biomasse de la production de la protéine.
- *P. pastoris* peut être cultivée en fermenteur à une densité cellulaire pouvant atteindre 100 g de matière sèche par litre; ainsi, même si chaque cellule produit peu de protéine, la quantité de protéine obtenue sera importante.
- La sécrétion d'un nombre limité de protéines endogènes par *P. pastoris* (moins d'une vingtaine) facilite la purification de la protéine d'intérêt.

Au cours de la thèse de C. Klein, nous avons transféré l'ADNc de la LTP de 9 kDa de blé dans un nouveau vecteur adapté à la sécrétion dans *P. pastoris*. Cette protéine qui forme des agrégats dans *E. coli* est ici sécrétée sous forme soluble. Ceci permet d'envisager le passage à l'échelle du pilote pour une production en grande quantité.

Pour mener à bien la production de protéine en grande quantité, nous avons établi une collaboration étroite avec une autre unité du département CEPIA, l'UMR IR2B. Nous avons

entrepris des cultures en fermenteur et l'optimisation des conditions de culture a permis d'obtenir plus de deux grammes de la protéine d'intérêt par litre de culture.

J'ai exploré différentes techniques pour purifier ces protéines. J'ai sélectionné la technique de chromatographie en lit fluidisé qui permet de passer de 3 litres de culture brute à 250 ml d'une solution de protéine purifiée et concentrée. Cette technique est transposable à des cultures de grands volumes de type industriel. Ce transfert est d'ailleurs facilité par la collaboration que j'ai mise en place avec la société développant cette technique. Par comparaison avec le système de production bactérien, 2 grammes de LTP ont été produits en une semaine de fermentation. De plus, par comparaison avec une méthode de purification "classique", la nouvelle méthode permet de purifier la LTP en deux jours au lieu de 5 et avec un rendement bien supérieur (Tableau IV).

		Protéine Totale (mg.l-1)	LTP (mg.l-1)	Pureté (%)	Rendement (%)	Durée
Protocole "classique"	Culture (2,1 L)	807	571	71	100	Jour 1
	concentration Ultrasette	770	537	69	94	Jour 2
	precipitat sulfate ammonium	421	300	71	52	Jour 3
	fraction G25	238	182	76	32	Jour 4
	S-Sepharose (34 ml)	61	59	**> 97**	**10**	Jour 5
Protocole lit fluidisé	Culture (700 ml)	3042	750	25	100	Jour 1
	Elution (250 ml)	477	476	**> 98**	**63**	Jour 2

Tableau IV : Comparaison de la méthode classique (centrifugation-concentration-chromatographies) avec la méthode de chromatographie en lit fluidisé

II F) Étude structurale d'une nsLTP2 de blé (pub 11, 12,13, 16)

Les LTP1 (9kDa) ont été largement étudiées alors qu'il existait un déficit d'information concernant les LTP2 (7kDa). Aucune structure de LTP2 n'était disponible, nous avons donc appliqué les avancées décrites ci-dessus à l'étude de ces LTP. Nous avons entrepris (en collaboration avec IR2B) de rechercher des conditions permettant de produire de la LTP 7 kDa marquée à l'azote 15 pour les expériences de RMN. La protéine est marquée à plus de 95% avec un rendement de production élevé (516 mg de protéine purifiée à partir d'un fermenteur de 400 ml). Le marquage ^{15}N nous donne accès à une méthode originale d'analyse par RMN (HSQC 15N = Heteronuclear Single Quantum Correlation).

Cette analyse permet d'obtenir des spectres en 10 min (au lieu de 10 heures). Nous pouvons donc analyser un nombre important d'échantillons et de conditions physico-chimiques. Elle ne nécessite pas de purification poussée de la protéine. Les échantillons issus du fermenteur ne subissent qu'une centrifugation pour l'élimination des cellules. Elle donne

des informations sur la quantité de protéine produite et sur son état de repliement. Ainsi, pour la première fois, il a été possible de suivre l'accumulation et le repliement de la protéine surproduite dans le fermenteur.

II F 1) Détermination de la structure IIIaire d'une LTP2 de blé (LTP 7.1)

C'est la première fois que la structure 3D d'une LTP de cette famille est obtenue. De plus, cette structure montre la LTP en interaction avec un lipide (Fig 6).

Figure 6 : Structures Iaire, IIaire et IIIaire de la LTP de type 2 de blé

Structure I^{aire}

ACQASQLAVCASAILSGAKPSGECCGNLRAQQGCFCQYAKDPTYGQYIRSPHARDTLTSCGLAVPHC

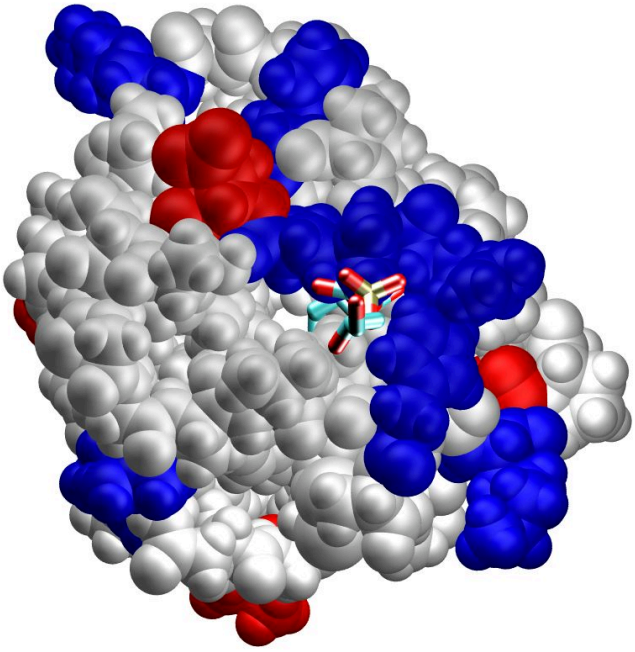
Structure II^{aire}

Estimation de structure secondaire & d'accessibilité moyenne

Légende :

