Etudes structurales de la défensine AhPDF1 de la plante Arabidopsis halleri impliquée dans la tolérance au zinc

Fanny Meindre

▶ **To cite this version:**

Fanny Meindre. Etudes structurales de la défensine AhPDF1 de la plante Arabidopsis halleri impliquée dans la tolérance au zinc. Sciences agricoles. Université d'Orléans, 2013. Français. NNT : 2013ORLE2064 . tel-01058780

HAL Id: tel-01058780

https://theses.hal.science/tel-01058780

Submitted on 28 Aug 2014

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 D'ORLÉANS

ÉCOLE DOCTORALE SANTE, SCIENCES BIOLOGIQUES ET CHIMIE DU VIVANT

Centre de Biophysique Moléculaire, Orléans

THÈSE présentée par :

Fanny MEINDRE

soutenue le : **17 décembre 2013**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université d'Orléans**

Discipline/Spécialité : Biophysique Moléculaire

Etudes structurales de la défensine AhPDF1 de la plante *Arabidopsis halleri* impliquée dans la tolérance au zinc

THÈSE dirigée par :

Françoise KEITA-PAQUET	Chargée de recherche, CNRS Orléans

RAPPORTEURS :

Françoise GUERLESQUIN	Directeur de recherche, CNRS Marseille
Isabelle SEGALAS-MILAZZO	Professeur, Université de Rouen

JURY :

Françoise GUERLESQUIN	Directeur de recherche, CNRS Marseille
Françoise KEITA-PAQUET	Chargée de recherche, CNRS Orléans
Anne-Christine LALMANACH	Chargée de recherche, INRA Tours
Alain LEGRAND	Professeur, Université d'Orléans
Laurence MARQUES	Maître de conférences, Université de Montpellier 2
Isabelle SEGALAS-MILAZZO	Professeur, Université de Rouen

Remerciements

Je remercie mes financeurs, le CNRS et la Région Centre pour m'avoir permis de réaliser ce travail de thèse réalisé au Centre de Biophysique Moléculaire.

Je remercie les directeurs successifs du laboratoire le docteur Jean-Claude Beloeil et le docteur Eva Jakab Toth pour m'avoir permis d'effectuer cette thèse au CBM.

Je remercie les membres de mon jury, le professeur Isabelle Segalas-Milazzo et le docteur Françoise Guerlesquin pour avoir accepté de juger ce travail ainsi que les docteurs Anne-Christine Lalmanach et Laurence Marquès pour avoir accepté d'examiner ce travail.

Je remercie le docteur Céline Landon pour m'avoir accueillie au sein de son équipe.

Je remercie tout particulièrement le docteur Françoise Keita-Paquet pour m'avoir encadrée durant cette thèse. J'ai adoré travailler avec toi Françoise ! Merci pour ton soutien et ta gentillesse sans faille.

Je remercie également les membres présents et passés de l'équipe de « RMN des biomolécules », notamment Hervé Meudal pour sa bonne humeur et ses conseils, Karine Loth pour ses corrections toujours judicieuses, et Laurence Jouvensal qui a gentiment partagé son bureau avec moi, qui m'a soutenue et beaucoup fait rire pendant ces 3 années. Merci pour tout Laurence !

Je remercie tous les collaborateurs du projet AhPDF1. Merci au docteur Agnès Delmas et son équipe pour m'avoir initiée à la synthèse chimique et à la purification HPLC, et un grand merci à Dominique Lelièvre pour m'avoir aidée et encadrée pour mes synthèses chimiques, merci pour ta bonne humeur et tes encouragements. Merci au professeur Pierre Berthomieu et son équipe qui m'ont accueillie dans son équipe à Montpellier pour la production de ma protéine dans la bactérie et la levure. Merci au docteur Laurence Marquès pour ses conseils sur la production de protéine et son énergie. Merci à Oriane Mith pour m'avoir fait découvrir le monde de la production et la ville de Montpellier. Merci au docteur Alain Van Dorsselaer et son équipe pour m'avoir accueillie à Strasbourg pour réaliser les expériences de spectrométrie de masse en conditions natives. Merci au docteur Sarah Cianferani-Sanglier pour ses conseils sur l'utilisation de la technique de spectrométrie de masse. Merci à Guillaume Terral pour la réalisation des analyses de spectrométrie de masse native. Merci à Guillaume Gabant pour l'acquisition des spectres de masse et ta persévérance avec mes échantillons dilués !

Je remercie tous les membres du CBM pour leur accueil chaleureux.

Je tiens à remercier ma famille et particulièrement ma mère qui m'a toujours soutenue et encouragée pendant ces 3 années de thèse.

Table des matières

Liste des abréviations 7

Préambule 11

Partie 1 - INTRODUCTION 13

I. Les peptides antimicrobiens 15
I. 1) Les peptides linéaires formant des hélices α 16
I. 2) Les peptides antimicrobiens linéaires riches en un acide aminé particulier 16
I. 3) Les peptides antimicrobiens en épingle à cheveux β (un ou deux ponts disulfure) 17
I. 4) Les peptides antimicrobiens riches en ponts disulfure intramoléculaires (≥3 ponts)... 18
I. 5) Les multiples fonctions des peptides antimicrobiens..... 23
II. Les peptides antimicrobiens de plantes 25
III. Les défensines de plantes..... 26
III. 1) Structure 3D des défensines de plantes 26
III. 2) Ressemblances entre les défensines de plantes et d'insectes..... 28
III. 4) Les multiples fonctions des défensines de plantes 29
IV. La défensine AhPDF1..... 34
IV. 1) Criblage des ADNc..... 35
IV. 2) Mise en évidence de la tolérance au zinc 36
V. Le zinc dans les protéines 39
V. 1) Motifs structuraux connus des protéines à zinc..... 39
V. 2) Les protéines à zinc en tant que protéines redox 41
V. 3) Exemple de la protéine Hsp33..... 42
V. 4) Exemple de la protéine Tim10..... 44

Partie 2 – MATERIEL ET METHODES 45

I. Méthodes d'analyse utilisées 47
I. 1) Analyses HPLC 47
I. 2) Spectrométrie de masse MALDI-TOF 47
I. 3) Spectrométrie de masse HR-ESI 48
II. Production de la protéine AhPDF1 48
II. 1) Production par voie bactérienne : *Escherichia coli* 48
II. 2) Voie chimique : Synthèse peptidique sur support solide 51
II. 3) Production dans la levure 55
III. Repliement oxydatif 63
IV. Test d'activité antifongique 64
V. Etude structurale par RMN 64
V. 1) Echantillon et expériences RMN utilisées 64
V. 2) Attribution des déplacements chimiques de la protéine 65
VI. Calcul de la structure tridimensionnelle de AhPDF1 65

Partie 3 – RESULTATS ET DISCUSSION 69

I. Production de la protéine AhPDF1 dans *E. coli* 72
I. 1) Protocole initial 72
I. 2) Améliorations apportées 77
II. Synthèse peptidique de la protéine AhPDF1 80
II. 1) Protocole 80
II. 2) Améliorations apportées 85
III. Repliement oxydatif 86
III. 1) Mise au point des conditions de repliement sur la protéine de *E. coli* 90
III. 2) Mise au point des conditions de repliement sur la protéine synthétique 100
III. 3) Conditions optimales de repliement 110
IV. Test d'activité antifongique 111
V. Production de la protéine AhPDF1 dans *Pichia pastoris* 112
V. 1) Production et purification de la protéine 112

V. 2) Essai de production de la protéine avec du zinc 114
V. 3) Production de la protéine marquée ^{15}N..... 116
VI. Avantages des différentes techniques de production 118
VII. Etude structurale de la protéine AhPDF1 oxydée 120
VII. 1) Détermination de la structure de la protéine AhPDF1 oxydée par RMN 120
VII. 2) Modélisation moléculaire 124
VII. 3) Comparaison des spectres obtenus avec AhPDF1 issue de la levure et AhPDF1 synthétique 130
VII. 4) Modélisation par homologie des défensines des familles AhPDF1 et AtPDF1 132
VIII. Réduction contrôlée de la protéine AhPDF1 et essais de chélation du zinc 135
VIII. 1) Modèles de chélation *in silico* 135
VIII. 2) Contrôle de la réduction 135
VIII. 3) Essais de chélation de zinc sur la protéine AhPDF1 140

Partie 4 - CONCLUSION ET PERSPECTIVES 147

Annexes 151

Bibliographie 163

Liste des abréviations

1D : une dimension
2D : deux dimensions
3D : trois dimensions

aa : acide aminé
ADR : Ambiguous Distance Restraints
ARIA : Ambiguous Restraints for Iterative Assignment

Boc : *tert*-butyloxycarbonyle
BRMB : Biological Magnetic Resonance Data Bank

CCPN : Collaborative Computing Project for NMR
COSY : COrrelation SpectroscopY
CSαβ : Cystein stabilized α-helix β-sheet
CSD : Chemical Shift Deviation

DCM : dichlorométhane
DIEA : diisopropyléthylamine
Dkp : diketopiperazine
DMF : *N,N*-diméthylformamide
DO : densité optique
DTT : dithiothréitol

E. coli : Escherichia coli
EDTA : acide éthyldiaminetétraacétique
ET : éthylène
ESI : electrospray ionisation

Fmoc : 9-Fluorenylmethyloxycarbonyle

GuCl : chlorure de Guanidinium
GSH : glutathion réduit
GSSG : glutathion oxydé

HATU : hexafluorophosphate de 2-(1H-7-azabenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetraméthylaminium
HBTU : hexafluorophosphate de 2-(1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetraméthylaminium
HCTU : 2-(6-Chloro-1H-benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tétraméthylaminium hexafluorophosphate
HOBT : 1-Hydroxybenzotriazole
HPLC : High Performance Liquid Chromatography (chromatographie en phase liquide à haute performance)

HR : haute résolution
HSQC : Heteronuclear Single Quantum Coherence

iPrOH : isopropanol
IPTG : isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside

JA : jasmonate

LB : Luria Bertani

MALDI : Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation
Me : méthyle
MPPA : méthylphénoxy propionique
MS : spectrométrie de masse
MSNT : 1-(Mesitylene-2-sulfonyl)-3-nitro-1H-1,2,4-triazole

NMP : N-méthylpirrolidinone
NOE : Nuclear Overhauser Effect
NOESY : Nuclear Overhauser effect spectroscopy

PAMs : Peptides AntiMicrobiens
Pbf : 2,2,4,6,7-pentaméthyldihydrobenzofuran-5-sulfonyle
Pdb : protein data bank
PEG : polyéthylène glycol
pGlu : pyroglutamine
PMSF : flurorure de phenylméthanesulfonyle
pO2 : pression partielle en oxygène
ppm : partie par million

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire
ROS : espèces réactives à l'oxygène

SA : acide salicylique
SDS : sodium dodécyl sulfate
SPPS : synthèse peptidique sur support solide

tBu : *tert*-butyle
TCEP : tris-carboxyéthylphosphine
TFA : acide trifluoroacétique
TFE : 2,2,2-trifluoroéthanol
TIS : triisopropylsilane
TOCSY : TOtal Correlation SpectroscopY
TOF : time-of-flight

Tris : 2-amino-2-hydroxyméthyl-1,3-propanediol
Trt : triphénylméthyle (trityle)

UV : ultra-violet

VC : volume colonne

YPDA : Yeast Peptone Dextrose Adenine

Acides Aminés

A/Ala : Alanine
C/Cys : Cystéine
D/Asp : Acide aspartique
E/Glu : Acide glutamique
F/Phe : Phénylalanine
G/Gly : Glycine
H/His: Histidine
I/Ile : Isoleucine
K/Lys : Lysine
L/Leu : Leucine
M/Met : Méthionine
N/Asn : Asparagine
P/Pro : Proline
Q/Gln : Glutamine
R/Arg : Arginine
S/Ser : Sérine
T/Thr : Thréonine
U/Sec : Sélénocystéine
V/Val : Valine
Y/Tyr : Tyrosine
W/Trp : Tryptophane

Préambule

Mon travail de thèse porte sur la protéine AhPDF1 de la plante *Arabidopsis halleri*. AhPDF1 est une défensine de 51 résidus : QRLCE KPSGT WSGVC GNNGA CRNQC IRLEK ARHGS CNYVF PAHKC ICYFP C, riche en cystéines qui participe à la défense de la plante en jouant un rôle antifongique. Les défensines de plantes sont généralement considérées comme de petites protéines secrétées sous leur forme totalement oxydée avec leurs 8 cystéines impliquées dans 4 ponts disulfure.

Les peptides antimicrobiens (PAMs), dont font partie les défensines de plantes, apparaissent de plus en plus dans la littérature comme des molécules multifonctionnelles dites HDPs pour « Host defense peptides ». Des travaux récents sur AhPDF1 ont permis d'identifier une nouvelle fonction : la tolérance aux métaux lourds, en particulier la tolérance au zinc (Mirouze et al., 2006). C'est la première fois qu'un lien entre les défensines et le zinc est réalisé. En effet, les défensines peuvent s'accumuler dans certains compartiments internes de la plante, dans un état au moins partiellement réduit, où elles pourraient coordiner le zinc sous sa forme Zn(II) (Oomen et al., 2011).

L'objectif général du projet est de comprendre le mécanisme par lequel les défensines de plantes confèrent la tolérance au zinc. Au niveau atomique, et en lien avec l'état d'oxydation des cystéines, nous nous intéressons donc à l'étude structurale fine d'AhPDF1 et à son interaction avec le zinc.

Les objectifs de ma thèse sont les suivants :

- **Produire la protéine AhPDF1 pure sous sa forme oxydée, bien repliée, et en quantité suffisante pour réaliser des études structurales par RMN**
- **Produire la protéine AhPDF1 sous sa forme réduite et contrôler l'oxydation partielle (ou la réduction partielle) de ses ponts disulfure.**
- **Réaliser les premiers essais de chélation de la protéine avec le zinc**

Dans la partie « Introduction », je présenterai la diversité structurale et fonctionnelle des peptides antimicrobiens (PAMs), en détaillant plus particulièrement les familles de PAMs riches en ponts disulfure, parmi lesquels se trouve la famille des défensines à motif CS$\alpha\beta$ à laquelle appartient la protéine AhPDF1. Puis, je détaillerai les défensines de plantes et leur homologie avec celles des d'insectes. Je me focaliserai sur les multiples fonctions actuellement identifiées des défensines de plantes et leur lien avec les différentes sources de stress. Ensuite je présenterai la protéine AhPDF1 d'*Arabidopsis halleri* et je détaillerai comment la tolérance au zinc a été mise en évidence. Enfin, je ferai un point sur les connaissances actuelles concernant les protéines à zinc.

Dans la partie « Matériel et méthodes » je décrirai les différentes techniques avec lesquelles je me suis familiarisée au cours de ma thèse.

Dans la partie « Résultats et Discussion » je présenterai les productions de la protéine AhPDF1 sous sa forme réduite par deux techniques (expression dans *E. coli* et synthèse chimique), avant d'aborder la délicate étape du repliement oxydatif. Je présenterai ensuite la production de la protéine AhPDF1 sous sa forme oxydée dans *Pichia pastoris*, puis je décrirai la structure tridimensionnelle de la protéine AhPDF1 obtenue par RMN à partir de la protéine synthétique. Enfin nous verrons quelques expériences préliminaires de suivi de chélation de la protéine avec le zinc par spectrométrie de masse.

INTRODUCTION

I. Les peptides antimicrobiens

Les défensines de plantes sont de petits peptides cationiques riches en cystéines. Elles appartiennent à la grande famille des peptides antimicrobiens (PAMs) découverte dans les années 1970. En 2009, plus de 1200 PAMs avaient été identifiés (Lai and Gallo, 2009). Les PAMs sont présents chez tous les organismes multicellulaires incluant les vertébrés, les insectes et les plantes (Aerts et al., 2008). Les peptides antimicrobiens participent à la réponse immunitaire innée des organismes en leur conférant une défense contre les pathogènes de leur environnement. Ces molécules agissent contre un très grand nombre de micro-organismes, incluant les bactéries, les champignons, les levures et les virus. Au cours des 20 dernières années, de nombreux PAMs ont été isolés à partir d'insectes et de plantes. Notons qu'il existe également des PAMs chez les organismes unicellulaires comme les bactéries (bactériocines), ces PAMs jouent un rôle dans la régulation de la dynamique des populations et des communautés microbiennes. Nous ne les détaillerons pas ici.

Les PAMs d'organismes multicellulaires présentent une diversité dans leur séquence et dans leur structure. Ils sont généralement de petite taille (12-50 acides aminés), et composés d'environ 40–50% de résidus hydrophobes qui permettent au peptide d'adopter le plus souvent une structure amphipathique. Dans leur grande majorité cationiques, les PAMs possèdent au moins deux charges positives (grâce aux résidus Arginine et Lysine) (Pinheiro da Silva and Machado, 2012). De plus, il existe des PAMs anioniques (comme la dermcidine) et des PAMs dérivés de protéines de haut poids moléculaire (par exemple la lactoferricine). La diversité des PAMs est si grande (taille, structures primaire, secondaire et/ou tertiaire, charge, hydrophobie, amphipathie et origine) qu'il est difficile de les classer de façon rationnelle. Plusieurs classifications ont été établies (Lai and Gallo, 2009) (Nguyen et al., 2011a).

Nous avons choisi ici de détailler les peptides cationiques en les classant selon leur diversité structurale (structure tertiaire et présence ou non de ponts disulfure) :

- Les peptides linéaires formant des hélices α
- Les peptides linéaires riches en un acide aminé particulier
- Les peptides en épingle à cheveux β (un ou deux ponts disulfure)
- Les peptides riches en ponts disulfure intramoléculaire (≥3 ponts)
    - Les défensines de vertébrés de type α, β et θ
    - Les protéines à nœud de cystéines
    - Les défensines d'invertébrés de type CSαβ

I. 1) Les peptides linéaires formant des hélices α

Cette catégorie rassemble des peptides de petite taille (inférieure à 40 acides aminés) qui ne contiennent pas de cystéines. En solution aqueuse, un grand nombre de ces peptides sont désordonnés mais dans un milieu mimant l'environnement d'une membrane biologique, comme un milieu contenant du trifluoroethanol (TFE) ou encore dans des micelles de sodium dodecyl sulfate (SDS), le peptide se replie en hélice α. Ces peptides se structureraient donc au contact de la membrane bactérienne, leur cible directe. La formation de l'hélice α augmente l'activité antimicrobienne du peptide contre les bactéries Gram-positives et Gram-négatives (Park et al., 2000).

Les peptides linéaires en hélices α provenant des insectes sont la cecropine A, l'andopine, la moricine, la ceratoxine et la melittine. On en trouve également chez les nématodes Ascaris avec la cécropine P1 (Andersson et al., 2003), chez les amphibiens avec la magainine, la dermaseptine (Amiche and Galanth, 2011), la bombinine (Figure 1) (Mangoni et al., 2006), la brevinine-1 (Samgina et al., 2012), l'esculentine (Conlon et al., 2013) et la buforine II (Hao et al., 2013). La pleurocidine (Syvitski et al., 2005) est trouvée dans les sécrétions de la peau du poisson de la famille des Pleuronectidae. Chez les vertébrés, on trouve les PAMs de bovins (BMAP), les PAMs de moutons (SMAP 29, l'ovospirine), les PAMs de cochons (PMAP). Chez l'Homme, il existe la cathélicidine LL37 (Thennarasu et al., 2010).

Exemple : Chez la grenouille, le peptide bombinine (code PDB : 2AP8)

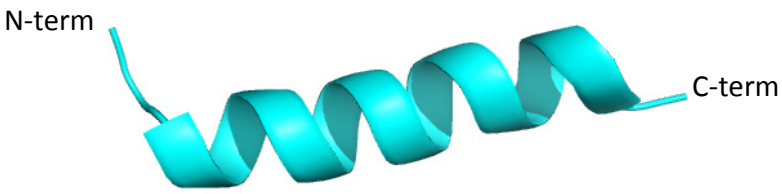


Figure 1 – Structure tridimensionnelle de la bombinine déterminée par RMN dans des micelles de SDS (représentée avec le logiciel Pymol)

I. 2) Les peptides antimicrobiens linéaires riches en un acide aminé particulier

Le groupe des peptides antimicrobiens linéaires, donc dépourvu de cystéines, et riches en un acide aminé particulier contient des peptides majoritairement cationiques et riches en proline, glycine ou tryptophane (Brogden, 2005). Ces peptides n'adoptent pas de structure secondaire canonique.

Ce groupe comprend par exemple les apidaecines (de l'abeille) (Boman, 1995) qui sont riches en proline. Les bacténécines, la drosocine (de *Drosophila*) (Boman, 1995), la

pyrrhocoricine (de l'hémiptère *Pyrrhocoris apterus*) et la PR-39 (cochons) qui sont riches en proline (33-49 %) et arginine (13–33 %) (Boman, 1995) (Abiraj et al., 2004). La prophénine du cochon est riche en proline (57 %) et phénylalanine (19%).

L'indolicine du bovin (Figure 2) (Selsted et al., 1992) et la tritrpticine du sanglier (Nguyen et al., 2011b) sont riches en résidus tryptophane (Gennaro and Zanetti, 2000). L'attacine, l'hymenoptaecine (de l'abeille) et la diptéricine sont riches en glycine. La coléoptericine et l'holotricine du coléoptère sont riches en glycine et proline. Il existe également des peptides riches en histidines comme l'histatine (Kavanagh and Dowd, 2004) chez l'homme.

Exemple : Chez le bovin, l'indolicidine (code PDB : 1G89)

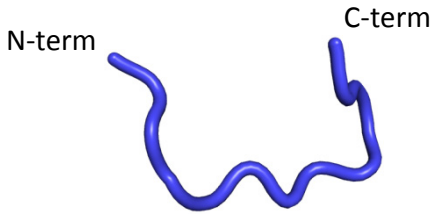


Figure 2 – Structure tridimensionnelle de l'indolicidine (représentée avec le logiciel Pymol)

I. 3) Les peptides antimicrobiens en épingle à cheveux β (un ou deux ponts disulfure)

Les peptides antimicrobiens à un ou deux ponts disulfure peuvent être anioniques ou cationiques et contiennent des cystéines qui forment des ponts disulfure (Brogden, 2005). Par exemple, la thanatine de *Podisus maculiventris* (insecte hémiptère) (Figure 3) est un peptide cationique de 20 acides aminés avec un pont disulfure (Mandard et al., 1998). La protégrine (Kokryakov et al., 1993) issue des leucocytes porcins est un petit peptide de 16 acides aminés possédant 4 cystéines liées par deux ponts disulfure intramoléculaires. La tachyplesine (Kawano et al., 1990) de *Limulidae* (arthropode marin) et la gomesine (Mandard et al., 2002) de l'araignée (18 résidus) sont également des PAMs à deux ponts disulfure.

Exemple : Chez les insectes, la thanatine (code PDB : 8TFV)

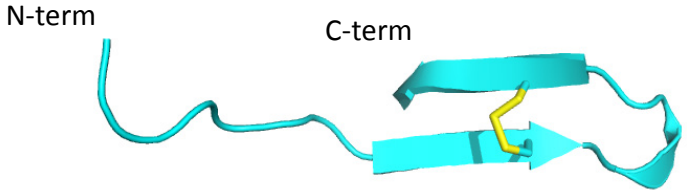


Figure 3 – Structure tridimensionnelle de la thanatine (représentée avec le logiciel Pymol)

I. 4) Les peptides antimicrobiens riches en ponts disulfure intramoléculaires (≥3 ponts)

I. 4) 1) Les défensines de vertébrés de type α, β et θ

- **α-défensines**

Les α-défensines de mammifères incluent les peptides des neutrophiles humains (HNPs) (Lehrer et al., 1993), des peptides de lapin (NP-1), de cochon (GPNP1), de macaque (Vasudevan et al., 2008) et de rat (cryptdine 4, RK1) (Jing et al., 2004).
Les α-défensines sont des peptides de 29 à 36 acides aminés, possédant 6 cystéines et sont constituées de 3 brins anti-parallèles stabilisés par 3 ponts disulfure d'après le réseau de ponts disulfure 1-6, 2-4 et 3-5 (Hill et al., 1991 ; Pardi et al., 1992) (Figure 4). Actuellement les structures de quatre défensines humaines, une défensine de macaque et deux défensines de rat sont connues.

Exemple : Chez l'homme, le peptide HD5 (code PDB : 2LXZ)

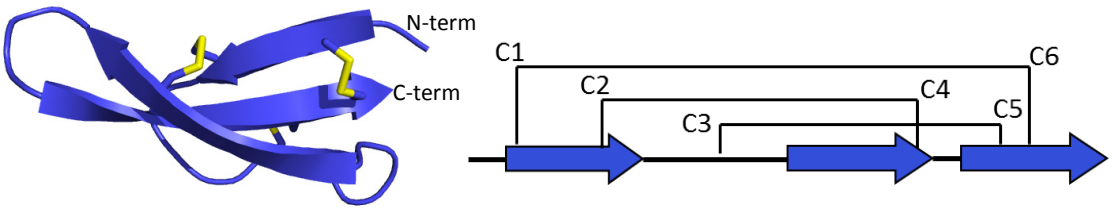


Figure 4 – Structure tridimensionnelle du peptide HD5 (représentée avec le logiciel Pymol) (gauche), représentation du repliement des α-défensines (droite)

- **β-défensines**

Les β-défensines proviennent des animaux (bovins, souris, rats, cochons, chèvres et volailles) ou de l'homme (HBDs) (Brogden, 2005). Les β-défensines sont des peptides de 36 à 42 acides aminés, possèdent 6 cystéines et sont constituées de 3 brins anti-parallèles stabilisés par 3 ponts disulfure d'après le motif 1-5, 2-4 et 3-6 (Hoover et al., 2000, 2001 ; Sawai et al., 2001) (Figure 5). Certaines β-défensines possèdent une hélice α N-terminale supplémentaire. Le feuillet à 3 brins anti-parallèles est superposable à celui des défensines de type α mais le réseau de ponts disulfure diffère. Actuellement sept structures de β-défensines sont connues, trois défensines humaines, une défensine bovine, deux défensines de souris et deux défensines aviaires.

Exemple : Chez l'homme, le peptide HBD1 (code PDB : 1IJV)

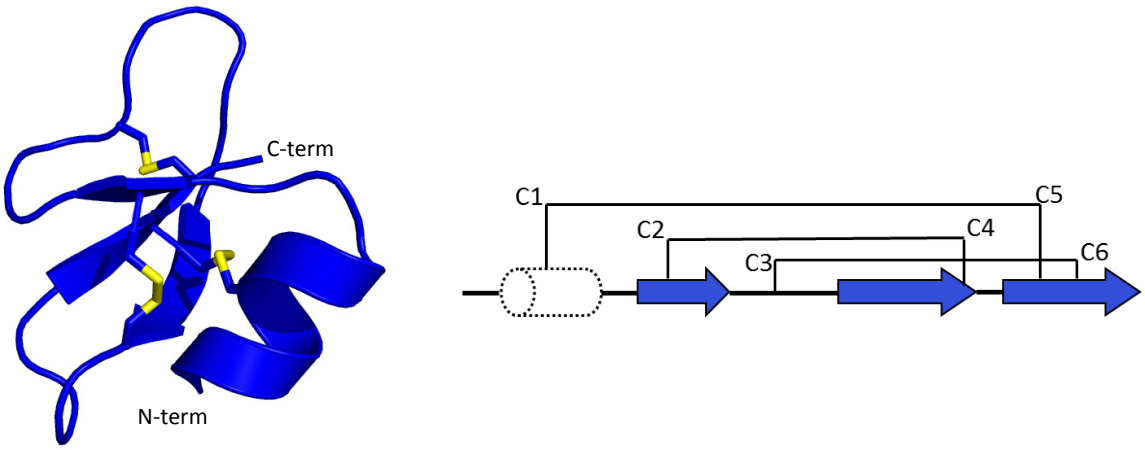


Figure 5 – Structure tridimensionnelle du peptide HBD1 (représentée avec le logiciel Pymol) (gauche), représentation du repliement des β-défensines (droite)

Remarques :

- La limule (arthropode marin) possède une « big defensin » de 79 résidus dont le domaine C-terminal est tout à fait superposable aux β-défensines de vertébrés (Kouno et al., 2008).

- Des β-défensines-like ont été répertoriées chez l'ornithorynque (Torres et al., 1999), la tortue (Lakshminarayanan et al., 2008) et même le serpent (Fadel et al., 2005). Elles possèdent le réseau de ponts disulfure des β-défensines de vertébrés mais beaucoup moins de structures secondaires.

- **θ-défensines**

La RTD-1 est la première structure de θ-défensine à avoir été déterminée. C'est une θ-défensine de singe de 18 acides aminés avec 3 ponts disulfure (Figure 6) (Trabi et al., 2001). Les θ-défensines sont constituées de 2 brins anti-parallèles liés par 3 ponts disulfure d'après le motif 1-6, 2-5 et 3-4 (Figure 6). Les structures de θ-défensines, où le squelette peptidique forme lui-même un cycle, ont été récemment étudiées (Conibear et al., 2012), ce qui a permis de définir le motif structural « cyclic cystine ladder ».

Exemple : Chez le singe, la RTD-1 (code PDB : 1HVZ)

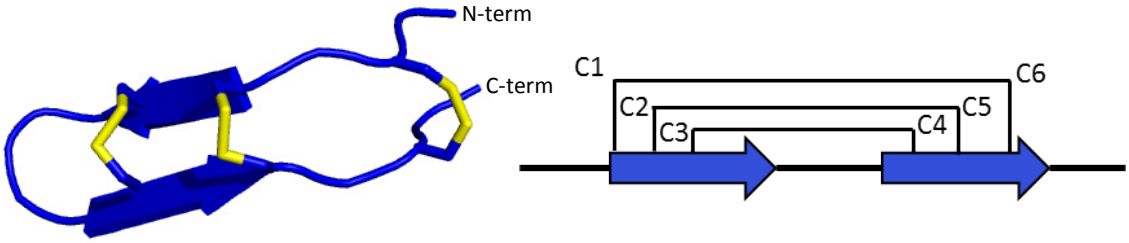


Figure 6 – Structure tridimensionnelle de la protéine RTD-1 (représentée avec le logiciel Pymol) (gauche), représentation du repliement des θ-défensines (droite)

Remarque :

- Les θ-défensines pourraient être classées dans les peptides β en épingle à cheveux à 3 ponts.

I. 4) 2) Les protéines à nœud de cystéines

Les protéines à nœud de cystéines, dites « cystine knot », sont de petites protéines contenant 6 cystéines et formant 3 ponts disulfure d'après le motif 1-4, 2-5 et 3-6 (Figure 7). Le motif « cystine knot » est par exemple retrouvé dans la kalata-B1 (Rosengren et al., 2003) de la plante *Oldenlandia affinis*, , et l'ALO3 d'insectes (Figure 7) (Barbault et al., 2003).

Les cyclotides sont une famille de mini protéines qui contiennent un squelette cyclisé en tête-à-queue et un arrangement noué de 3 ponts disulfure selon le motif « cyclic cystine knot ». Ils sont composés d'environ 30 acides aminés et sont présents en grande abondance dans les familles de plante *Violaceae*, *Rubiaceae* et les Cucurbitacées (Craik et al., 2006).

Exemple : Chez les insectes, l'ALO3 (code PDB :1Q3J)

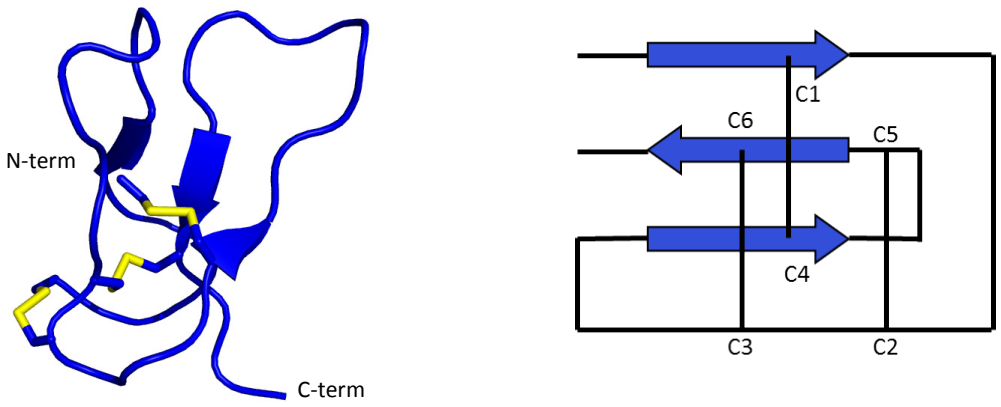


Figure 7 – Structure tridimensionnelle de l'ALO3 (représentée avec le logiciel Pymol) (gauche), représentation du repliement des cystines knot (droite)

Remarque :

La structure de la tachystatine de la limule (Figure 8) (Fujitani et al., 2002) qui comporte le réseau de ponts des « cystines knot », adopte une organisation atypique, sans nœud. Elle ne peut donc pas être classée.

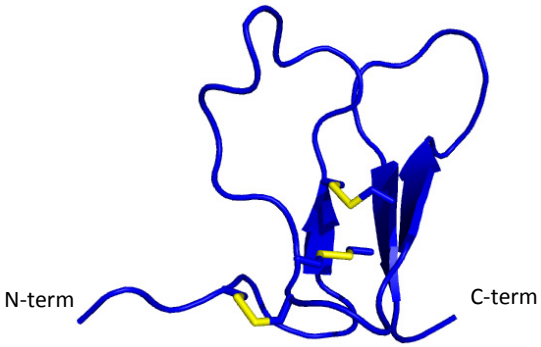


Figure 8 – Structure tridimensionnelle de la tachystatine (représentée avec le logiciel Pymol)

I. 4) 3) Les défensines d'invertébrés

Les défensines trouvées chez les invertébrés (plantes, champignons, mollusques, insectes) contiennent 6 à 8 cystéines, formant 3 ou 4 ponts disulfure, et sont constituées d'une hélice α et d'un feuillet à 2 ou 3 brins β anti-parallèles. Ces défensines comportent le motif dit « CSαβ » pour « Cystein stabilized α-helix β-sheet ». Le terme de CSαβ a été donné pour la première fois pour la structure tridimensionnelle de la défensine A d'insecte pour définir cette hélice stabilisée par 2 ponts disulfure sur un feuillet β à 2 brins (Cornet et al., 1995). Un 3ème pont au moins stabilise ces protéines. Les défensines CSαβ ont été trouvées chez les plantes et les insectes et leur structure tridimensionnelle est proche de la structure tridimensionnelle des toxines de scorpion (Figure 9).

Exemple : Chez la drosophile, la drosomycine (code PDB : 1MYN)

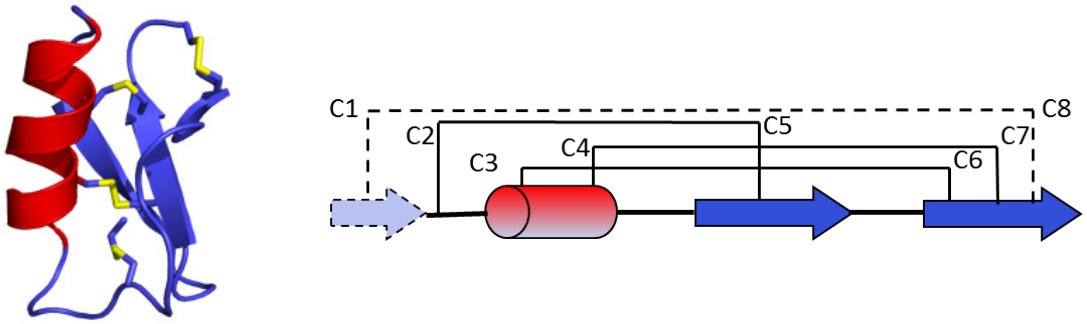


Figure 9 – Structure tridimensionnelle de la drosomycine composée d'une hélice alpha et d'un feuillet à 3 brins (représentée avec le logiciel Pymol) (gauche), représentation schématique des ponts disulfure des défensines CSαβ et des éléments de structure secondaire minimum définis dans le motif CSαβ (une hélice reliée par deux ponts disulfure à un feuillet à deux brins) (Cornet et al., 1995) (droite)

Remarque :

Les γ-thionines de plantes sont de petits peptides basiques de 45 à 47 résidus, possédant 8 cystéines qui forment 4 ponts disulfure. Elles ont une activité antibactérienne. Les γ-thionines ont un repliement identique aux défensines CSαβ avec le même réseau de ponts (Pelegrini and Franco, 2005). De par leur similarité structurale elles ont ensuite été renommées plant defensin (Broekaert et al., 1995a).

Dans la Protein Data Bank (PDB), on compte actuellement un nombre important de protéines comportant le motif CSαβ : 11 défensines de plantes auxquelles sont rattachées 2 γ-thionines, 6 défensines d'insectes, 4 défensines de champignons, une défensine de mollusque, 2 γ-thionines et 30 toxines de scorpions. Qu'elles soient antimicrobiennes ou non, nous les avons répertoriées dans le Tableau 1.

Protéines de structure CSαβ de la Protein Data Bank		
Code PDB	Nom	Auteurs
Défensines de plantes (13)		
- 2LR3	- MtDef4	- (Sagaram et al., 2013)
- 2KSK	- Sd5	- (de Paula et al., 2011)
- 2LJ7	- Lc-def	- (Shenkarev et al., 2011) Non publié
- 3PSM	- SPE10	- (Zhou et al., 2010) Non publié
- 2GL1	- VrD2	- (Lin et al., 2007)
- 1TI5	- VrD1	- (Liu et al., 2006)
- 1MR4	- NaD1	- (Lay et al., 2003a)
- 1N4N	- PhD1	- (Janssen et al., 2003)
- 1JKZ	- PsD1	- (Almeida et al., 2002)
- 1BK8	- AhAMP1	- (Fant et al., 1999)
- 1AYJ	- RsAFP1	- (Fant et al., 1998)
- 1GPS	- γ 1-hordothionin	- (Bruix et al., 1993a)
- 1GPT	- γ 1-purothionin	- (Bruix et al., 1993b)
Défensines d'insectes (6)		
- 1OZZ	- ARD1	- (Landon et al., 2004)
- 1MM0	- Termicine	- (Da Silva et al., 2003)
- 1I2U	- Heliomicine	- (Lamberty et al., 2001)
- 1MYN	- Drosomycine	- (Landon et al., 1997)
- 1ICA	- DefA	- (Cornet et al., 1995)
- 1L4V	- Sapecine	- (Hanzawa et al., 1990)
Défensines de champignons (4)		
- 2LT8	- Eurocine	- (Oeemig et al., 2012)
- 3E7U (RX)	- Plectasine	- (Mandal et al., 2009)
- 1ZFU	- Plectasine	- (Mygind et al., 2005)
- 2LR5	- Micasine	- (Zhu et al., 2012)
Défensines de mollusques (1)		
- 1FJN	- MGD1	- (Yang et al., 2000)

Toxines de scorpions (30)		
- 2LKB	- MeuNaTxα-5	- (Zhu et al., 2011)
- 2Z3S	- AgTx2-MTX	- (Pimentel et al., 2008)
- 2A7T	- Neurotoxine	- (Sharma et al., 2006)
- 1T0Z	- BMK IT-AP	- (Li et al., 2005)
- 1WZ5	- Pi1-3p	- (Carrega et al., 2005)
- 1Y2P	- Hstx3P	- (Carrega et al., 2005)
- 1PE4	- Cn12	- (del Río-Portilla et al., 2004)
- 1S8K	- BMKK4	- (Zhang et al., 2004)
- 1SEG	- Lqh alpha IT	- (Karbat et al., 2004)
- 1NPI	- Ts1	- (Pinheiro et al., 2003)
- 1JZA	- CSE-V2	- (Cook et al., 2002)
- 1I6F	- CSE-V5	- (Jablonsky et al., 2001)
- 1HP2	- TSTX-K alpha	- (Ellis et al., 2001)
- 1C49	- Pandinotoxines	- (Klenk et al., 2000)
- 1B7D	- TS1	- (Polikarpov et al., 1999)
- 1BMR	- LQH III	- (Krimm et al., 1999)
- 1CHZ	- BMK M2	- (He et al., 2000)
- 1CN2	- Cn2	- (Pintar et al., 1999)
- 1QKY	- Pi7	- (Delepierre et al., 1999)
- 1QUZ	- HSTX1	- (Savarin et al., 1999)
- 1SN1	- BMK M1	- (He et al., 1999)
- 1SN4	- BMK M4	- (He et al., 1999)
- 1B3C	- Beta-neurotoxine	- (Jablonsky et al., 1999)
- 1BIG	- BMTX1	- (Blanc et al., 1998)
- 2BMT	- BMTX2	- (Blanc et al., 1998)
- 2PTA	- PITX-KA	- (Tenenholz et al., 1997)
- 1ACW	- P01	- (Blanc et al., 1996)
- 1LQQ	- Toxine III	- (Landon et al., 1996)
- 1PTX	- Toxine II	- (Housset et al., 1994)
- 2CRD	- Charybdotoxine	- (Bontems et al., 1992)

Tableau 1 – Tableau regroupant toutes les protéines comportant le motif CSαβ répertoriées dans la Protein Data Bank (PDB)

I. 5) Les multiples fonctions des peptides antimicrobiens

Même si les « peptides antimicrobiens » ou PAMs ont été historiquement nommés ainsi, il a ensuite été proposé de les nommer plutôt peptides de défense de l'hôte (HDP) afin de mieux rendre compte de la diversité de leurs fonctions biologiques (Scott and Hancock, 2000 ; Yeung et al., 2011 ; Arnett and Seveau, 2011 ; Yount and Yeaman, 2013). De nombreux travaux montrent que l'activité antimicrobienne des PAMs n'est pas leur seule activité, voire pour certains l'activité antimicrobienne ne serait probablement pas leur fonction principale *in vivo.*

Ces dernières années, un nombre croissant d'articles montre que ces peptides dits « peptides antimicrobiens » sont en fait des peptides multi-fonctionnels dont l'activité biologique principale *in vivo* serait l'élimination des micro-organismes pathogènes comme les bactéries, les champignons, les parasites et les virus (Scott and Hancock, 2000 ; Dhople et al., 2006 ; Easton et al., 2009 ; Afacan et al., 2012 ; Alba et al., 2012 ; Hancock et al., 2012 ; Haney and Hancock, 2013 ; Mok and Li, 2013). Les gènes codant ces peptides sont exprimés dans de nombreuses cellules de l'hôte, notamment les cellules circulantes phagocytaires et les cellules épithéliales de la muqueuse, ce qui atteste de l'implication des PAMs dans le système immunitaire inné. De plus, l'expression de ces gènes peut être, soit induite par des agents pathogènes et des cytokines dans le cadre de la réaction de défense de l'hôte, soit réprimée par des facteurs de virulence bactérienne et des facteurs environnementaux pouvant conduire à une augmentation de la susceptibilité à l'infection. Par ailleurs, de nouvelles recherches ont également jeté la lumière sur les fonctions supplémentaires exercées par les PAMs, comme les activités immuno-modulatrices.

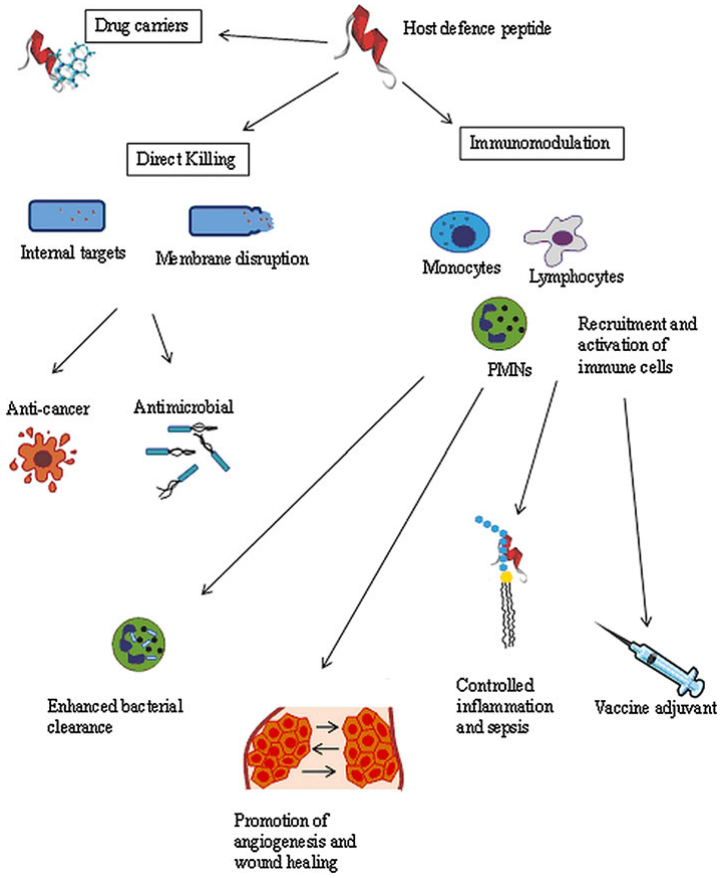


Figure 10 – Utilisation potentielle des HDPs (extraite de Yeung et al., 2011)

Compte tenu des leurs multiples facettes, de nombreuses utilisations potentielles des PAMs sont décrites (Figure 10 et pour revue Yeung et al., 2011) par exemple comme agents anticancéreux, immunomodulateurs, chimiokines, adjuvants vaccinaux, régulateurs de la défense innée, agents cicatrisants, ou encore molécules vecteurs.

De leur utilisation comme simples antibiotiques exogènes, leur rôle s'est désormais élargi à celui de peptides de défense de l'hôte et de médiateurs multifonctionnels. En outre, alors que leur développement thérapeutique en tant qu'agents antimicrobiens exogènes reste en attente d'une accréditation par les agences de médicaments, la découverte de ces nouvelles activités peut permettre la mise en place d'une plateforme technologique innovante et rationnelle pour une utilisation pharmacologique et thérapeutique ciblée.

Il est ainsi devenu évident que ces PAMs présentent un large éventail d'activités biologiques nouvelles, les défensines de plantes n'y faisant pas exception.