Helix Beta strand Random coil Accessibility shading: Buried Accessible

Structure III^{aire}



La Protéine est figurée en CPK, les résidus acides en rouge, basiques en bleu

Le Lyso-Phosphatidyl-Glycérol est représenté en licorice

Cette LTP diffère sensiblement des LTP de type 1. Bien que plus petite d'une vingtaine de résidus, elle possède 5 hélices α (4 pour les LTP de type 1). Les hélices amphiphiles forment une cavité hydrophobe apte à recevoir un lipide. On note que l'entrée de la cavité

est composée de résidus basiques qui vont diminuer l'affinité de la LTP pour les lipides à tête basique et, *a contrario,* l'augmenter pour ceux à tête acide, comme ici le lyso phosphatidyl glycérol (LPG).

Là encore, il apparaît que la structure permet de comprendre le fonctionnement. En effet, la disposition de ces résidus basiques explique la meilleure affinité notée pour certains lipides à tête acide. De plus, il est maintenant possible de mieux comprendre les tests d'affinité menés par C. Blanchart en étude de fluorescence des tyrosines (la LTP 7 kDa est dépourvue de tryptophane). La fluorescence est généralement utilisée pour mesurer l'interaction protéine/lipide, et, par exemple, rechercher des ligands affins. Or, les 3 tyrosines sont situées au fond de la cavité et ne voient leur environnement modifié que pour des lipides dont la chaîne grasse dépasse les 14 atomes de carbone. La fluorescence ne peut donc pas être utilisée ici pour les lipides à courte chaîne.

II F 2) Analyse dynamique de la structure tertiaire de la LTP 7.1

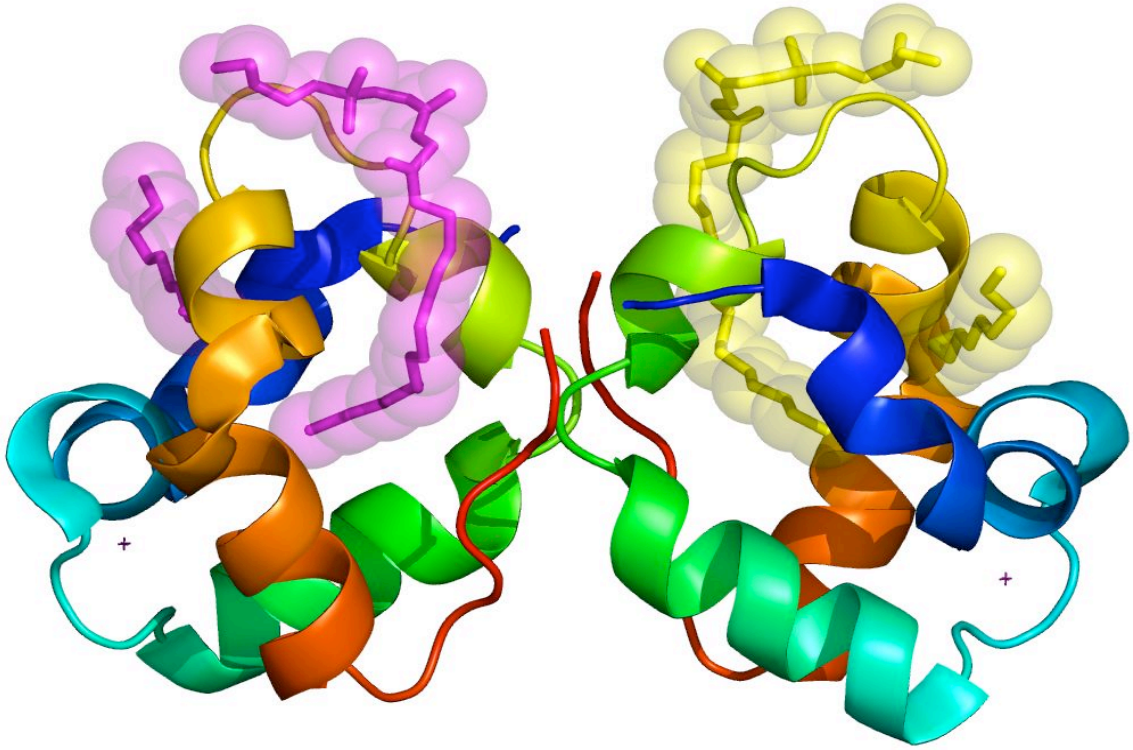
L'étude d'une structure figée ne peut suffire à la compréhension du fonctionnement des protéines. Une analyse dynamique s'avère indispensable. Cela est devenu possible dès que nous avons pu produire une protéine marquée ^{15}N. Au cours du DEA de F. Vagner, des spectres HSQC ont été réalisés avec de nombreux lipides, dans des conditions de pH, de force ionique et de température variées. Cette analyse étant menée conjointement avec la détermination de la structure tertiaire, nous pouvons réaliser un véritable atlas de la protéine, soulignant les zones dont la stabilité structurale est affectée par la liaison avec tel ou tel lipide. Ceci permet donc de mesurer, résidu par résidu, les variations dans la dynamique de la protéine. De cela, il ressort que la LTP de type 2 est formée de 2 zones, l'une insensible à la ligandation, l'autre, sensible à la ligandation et au type de ligand. Ainsi semble se dessiner un mécanisme avec une zone rigide insensible et une zone "adaptative" qui est diversement modifiée par un large spectre de ligands. Ces variations de dynamique n'impliquent, à aucun moment, de passage par des états dénaturés ou de molten globule.