II. Les peptides antimicrobiens de plantes

La base de données PhytAMP (http://phytamp.pfba-lab-tun.org) répertorie actuellement presque 300 peptides de plantes considérés comme antimicrobiens. En fait, l'activité antimicrobienne n'a été testée que pour 40 % d'entre eux (51 % sont antifongiques, 33 % antibactériens, 10 % antiviraux). 70 % de ces PAMs de plantes ont été séquencés directement, les autres séquences étant prédites à partir des séquençages génomiques. Une grande majorité de ces PAMs de plantes sont des peptides riches en cystéines tels que décrits précédemment.

Dans cette banque, la structure 3D est répertoriée pour une quarantaine d'entre eux (mais en réalité un plus grand nombre de structures est disponible dans la PDB), et permet de définir 7 familles structurales pour les PAMs de plantes (Figure 11) : Les défensines qui nous intéressent ici, les snakins (Segura et al., 1999) (aucune structure 3D déterminée actuellement), les thionines (Johnson et al., 2005), les protéines de transfert de lipides (Da Silva et al., 2005), les cyclotides (Daly et al., 1999a), les hevein-like (Andersen et al., 1993), et les knottins (Gao et al., 2001).

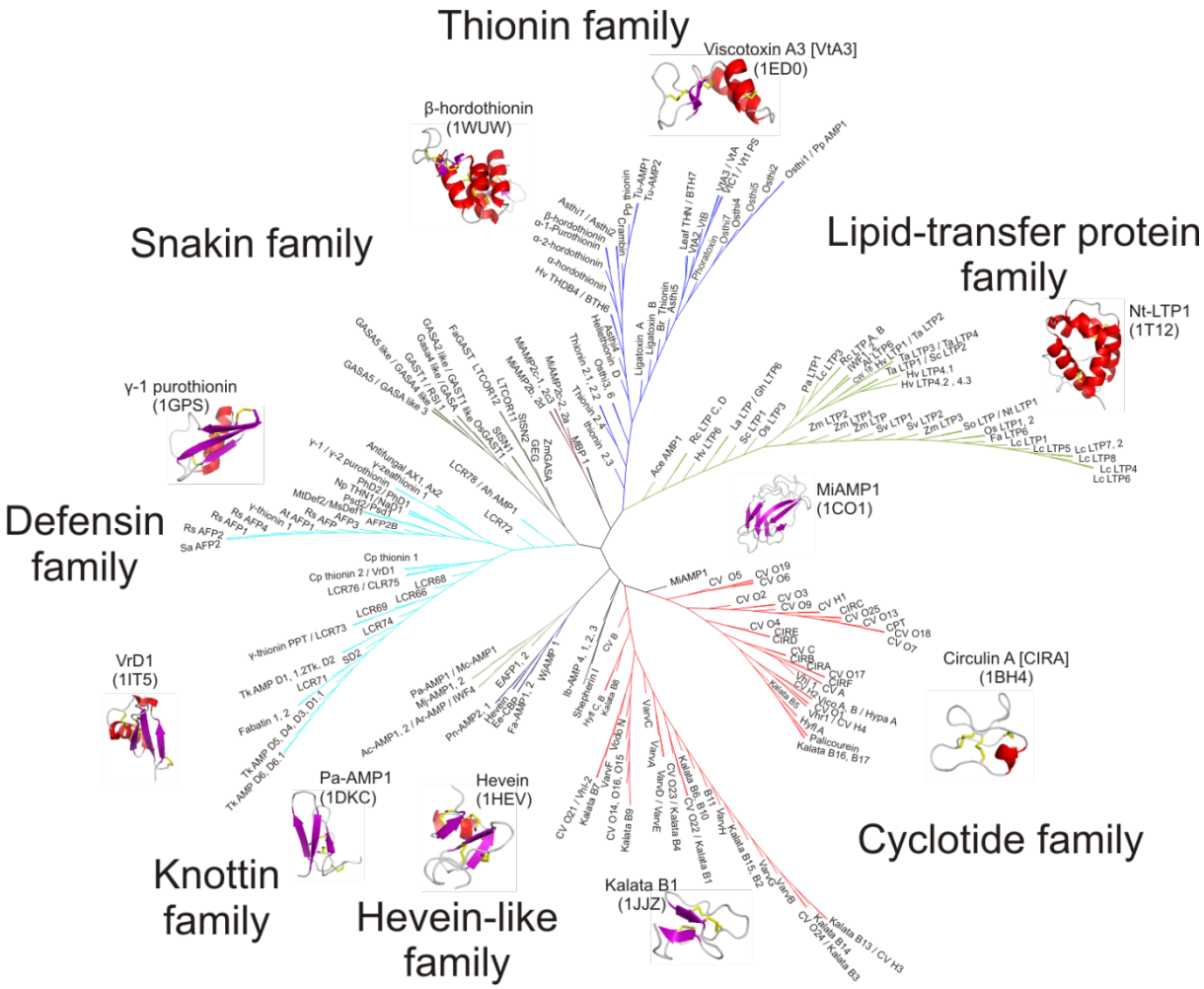


Figure 11 – Arbre phylogénétique des PAMs de plantes compilés dans la base de données PhytAMP (figure extraite de http://phytamp.pfba-lab-tun.org). Un alignement de 271 PAMs de plantes a permis de classer les PAMs dans 7 familles structurales. Chaque famille est associée à une couleur et représentée par au moins une structure 3D extraite de la PDB.

III. Les défensines de plantes

III. 1) Structure 3D des défensines de plantes

Les défensines de plantes sont de petites protéines de 45 à 54 résidus d'acides aminés, avec un faible poids moléculaire d'environ 6 kDa. En général, les défensines de plantes sont monomériques, à l'exception de la défensine SPE10 isolée à partir de graines de *Pachyrrhizus erosus*, qui forme des dimères (Song et al., 2005).

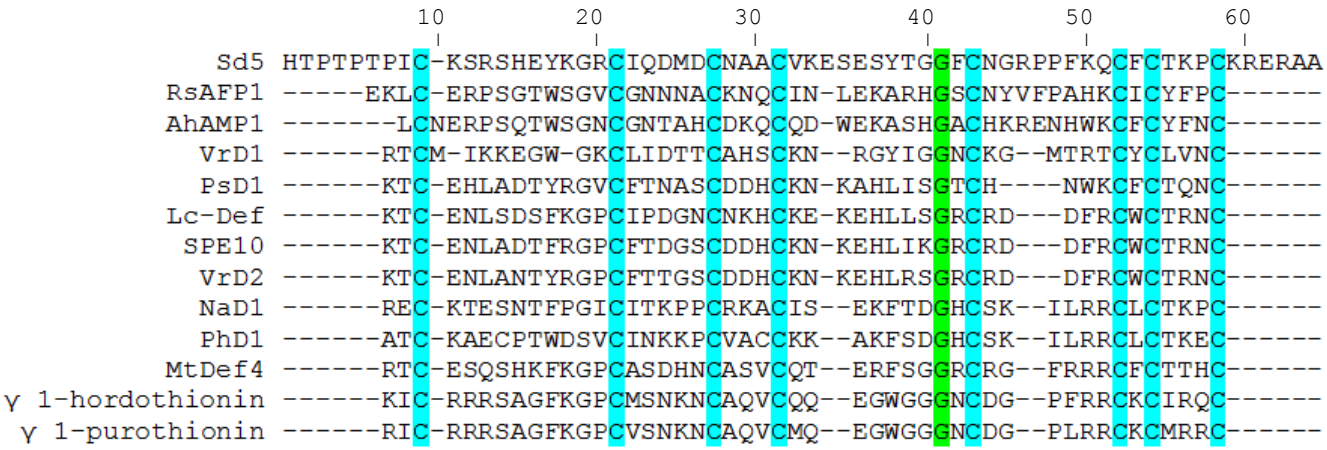


Figure 12 – Alignement de séquences des 13 défensines de plantes pour lesquelles une structure 3D a été résolue. La conservation des acides aminés est représentée en bleu pour les cystéines et en vert pour la glycine. L'alignement de séquences a été réalisé avec le logiciel ClustalW

La séquence des défensines de plantes varient considérablement à l'exception des huit résidus cystéines et d'une glycine, strictement conservés (Figure 12). Les cystéines sont impliquées dans les quatre ponts disulfure intramoléculaires qui stabilisent la structure tridimensionnelle de la protéine. La glycine en position 41 (numérotation de la Figure 12) appartient au motif GXC(X3-9)C qui est conservé dans toutes les séquences de défensines de plantes et plus généralement de tous les peptides antimicrobiens à ponts disulfure (Sagaram et al., 2011). On remarque également la conservation d'un résidu aromatique en position 17 et de résidus hydrophobes en position 53 àl'exception des 2 γ-thionines (numérotation de la Figure 12). Les acides aminés T10, S12, L28, Y38, F40, A42, K44, I46 et F49 de RsAFP1 sont essentiels pour son activité antifongique (Samblanx et al., 1997). Néanmoins, à l'exception de T10 qui est retrouvé dans plusieurs séquences de défensines de plantes, ces résidus ne sont pas conservés. AhAMP1 est une défensine *d'Aesculus hippocastanum* et pas d'*Arabidopsis halleri*.

Actuellement, les structures tridimensionnelles de 13 défensines de plantes ont été résolues par RMN ou cristallographie (Tableau 1). Elles présentent toutes un repliement commun composé d'un feuillet β anti-parallèle à 3 brins, relié à l'hélice α, appelé motif CSαβ. Un quatrième pont disulfure entre les extrémités N- et C-terminales est présent.

Malgré ce repliement commun, les défensines de plantes diffèrent dans leurs activités. Les défensines de plantes sont toutes antifongiques, mais certaines ont en plus d'autres fonctions comme VrD2 qui est inhibitrice de l'α-amylase (insecticide) (Lin et al., 2007) et AhPDF1 qui confère une tolérance au zinc (Mirouze et al., 2006), d'où l'objet de cette thèse.

III. 2) Ressemblances entre les défensines de plantes et d'insectes

En réalisant un alignement de séquences entre des défensines d'insectes et les défensines de plantes présentées dans le tableau 1, on remarque que les 6 cystéines qui forment les 3 ponts disulfure communs aux plantes et aux insectes sont très bien conservées (Figure 13). Les défensines de plantes et la drosomycine possèdent 2 cystéines additionnelles qui forment le quatrième pont disulfure.

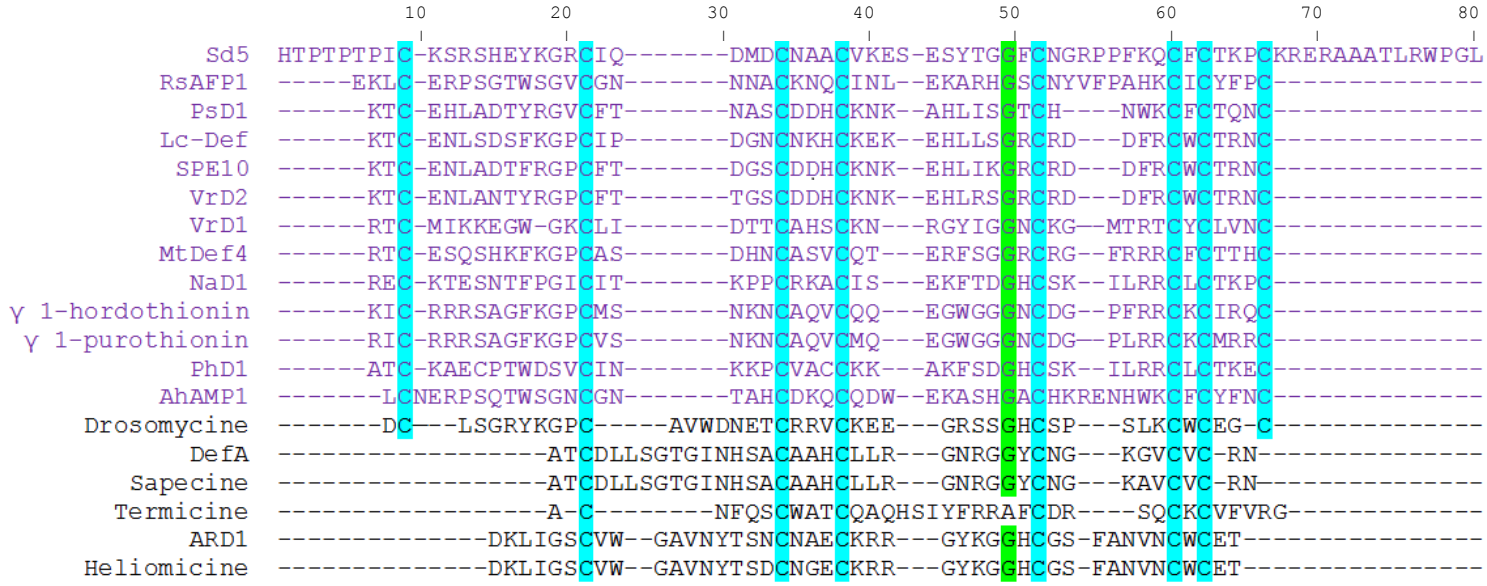
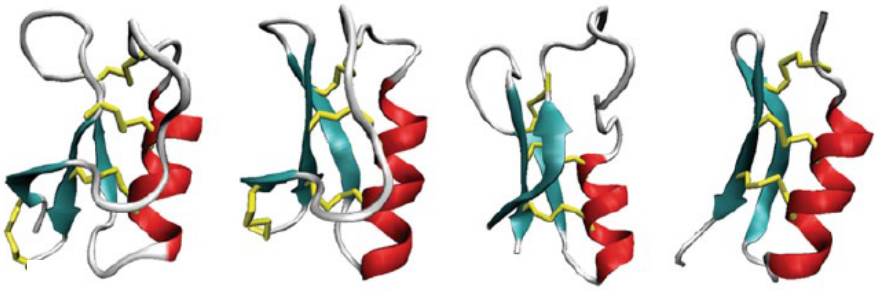


Figure 13 – Alignement de séquences des 13 défensines de plantes (violet) et des 6 défensines d'insectes (noir) pour lesquelles une structure 3D été résolue. La conservation des acides aminés est représentée en bleu pour les cystéines et en vert pour la glycine.

Les structures tridimensionnelles de 3 défensines d'insectes et d'une défensine de plantes sont représentées ci-dessous, respectivement la drosomycine (code pdb : 1MYN), l'héliomicine (code pdb : 1I2U) et la termicine (code pdb : 1MN0) pour les insectes et NaD1 (code pdb : 1MR4) pour les plantes (Figure 14).



NaD1 1MR4 | Drosomycine 1MYN | Héliomicine 1I2U | Termicine 1MNO

Figure 14 – Représentations des structures tridimensionnelles de la défensine de plante NaD1 et des défensines d'insectes drosomycine, héliomicine et termicine (extraite de van der Weerden et al., 2013)

Les défensines de plantes partagent avec les défensines d'insectes une homologie de structure tridimensionnelle. Il existe certainement un lien évolutif entre les défensines de plantes et les défensines d'insectes.

III. 4) Les multiples fonctions des défensines de plantes

Depuis la fin des années 1990, il est reconnu que la famille des défensines de plantes est diversifiée de par leur séquence mais également de par leur activité biologique (Osborn et al., 1995 ; Broekaert et al., 1995b ; Segura et al., 1998). Les défensines de plantes possèdent de multiples activités et cette grande diversité de fonctions font d'elles des molécules thérapeutiques prometteuses (van der Weerden et al., 2013). Grâce à elles la plante réagit à différents stress qui peuvent être de deux natures : les stress biotiques et les stress abiotiques.

III. 4) 1) Stress biotiques

Les stress biotiques sont causés par des pathogènes de l'environnement de la plante comme les bactéries, les champignons ou les insectes. Lors de stress biotiques, un dialogue moléculaire complexe s'installe dans la plante, faisant intervenir une multitude de signaux (ROS, acide salicylique, acide jasmonique, éthylène, monoxyde d'azote….) dans une cascade de signalisation qui aboutit à la réponse hypersensible (HR) (Pieterse et al., 2009). La HR est considérée comme le mécanisme de défense ultime contre les pathogènes, car non seulement elle mène à la mort du tissu infecté, mais déclenche également de façon coordonnée l'activation de nombreuses voies métaboliques et de signalisation.

En complément de la voie de signalisation du SA (acide salicylique), l'implication d'une voie de signalisation lipidique a été proposée, qui fait intervenir le jasmonate (JA) et l'éthylène (ET) (Figure 15). Ces deux phytohormones sont étroitement liées à l'activation de mécanismes de défenses chez les végétaux. Elles fonctionneraient en synergie, en induisant des gènes de défensine PDF1.

La voie SA est activée en réponse à une attaque de pathogènes biotrophes, les voies JA et ET lors d'une attaque de nécrotrophes et la voie JA lors d'une attaque de la plante par des insectes.

Les plantes produisent plusieurs défensines de la même famille ou de familles différentes et chaque défensine possède son spectre d'action. Le fait d'avoir différentes défensines permet de superposer les spectres afin d'obtenir une plus grande protection contre les pathogènes. En effet, les défensines ont une activité antimicrobienne : antifongique contre une grande variété de champignons, antibactérienne contre les bactéries Gram positives et négatives et une activité insecticide (Thomma et al., 2002 ; Carvalho and Gomes, 2009). L'activité antifongique des défensines de plantes est la plus documentée.

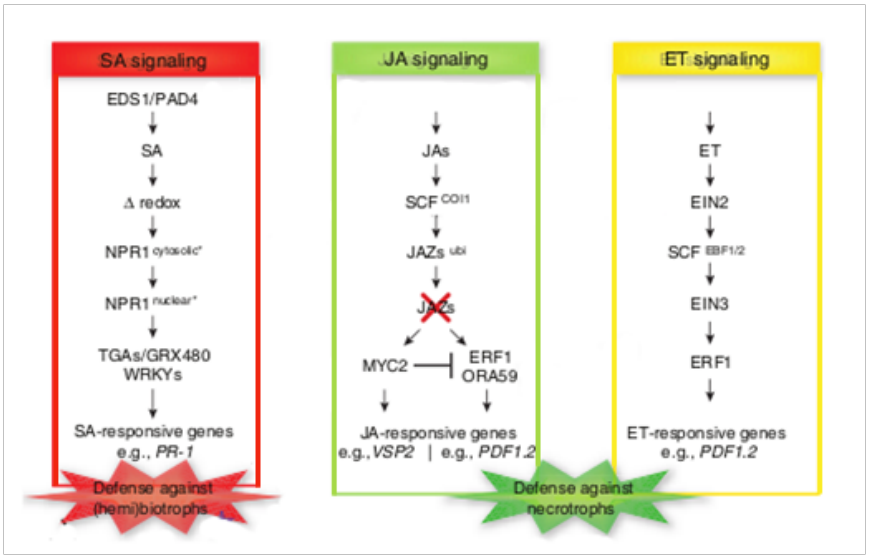


Figure 15 – Voies de signalisation SA, JA et ET impliquées dans les stress biotiques chez *Arabidopsis thaliana*. ABA : acide abscissique ; Against (hemi)biotrophs/necrotrophs : contre les (hémi) biotrophes (se dit d'un organisme qui s'alimente aux dépens d'un autre être vivant mais sans être létal) / nécrotrophes (désigne un organisme qui consomme son hôte une fois mort) ; COI1 : coronatine insensitive 1 ; EDS: enhanced disease susceptibility ; e.g. : par exemple ; EIN : ethylene insensitive ; ET : éthylène ; GRX : glutarédoxine ; JA : acide jasmonique ; JAZ : jasmonate ZIM-domain ; NPR1 : non expressor of PR genes ; PAD4 : phytoalexin deficient 4 ; PDF1.2 : plant defensin 1.2 ; PR : pathogenesis-related ; responsive genes : gènes répondant à/au ; SA : acide salicylique ; Signaling : signalisation (extraite de Pieterse et al., 2009)

- Activité antifongique

La première étape de l'interaction entre les défensines et le champignon se fait par leur fixation sur certains sphingolipides spécifiques de la membrane plasmique du champignon (Thevissen et al., 2000, 2004) suivie par une perméabilisation de cette membrane conduisant à de rapides flux ioniques comme des fuites de K^+ et des afflux de Ca^{2+} dans l'hyphe du champignon (Thevissen et al., 1999). L'hyphe est un filament composé d'une ou plusieurs cellules plus ou moins ramifié, qui peut mesurer plusieurs centimètres. La membrane plasmique du champignon est constituée de phospholipides, de sphingolipides (sphingomyélines, glycosylcéramides), de cholestérol, et d'acides gras (Figure 16).

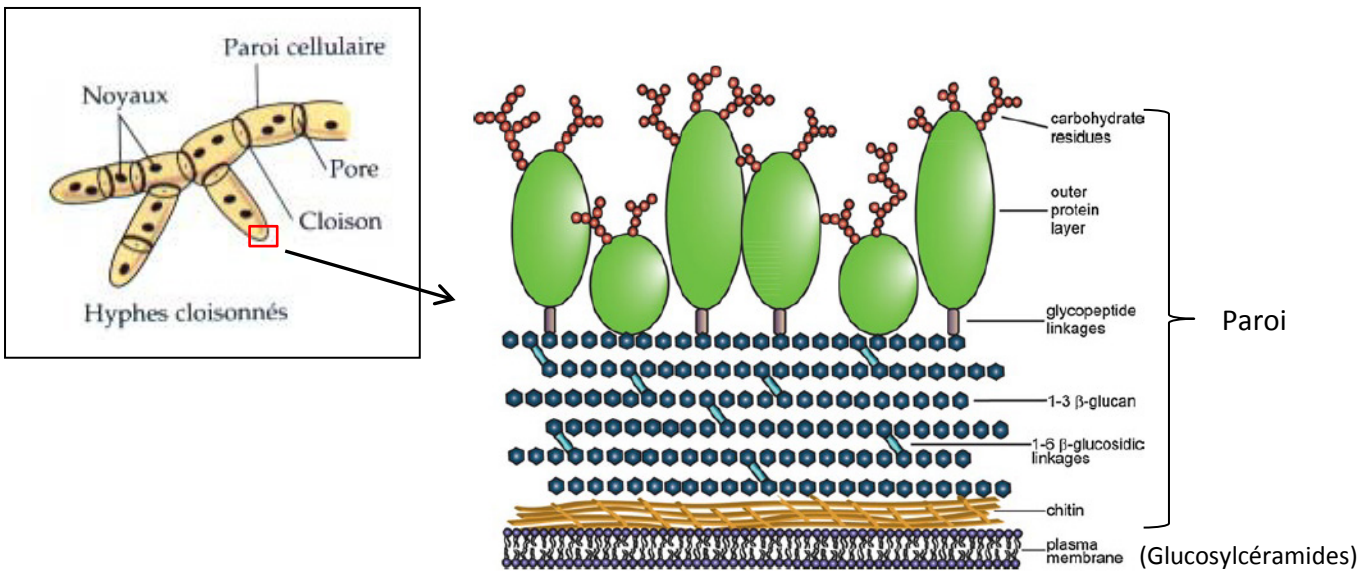


Figure 16 – Schéma de la paroi et de la membrane du champignon (d'après van der Weerden et al., 2013)

La défensine Dm-AMP1 trouvée dans les graines du *Dahlia merckii*, induit des fuites de K^+ et des afflux de Ca^{2+} dans l'hyphe du champignon *Neurospora crassa* en se fixant sur le mannosyl diinositolphosphorylcéramide de la membrane plasmique (Thevissen et al., 2007). Les défensines HsAFP1, RsAFP2, respectivement de *Heuchera sanguinea* (Aerts et al., 2011) et *Raphanus sativus*, quant à elles sont capables d'inhiber la croissance des champignons *Candida albicans* et *Candida krusei* mais pas celle de *Candida glabrata*. RsAFP2 interagit avec les glucosylcéramides de la membrane des champignons (Figure 17). *Candida glabrata* ne synthétise pas les glucosylcéramides, ce qui explique sa résistance contre la défensine RsAFP2 (Thevissen et al., 2007). Le mécanisme est le même pour NaD1, une défensine de la plante *Nicotiana alata*, elle forme des pores dans la membrane plasmique du champignon *Fusarium oxysporum* puis pénètre dans le cytoplasme de la cellule et engendre la formation de ROS. Cela engendre la mort de la cellule (Weerden et al., 2008, 2010).

Le blocage de la synthèse des glucosylcéramides chez le champignon le rend résistant à l'action antifongique des défensines. Ces exemples prouvent que le mannosyl diinositolphosphorylceramide et le glucosylcéramide présents dans les membranes fongiques, forment des sites de fixation spécifiques pour les défensines de plantes DmAMP1 et RsAFP1 provenant respectivement de *Dahlia merckii* et de *Raphanus sativus*.

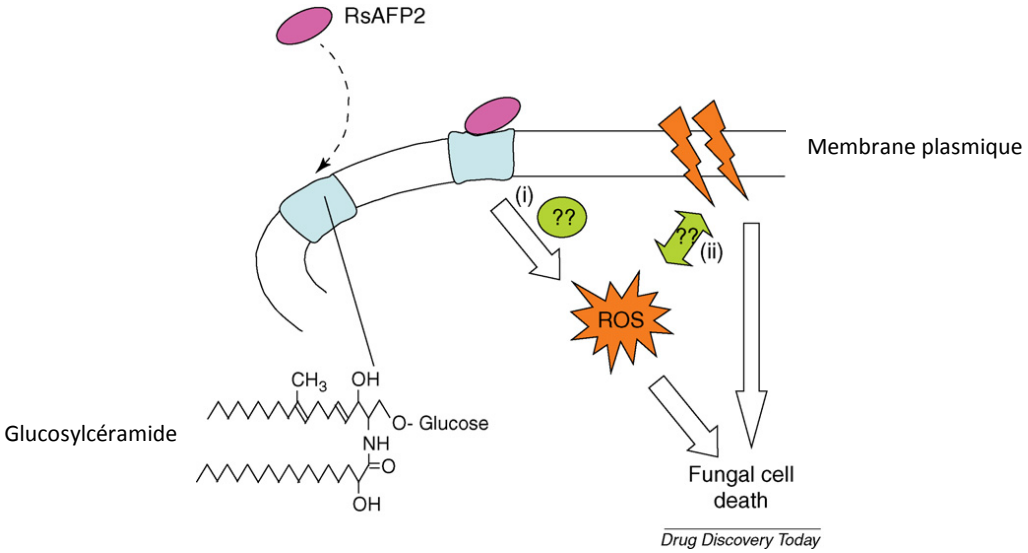


Figure 17 – Modèle d'action de la défensine de plante antifongique RsAFP2 du radis. RsAFP2 (rose) interagit avec les glucosylcéramides (bleu) dans la membrane plasmique du champignon perméabilisant la membrane. De plus, RsAFP2 après son interaction initiale avec les glucosylcéramides, induit la formation d'espèces oxydantes réactives (ROS) comme O_2^{-}, H_2O_2 et $HO^{\cdot}$, conduisant à la mort de la cellule fongique. Actuellement, le lien entre la perméabilisation de la membrane et le phénomène ROS est encore inconnu (Thevissen et al., 2007)

D'autres études ont montré que les défensines de plantes peuvent pénétrer les cellules du champignon et interagir avec des cibles intracellulaires. Par exemple, PsD1 est une défensine du petit pois qui est internalisée par les cellules du champignon *Neurospora crassa* où elle va pouvoir atteindre le noyau et stopper le cycle cellulaire (Figure 18).

Des études sur la conformation et la dynamique de PsD1 avec des membranes modèles ont été réalisées par RMN (de Medeiros et al., 2010). Des NOEs sont observés entre le peptide et la partie céramide des glycosphingolipides. La défensine PsD1 interagit donc bien avec les glycosphingolipides. Après pénétration dans la cellule du champignon, PsD1 perturbe la division cellulaire en bloquant la complexation de la cycline F avec la cycline B1 lors des phases S à G2 de la réplication cellulaire (Lobo et al., 2007).

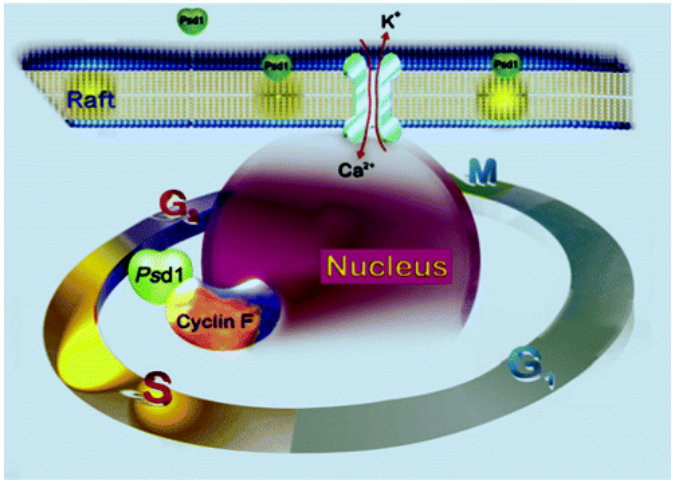


Figure 18 – Représentation de l'action de PsD1 au cours du cycle cellulaire (Lobo et al., 2007)

- Activité insecticide

Certaines défensines de plantes telle la défensine VrD1 du soja vert *Vigna radiate*, sont des insecticides du fait de leur action inhibitrice d'enzymes (Lin et al., 2007). L'α-amylase est une enzyme de l'intestin de l'insecte. Elle joue un rôle essentiel dans l'hydrolyse de l'amidon et son inhibition empêche la digestion de la plante par l'insecte. La défensine permet donc de protéger la plante contre les insectes (Osborn et al., 1995). L'évolution pourrait avoir conduit certaines défensines à développer une activité inhibitrice de l'α amylase pour se défendre contre les insectes phytophages, et d'autres défensines à développer une activité antimicrobienne pour se défendre contre les micro-organismes pathogènes.

III. 4) 2) Stress abiotiques

Les stress abiotiques viennent de l'environnement (température, pH, salinité, métaux lourds…). Ils affectent grandement la croissance de la plante et la production de graines. Pour pouvoir survivre face à ces stress, la plante répond et s'adapte à l'aide de mécanismes complexes : morphologiques, physiologiques et biochimiques.

- La salinité du milieu

Une salinité élevée est la principale cause des stress osmotiques (Taji et al., 2004). *Thellungiella halophila* est une plante halophyte adaptée aux milieux salés. En comparant *Thellungiella halophila* avec *Arabidopsis thaliana*, on remarque que leurs ADNc ont une identité de séquence élevée (90 %–95 %). L'expression de différents gènes est induite par un stress abiotique chez *Arabidopsis thaliana* alors qu'ils sont déjà surexprimés en conditions non stressantes chez *Thellungiella halophila*. Ceci suggère que

l'expression de ces gènes est constitutive chez *Thellungiella halophila* alors qu'elle est induite par un stress chez *Arabidopsis thaliana* (Taji et al., 2004).

- Le climat

Les plantes subissent également des stress d'ordre climatique. Les plantes hivernales sont capables de résister à des basses températures. La tolérance au froid de ces plantes augmente après une longue période d'exposition à des températures basses mais pas glaciales. Les basses températures induisent l'expression de défensines qui vont lutter contre des pathogènes qui sont eux aussi résistants au froid (Koike et al., 2002).

- La présence de métaux lourds

Le sol fournit les ressources essentielles au développement de la plante. Il est également le support de nombreuses activités industrielles, agricoles et urbaines. La révolution industrielle a entrainé une forte augmentation de la présence de métaux tels que le cadmium (Cd), le cuivre (Cu), le zinc (Zn) et le plomb (Pb). Certains sont des oligo-éléments essentiels au bon développement de la plante comme le zinc et le cuivre, mais deviennent toxiques à fortes concentrations. D'autres comme le plomb ou le cadmium sont toxiques dès l'état de trace. La trop grande présence de métaux dans le sol engendre un stress oxydatif au niveau de la plante. Ce stress déclenche une cascade de réactions au sein de la plante. Le stress oxydatif se définit comme étant le résultat d'un déséquilibre entre la balance des ROS et les systèmes de défense (antioxydants), avec comme conséquence, l'apparition de dégâts souvent irréversibles pour la cellule.

Récemment une nouvelle fonction a été découverte pour la défensine de plante AhPDF1 chez la plante *Arabidopsis halleri*, c'est la tolérance au zinc (Mirouze et al., 2006).

IV. La défensine AhPDF1

Le zinc est un oligoélément nécessaire à la croissance de la plante mais il devient toxique lorsqu'il est présent en excès dans le sol, c'est pourquoi les plantes ont besoin de contrôler les concentrations de zinc interne, ce processus est appelé homéostasie du zinc. Il existe néanmoins des plantes qui résistent aux métaux et sont capables de pousser sur des sols pollués. Certaines d'entre elles supportent des quantités élevées de métaux en les transportant du sol vers les parties aériennes de la plante. Ces plantes sont appelées des plantes hyper-accumulatrices et sont cultivées pour détoxifier les sols pollués (phytoremédiation) (Zhao and McGrath, 2009).

L'équipe d'adaptation des plantes aux métaux de Pierre Berthomieu à Montpellier a réalisé un criblage fonctionnel des librairies d'ADNc d'*Arabidopsis halleri* dans la levure *Saccharomyces cerevisiae* afin de trouver les gènes conférant la tolérance au zinc à la levure. Elle a ainsi mis en évidence que la protéine AhPDF1 est impliquée dans la tolérance au zinc chez *Arabidopsis halleri*. Des travaux en 2005 montraient qu'un stress aux métaux lourds induit une accumulation de jasmonate dans *Arabidopsis thaliana* et *Phseolus coccineus* (Maksymiec et al., 2005). La voie de signalisation utilisée par la plante lors de ce stress abiotique est la voie JA, la même que celle utilisée pour lutter contre les nécrotrophes et les insectes (Figure 15). Quelques mois après la publication de Mirouze et al., des travaux montraient la différence d'expression des gènes de l'homéostasie du zinc lors d'une carence et d'un excès de zinc chez *Arabidopsis thaliana* et *Thlaspi caerulescens*, une plante hyperaccumulatrice de métaux (Mortel et al., 2006).

IV. 1) Criblage des ADNc

Afin de caractériser les mécanismes moléculaires de la tolérance au zinc de la plante *Arabidopsis halleri*, un criblage des ADNc conférant la tolérance au zinc à la plante a été effectué dans la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Le criblage a été réalisé sur un milieu minimum contenant 15mM de sulfate de zinc ($ZnSO_4$) qui à cette concentration, inhibe la croissance de la levure sauvage. Le criblage a révélé que quatre gènes codants pour des défensines (AhPDFs) chez *Arabidopsis halleri* induisent une tolérance au zinc chez la levure. Ensuite, la défensine AhPDF1 sous le contrôle du promoteur 35S, a été exprimée dans la plante *Arabidopsis thaliana* qui initialement ne possède pas la tolérance au zinc. La plante *Arabidopsis thaliana* transgénique devient alors plus tolérante au zinc que le phénotype sauvage. AhPDF1 est donc capable de conférer la tolérance au zinc à la levure, mais aussi à la plante.

Parmi les levures transfectées, neuf mutants indépendants ont été sélectionnés, leur ADNc a été alors séquencé. Les neuf ADNc étaient très similaires (87 % d'identité), ils permettent de coder quatre protéines différentes de 80 résidus. Les comparaisons de séquences ont montré que ces ADNc codaient pour des défensines de plantes. Ces protéines ont un fort degré d'identité (de 71 à 96 %) avec les défensines d'*Arabidopsis thaliana* ou les défensines RsAFP du radis *Raphanus sativus* (Figure 19). La famille des défensines d'*Arabidopsis thaliana* est divisée en deux sous-familles nommées AtPDF1 et AtPDF2 (Thomma et al., 2002). D'après les relations phylogénétiques entre les défensines, les quatre ADNc clonés d'*Arabidopsis halleri* appartiennent à la sous-famille AtPDF1. Elles sont nommées AhPDF1.1, AhPDF1.2, AhPDF1.3 et AhPDF1.4 (Mirouze et al., 2006). Quelques mois après la publication de Mirouze et al., des travaux montraient que la défensine PDF1.2 est constitutivement surexprimée chez *Thlaspi caerulescens*, plante hyperaccumulatrice de zinc, par rapport à *Arabidopsis thaliana* (Mortel et al., 2006).

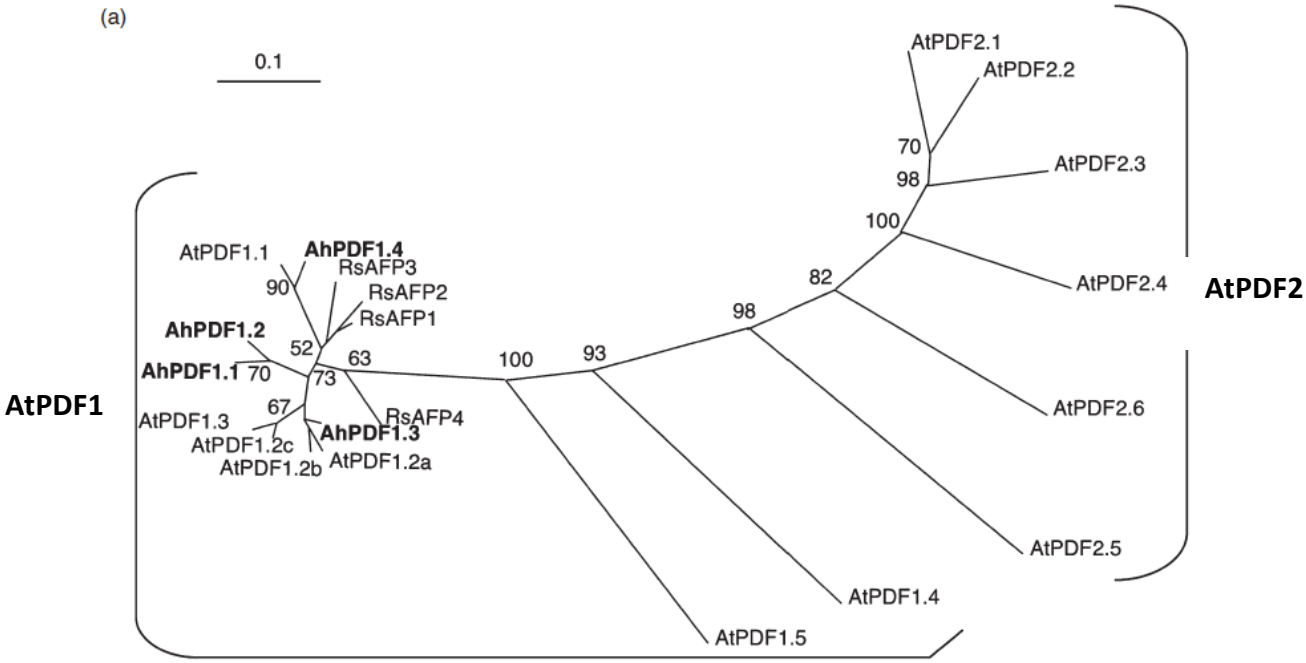
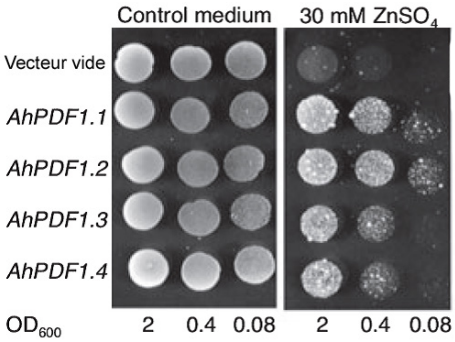


Figure 19 – Arbre phylogénétique des ADNc de défensines AhPDF1 et AtPDF1 (extraite de Mirouze et al., 2006)

IV. 2) Mise en évidence de la tolérance au zinc

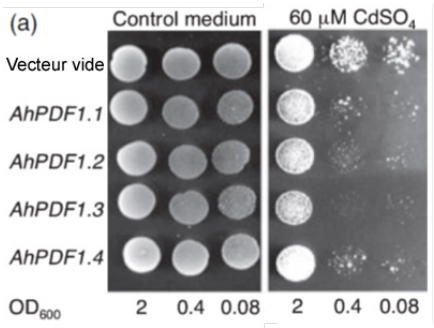
La croissance des levures exprimant les défensines d'*Arabidopsis halleri* a été réalisée sur un milieu minimum et sur un milieu contenant 30 mM de $ZnSO_4$ (Figure 20) (Mirouze et al., 2006). L'expression de l'une des quatre défensines permet à la levure de se développer sur un milieu riche en zinc.



Le phénotype de tolérance au zinc est plus important pour les levures exprimant la défensine AhPDF1.1 et AhPDF1.2 que celles exprimant AhPDF1.3 ou AhPDF1.4.

Figure 20 – Tolérance au zinc de la levure *S. cerevisiae* exprimant les protéines AhPDF1.1, AhPDF1.2, AhPDF1.3 et AhPDF1 .4 (extraite de Mirouze et al., 2006)

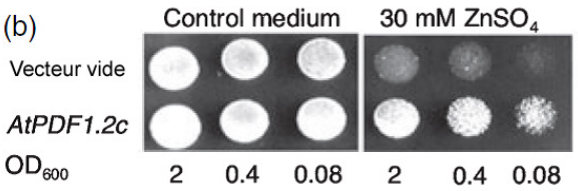
Comme *Arabidopsis halleri* est résistante au zinc mais également au cadmium, l'hypothèse de la résistance au cadmium donnée par les défensines a aussi été testée. Les levures exprimant les défensines ont été placées sur un milieu riche en cadmium (Figure 21).



Les défensines AhPDF1 ne confèrent aucune tolérance au cadmium chez la levure.

Figure 21 – Tolérance au cadmium de la levure *S. cerevisiae* exprimant les protéines AhPDF1.1, AhPDF1.2, AhPDF1.3 et AhPDF1 .4 (extraite de Mirouze et al., 2006)

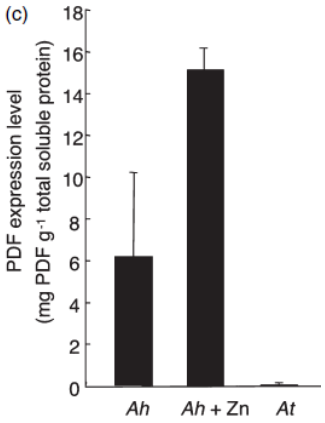
Pour vérifier si la tolérance au zinc observée dans la levure *S. cerevisiae* est spécifiquement due à la défensine d'*Arabidopsis halleri*, des levures ont été transfectées avec l'ADNc AtPDF1.2c d'*Arabidopsis thaliana* et testées sur le milieu riche en zinc (Figure 22).



La défensine AtPDF1.2c confère également une tolérance au zinc chez la levure.

Figure 22 – Tolérance au zinc de la levure *S. cerevisiae* exprimant la protéine AtPDF1.2c (extraite de Mirouze et al., 2006)

Les niveaux d'expression des défensines AhPDF1 d'*Arabidopsis halleri* et AtPDF1.2c d'*Arabidopsis thaliana* ont été comparés chez la plante à l'aide d'un test ELISA compétitif utilisant le sérum RsAFP2. Les plantes poussent d'abord sur un milieu hydroponique (substrat neutre et inerte de type sable ou billes d'argile, irrigué d'un courant de solution apportant les sels minéraux et les nutriments essentiels à la plante) pendant 8 semaines sans zinc, puis est ensuite ajouté 1 mM de $ZnSO_4$ dans le milieu de culture pendant une semaine. La protéine AhPDF1 est largement plus exprimée que la protéine AtPDF1.2c, dans les conditions normales et AhPDF1 est plus fortement surexprimée en présence qu'en absence de zinc (Figure 23).



C'est donc le niveau d'expression des défensines qui compte, et pas la séquence de la défensine.

Figure 23 – Niveaux de protéines dans les racines de *Arabidopsis halleri* en absence et en présence de zinc et de *Arabidopsis thaliana* (extrait de Mirouze et al., 2006)

Arabidopsis thaliana et une lignée transgénique d'*Arabidopsis thaliana* exprimant la défensine AhPDF1 ont été plantées sur différents milieux avec une concentration croissante de zinc. On observe des différences importantes entre le phénotype sauvage et la lignée transgénique sur les milieux contenant 400 ou 500 µM de $ZnSO_4$. La plante *Arabidopsis thaliana* transgénique exprimant AhPDF1 est plus grande et plus verte que le phénotype sauvage. Sur les milieux à hautes concentrations en zinc, les deux plantes montrent des symptômes d'empoisonnement. La lignée transgénique est donc plus tolérante au zinc que le phénotype sauvage.

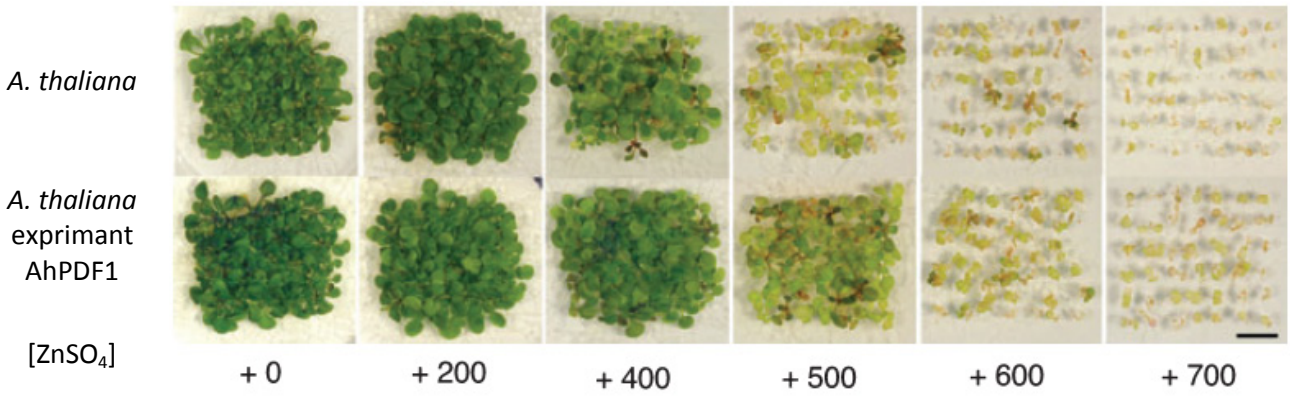


Figure 24 – Plante *Arabidopsis thaliana* de phénotype sauvage et exprimant la protéine AhPDF1 poussant sur un milieu riche en zinc et photographiées au bout de 16 jours (extraite de Mirouze et al., 2006)

La capacité des défensines à conférer une tolérance au zinc est confirmée par cette expérience (Figure 24), la plante *Arabidopsis thaliana* surexprimant la défensine AhPDF1 possède une tolérance au zinc que n'a pas le phénotype sauvage.