Pour compléter ces travaux, il faudra élargir nos tests. En effet, même la structure tridimensionnelle d'une petite protéine représente un ensemble complexe et, dans l'état de l'art, il est impossible d'attribuer automatiquement des liens entre cette structure et la ou les fonctions de la protéine étudiée. Afin de créer des correspondances entre la structure tertiaire et les propriétés de la LTP, il est primordial de disposer d'un plus large éventail de tests physico-chimiques, fonctionnels ou technologiques. Certains de ces tests sont disponibles au laboratoire ou sur le campus, cependant, nous devons renforcer nos collaborations.

II G) Analyse structurale par radio-cristallographie de la LTP 7.1

Nous avons complété l'étude de cette même LTP par une analyse par radio-cristallographie. Il est particulièrement intéressant d'obtenir la structure de la protéine par une méthode totalement indépendante et qui devrait permettre de mieux positionner le ligand. Cette étude a été menée avec un autre groupe du CBS (Ch. Dumas et F. Hoh). La structure obtenue (Fig. 7) est d'une très haute résolution, la qualité du cristal (donc l'état de pureté de la protéine ...) a permis une résolution *ab initio*.

Figure 7 : Structure de la LTP 7.1 obtenue par radio-cristallographie.



La protéine est représentée en ruban et les lipides en stick et sphere.

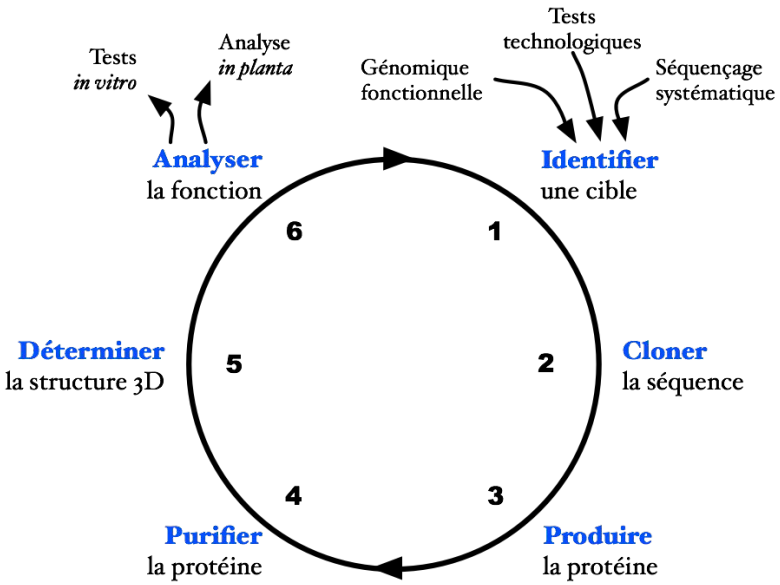
La protéine apparaît sous forme d'un dimère liant 4 chaînes grasses. Cela peut paraître surprenant et en contradiction avec les données obtenues en RMN (monomère en interaction avec un phospholipide). En fait, j'ai pu démontrer que la transition monomère - dimère dépend du pH et intervient vers pH 5 (L'analyse RMN a été menée à pH 3 et la cristallisation a été réalisée à pH 7.). Cela nous rappelle à quel point l'expérimentation peut influer sur les objets étudiés et donc doit nous inciter à la plus grande prudence dans l'interprétation des résultats. Il est intéressant de noter que nous avons mis en évidence un

mécanisme de dimérisation associé à une certaine forme d'allostérie. Il sera intéressant de chercher d'éventuelles connexions avec la fonction de cette LTP.

III) Discussion

J'ai montré la construction d'une chaîne de compétences nécessaire à l'étude des relations structure - fonction. Cette chaîne a déjà prouvé son efficacité à générer les données nécessaires à l'étude des relations structure - fonction. Si la construction de ce réseau est un résultat, il convient de l'analyser comme tel afin de détecter les points à améliorer.

Figure 8 : La roue des études structure - fonction



Ce réseau permet de réaliser les différentes étapes de l'étude des relations structure - fontion :

- **1** identifier une cible : cette étape est réalisée, soit au sein de l'équipe de génomique fonctionnelle (par exemple au sein des 100 000 EST générés lors du programme Génoplante), soit par une des autres équipes de l'UMR dont l'approche "gène candidat" trouve une suite logique par l'étude de la protéine codée par ce gène.

- **2** cloner la séquence codante : le clonage est réalisé en fonction du système de surexpression choisi, et comprend éventuellement l'ajout d'une extension permettant la purification par bioaffinité.

- **3** produire la protéine : si le système d'expression choisi fait appel à *E. coli*, cette étape peut être réalisée par n'importe quel laboratoire. Dans le cas où le système sélectionné nécessite *P. pastoris*, l'UMR IR2B dispose des installations et du savoir-faire requis. Notre collaboration a débuté lors de la thèse de C. Klein (1995-1998). Dès lors, nous avons obtenu le financement de nombreux contrats.

- **4** purifier la protéine : le savoir faire accumulé, notamment en ce qui concerne la chromatographie en lit fluidisé, de même que la collaboration avec Amersham Biosciences constituent incontestablement un point fort de l'équipe.

- **5** déterminer la structure 3D : le CBS dispose de trois spectromètres RMN et d'une source de rayons X. Notre collaboration avec l'équipe de M-A Delsuc est très forte et a conduit à plusieurs publications, une thèse et deux DEA co-encadrés. Nous avons obtenu le financement d'un programme qui nous permet de continuer à développer nos méthodes d'analyse par RMN. Dernièrement, nous avons réalisé la détermination d'une structure de protéine avec l'équipe de cristallographie. Ceci nous permet d'envisager l'analyse structurale des protéines de masse moléculaire élevée (qui échappent encore à l'analyse par RMN) en collaboration avec cette équipe.

- **6** analyser la fonction : la nature de cette étape dépend de la protéine étudiée. Dans le cas des LTP et des TRX, elle est menée au laboratoire, pour les tests enzymatiques, ou au CBS, pour les tests biophysiques (notamment les mesures de dynamique moléculaire qui représentent un atout certain pour l'étude détaillée du fonctionnement des protéines). Nous avons déjà étudié l'expression de gènes de blé dans le riz avec une équipe "analyse fonctionnelle du génome du riz" de l'UMR qui maîtrise parfaitement la transgenèse dans cette plante modèle. Ces travaux menés en collaboration depuis plusieurs années confirment l'utilité du modèle riz. Nous pouvons envisager de tester certaines hypothèses fonctionnelles grâce à cette approche.

Il nous reste maintenant à :

- étendre l'utilisation de ce réseau à toute la famille des LTP, en explorant les variations de structure et de fonction corrélées aux variations des structures primaires.

- améliorer ses capacités, en multipliant les tests utilisables et en augmentant le débit.

Utilisation amplifiée

Les études de génomique fonctionnelle ont identifié de nombreuses autres formes de LTP de type 2. Les ADNc sont maintenant disponibles et leur niveau d'expression à divers stades de développement de la plante a été mesuré. Les séquences primaires de ces LTP de type 2 montrent un degré de similitude variant de 30 à 97%. Nous allons déterminer les structures de ces différentes LTP, soit par RMN soit par modélisation. Nous pourrons alors entreprendre une analyse des fines variations de structure mesurées et établir des liens entre

ces variations structurales et les variations de profils d'expression, en tentant de les relier avec des fonctions putatives différentes.

L'UMR englobe des groupes du CIRAD qui travaillent sur le riz, mais aussi sur l'hévéa ou le cocotier. Les approches de génétique classique et de génomique fonctionnelle ont permis la sélection de "gènes candidats". Certains de ces travaux pourront, à moyen ou court terme, bénéficier de notre approche structure - fonction.

D'une manière plus générique, cet outil peut être bénéfique pour l'étude de toute séquence d'intérêt issue des programmes de génomique.

Capacités étendues et débit augmenté

Si nous avons apporté une réponse à plusieurs des problèmes posés par l'étude des relations structure - fonction, le rythme d'obtention des structures 3D reste limité, en RMN, par la lourde étape d'analyse des données brutes.

Nous avons donc engagé un programme multidisciplinaire "Géométrie de distance et protéomique structurale à haut débit par RMN". Pour ce projet, le réseau des collaborations est étendu à trois autres groupes: de mathématiciens de l'INRIA (Sophia-Antipolis), le laboratoire de Biochimie Théorique (CNRS PARIS) et l'unité de Bio-informatique Structurale de l'Institut Pasteur. Nous allons développer des méthodes de détermination rapide de structure de protéine à partir de spectres RMN non interprétés.

Les prochaines structures seront réalisées par RMN et nous nous attacherons à mettre en évidence d'éventuelles dimérisations. L'interaction de ces protéines avec les lipides sera analysée. Nous développerons une méthode de criblage optimum appuyée sur l'approche RMN. De plus, l'utilisation d'une sonde capillaire permettra de diminuer de manière importante les volumes et les quantités de protéines utilisées (**T**hroughput **E**nhanc**E**d **N**MR **S**pectrosco**P****Y**).

Nous avons également besoin de disposer de plus de tests fonctionnels. J'ai établi des contacts avec une équipe du Max Planck Institut de Postdam pour la réalisation de mesure d'activité de transfert ou de liaison aux membranes. L'équipe CIRAD animé par E. Guiderdoni maîtrise la transgenèse du riz. Il nous est donc possible de vérifier certaines hypothèses fonctionnelles en sur-exprimant certaines LTP.

II f) Conclusions

Au cours de ces dix dernières années, nous nous sommes attachés à faire progresser les connaissances sur des protéines ayant un impact sur la qualité des produits à base de céréales tout en améliorant, en parallèle, les moyens et méthodes pour analyser ces protéines.

Ainsi, par exemple, nous avons affiné la vision des systèmes d'oxydo-réduction du grain de blé; notamment au niveau du polymorphisme des thiorédoxines et de la GR.

L'étude d'une LTP de type 2 a permis de déterminer sa structure mais aussi d'approcher l'intimité de son fonctionnement. Ces résultats permettent de progresser dans l'attribution d'une ou de plusieurs fonctions à la famille des LTP végétales mais aussi de rendre plus efficace leur utilisation à des fins non alimentaires, comme par exemple le ciblage de médicaments. Nous allons maintenant tenter de détailler le mécanisme d'action.

Parallèlement, nous avons identifié une série de verrous dans l'analyse des relations structure - fonction (production, purification, analyse...) et nous avons essayé d'apporter des réponses pertinentes. Ce travail pluridisciplinaire a nécessité l'emploi de techniques de plus en plus performantes dans des champs scientifiques de plus en plus larges.

Au cours de ces années, j'ai œuvré pour mieux comprendre la physiologie des végétaux à travers le fonctionnement de certaines de leur protéines. Voulant aller toujours plus loin dans la compréhension des mécanismes réactionnels, je suis passé de la réaction enzymatique mesurée au spectrophotomètre à une analyse en dynamique moléculaire sur plusieurs échelles de temps. Sans établir d'échelle de valeur entre les différentes techniques utilisées (bien que 100 fois plus coûteux, un spectromètre RMN ne peut pas se substituer à un spectrophotomètre U.V.), il est permis de penser que j'ai construit, avec d'autres, la chaîne de compétences qui permettra de réaliser le rêve décrit dans l'avant-propos.