La surexpression de la défensine AhPDF1 confère une tolérance au zinc chez la plante *Arabidopsis thaliana*.

V. Le zinc dans les protéines

Le zinc est un élément essentiel qui joue un rôle très important dans les processus physiologiques et métaboliques de la plante, il sert de cofacteur à de très nombreuses enzymes. En effet, le zinc peut jouer un rôle structural ou un rôle catalytique au sein de la protéine. Après avoir analysé plus d'une centaine de structures 3D cristallographiques de protéines comportant du zinc, Lee et al., (2008) a constaté qu'en fonction du nombre de cystéines présentes, on peut prédire si le zinc est structural ou catalytique (Figure 25).

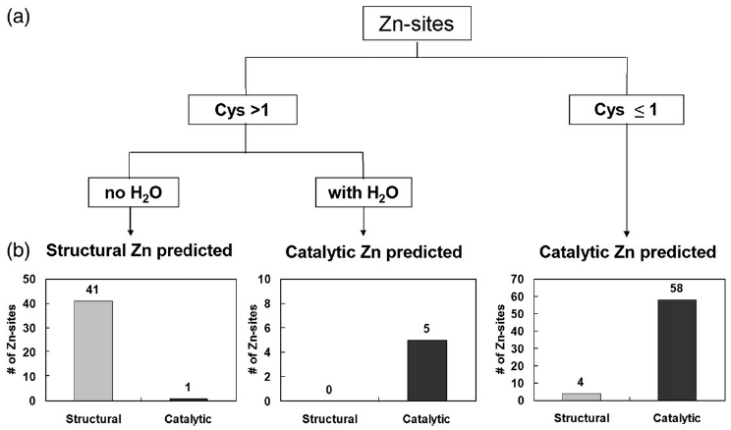


Figure 25 – Diagramme permettant de prédire la fonction du site à zinc en fonction du nombre de cystéines et des molécules d'eau (extraite de Lee and Lim, 2008)

Dans les sites de zinc catalytiques, l'atome de zinc Zn^{2+} se trouve généralement lié à une molécule d'eau et par ordre de préférence décroissante à une histidine, une glutamine, une asparagine, et une cystéine (Auld, 2001).

Dans les sites de zinc structuraux, l'atome de zinc Zn^{2+} est lié tétraédriquement aux acides aminés. Il se coordinne préférentiellement avec la cystéine plutôt que l'histidine (Auld, 2001).

L'analyse de 126 structures de protéines obtenues par cristallographie montre que dans une majorité des cas (82 %) le zinc est coordinné par 4 résidus, par 5 résidus dans 14 % des cas et par 6 résidus dans 4 % des cas (Patel et al., 2007). La coordination tétraédrique est dominante chez les protéines.

V. 1) Motifs structuraux connus des protéines à zinc

Il existe des motifs structuraux appelés doigts de zinc qui complexent le zinc. Ils peuvent coordinner un ou plusieurs atomes de zinc afin de stabiliser la structure de la protéine. Ces motifs sont très souvent rencontrés chez les protéines fixant l'ADN ou l'ARN.

Les doigts de zinc coordinent l'atome de zinc de différentes façons. Ils peuvent être classés selon le type de résidus (cystéine ou histidine) impliqués dans l'interaction avec le zinc

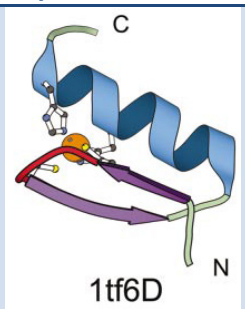
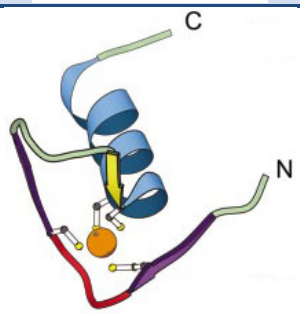
(C_2H_2, C_4, et C_6) mais aussi par leur repliement global. Les doigts de zinc les plus courants ont un repliement C_2H_2-like, en clé de sol et en ruban à zinc (Tableau 2).

Quant aux métallothionéines, elles possèdent plusieurs cystéines capables de chélater Zn^{2+} dans des boucles et sont connues pour participer à l'homéostasie du zinc (Roosens et al., 2008).

Pendant longtemps on a pensé que le zinc avait un rôle exclusivement structural dans les protéines à doigts de zinc. En fait les structures à doigts de zinc peuvent agir comme des commutateurs moléculaires sensibles au potentiel redox (switch redox) contrôlant plusieurs processus cellulaires importants (Kröncke and Klotz, 2009 ; Ilbert et al., 2006 ; Maret, 2005) :

- Zn^{2+} peut entrer en compétition avec d'autres métaux cruciaux pour l'activité de protéines de signalisation (exemple : Ca^{2+}/calmoduline)
- Zn^{2+} peut activer ou inhiber d'autres enzymes
- Zn^{2+} peut affecter l'affinité de ligands pour des protéines

La libération de zinc permet également d'augmenter le taux de Zn^{2+} libre dans les cellules, participant ainsi à l'homéostasie du zinc.

Nom	Représentation 3D	Repliement
Cys2His2 like		Deux ligands du doigt, et deux autres de l'extrémité C-terminale de l'hélice ➔ Repliement ββα
Clé de sol	 1hcq	Deux ligands du doigt, et deux autres de l'extrémité N-terminale d'une hélice ➔ Repliement β en épingle à cheveux à l'extrémité N-terminale et une hélice α à l'extrémité C-terminale

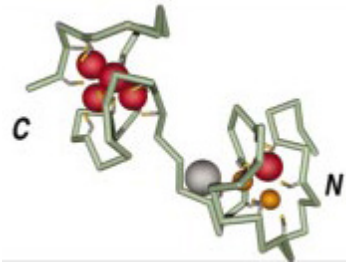
Ruban à zinc	 1dfeA	Deux ligands chacun de deux doigts ➔ Repliement en forme de deux épingles à cheveux β
Métallothionéines		Protéine riche en cystéines complexant les métaux dans une boucle

Tableau 2 – Classification structurale des 4 principaux motifs de protéines à zinc (Krishna et al., 2003)

V. 2) Les protéines à zinc en tant que protéines redox

En biologie l'ion zinc est toujours sous son état Zn^{2+} et ne peut donc avoir une activité redox. C'est la raison pour laquelle les protéines à zinc ont été longtemps considérées comme « redox-inertes ». Cependant, lorsque Zn^{2+} est fixé à des cystéines « redox-actives », celles-ci confèrent leurs propriétés redox au complexe (Wouters et al., 2010). Nous venons de voir que les sites Zn^{2+} peuvent être à la fois vus comme des sites structuraux ou catalytiques mais en plus ils peuvent avoir ou non une activité redox. De ce point de vue ils sont classés en 2 autres catégories : sites Zn^{2+} redox-actifs et sites Zn^{2+} redox-inertes (Figure 26).

Un site Zn^{2+} peut être à la fois structural et redox-actif (Figure 26C). C'est le cas des régulateurs de transcription (SMAD, anti-TRAP et SIRT) et de la protéine chaperonne Hsp33. Ces protéines libèrent de façon réversible Zn^{2+} pour former des ponts disulfure dans des conditions de stress oxydant. C'est le cas également de protéines impliquées dans des fonctions cellulaires comme le transport intracellulaire (protéines Tim).

Les sites Zn^{2+} impliqués dans les switch redox sont accompagnés d'un changement de conformation des protéines entre leur état actif/inactif et réduit/oxydé. Cet échange est réversible tant qu'il n'y a pas clivage d'une partie de la protéine.

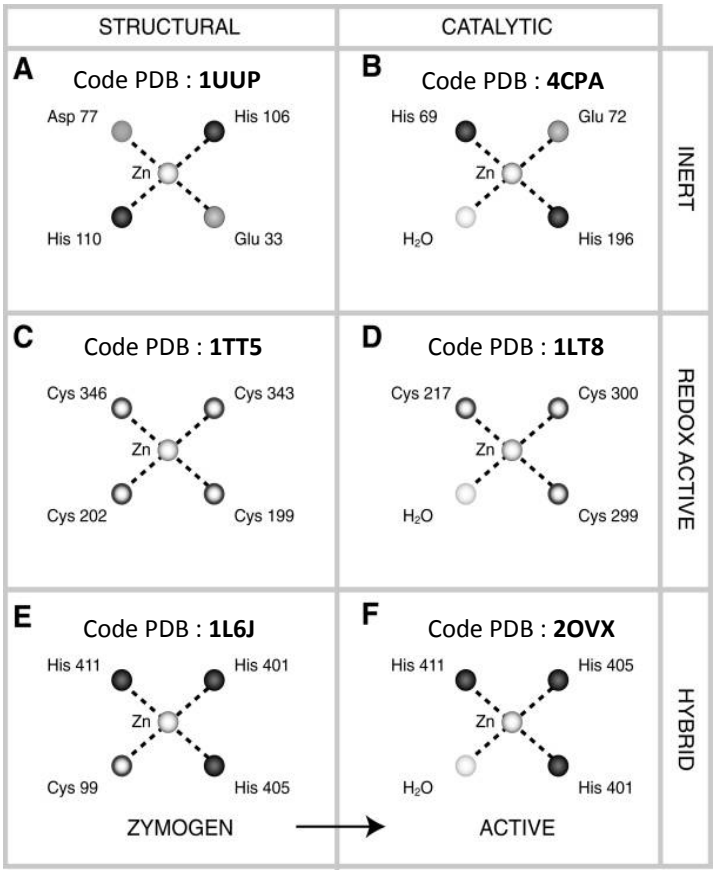


Figure 26 – Types de sites Zn^{2+} rencontrés dans les protéines (extraite de Wouters et al., 2010). Un exemle de protéine (code PDB) est donné pour chaque type de site à zinc.

V. 3) Exemple de la protéine Hsp33

La protéine chaperonne Hsp33 (Heat shock protein 33) de 294 acides aminés (32,8kDa) est exprimée de façon constitutive en conditions non-stressantes, elle se trouve alors sous forme d'un monomère compact, réduit et inactif dont les 4 cystéines appartenant à un motif Cys-X-Cys-X30-Cys-X-X-Cys sont liées à Zn^{2+} (Won et al., 2004). Quand les cellules sont exposées à la fois à des ROS (H_2O_2) et à des températures élevées, les fonctions de chaperonne sont activées afin de protéger les cellules des conséquences létales d'un stress oxydant (Winter et al., 2005 et 2008). Hsp33 subit alors d'importants changements de conformations : les ponts disulfure se forment, le zinc est libéré et la protéine se dimérise.

Hsp33 possède deux senseurs de stress interdépendants, qui sont tous les deux localisés dans le domaine C-terminal (résidus 179 à 294) (Figure 27A). Ces senseurs de stress activent la protéine seulement quand un stress H_2O_2 est combiné avec des conditions de dépliement de la protéine comme la chaleur. H_2O_2 oxyde les thiols des cystéines chélatant le zinc et entraine sa libération puis le dépliement du cœur à zinc. La chaleur est détectée par les régions directement

en amont du domaine de liaison au zinc (résidus 179 à 231), qui deviennent thermolabile et s'ouvrent une fois qu'Hsp33 ne lie plus le zinc. Hsp33 est active lorsqu'elle est intrinsèquement désordonnée.

Le dépliement de la partie C-terminale de la protéine Hsp33 expose les surfaces hydrophobes du domaine N-terminal de liaison au substrat et provoque l'activation de la fonction chaperonne de Hsp33.

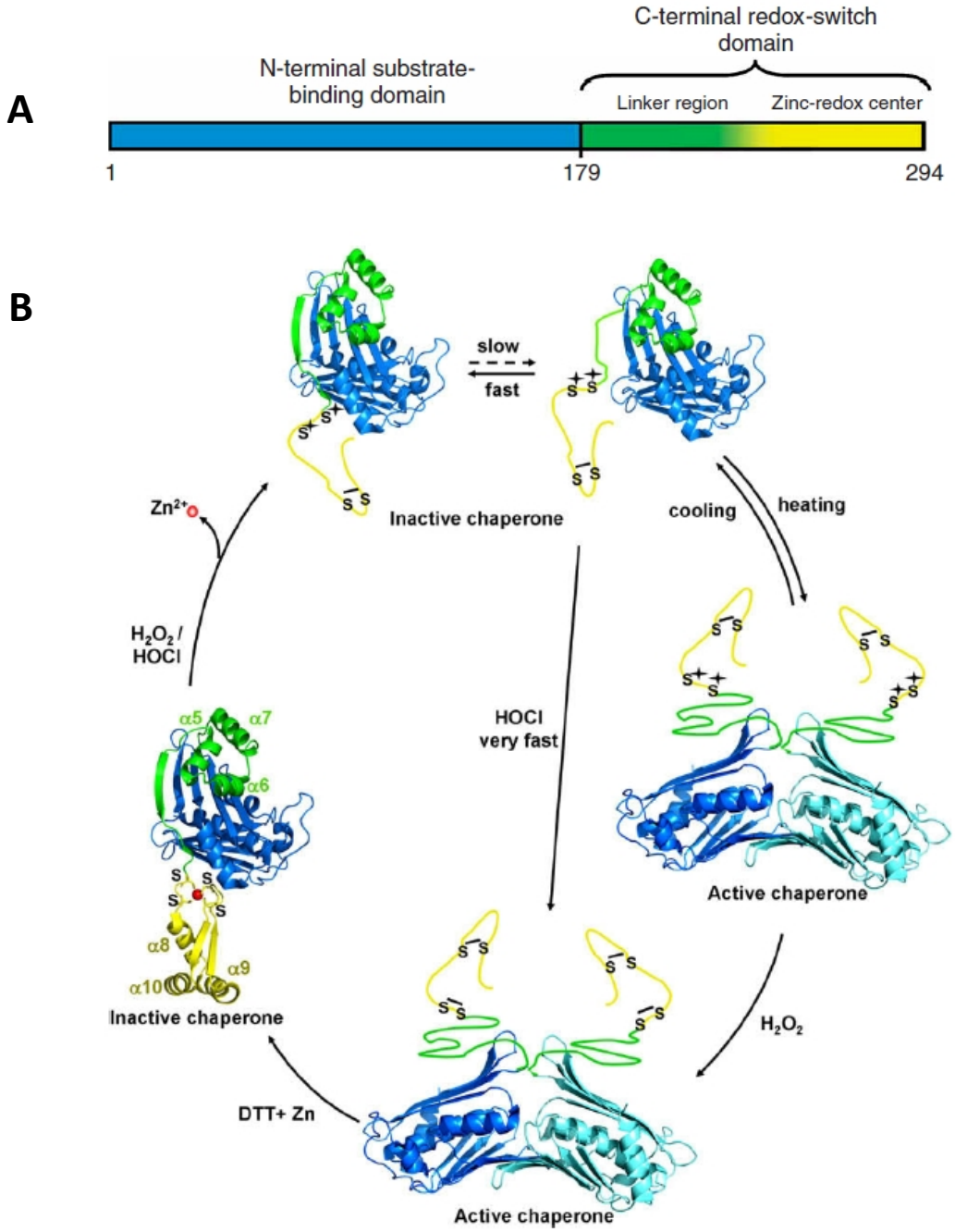


Figure 27 A et B – Hsp33 est composé d'un domaine N-terminal (bleu), d'un domaine redox-sensitif liant le zinc (jaune), et d'un linker flexible (vert). Cycle de d'activation et d'inactivation de la protéine chaperonne Hsp33 (extraite de Winter et al., 2008)

V. 4) Exemple de la protéine Tim10

Contrairement à la protéine Hsp33, le switch redox de Tim10 n'est pas une réponse à un stress oxydatif, Tim10 doit être importée du cytosol vers l'espace inter membranaire de la mitochondrie. Dans un état oxydé avec ses ponts disulfure Tim10 ne pourrait pas traverser la membrane externe de la mitochondrie. Le passage réussit à se faire lorsque la protéine est dans un état réduit et non replié. Grâce à la présence d'ions Zn^{2+} dans le cytosol qui ralentissent le repliement oxydatif (Figure 28) (Lu and Woodburn, 2005), Tim10 peut alors traverser la membrane et pénétrer dans l'espace inter membranaire, devenir active après un repliement oxydatif et former un complexe avec Tim9.

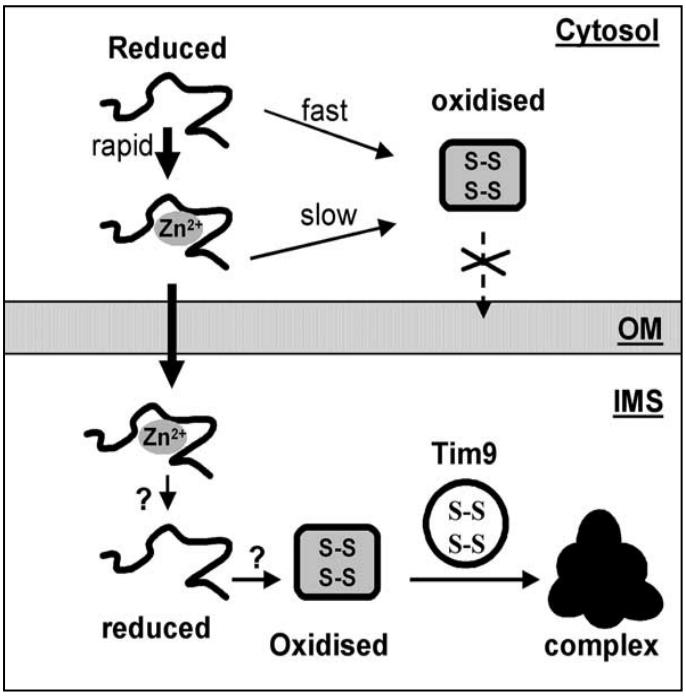


Figure 28 – Schéma représentant le rôle du zinc dans le passage de la membrane mitochondriale et le repliement de la protéine Tim10 (extraite de Lu and Woodburn, 2005)

Le mécanisme moléculaire de ce switch redox n'est pas encore élucidé, il semble que la fixation du zinc suive un processus complexe passant par un intermédiaire non-structuré (Ivanova et al., 2008).

Notre hypothèse est que le zinc est chélaté par 4 cystéines de la protéine AhPDF1, ce qui en ferait un site de zinc structural et redox-actif.

MATERIEL ET METHODES

Séquence de la protéine AhPDF1.1b (parfois nommée AhPDF1.c dans certains articles) :

QRLCE KPSGT WSGVC GNNGA CRNQC IRLEK ARHGS CNYVF PAHKC ICYFP C

Pour des raisons pratiques, nous l'appellerons AhPDF1 dans ce manuscrit.

I. Méthodes d'analyse utilisées

La protéine AhPDF1 est analysée en HPLC, spectrométrie de masse MALDI-TOF et spectrométrie de masse à haute résolution HR-ESI.

I. 1) Analyses HPLC

Les analyses HPLC sont réalisées sur un système LaChrom Elite équipé d'une pompe Hitachi L-2130, d'un détecteur Hitachi L-2455 et d'un échantillonneur automatique Hitachi L-2200. Les machines sont équipées d'une colonne Nucleosil C18 à phase inverse, 300 Å, 5 µm, 250×4,6 mm pour l'analyse (débit : 1 mL/min) et 300 Å, 5 µm, 250×10 mm pour la purification (débit : 3 mL/min). Les solvants A et B sont composés respectivement de 0,1 % TFA dans H_2O et 0,1 % TFA dans MeCN.

I. 2) Spectrométrie de masse MALDI-TOF

Les spectres MALDI-TOF sont réalisés sur un spectromètre de masse UltraFlex I (Bruker Daltonics). Les échantillons sont dilués entre 0,5 et 5 µM avec une solution acétonitrile/H_2O/TFA (33,3/66,6/0,1) saturée avec de l'acide 4-hydroxy-α-cyano-cinnamique. Le mélange échantillon-matrice est ensuite déposé sur une cible plaquée or en utilisant la méthode en couche ultramince (Cadene and Chait, 2000 ; Gabant and Cadene, 2008). La désorption-ionisation de l'échantillon est réalisée avec un laser à azote (λ = 337 nm). Les spectres sont acquis en mode réflectron positif (gamme *m/z* 500-5000) ou en mode linéaire positif (gamme *m/z* 1000-17000) et représentent la somme cumulée de 1000 tirs. Une calibration externe des spectres est réalisée en se servant de solutions de calibration standard : Pepmix I (Bruker Daltonics) pour le mode réflectron et un mélange de cytochrome C et d'apomyoglobine pour le mode linéaire. L'acquisition des spectres est réalisée via le logiciel Flexcontrol 3.3 (Bruker Daltonics) et l'exploitation des données est réalisée via le logiciel Flexanalysis 3.3 (Bruker Daltonics). Ces analyses de masse sont réalisées par la plateforme de spectrométrie de masse du laboratoire.

I. 3) Spectrométrie de masse HR-ESI

Pour les analyses en conditions natives et la mobilité ionique, nous avons utilisé un spectromètre de masse Synapt G2 HDMS (WATERS) couplé à un Nanospray Triversa Nanomate (ADVION BIOSCIENCES).

Pour les expériences de mobilité ionique, nous avons utilisé les conditions suivantes : Pi (pression dans l'interface) de 4 mBar, Vc (tension d'accélération des ions) de 40 V, avec une pression dans la cellule de mobilité de 2,3 mBar avec un rapport débit d'hélium sur débit d'azote de (100 mL/min)/(25 mL/min), une vitesse de vague de 1600 m/s et une hauteur de vague de 30 V. Ces analyses de masse sont réalisées par nos collaborateurs du laboratoire de spectrométrie de masse BioOrganique de Strasbourg (LSMBO).

II. Production de la protéine AhPDF1

II. 1) Production par voie bactérienne : *Escherichia coli*

II. 1) 1) Production

La production de la protéine a été mise au point avec la souche BL21 *d'Escherichia coli* par nos collaborateurs de l'INRA de Montpellier (Marquès et al., 2009). Le plasmide utilisé est pET-28-a(+). Les bactéries produisent la protéine réduite sans les ponts disulfure. A l'extrémité N-terminale de la protéine se trouve un TAG de 36 résidus riche en Histidine (6 His). Ce TAG Histidine permet de purifier la protéine par colonne d'affinité. La protéine TAG-AhPDF1 est produite dans les corps d'inclusion de la bactérie parce qu'elle n'est pas soluble.

II. 1) 2) Purification

J'ai optimisé le protocole de purification précédemment mis au point afin d'obtenir une plus grande quantité de protéine et avec une meilleure pureté. Toutes les étapes de purification se font entre 4 et 6 °C. Les culots bactériens sont tout d'abord décongelés sur un lit de glace, puis les cellules sont resuspendues dans du tampon de lyse dénaturant (50 mM Tris HCl pH 8 ; 150 mM NaCl ; 6 M GuCl ; 1 mM PMSF pH 8) à raison de 10 mL/g de cellules humides. Le PMSF (flurorure de phenylméthanesulfonyle) est un inhibiteur des protéases à sérine qui réagit avec la sérine du site actif des enzymes.