La construction de cette chaîne de compétences a nécessité d'initier et d'entretenir un réseau de collaborations fructueuses. Ces collaborations impliquent des spécialités variées qui vont de la microbiologie à la biochimie structurale ou de la biologie moléculaire à la modélisation moléculaire. Ce large éventail de savoir-faire fait la force de ce réseau mais nécessite un effort constant pour être compris de tous (et comprendre tout le monde). Ce défi permanent est très stimulant et très enrichissant.

III Projet de recherche

Donner du sens à la complexité : Intégration de données hétérogènes pour l'extraction de connaissances sur les relations Structure - Dynamique - Fonction des protéines de transfert de lipides non spécifiques (nsLTP).

L'année 2006 marque les 20 ans de mon DEA et la dernière année de fonctionnement de notre UMR. Le second de ces deux événements engendre des modifications dans mon environnement scientifique puisque nous créons une nouvelle UMR (Développement et Amélioration des Plantes) et dans mon évolution personnelle puisque je prends la responsabilité de l'équipe Développement du Grain de Blé (DGB) au sein de cette UMR.

Cette nouvelle UMR regroupe des chercheurs du CIRAD, de l'INRA, de l'IRD et des enseignants chercheurs de l'Agro-M et de l'UMII. Ces chercheurs sont regroupés autour de questions scientifiques fortes et s'intéressent aux processus de développement et aux répercussions de ces processus sur la plante et les produits qui en dérivent.

L'équipe DGB contribue au projet global en se basant sur ses acquis en génomique et en biochimie structurale et sur le savoir scientifique généré ces dernières années. Ainsi, gardant à l'esprit que la qualité des blés et des produits qui en sont dérivés varie sous l'influence de facteurs génétiques et environnementaux, il apparaît important de chercher à comprendre cette variabilité pour mieux pouvoir la maîtriser. Il nous faut mieux appréhender comment le blé s'adapte à son environnement et comment sont mises en place les réserves du grain dans des conditions variables. Ainsi, deux grands axes sont définis:

1 - Bases moléculaires et cellulaires déterminant la structure (hard ou soft) de l'albumen du grain de blé et étude du routage des puroindolines.

2 - Implication des protéines de transfert de lipides (LTP) du blé dans son développement et son adaptation aux conditions environnementales.

Ce second point représente une nouvelle étape après les travaux présentés au chapitre précédent. Si nous allons continuer à accumuler des données, nous allons également les organiser et les analyser. Ainsi, *après avoir brisé l'os, nous allons sucer la substantifique moelle* ! Cette étape de structuration et d'analyse des données est présentée ici.

Il est acquis que la compréhension des relations entre structure et fonction des protéines est un enjeu primordial pour la biologie moderne. Dans cette optique, nous avons entrepris des études sur les relations structure - fonction au sein d'une famille multigénique de protéines de transfert de lipides non spécifiques (LTP).

De par leur ubiquité et leurs divers rôles putatifs, de nombreux groupes (plus d'une dizaine, en France) étudient les LTP par différentes approches; ainsi, une grande quantité de données très variées a été accumulée. Nous nous heurtons à l'analyse et à la mise en cohérence des données accumulées. Le défi que nous devons relever est la mise en place d'un système regroupant toutes les données concernant les LTP. De plus, cette réorganisation n'étant pas intrinsèquement suffisante pour progresser dans l'étude des relations structure - fonction des LTP, il nous faut mettre en place un outil permettant de mettre en relation intelligente ces données hétérogènes.

Ainsi, nous devons structurer les différentes recherches en regroupant et organisant les données disponibles, du niveau génomique (ex : au moins 100 gènes chez le blé) jusqu'au niveau fonctionnel (rôle des LTP dans le développement des racines du riz, dans la protection du plan de tabac ou utilisation de certaines LTP pour la vectorisation de molécules actives en galénique). Nous devons également développer un système d'analyse qui permette d'intégrer de façon sophistiquée des informations hétérogènes en s'appuyant sur une description multi-échelle et dépendante du contexte des connaissances.

La Biologie Systémique : La biologie systémique peut apporter une solution à notre problème. Cette nouvelle branche de la biologie est apparue récemment. Le congrès fondateur de cette discipline s'est tenu à Tokyo en 2000 (ICSB 2000) et a réuni des chercheurs venant d'horizon divers comme les mathématiques, la physique, la biologie ou l'informatique. La biologie systémique tente de comprendre le fonctionnement d'un système biologique à partir de l'ensemble des événements moléculaires interdépendants qui se déroulent en son sein. Par essence, le champ d'application de la biologie systémique est l'analyse de fonctionnement cellulaire en ordonnant et connectant les données recueillies par les méthodes à haut débit de la génomique ou la protéomique ou par les méthodes à "bas débit" comme la physiologie ou la biochimie. L'enjeu est de comprendre la cascade des réactions biochimiques entre les diverses molécules biologiques (ADN, ARN, protéines, sucres, lipides ...).

III A) État de l'art international

L'analyse de l'immense quantité de données générées par les méthodes à haut débit comme la génomique ou la protéomique est un grand défi pour le biologiste. Pour tenter de donner un sens à ces données, elles ont été regroupées dans des bases de données. La plupart de ces bases peuvent être globalement rassemblées sous trois formes principales (M. Galperin. The Molecular Biology Database Collection: 2004 update. Nucleic Acid Research. 2004. 32. 3-22).

1) Les grandes banques de dépôt d'informations, rassemblent une très grande quantité d'information, très homogène. C'est d'une certaine manière la matière première de la bioinformatique actuelle. On peut citer en guise d'exemples GenBank, Swissprot, PDB, PubMed .... Ces banques contiennent l'information telle qu'elle a été publiée. Généralement l'information est déposée sous la responsabilité des auteurs, les équipes maintenant ces banques ayant pour souci de préserver l'exactitude et la pertinence des données, et leur facilité d'accès. Cette information s'enrichit peu à peu grâce aux efforts d'annotation des équipes. Le premier rôle de ces banques de données est de constituer la référence dans leur domaine respectif (bases de données spécialisées, par ex knottin).

2) Un deuxième type de base de données est créé quand une équipe propose une méthode permettant d'extraire une information supplémentaire à partir du matériaux brut des banques de données présentées ci-dessus (Prosite, SCOP, Pfam, Prodom, ...). Le service rendu consiste généralement dans une interprétation des données disponibles dans les banques de données. Ces bases de données rassemblent alors le résultat de l'application de la méthodologie choisie sur l'état actuel des grandes banques de données. Suivant que la mise à jour est simple et automatisée, ou complexe, et requérant une intervention humaine, ces bases de données sont mises à jour avec une régularité qui varie entre quelques semaines à une fois par an. Le rôle rempli par ces bases de données est d'essayer de sortir une information pertinente originale à partir du contenu brut des bases de données généralistes.

3) Plus récemment les approches de « système d'information » proposent une gestion encore plus sophistiquée des connaissances (par exemple IMGT).

Aucune de ces bases ne traite l'ensemble des données de manière compatible avec nos besoins pour l'exploration détaillée des relations structure – fonction des LTP. A titre d'exemple, il n'existe qu'une base qui regroupe des informations concernant les LTP mais qui ne traite que des propriétés allergènes d'un sous-groupe de LTP. http://fermi.utmb.edu/SDAP.

III A1) Description du projet

Pour atteindre nos objectifs, nous voulons exploiter les caractéristiques du modèle de traitement des informations relatives à la structure et aux fonctions des protéines déjà développé dans le cadre du projet Silibase (Mazière *et al.* 2004; http://ibph.pharma.univ-montp1.fr/cpbswebsite). Cette approche permet d'intégrer de façon sophistiquée des informations hétérogènes en s'appuyant sur une description multi-échelle et dépendante du contexte des connaissances. La description générique des objets (type de repliement, de domaine fonctionnel) et des fonctions (actions élémentaires) permet de façon avantageuse de nombreux traitements informatiques qui n'étaient pas réalisables avec les outils existant (comparaison fonctionnelle sans comparaison de séquences). La formalisation des connaissances spécifiques aux LTP (propriétés allergènes, spectre de ligands, etc.) devra être entreprise; ainsi chaque données dont nous disposons devra être déconvoluée en actions élémentaires. Qui plus est, le comportement biologique des LTP peut varier selon les conditions; notre outil d'intégration devra tenir compte d'annotations dépendantes du contexte et donner la possibilité de réaliser des annotations conflictuelles (elles-mêmes génératrices de découverte). Enfin, sur un certain type d'information, des spécifications pour construire des modèles de données existent déjà (http://www.ccpn.ac.uk) et seront exploitées.

Cette base de connaissances permettra une analyse pertinente de données hétérogènes et obtenues dans des contextes variés. Elle pourra également servir de socle à une structuration de la recherche menée sur les LTP en permettant à la dizaine d'équipes françaises concernées de trouver un maximum d'informations en un seul lieu. La variété de ces informations agencées de manière claire et organisée devrait stimuler les réflexions interdisciplinaires et susciter des nouvelles coopérations.

III A 2) Partenariats

Au sein de l'UMR DAP

DGB : les LTP sont une thématique forte du laboratoire. L'étude des relations structure - fonction des LTP de blé est menée en parallèle par une approche génomique et par une approche biochimique. L'apport attendu pour une telle base des connaissances est la mise en relation pertinente de données concernant une famille de protéines et issues d'approches méthodologiques très variées.

Développement **A**daptatif du **R**iz : la création de l'UMR DAP va permettre un rapprochement important de renforcer les collaborations avec l'équipe animée par

Emmanuel Guiderdoni. En effet, la complémentarité des outils et la convergences des approches permettent d'envisager des synergies importantes :

- Le riz permet l'accès à la transgenèse, et par la même permet les tests de validation fonctionnelle qui complètent idéalement nos travaux. La collection de mutant sd'insertion va également permettre d'étudier des plantes dont l'un des gènes *ltp* a été inactivé. 2 thèses ont déjà été réalisée en collaboration (JF Digeon et F Boutrot) et ont montré notre capacité à travailler ensemble.

- Les études menées par l'équipe riz sur des gènes candidats impliqués dans le développement adaptatif trouvent un complément naturel dans l'approche "structure - fonction" que nous maîtrisons. De plus, certains des gènes étudiés chez le riz codent pour des LTP. Ces derniers apparaissent donc comme un premier sujet d'étude commun entre nos deux équipes.

Virtual **P**lant : l'équipe animé par Christophe Godin développe des modèles mathématique de la morphogenèse des plantes à différentes échelles. Notre souhait de relier le nanoscopique, le mésoscopique et le macroscopique trouve un échos dans les travaux de cette équipe. Parallèlement, la production d'un jeu de données multi-échelle par notre équipe peut fournir à l'équipe VP l'opportunité de tester ses modèles.

Biologie cell**U**laire de la **R**éponse aux **ST**ress : l'équipe animée par Pascal Montoro étudie la réponse des plantes aux stress biotiques et abiotiques. Nous collaborons déjà avec un chercheur de cette équipe qui peut nous aider dans l'analyse de l'action des LTP dans la réponse aux stress.

Intégration des **D**onnées pour la génomique comparative : l'équipe animée par Brigitte Courtois maîtrise la conception de systèmes d'information et s'intéresse aux chaînes de traitement automatisées pour la génomique fonctionnelle. L'équipe ID pourra donc nous apporter une aide précieuse pour de déploiement de la base de connaissances.

Plateaux techniques : ce projet fait appel aux plateaux techniques de l'UMR, notamment pour la transgenèse, l'imagerie cellulaire ou la modélisation.