Le chlorure de guanidinium (GuCl) permet de casser les corps d'inclusion et de rendre la protéine soluble. Le lysozyme (0,5 mg/mL) est ajouté à la solution pour lyser les membranes cellulaires. La solution est ensuite soniquée dans la glace : une pulsation de 5 secondes avec une amplitude de 100%, suivie de 5 secondes de repos ; ce cycle est répété pendant 1 min 30 sec. A

la fin du cycle, il y a une phase de repos (sans pulsation) de 2 min. Le cycle total est répété 6 fois. Le lysat obtenu est fluide. Il est alors réparti dans 4 tubes Beckman et centrifugé à 50 000 g (rotor type 45 Ti) pendant 1 h à 4 °C pour séparer les protéines des débris cellulaires et de l'ADN.

Le surnageant récupéré est passé sur une colonne d'affinité au nickel (proBond) pour la purification. Le TAG polyhistidine a une affinité avec les ions nickel de la résine, ce qui va permettre de retenir la protéine et de l'isoler (Figure 29).

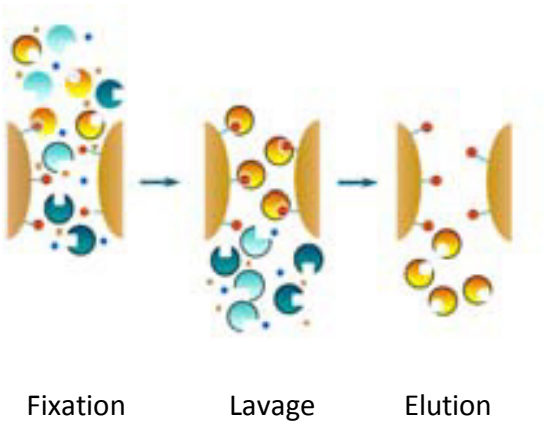


Figure 29 – Schéma du principe de la résine de Nickel. En jaune, la protéine d'intérêt possède un tag poly-histidine, en bleu les autres protéines ne se fixant pas à la colonne

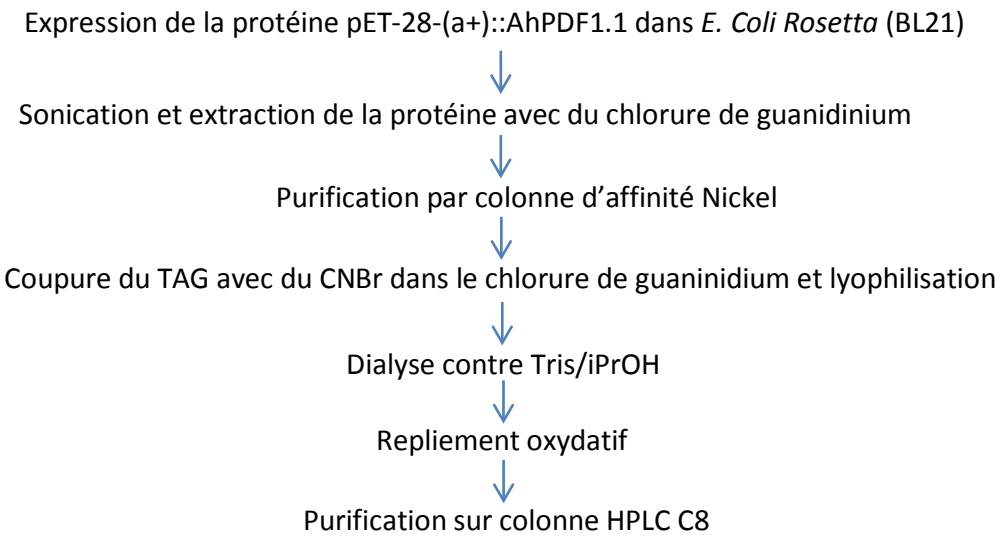


Figure 30 – Protocole de purification utilisé pour la protéine AhPDF1

Dans un premier temps la résine est lavée avec de l'eau ultrapure puis avec du tampon de lyse dénaturant. Le surnageant est alors placé sur la résine sous rotation dans des Falcons pendant 1 h à 4 °C afin de fixer la protéine TAG-AhPDF1 sur la résine. Le mélange est centrifugé à 750 g pour culoter la résine. La fraction « non retenue » et la résine sont récupérées séparément. La résine est placée dans une colonne (BioRad) afin de pouvoir faire plusieurs fractions d'élution. Par précaution la fraction non retenue qui ne contient normalement pas de protéine est passée une deuxième fois sur la résine. La résine est lavée avec du tampon de lyse dénaturant pour décrocher les protéines qui se seraient accrochées non spécifiquement à la colonne. Puis la protéine est éluée avec des concentrations croissantes d'imidazole : 50, 100, 250 et 500 mM (tampon d'élution : 50 mM Tris HCl pH 8 ; 150 mM NaCl ; 6 M GuCl ; 1 mM PMSF ; imidazole). L'élution est réalisée avec un débit de 0,5 mL/min. Les fractions d'élution ayant une absorbance positive à 280 nm sont déposées sur gel Tris-Tricine 14,5 %. Les fractions montrant une présence protéique sont analysées en HPLC et spectroscopie de masse. Les fractions contenant la protéine d'intérêt sont rassemblées. La protéine TAG-AhPDF1 ainsi extraite est sous la forme réduite.

Le TAG de 36 résidus est clivé par une coupure au bromure de cyanogène (CNBr) directement dans le tampon d'élution. Le bromure de cyanogène coupe la liaison peptidique après une Méthionine, le TAG va donc être morcelé parce qu'il possède 5 Méthionines. La solution est d'abord acidifiée par un ajout d'acide chlorhydrique concentré jusqu'à obtenir une concentration finale de 0,3 M d'acide chlorhydrique, puis 500 équivalents de bromure de cyanogène sont ajoutés (100 équivalents/Méthionine). L'ajout du bromure de cyanogène est fait sous Argon, à l'abri de la lumière sous agitation à température ambiante pendant 24 h. Le lendemain, le ballon est ouvert sous la hotte pendant 1 h puis, après ajout de 1 mL H_2O, est mis à lyophiliser. Le lyophilisat est resuspendu dans de l'eau ultrapure, puis dialysé sur une membrane d'un seuil de coupure de 1 kDa contre une solution de Tris 100 mM à pH 7, iPrOH 25 % pour éliminer le chlorure de guanidinium. L'isopropanol évite que la protéine ne précipite. La protéine ainsi obtenue peut maintenant être repliée par repliement oxydatif.

La protéine d'intérêt contenue dans les fractions est alors purifiée sur une colonne HPLC semi-préparative C18 avec un gradient de 20 à 28 % d'acétonitrile/0,1 % TFA en 12 minutes.

II. 2) Voie chimique : Synthèse peptidique sur support solide

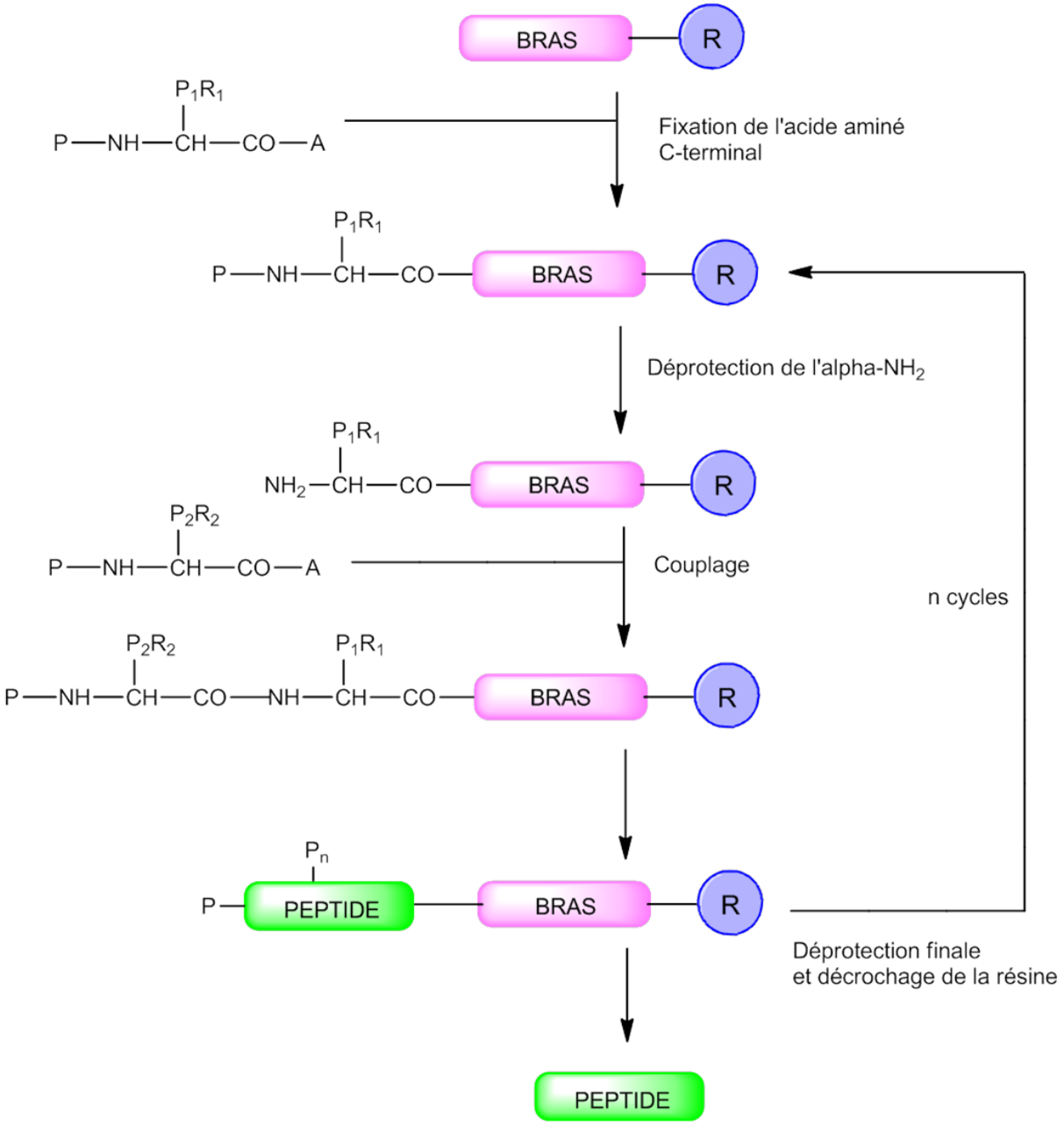
- Principe

La synthèse peptidique sur support solide (SPPS pour Solid Phase Peptide Synthesis) a été inventée par Merrifield en 1963 pour la synthèse d'un tetrapeptide, cette technique a révolutionné la synthèse peptidique. La synthèse chimique sur support solide permet de synthétiser des peptides naturels qui sont difficilement exprimables dans les bactéries, elle permet aussi l'incorporation d'acides aminés non naturels ou encore de synthétiser des peptides contenant des acides aminés D, de rajouter des groupements non naturels comme un fluorophore ou un acide aminé marqué afin de faire des études biophysiques.

Le peptide est immobilisé sur un support polymérique insoluble appelé résine via un bras qui permettra le décrochage du peptide. Il existe plusieurs avantages à la synthèse peptidique sur support solide, en effet le peptide d'intérêt est fixé au support solide, ce qui supprime les étapes de purification car un simple lavage suffit pour éliminer les réactifs restés en solution. De plus, comme le peptide d'intérêt reste fixé sur le support jusqu'à la fin de la synthèse, on peut travailler en excès de réactifs.

Le principe général de la SPPS est une répétition d'étapes de couplage, lavage, déprotection, lavage, et ceci jusqu'à l'obtention du peptide souhaité (Figure 31). Lors de l'élongation, les acides aminés constituant le peptide sont successivement couplés les uns aux autres de l'extrémité C-terminale vers l'extrémité N-terminale. Ces couplages permettent de former des liaisons amides entre les fonctions acides carboxyliques et les fonctions amines des différents résidus. Les chaînes latérales réactives des acides aminés sont protégées par des groupements protecteurs durant toute la phase d'élongation, la fonction amine de l'acide aminé couplé est spécifiquement déprotégée à chaque cycle. En général les chaînes latérales du peptide sont déprotégées par un traitement acide qui clive simultanément le peptide du support. Le peptide brut obtenu par précipitation à l'éther est analysé par HPLC analytique et spectrométrie de masse puis purifié par HPLC semi-préparative.

Il existe deux groupements protecteurs qui protègent temporairement les α-NH_2 des acides aminés : le groupement Boc (t-Butoxycarbonyle) et le groupement Fmoc (9-Fluorenylmethyloxycarbonyle). Le groupement Fmoc, actuellement le plus utilisé, est celui que nous avons choisi. Il est éliminé en milieu basique (Pipéridine/NMP, 1/4). De plus lors de cette étape de déprotection, le produit de la réaction formé réagit avec la pipéridine et forme un adduit dibenzofulvène pipéridine dosable en UV à 301 nm. Cette propriété permet de suivre les rendements de l'élongation à l'aide d'un détecteur UV.



A : groupement activateur
R : Support solide (résine)
P: Protection temporaire de la fonction amine
P_1, P_2, …, P_n : Protection permanentes des chaînes latérales R_1, R_2, …, R_n.

Figure 31 – Principe de la synthèse peptidique sur support solide

II. 2) 1) Synthèse en utilisant le bras MPPA

II. 2) 1) 1) Fixation du bras MPPA sur la résine

Le bras acide méthylphénoxy propionique (MPPA) (253,44 mg, 1,2 mmol, 3 équivalents) est mis en solution avec l'activateur HATU (hexafluorophosphate de 2-(1H-7-azabenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetraméthylaminium) (456,24 mg, 1,2 mmol, 3 équivalents) dans 30 mL de NMP, la DIEA (416 µL, 6 équivalents) est ajoutée à la solution. La DIEA permet de générer l'ion carboxylate (COO^-) nécessaire pour former l'ester actif d'HATU. Le mélange est aspiré dans une seringue contenant 0,8 g de résine aminomethyl-ChemMatrix® avec un taux de substitution de 0,5 mmol/g. La seringue est mise sous agitation pendant 3 h, puis la résine est lavée par 5 passages successifs de NMP, DCM.

II. 2) 1) 2) Test de Kaiser

Afin de savoir si le couplage est quantitatif, on réalise un test colorimétrique de Kaiser basé sur la réaction de la ninhydrine avec les amines (on utilise le même test pour évaluer l'efficacité d'un couplage peptidique). Quelques grains de résine sont placés dans un tube à hémolyse, puis 2 gouttes d'une solution de phénol liquide (80 g) dans l'éthanol (20 mL), 2 gouttes d'un mélange KCN (10^{-3} M) dans H_2O/pyridine (2/98) et 2 gouttes d'une solution de ninhydrine (5 g) dans l'éthanol (100 mL) sont ajoutées à la résine puis le tube est placé 5 min à 100 °C au bain marie. Les amines primaires sont visualisées par une couleur bleue nuit (contrôle positif). La couleur jaune obtenue (comme le contrôle négatif) indique un couplage quantitatif.

II. 2) 1) 3) Fixation de la Cystéine C-terminale

Le couplage de la cystéine sur le MPPA-ChemMatrix® est réalisé dans des conditions anhydres et sous argon. L'acide aminé Fmoc-Cys(Trt)-OH (390 mg, 0,66 mmol, 5 équivalents) est mis en solution avec l'activateur MSNT (1-(Mesitylene-2-sulfonyl)-3-nitro-1H-1,2,4-triazole) (195,5 mg, 0,66 mmol, 5 équivalents) dans 20 mL de DCM, le 1-méthylimidazole (40,6 mg, 0,49 mmol, 3,75 équivalents) est ajouté à la solution. Le mélange est aspiré dans une seringue contenant 0,8 g de MPPA-ChemMatrix®. La seringue est mise sous agitation pendant 5 h, puis la résine est lavée par 5 passages successifs de NMP, DCM.

Le groupement Fmoc qui protège l'α-NH_2 des cystéines est décroché en présence de NMP et de pipéridine (2/1) pendant 3x3 min, puis il est dosé par UV à 301 nm pour connaitre le rendement de couplage.

II. 2) 1) 4) Ajout du dipeptide Fmoc-Phe-Pro

Le dipeptide commercial Fmoc-Phenylalanine-Proline (FP) est couplé manuellement à la H-Cys(Trt)-MPPA-ChemMatrix®. Le dipeptide Fmoc-Phenylalanine-Proline (FP) (10 équivalents) est mis en solution avec l'activateur HOBT (1-Hydroxybenzotriazole) (10 équivalents), HBTU (hexafluorophosphate de 2-(1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetraméthylaminium) (10 équivalents) dans 20 mL de DCM, la DIEA (20 équivalents) est ajoutée à la solution. Le mélange est aspiré dans une seringue contenant 0,8 g de Cys-MPPA-ChemMatrix®. La seringue est mise sous agitation pendant 2 h, puis la résine est lavée par 5 passages successifs de NMP, DCM.

Quelques grains de résine sont prélevés afin de réaliser un test de Kaiser. La couleur jaune du test révèle un couplage quantitatif.

Afin de contrôler le pourcentage d'épimérisation de la cystéine et le rendement de couplage du dipeptide sur la résine, un aliquot de la résine Fmoc-Phe-Pro-Cys(Trt)-MPPA-ChemMatrix® est prélevé et le tripeptide est clivé par un mélange TFA/Phénol/H_2O/Tis (88/5/5/2) pendant 1 h sous rotation dans une seringue frittée. Le surnageant est récupéré dans un Falcon. On réalise encore 2 extractions de 3 minutes sous agitation avec un mélange de TFA/H_2O (99/1) que l'on rajoute au surnageant déjà récupéré. Le peptide est ensuite précipité dans de l'éther à 4 °C. Le précipité est culoté par centrifugation (5 min à 780 g rotor Jonan S40) et dispersé dans le l'éther pour le laver, on répète ces lavages trois fois. Ensuite les traces d'éther sont éliminées par un séchage au dessiccateur sous vide. Le culot est repris dans une solution H_2O/acétonitrile (0,1 % TFA) (50/50) pour pouvoir mesurer l'absorbance à 280 nm. Le peptide brut est analysé en HPLC et un seul pic correspond à la masse attendue.

II. 2) 1) 5) Elongation du peptide

L'élongation du peptide à partir du composé Fmoc-FPC-MPPA-ChemMatrix est réalisée à l'aide d'un synthétiseur Applied Biosystem 433A. 0,1 mmol de Fmoc-FPC-MPPA-ChemMatrix® est placée dans le réacteur. La chimie utilisée est de type Fmoc/tBu. Pour réaliser un couplage, 10 équivalents d'acides aminés protégés et 10 équivalents d'agents de couplage (mélange HOBT et HBTU) sont utilisés.

Certains résidus nécessitent des groupements protecteurs sur leur chaîne latérale. Les protections utilisées sont de type Pbf pour les Arginines, tBu pour les Sérines, Thréonines et Tyrosines, Boc pour les Lysines et Tryptophanes, OtBu pour les Acides glutamiques, Trt pour les Asparagines, Cystéines, Glutamines et Histidines (tous les acides aminés utilisés sont commercialisés par NovaBiochem).

Le synthétiseur est équipé d'un détecteur UV qui permet de quantifier le Fmoc libéré à chaque cycle de déprotection.

II. 2) 1) 6) Décrochage du peptide de la résine

A la fin de l'élongation, un aliquot de peptide-résine est prélevé afin de vérifier la qualité de la synthèse. Les déprotections des chaînes latérales et le décrochage du peptide sont simultanément réalisés par un traitement acide de 3 h avec une solution de TFA/Phénol/H_2O/TIS (88/5/5/2). Le peptide est ensuite précipité dans un mélange d'éther/éther de pétrole (1/1) à 4 °C. Le précipité est culoté par centrifugation (5 min à 780 g rotor Jonan S40) et dispersé dans de l'éther pour le laver, on répète ces lavages trois fois. Ensuite les traces d'éther sont éliminées par un séchage au dessiccateur sous vide. Le composé obtenu est analysé par HPLC et spectrométrie de masse. Une fois ces analyses effectuées, on peut traiter toute la résine et décrocher la totalité du peptide. Le peptide peut être conservé à -20 °C en attendant d'être purifié.

II. 2) 2) Synthèse en utilisant le bras Trt

On utilise une résine ChemMatrix® avec un bras trytil (TRT) et une Fmoc-Cys(Trt) déjà fixée sur la résine et 0,12mmol de Fmoc-Cyst(Trt)-TRT-ChemMatrix® est placé dans le réacteur du synthétiseur. L'élongation du peptide est réalisée à l'aide d'un synthétiseur Applied Biosystem 433A comme décrit précédemment (voir I.3)A.5). Seul l'agent de couplage a été modifié : HCTU (2-(6-Chloro-1H-benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tétraméthylaminium hexafluorophosphate) à la place du mélange HOBT/HBTU.

A la fin de l'élongation, un aliquot de résine est prélevé afin de vérifier la qualité de la synthèse. Le peptide est décroché de la résine comme décrit précédemment (voir II.2)1)6)).

II. 3) Production dans la levure

II. 3) 1) Production dans *Pichia pastoris*

La production dans *Pichia pastoris* a été réalisée dans la Halle de Biotechnologie de Supagro Montpellier dirigée par le Pr E. Dubreucq avec l'aide d'O. Mith, doctorante de l'équipe de P. Berthomieu (B&PMP, Supagro Montpellier). O. Mith a produit et sélectionné les clones de *Pichia pastoris* exprimant avec le plus fort niveau la défensine AhPDF1.

La défensine AhPDF1 est produite et secrétée dans la levure *Pichia pastoris* à partir du plasmide pPICZα. La levure *Pichia pastoris* secrète peu de protéines endogènes, il sera alors facile de purifier le milieu de culture pour récupérer la protéine d'intérêt.

La levure *Pichia pastoris* possède un promoteur régulé par le gène de l'alcool oxydase 1 (AOX1), cela permet de contrôler l'expression de gènes d'intérêt. Le promoteur AOX1 est

fortement réprimé lorsque les levures poussent sur un milieu riche en glucose et pour la plupart des autres milieux riches en carbone, mais lorsque les levures sont placées dans un milieu riche en méthanol comme source de carbone, le promoteur induit l'expression du gène. Le plasmide utilisé est le pPICZα (Figure 32).

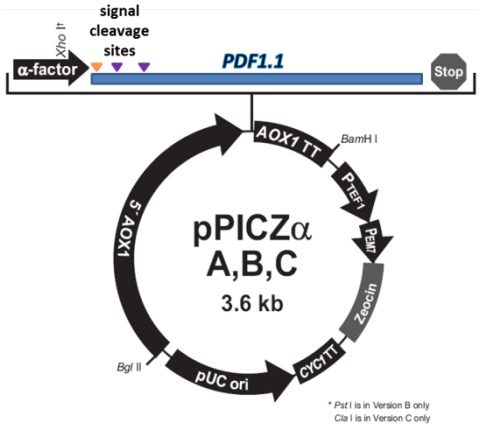


Figure 32 – Schéma du plasmide pPICZα

La culture de levures peut se faire en erlenmeyer mais les quantités de protéines exprimées sont généralement plus faibles qu'en fermenteur. De plus, dans les fermenteurs, le pH, l'apport en oxygène, l'apport de la source de carbone sont rigoureusement contrôlés, ce qui n'est pas le cas d'une culture en Erlenmeyer. Dans un fermenteur, la quantité de cellules obtenues est également plus importante. Nous avons choisi d'effectuer nos cultures en fermenteur (Figure 33).