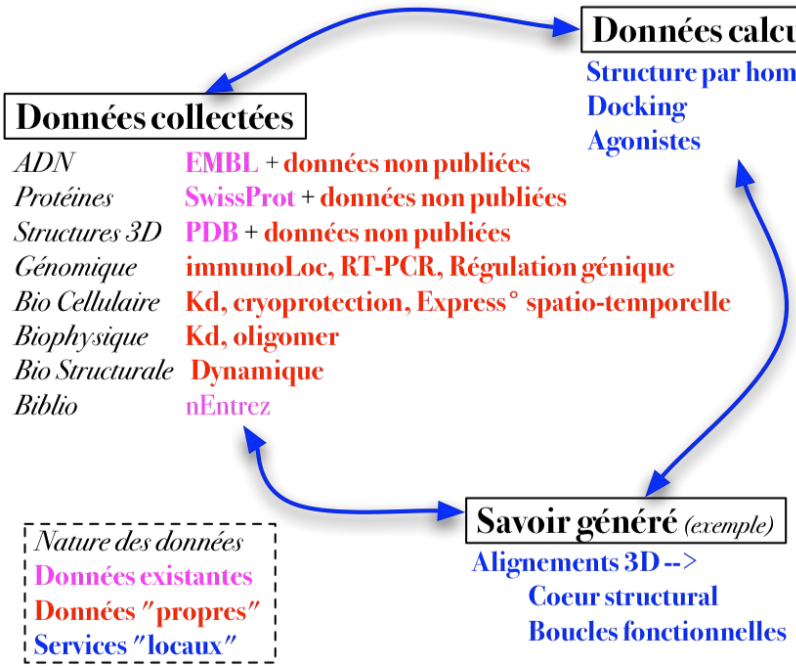
Inter - UMR

Centre de Biochimie Structurale : le CBS est une plate-forme RIO pour la bio-informatique et pour la biologie structurale. Il apporte les compétences scientifique, méthodologique et organisationnelle complémentaires pour réaliser une base de données adaptée. Nous collaborons depuis plus de dix ans et c'est au CBS que les structures des LTP sont déterminées.

Centre de **P**harmacologie et **B**iotechnologie pour la **S**anté : l'équipe de bio-informatique pour la biologie systémique développe une approche interdisciplinaire (Bio, Math, informatique) pour la modélisation des systèmes complexes biologiques. Elle est considérée comme l'une des équipes pionnières dans ce domaine. La création de la base de connaissances consacrées au LTP leur permettra de tester et affiner leur modèle.

III A 3) Aspects innovants du projet

Il n'existe pas encore de base de données regroupant toutes les informations nécessaires à la compréhension des relations structure - fonction pour une famille de protéines. Les bases existantes sont plutôt centrées sur un organisme modèle (ex : nématode ou *A. thaliana*) et sur une approche méthodologique (génomique ou protéomique).



Cette base de données sera dédiée à une famille de protéines et regroupera toutes les informations les concernant, de la séquence du gène jusqu'à l'expression spatiale et temporelle dans la plante Nous désirons ainsi aider les équipes de recherche à mettre en évidence les liens entre des informations très variées, et donc mieux comprendre les relations structure - fonction.

Ainsi, la mise en ordre des données et la création d'ontologie nous permettrons une meilleures exploitation des résultats et donc une meilleures compréhension des relations qui lient la structure d'une protéine à sa fonction.

Littérature citée

Boutrot F., Guirao A, Alary R, Joudrier P. And Gautier M.-F. (2005). Wheat non-specific lipid trandfer protein genes display a complex pattern of expression in developing seeds. Biochem. Biophys. A., **1730:**114-125.

Buchanan B.B. 1980 Role of light in the regulation of chloroplast enzymes.Ann. Rev. Plant. Physiol. **31**, 341-374

Castro M. S., Gerhardt I. R., Orru S., Pucci P. et Bloch C. J. (2003). Purification and characterization of a small (7.3 kDa) putative lipid transfer protein from maize seeds. *Journal of Chromatography B*, **794(1):**109-114.

Conti A., Fortunato D., Ortolani C., Giuffrida M. G., Pravettoni V., Napolitano L., Farioli L., Perono Garoffo L., Trambaioli C. et Pastorello E. A. (2001). Determination of the primary structure of two lipid transfer proteins from apricot (*Prunus armeniaca*). *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, **756(1-2):**123-129.

Decottignies P. ; Schmitter J.M. ; Jacquot J.P. ; Dutka S. ; Picaud A. ; Gadal P. (1990) purification, characterization, and complete amino acid sequence of a thioredoxin from a green alga, *chlamydomonas reinhardtii*. Archiv. Biochem. Biophys., **281**, 112-121

Decottignies P.; Lemarechal, P.; Jacquot, J.P.; Schmitter, J.M.; Gadal, P. (1995) Primary structure and post-translational modification of ferredoxin-NADP reductase from *Chlamydomonas reinhardtii* Plant Mol. Biol., **28**:487-503

Douliez J.-P., Pato C., Rabesona H., Mollé D. et Marion D. (2001c). Disulfide bond assignment, lipid transfer activity and secondary structure of a 7-kDa plant lipid transfer protein, LTP2. *European Journal of Biochemistry*, **268 (5):**1400-1403.

Galperin M. The Molecular Biology Database Collection: 2004 update. Nucleic Acid Research. **32**. 3-22

Han G. W., Lee J. Y., Song H. K., Chang C., Min K., Moon J., Shin D. H., Kopka M. L., Sawaya M. R. et Yuan H. S. (2001). Structural basis of non-specific lipid binding in maize lipid-transfer protein complexes revealed by high-resolution X-ray crystallography. *Journal of Molecular Biology*, **308(2):**263-278.

Hoh F., Pons J.-L., de Lamotte F. et Dumas C. (2005). The crystal structure of a liganded type 2 non-specific lipid transfer protein and the molecular basis of lipid binding. Acta Cryst. **D61**, 397-406

Jakobsen K., Klemsdal S. S., Aalen R. B., Bosnes M., Alexander D. et Olsen O.-A. (1989). Barley aleurone cell development : molecular cloning of aleurone-specific cDNAs from immature grains. *Plant Molecular Biology*, **12:**285-293.

José-Estanyol M., Gomis-Rüth F. X. et Puigdomènech P. (2004). The eight-cysteine motif, a versatile structure in plant proteins. *Plant Physiology and Biochemistry*, **42(5):**355-365.

Jouannic N., Lepetit M., Vergnolle C., Cantrel C., Gardies A. M., Kader J.-C. et Arondel V. (1998). Isolation of a cDNA from *Arabidopsis thaliana* that complements the *sec14* mutant of yeast. *European Journal of Biochemistry*, **258(2):**402-410.

Kader J.-C. (1975). Proteins and the intracellular exchangeof lipids: stimulation of phospholipid exchange between mitochondria and microsomal fractions by proteins isolated from potato tuber. *Biochimica et Biophysica Acta - Lipids and Lipid Metabolism*, **380(1):**31-44.

Kader J.-C., Julienne M. et Vergnolle C. (1984). Purification and characterization of a spinach-leaf protein capable of transferring phospholipids from liposomes to mitochondria or chloroplasts. *European Journal of Biochemistry*, **139(2):**411-416.

Kader J.-C. (1996). Lipid-transfer proteins in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **47:**627-654.

Kearns M. A., Monks D. E., Fang M., Rivas M. P., Courtney P. D., Chen J., Prestwich G. D., Theibert A. B., Dewey R. E. et Bankaitis V. (1998). Novel developmentally regulated phosphoinositide binding proteins from soybean whose expression bypasses the requirement for an essential phosphatidylinositol transfer protein in yeast. *EMBO Journal*, **17(14):**4004-4017.

Kobrehel K. Wong, J.H. ; Balogh, A. ; Kiss, F. ; Yee, B.C. and Buchanan, B.B. (1992), Specific reduction of wheat storage proteins by thioredoxin h 1. Plant Physiol., 99, 919-924

Lee J. Y., Min K., Cha H., Shin D. H., Hwang K. Y. et Suh S. W. (1998). Rice non-specific lipid transfer protein: the 1.6 Å crystal structure in the unliganded state reveals a small hydrophobic cavity. *Journal of Molecular Biology*, **276(2):**437-448.

Lerche M. H., Kragelund B. B., Bech L. M. et Poulsen F. M. (1997). Barley lipid-transfer protein complexed with palmitoyl CoA: the structure reveals a hydrophobic binding site that can expand to fit both large and small lipid-like ligands. *Structure*, **5(2):**291-306.

Lindorff-Larsen K., Lerche M. H., Poulsen F. M., Roepstorff P. et Winther J. R. (2001). Barley lipid transfer protein, LTP1, contains a new type of lipid-like post-translational modification. *The Journal of Biological Chemistry*, **276(36):**33547-33553

Liu H., Xue L., Li C. F., Zhang R. et Ling Q. L. (2001). Calmodulin-binding protein BP-10, a probable new member of plant nonspecific lipid transfer protein superfamily. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **285(3):**633-638.

Mazière P., Garnier C. And Molina F. (2004). A description scheme of biological processes based on elementary bricks of action. J. Mol. Biol. **229**:77-88

Monnet F.-P. (1990). Caractérisation d'une protéine de fixation de lipides du blé dur, purification, séquençage, ADN complémentaire : relations aux protéines végétales de transfert de lipides et aux inhibiteurs d'amylase / trypsine des céréales. *Thèse*, Université de Montpellier II, France. pp 121.

Monnet F.-P., Dieryck W., Boutrot F., Joudrier P. et Gautier M.-F. (2001). Purification, characterisation and cDNA cloning of a type 2 (7 kDa) lipid transfer protein from *Triticum durum*. *Plant Science*, **161(4):**747-755.

Pons J.-L., de Lamotte F., Gautier M.-F. et Delsuc M.-A. (2003). Refined solution structure of a liganded type 2 wheat nonspecific lipid transfer protein. *The Journal of Biological Chemistry*, **278(16):**14249-14256.

Rickers J., Spener F. et Kader J.-C. (1985). A phospholipid transfer protein that binds long-chain fatty acids. *FEBS Letters*, **180(1):**29-32.

Samuel D., Liu Y.-J., Cheng C.-S. et Lyu P.-C. (2002). Solution structure of plant nonspecific lipid transfer protein-2 from rice (*Oryza sativa*). *The Journal of Biological Chemistry*, **277(38):**35267-35273.

Sodano P., Caille A., Sy D., de Person G., Marion D. et Ptak M. (1997). ^{1}H NMR and fluorescence studies of the complexation of DMPG by wheat non-specific lipid transfer protein. Global fold of the complex. *FEBS Letters*, **416(2):**130-134.

Stevenson J. M., Perera I. Y., Heilmann I., Persson S. et Boss W. F. (2000). Inositol signaling and plant growth. *Trends in Plant Science*, **5(6):**252-258.

Tanaka T. et Yamada M. (1982). Properties of phospholipid exchange proteins from germinated castor bean endosperm. *5th International Symposium on the Biochemistry and Metabolism of Plant Lipids (Groningen, Pays-Bas)*, 99-106.

Tassin S., Broekaert W. F., Marion D., Acland D. P., Ptak M., Vovelle F. et Sodano P. (1998). Solution structure of *Ace*-AMP1, a potent antimicrobial protein extracted from onion seeds. Structural analogies with plant nonspecific lipid transfer proteins. *Biochemistry*, **37(11):**3623-3637.