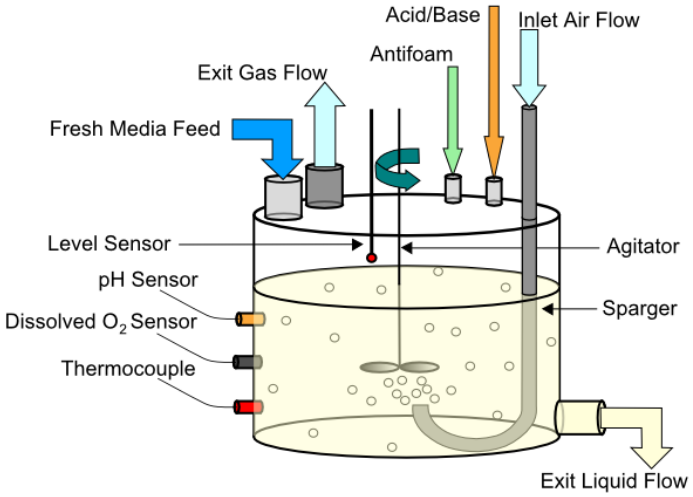


Figure 33 – Schéma d'un fermenteur servant à la production de protéine par la levure *Pichia pastoris*

Dans un premier temps, les levures sont placées en culture batch. La culture batch est un volume de milieu réduit contenant du glycérol qui est une source de carbone répressive du promoteur AOX1, ceci afin de former de la biomasse. Puis les levures passent par la phase de Fed-batch où le glycérol est ajouté en quantité limitée pour augmenter encore la concentration en levures sans réprimer leur croissance. En effet le but étant de maintenir les cellules dans leur phase exponentielle, on attend alors que le substrat devienne limitant avant d'en introduire du frais. Pour se faire on étudie la pression partielle en oxygène (pO2) qui est directement liée à la consommation du substrat et l'absorbance du milieu pour connaitre la quantité de biomasse présente. On va rajouter à chaque batch du glycérol qui va être totalement consommé par les levures. Cette étape permet également de préparer les cellules à une autre source de carbone. La troisième étape est la phase d'induction, le méthanol est ajouté lentement pour permettre à la culture de s'adapter à cette nouvelle source de carbone et d'initier la production de la protéine recombinante. Une concentration de 4 g/L de méthanol inhiberait la croissance cellulaire (Zhang et al., 2000), il faut donc garder la concentration en dessous de cette limite. L'ajout de substrat continuel tout en restant à un niveau presque limitant va forcer la cellule à utiliser son métabolisme secondaire qui est souvent inhibé par une trop grosse concentration de substrat. Il faut prendre bien soin de se placer en conditions riches en oxygène parce que l'oxygène est utilisé dans la réaction secondaire d'oxydation du méthanol en formaldéhyde (Sibirny et al., 1988). Le pO2 doit être maintenu entre 20 et 30 % dans la culture (Çelik and Çalık, 2012).

Les cultures sont faites dans des petits fermenteurs de 1 L. Les compositions des milieux sont répertoriées en annexes (Annexes 1 et 2).

Protocole de production dans la levure pour un fermenteur :

- Jour 0 : Une préculture de *Pichia pastoris* est placée dans 10 mL de « Yeast Peptone Dextrose Adenine » (YPDA). Elle est nommée préculture 1.
- Jour 1 : Ensuite on ajoute la préculture 1 dans 10 mL de milieu Pichia + N, ceci est la préculture 2 (1 mL de préculture 1 + 8 mL tampon tartrate pH 5,4 + 0,4 g de glycérol + 1 mL de sels minéraux (FM21) avec du sulfate d'ammonium marqué ^{15}N (10X) + 100 µL d'oligoéléments (PTM1) 100X + 40 µL biotine à 20 mg/L).
- Jour 2 : La préculture 2 est ajoutée dans 100 mL de milieu Pichia + N, on la nomme préculture 3 (10 mL de préculture 2 + 80 mL tampon tartrate pH 5,4 + 4 g de glycérol + 10 mL de FM21+N 10X + 1 mL de PTM1 100X + 400 µL de biotine à 20 mg/L)
- Jour 3 : Lancement du batch en fermenteur sur 500mL. La température interne du fermenteur est de 28 °C avec un pH de 5, les levures sont sous agitation, le pourcentage de O_2 est de 100 % au départ.

  La biomasse des levures augmente pendant 24 h, jusqu'à ce qu'elles aient consommé tout le glycérol présent. On autoclave 320 mL d'eau ultrapure avec 20 g de glycérol dans le fermenteur. Puis dans ce dernier sont ajoutés 50 mL de FM21, 5 mL de PTM1, 2 mL de biotine à 20 mg/L et 100 mL de préculture 3. L'absorbance UV du milieu de culture à 600 nm est de 2,2.

- Jour 4 :
    - Lorsque la DO_{600nm} atteint environ 60 c'est-à-dire environ 20 g de biomasse, 20 g de glycérol sont ajoutés dans le fermenteur, c'est le Batch2. On continue d'augmenter la biomasse des levures. Il faut faire attention à ne pas contaminer l'intérieur du fermenteur lors de l'ajout du glycérol.
    - Lorsque la DO_{600nm} atteint environ 130 c'est-à-dire environ 40 g de biomasse, 20 g de glycérol sont ajoutés dans le fermenteur, c'est le Batch3.
    - Lorsque la DO_{600nm} atteint environ 200 c'est-à-dire environ 60 g de biomasse. Les levures sont dans la phase stationnaire, elles ne vont pas produire davantage de biomasse. On commence le Fed-batch. Une solution de 300 mL de méthanol, 15 mL PTM1 et 1,8 mL de biotine à 20 mg/L est ajoutée en continu dans le fermenteur. Cela induit la production de la protéine.
- Jour 5 à jour 7 : Suivi du Fed-batch pour vérifier la bonne santé des levures.
- Jour 8 : Arrêt du Fed-batch et du fermenteur.

II. 3) 2) Purification

Toutes les étapes de purification sont réalisées à 4 °C. Le milieu de culture contenant les levures est centrifugé afin de récupérer le surnageant contenant la protéine et d'éliminer les cellules. Une pastille de cocktail d'inhibiteurs de protéases réduite en poudre à l'aide d'un mortier, est ajoutée au surnageant. Le surnageant est filtré successivement sur des filtres de 10 µm, 5 µm, 2 µm, 1 µm et enfin 0,5 µm. Le milieu est ensuite lavé puis concentré sur un système de diafiltration. Le milieu (700 mL) est séparé en 2 lots de 350 mL puis lyophilisé. Le lyophilisat correspondant à 350 mL de culture est repris dans 500 mL d'eau ultra pure et passé sur une colonne échangeuse de cations forts (Sulfopropyle). La force ionique de l'échantillon ne doit pas être supérieure à celle du tampon d'élution B, il faut donc auparavant mesurer la conductimétrie de l'échantillon et des tampons. Par précaution, l'échantillon est dilué dans un grand volume d'eau (500 mL).

La colonne échangeuse de cations utilisée est une HiPrep SP FF 16/10. Elle est d'abord lavée avec 10 volumes de colonne (VC) de tampon A (Tris 20 mM ; EDTA 10 mM, pH 7) puis 10 VC de tampon B (Tris 20 mM ; EDTA 10 mM ; NaCl 1 M, pH 7), à un débit de 5 mL/min et enfin équilibrée avec 10 VC de tampon B 5 %.

L'échantillon est chargé sur la colonne. La colonne est lavée, avec le tampon B 5 % pour ôter les protéines qui ne sont pas retenues par la colonne, jusqu'à ce que l'absorbance soit nulle. La protéine peut maintenant être éluée grâce à un gradient de 5 à 50 % de tampon B en 250 mL. Des fractions d'élution de 5 mL sont collectées avec un collecteur automatique. Un détecteur UV placé après la colonne permet de mesurer l'absorbance de chaque fraction. Les fractions d'élution ayant une absorbance positive à 280 nm sont déposées sur gel SDS-PAGE 12,5 %, ainsi que la fraction non retenue et le lavage de la colonne. Celles possédant une bande correspondant au poids moléculaire de la protéine sur le gel sont analysées en HPLC avec une

colonne C18, avec un gradient 20-40 % d'acétonitrile/0,1 % TFA en 30 min (1 mL/min). Les fractions contenant la protéine d'intérêt sont purifiées sur une colonne HPLC semi-préparative. Les fractions sont peu contaminées, l'étape de purification par HPLC permet surtout d'éliminer les dernières traces de sels en vue d'une étude par RMN.

II. 3) 3) Production de la protéine marquée ^{15}N

Dans le but de réaliser des expériences RMN hétéronucléaires (^{1}H, ^{15}N), nous avons entrepris une production de la protéine ^{15}N-AhPDF1 dans la levure *Pichia pastoris*. Pour ce faire, la production est réalisée dans un blastulor de 150 mL. Le blastulor est un système mis au point à la halle de biotechnologie de l'INRA de Montpellier. La composition des milieux est en Annexe (Annexe 3).

Le système est composé de

- 32 tubes de culture avec capuche, chaque tube de 13 mL de volume total renferme 5 mL de milieu de culture.
- Un réservoir A renfermant 600 mL d'eau + 1mL $^{15}NH_3$ à 32 %, (concentration finale : 0,055 %)
- Un réservoir B renfermant 600 mL d'eau + 1mL $^{15}NH_3$ à 32 %, (concentration finale : 0,055 %) + 19,2 mL Méthanol (concentration finale : 3,2 % v/v)
- 32 tubes inox de diamètre 0,5 mm (tube HPLC) et de longueur 15 cm
- Tuyaux souples autoclavables avec 35 raccords en T ou Y
- Un filtre à air (0,45 µm)
- 4 diffuseurs d'air (crépines HPLC), 2 par réservoir
- Un débitmètre

Les levures *Pichia pastoris* sont mises en culture dans un milieu contenant

- Glycérol (20 g/L) dans un tampon phtalate pH 5,4 (100 mM)
- 100 mL/L de sels minéraux FM21 avec du sulfate d'ammonium marqué ^{15}N : $(^{15}NH_4)_2SO_4$
- 10 mL/L d'oligoéléments PTM1
- 5 mL/L D-biotine
- Antimousse 153K 10 % (v/v) 2 mL/L

Le blastulor (Figures 34 et 35) permet d'avoir des conditions se rapprochant des conditions de culture en fermenteur. Le pH est maintenu dans une gamme de valeurs compatibles avec la croissance et la production de biomasse. L'aération est améliorée par rapport à celle obtenue en erlenmeyer grâce à la dispersion de microbulles générées par un

micro tuyau d'aération. Le pH est maintenu entre 5,5 et 3,5 par entraînement d'ammoniac (0,055 %) grâce à un débit d'air de 0,0261 mL/min par tube. Au cours de l'induction, l'apport en méthanol est effectué par entraînement à partir du réservoir B, vers les tubes de culture.

L'azote marqué est apporté dans deux sources, tout d'abord sous forme de sulfate d'ammonium marqué ^{15}N qui se trouve dans le milieu de culture, puis dans l'ammoniac qui est apporté sous forme gazeuse. L'ammoniac est une source d'azote supplémentaire qui est rajoutée à celle amenée par le sulfate d'ammonium du milieu qui seule est insuffisante pour une croissance optimale des levures. Les bouteilles A et B sont placées au bain-marie afin d'évaporer et de saturer l'air en ammoniac (A) et méthanol (B) lors de l'induction.

La purification de la protéine est réalisée de la même façon que pour la protéine non marquée (voir protocole II. 3)2)).

Phase I : Production de biomasse en présence de MS glycérol

Chaque tube de 5 mL est ensemencé avec 100 µL de préculture, les tubes en inox amenant l'air sont connectés aux tubes à capuche. Les températures des bains-marie des flacons A et B sont réglées respectivement à 20 et 25 °C afin de contrôler l'évaporation. Les tubes contenant les levures sont placés dans un bain-marie à 28 °C. Le débit d'air est réglé à 0,0261 mL/min/tube, on oriente le circuit d'air uniquement vers la bouteille de solvant A (H_2O + $^{15}NH_4$). Le blastulor permet la production de biomasse, le temps de culture est de 48 h (Figure 34).

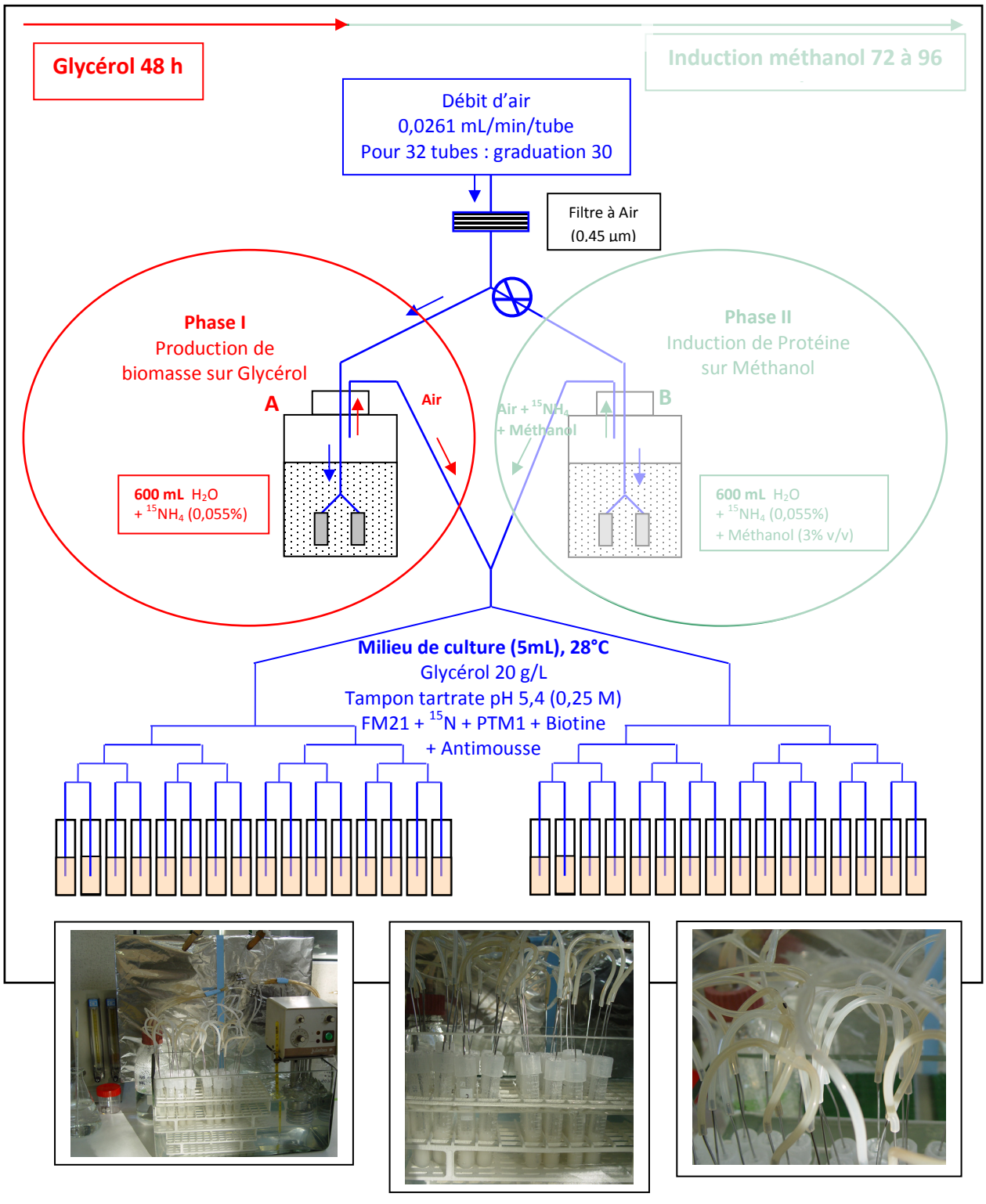


Figure 34 – Schéma de fonctionnement du blastulor (Phase I : Production de biomasse)

Phase II : Induction de la protéine en présence de MS méthanol

Après 48 h de culture, on induit la production de la protéine au méthanol. Le circuit d'air est orienté uniquement vers la voie B (H_2O + $^{15}NH_4$ + méthanol). Le changement de voie est à faire simultanément afin d'éviter une baisse de pression dans le système induisant une remontée du milieu de culture dans les tuyaux capillaires. Le temps d'induction est de 72 à 96 h en fonction de la protéine produite (Figure 35).

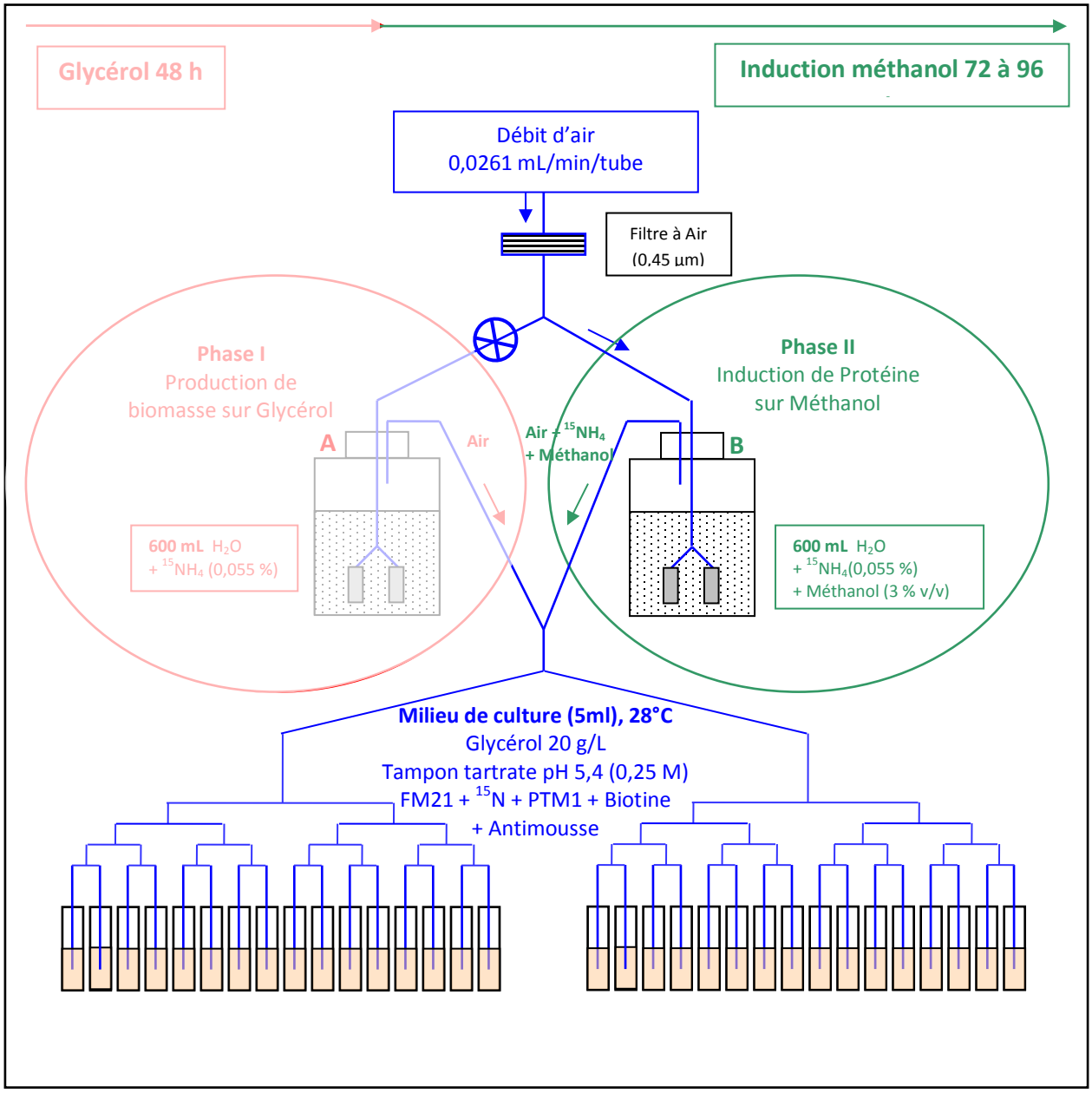


Figure 35 – Schéma de fonctionnement du blastulor (Phase II : Induction de la protéine)

III. Repliement oxydatif

La protéine obtenue par synthèse chimique ou par production dans *Escherichia coli* est à l'état réduit et lyophilisée. La protéine réduite est solubilisée dans une solution H_2O/TFA (99,9/0,1). L'étape de repliement oxydatif se fait sous argon dans un milieu réactionnel dont la composition permet de faire varier plusieurs paramètres tels que la concentration du peptide, le pH, le couple oxydo-réducteur, la présence ou non de co-solvant. La température est également un paramètre qui influe le repliement de la protéine.

Solutions à préparer :

- Solution mère de protéine réduite : 100 µM dans H_2O/TFA (99,9/0,1)
- Tampon Tris 1 M pH 8,5
- Solution de GSH 22 mM
- Solution de GSSG 2,2 mM
- Solution EDTA 0,25 M pH 7

Réactifs	Concentration finale
AhPDF1	25 µM
Tris pH 8,5	100 mM
GSSG	250 µM
GSH	2,5 mM
EDTA	1 mM
H_2O	Qsp volume final

Tableau 3 – Exemple de conditions de repliement oxydatif de la protéine AhPDF1 synthétique

Le couple oxydo-réducteur utilisé est le glutathion avec 10 fois plus de GSSG et 100 fois plus de GSH que de protéine. L'ajout d'EDTA permet de chélater les métaux en solution qui peuvent perturber le repliement. Les réactifs sont ajoutés selon l'ordre suivant : Tris, H_2O, EDTA, GSSG, AhPDF1 et GSH. Le réducteur GSH est introduit en dernier.

Des aliquots sont prélevés à différents temps pour suivre la cinétique du repliement oxydatif. Pour chaque aliquot (12,5 µM), le repliement est arrêté par ajout de TFA (Cf = 2 %). La cinétique du repliement est suivie par HPLC analytique (gradient 20-40 % d'acétonitrile en 30 min).

Les conditions les plus efficaces sont ensuite utilisées pour oxyder plusieurs mg de protéine AhPDF1. La protéine oxydée est purifiée sur une colonne HPLC semi-préparative C18 (gradient 20-28 % d'acétonitrile/0,1 % TFA en 12 min).

IV. Test d'activité antifongique

Le test antifongique a été réalisé sur le champignon filamenteux *Fusarium oxysporum f*. sp*. melonii* par nos collaborateurs de Montpellier selon le protocole déjà publié (Marquès et al., 2009). Le test est réalisé en plaque 96 puits avec des dilutions en série de 2 en 2 de la solution antifongique à tester afin de trouver la concentration minimale inhibitrice de la croissance du champignon (MIC). Chaque puit contient 90 µL d'une suspension de spores de *Fusarium oxysporum* à 10^{-4} spores/mL dans un milieu de culture Potato Dextrose Broth dilué deux fois, de la tétracycline à 20 µg/mL et 10 µL de la solution de défensine à tester.

V. Etude structurale par RMN

La résonance magnétique nucléaire (RMN) utilise la propriété des noyaux atomiques possédant un spin nucléaire non nul placés dans un champ magnétique.

V. 1) Echantillon et expériences RMN utilisées

La protéine AhPDF1 oxydée est mise en solution dans 300 µL d'un mélange de H_2O/D_2O (9/1) à pH 4,5 et une concentration finale de 1,3 mM pour AhPDF1 synthétique et 0,7 mM pour AhPDF1 issue de *Pichia pastoris*. Tous les spectres RMN de la protéine AhPDF1 synthétique ont été enregistrés sur un spectromètre VARIAN Inova 600 MHz à 25 °C et 35 °C (pour lever les ambiguïtés en cas de superposition des pics), puis traités avec NMRPipe (Delaglio et al., 1995). L'attribution et l'analyse des spectres ont été réalisées avec le logiciel CCPNMR (Vranken et al., 2005).

Dans notre étude, nous avons utilisé 4 types d'expérience RMN : des expériences homonucléaires (COSY, TOCSY, NOESY) qui n'utilisent qu'un seul type d'atome, ici l'hydrogène, et des expériences hétéronucléaires qui utilisent au moins deux types d'atomes (^{15}N et H pour le ^{15}N-HSQC et ^{13}C et H pour le ^{13}C-HSQC, enregistrés ici en abondance naturelle).

Ces séquences d'impulsions permettent d'observer certains couplages entre atomes, qui correspondent à des transferts d'aimantation : le couplage scalaire qui est transmis à travers les liaisons covalentes, et le couplage dipolaire qui se transmet à travers l'espace. Les signaux qui correspondent à ces couplages sont appelés pics de corrélation et sont identifiés par les fréquences de résonance de chacun des atomes impliqués dans le couplage :

- L'expérience COSY utilise le couplage scalaire, faisant apparaître des pics de corrélation entre deux atomes d'hydrogène reliés par moins de 3 liaisons covalentes.

- L'expérience TOCSY (temps de mélange de 80 ms pour AhPDF1 synthétique et 70 ms pour celle obtenue dans Pichia) utilise les mêmes couplages, mais le transfert d'aimantation est

relayé, permettant d'observer des couplages entre tous les atomes d'hydrogène d'un même système de spin.

- Les expériences hétéronucléaires ^{15}N-HSQC et ^{13}C-HSQC utilisent également un couplage scalaire entre les deux atomes d'une liaison N-H ou C-H. La protéine n'étant pas marquée, les spectres ^{15}N et ^{13}C-HSQC sont enregistrés en abondance naturelle.

- L'expérience NOESY (temps de mélange de 160 ms) utilise le couplage dipolaire, faisant apparaître un pic de corrélation entre deux atomes d'hydrogène proches dans l'espace, jusqu'à 5 Å.

V. 2) Attribution des déplacements chimiques de la protéine

En théorie, tous les spins nucléaires de même nature devraient avoir une fréquence de résonance identique. Cependant il existe un champ magnétique local, formé par les électrons circulant à proximité des noyaux, qui va s'additionner au champ magnétique appliqué. L'environnement chimique local de chaque atome va donc lui donner une fréquence de résonance légèrement différente de celle de son voisin. C'est cette différence, appelée déplacement chimique, que l'on va étudier pour obtenir des informations sur l'environnement des atomes. La première étape de l'analyse RMN consiste à attribuer le déplacement chimique de chaque proton de la protéine. La seconde étape consiste à attribuer l'azote lié au proton amide sur le spectre ^{15}N-HSQC et attribuer principalement les Cα sur le spectre ^{13}C-HSQC.

L'analyse des spectres permet d'attribuer le déplacement chimique de chaque atome ^{1}H, ^{15}N, ^{13}C. L'analyse du spectre TOCSY permet d'attribuer les systèmes de spin de chaque résidu. On appelle système de spin, l'ensemble des spins couplés de manière scalaire, cela correspond aux atomes ^{1}H d'un même résidu. Plusieurs acides aminés sont décrits par le même système de spins et certains acides aminés sont décrits par plusieurs systèmes de spins. Afin d'identifier la place d'un résidu dans la séquence de la protéine, on utilise les informations présentes sur le spectre NOESY. Le spectre NOESY permet d'attribuer de proche en proche les acides aminés dans la séquence. Les NOEs donnent des informations de distance entre les acides aminés voisins mais aussi éloignés dans la séquence. L'attribution de la protéine est terminée quand un déplacement chimique est affecté à chaque atome.

VI. Calcul de la structure tridimensionnelle de AhPDF1

La structure tridimensionnelle de AhPDF1 a été déterminée avec ARIA2 (Rieping et al., 2007) uniquement à partir de contraintes de distances inter-protons. Ces contraintes de distances sont obtenues par intégration des pics de corrélation NOE : l'intensité de ces pics est inversement proportionnelle à la distance qui sépare les deux protons (en $1/r^6$). Le logiciel de calcul de structure procède ensuite par itération afin de proposer un jeu de structures satisfaisant au mieux l'ensemble de ces contraintes de distances.

Chaque calcul est composé de 8 itérations, avec 500 structures initiales. Les 200 meilleures structures, en termes d'énergie de contraintes, sont conservées pour l'itération suivante, ce qui permet de mieux tenir compte des effets électrostatiques. A la 8ème itération, les 50 meilleures structures sont affinées dans l'eau, ce qui minimise les énergies et diminue les éventuels chocs stériques (Figure 36).

Les pics de corrélation NOE ont été attribués manuellement et leur intégration, pour obtenir les contraintes de distances, a été réalisée directement par ARIA. Les premiers calculs ont été réalisés à partir de contraintes intra-résiduelles et séquentielles essentiellement, puis les contraintes moyenne et longue distance ont été introduites graduellement dans les runs suivants. Les contraintes violées ont été systématiquement vérifiées et certaines ambiguïtés d'attribution ont pu être levées, aboutissant à l'attribution de la totalité du spectre NOESY.

Parmi les meilleures structures, classées par ARIA en termes d'énergie de contraintes, un jeu de 10 structures finales a été sélectionné selon les violations de contraintes résiduelles et la qualité du diagramme de Ramachandran. L'analyse et la représentation de ces structures ont été réalisées avec ProcheckNMR (Laskowski et al., 1996), Pymol (De Lano WL, 2002).

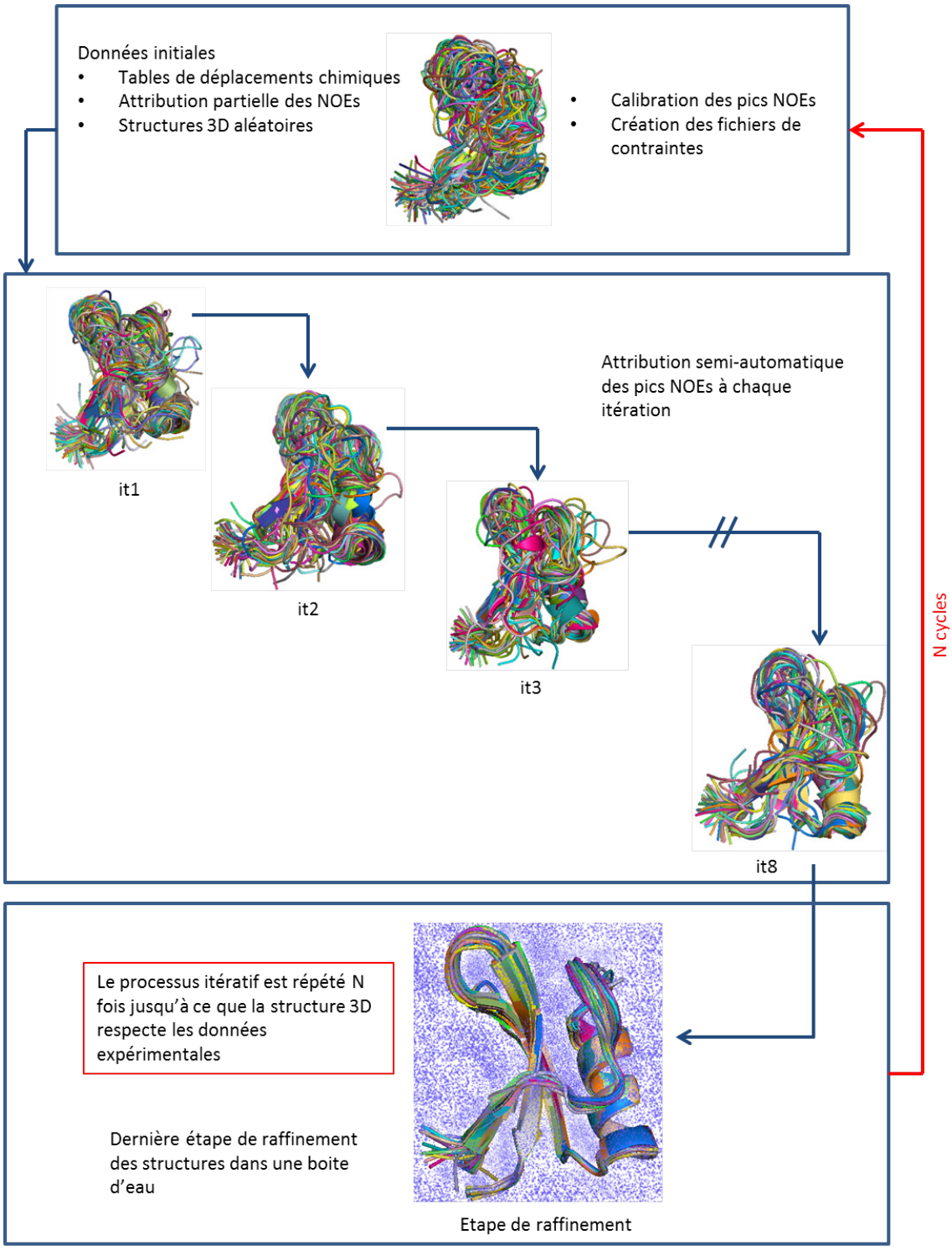


Figure 36 – Description schématique simplifiée du processus itératif ARIA utilisé pour la modélisation moléculaire de la protéine AhPDF1

RESULTATS ET DISCUSSION

Les premières structures de défensines de plantes ont été réalisées sur des protéines extraites des plantes :

- Ah-AMP1 est extraite des graines de *Aesculus hippocastanum* (marronnier) (Osborn et al., 1995)
- PsD1 est extraite des graines du pois (*Pisum sativum*) (Almeida et al., 2000)
- NaD1 est extraite des fleurs de *Nicotiana alata* (Weerden et al., 2008)
- PhD1 est extraite des fleurs de *Petunia hybrida* (Lay et al., 2003b)
- RsAFP1 est extraite à partir des graines du radis *Raphanus sativus* (Terras et al., 1992)
- VrD1 est extraite de la graine du haricot mungo (Liu et al., 2006)

Production dans *Escherichia coli*	Production dans *Pichia pastoris*
• Défensine PsDef1 du pin sylvestre (Kovaleva et al., 2011) • Lc-Def (Shenkarev et al., 2011) • Défensine de canne à sucre Def 5 (de Paula et al., 2011) • Défensine de *Vigna unguiculata* (Dos Santos et al., 2010) • Défensine PTH1 (Kovalskaya and Hammond, 2009) • Défensine de *Tephrosia villosa* (plante fleurie de la famille du pois) TvD1 (Vijayan et al., 2008) • Défensine du tournesol HaDef1 (de Zélicourt et al., 2007) • Défensine de *Trigonella foenum-graecum* (plante herbacée) Tfgd1 (Olli and Kirti, 2006) • Défensine de colza BSD1 (Park et al., 2002)	• Défensine MtDef4 et MsDef1 (Sagaram et al., 2013) • Défensine de tomate TPP3 (Lay et al., 2012) • Défensine de *Vigna radiata* VrD2 (Lin et al., 2007) • Défensine de *Pachyrrhizus erosus* (appelé pois patate) SPE10 (Song et al., 2005) • Défensine de *Vigna radiata* VrD1 (Chen et al., 2004) • Défensine de pois PsD1 (Cabral et al., 2003) • Défensine de bettrave sucrière AX2 (Kristensen et al., 1999)
• Défensine de maïs PDC1 (Kant et al., 2009)	

Tableau 4 – Méthodes de production utilisées en fonction de la défensine de plante produite

Même si la taille des défensines se prête à la RMN homonucléaire et ne nécessite donc pas de marquage, la protéine AhPDF1 ne peut pas être extraite de la plante *Arabidospis halleri*. C'est pourquoi il a fallu trouver d'autres moyens pour obtenir la protéine. Dans la littérature, on trouve deux méthodes de production des défensines de plantes : la production dans la bactérie *Escherichia coli* et la production dans la levure *Pichia pastoris*. Le Tableau 4 répertorie de manière non exhaustive les différentes défensines de plantes et leur moyen de production. On peut considérer que les deux techniques de production sont utilisées de manière équivalente.

Nous avons entrepris la production de la protéine AhPDF1 dans la bactérie *Escherichia coli*. La production dans les bactéries offre l'avantage de pouvoir obtenir une protéine marquée ^{15}N ou $^{15}N^{13}C$ pour faire des études structurales de dynamique de la protéine. En parallèle, nous avons fait de la synthèse chimique sur support solide, ce qui est accessible pour des protéines de cette taille. Cette technique permet d'introduire des cystéines marquées sélectivement, dans le but de suivre le repliement oxydatif de la protéine par RMN, c'est-à-dire l'appariement des ponts disulfure. Mais obtenir la protéine marquée ^{15}N par la synthèse chimique est inaccessible à cause de son coût élevé. Ces deux approches se complètent et permettent d'obtenir des informations différentes et complémentaires.

I. Production de la protéine AhPDF1 dans *E. coli*

I. 1) Protocole initial

Dans le cadre d'une collaboration avec l'équipe d'adaptation des plantes aux métaux dirigée par Pierre Berthomieu, je me suis rendue à l'INRA de Montpellier afin de produire et purifier la protéine AhPDF1 selon le protocole déjà publié (Figure 37) (Marquès et al., 2009) et décrit dans la partie Matériel et méthodes.

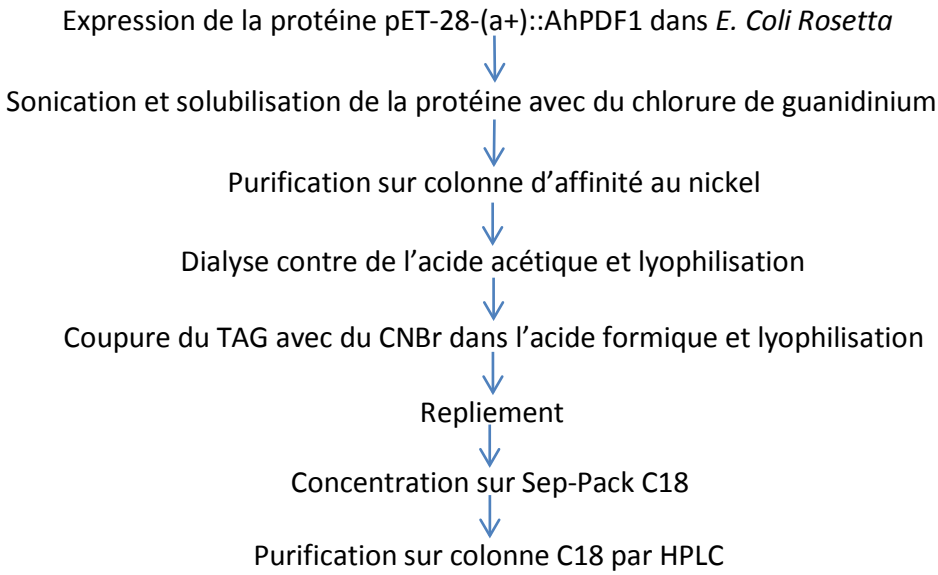


Figure 37 – Protocole initial de purification de la protéine issue de la production dans *Escherichia coli*

Dans le système de production utilisé, la protéine AhPDF1 est produite sous sa forme réduite. La protéine va adopter des conformations partiellement repliées et avoir une forte tendance à s'agréger, elle est donc stockée dans les corps d'inclusion de la bactérie *E. coli*.

En effet, de nombreuses protéines ne sont pas produites dans leur état natif, mais s'agrègent dans un état le plus souvent biologiquement inactif, appelé corps d'inclusion. Les corps d'inclusion sont des agrégats protéiques non ordonnés (Betton and Chaffotte, 2005). Le mécanisme moléculaire de l'agrégation des protéines recombinantes suggère que les chaînes polypeptidiques naissantes, adoptent des conformations partiellement repliées et instables (les intermédiaires de repliement). Les protéines peuvent ensuite se replier correctement et adopter leur forme native, ou avoir un repliement incorrect, qui conduit à l'agrégation.

La production de la protéine AhPDF1 est réalisée sur 5 L de cultures bactériennes. Les corps d'inclusion sont isolés par centrifugation après lyse cellulaire. L'étape suivante de solubilisation nécessite la dénaturation chimique complète de la protéine agrégée par des dénaturants forts comme le chlorure de guanidinium.

Puis la protéine avec son TAG riche en histidine est purifiée sur une colonne d'affinité au nickel. Après avoir chargé la protéine sur la colonne, la résine est lavée avec 10 volumes colonne de chlorure de guanidinium (6 M), NaCl (300 mM) et Tris-HCl (20 mM, pH 8). La protéine taguée est éluée en ajoutant au tampon une forte concentration d'imidazole (1 M). Le pH est abaissé à 6 afin d'éviter un repliement incorrect de la protéine et son agrégation. L'absorbance des fractions d'élution est mesurée avec la méthode de Bradford et on estime la quantité de protéine taguée à 18,54 mg (1,9 µmol).

La protéine taguée se trouve donc en solution dans le tampon d'élution contenant une concentration importante de sels, le milieu est dialysé contre un mélange H_2O/acide acétique (95/5) et lyophilisé. Le lyophilisat est repris dans un mélange H_2O/acide formique (1/4) en présence de bromure de cyanogène afin d'effectuer la coupure du TAG de la protéine.

Le mélange contenant la protéine AhPDF1 (et les petits morceaux du tag-histidine) est lyophilisé, repris dans un tampon Tris-HCl à pH 7 et abandonné plusieurs heures à température ambiante afin que la protéine se replie. Or, en ne faisant pas un repliement oxydatif, on ne peut pas contrôler le repliement et on obtient un mélange de plusieurs formes avec des ponts intra et intermoléculaires.

La protéine est concentrée sur une colonne Sep-Pack C18. On obtient deux fractions d'élution : une fraction d'élution avec H_2O/acétonitrile (8/2) et 0,1 % TFA (4 mL) et une fraction avec H_2O/acétonitrile (4/6) et 0,1 % TFA (4 mL). On mesure l'absorbance à 280 nm des fractions (Tableau 5).

Fractions	Absorbance (280 nm)	Concentration (mg/mL)	Quantité (mg)	Quantité (µmol)
20 % MeCN	0,28	0,18	0,72	0,1
60 % MeCN	0,82	0,55	2,2	0,4

Tableau 5 – Absorbance, concentration et quantité de protéine absorbant à 280nm de chaque fraction d'élution de la colonne Sep-Pack

Au total, on ne récupère que 2,92 mg (0,5 µmol) de protéine. Ces fractions sont analysées sur une colonne HPLC analytique C18 avec un gradient 20 à 40 % d'acétonitrile/0,1 % TFA en 30 min. Les pics sont collectés et analysés en spectrométrie de masse (MALDI-TOF) pour déterminer leur masse exacte.

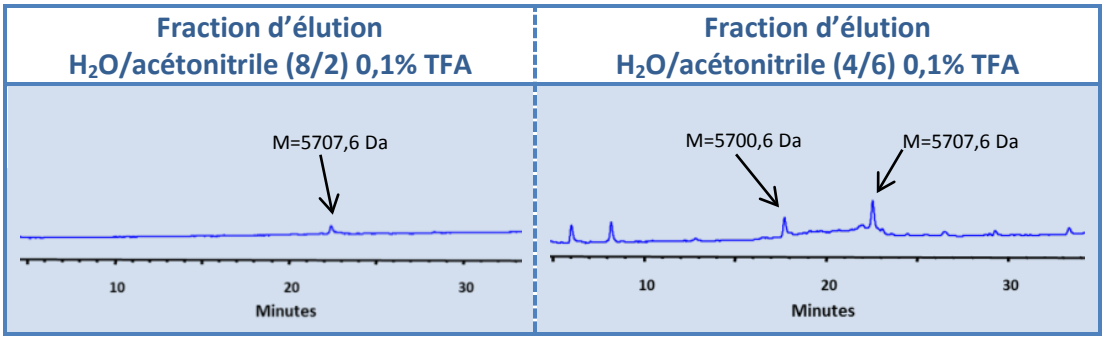


Figure 38 – Analyse des fractions d'élution de la colonne Sep-Pack sur une colonne HPLC analytique C18 avec un gradient de 20 à 40 % d'acétonitrile/0,1 % TFA en 30 min. Les chromatogrammes présentés ont la même échelle

La protéine AhPDF1 sous sa forme réduite (M=5707,6 Da) est présente en faible quantité dans les deux fractions d'élution. De plus dans la fraction d'élution avec 60 % d'acétonitrile, on observe également de la protéine oxydée (M=5700,6 Da) (Figure 38). La forte absorbance à 280 nm de cette fraction est probablement due à la présence d'autres protéines.

La protéine contenue dans la fraction avec 60 % d'acétonitrile est soumise à un repliement oxydatif dans les conditions optimales décrites dans la partie Matériel et méthodes (voir III).

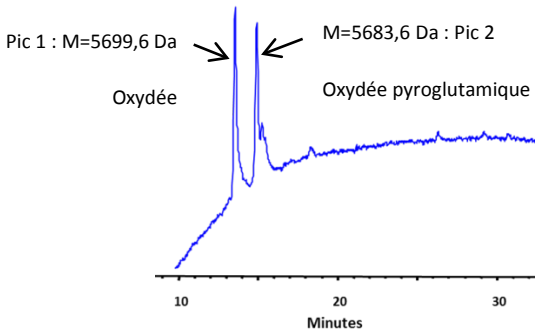


Figure 39 – Chromatogramme HPLC de la protéine AhPDF1 oxydée sur une colonne HPLC C18 avec un gradient de 20 à 40 % d'acétonitrile/0,1 % TFA en 30 min. Les masses correspondantes aux pics sont reportées

On obtient 2 pics correspondant à la protéine totalement oxydée (c'est-à-dire avec les 4 ponts disulfure) où le premier acide aminé se trouve sous la forme glutamique ou pyroglutamique (Figure 39).

Dans les plantes, il existe une enzyme appelée la glutaminyl cyclase qui cyclise la glutamine placée en position N-terminale en pyroglutamine. *In vitro* la pyroglutamine se forme spontanément au cours du temps (Figure 40).

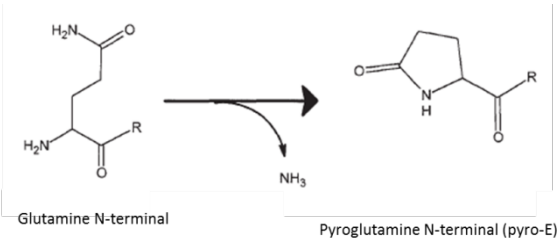


Figure 40 – Schéma de la formation de la pyroglutamine (extraite de Dick et al., 2007)

A la fin du repliement, le volume réactionnel est concentré en vue de sa purification sur une colonne HPLC. Lors de la concentration à l'aide d'un évaporateur rotatif, un précipité blanc apparaît, qui se solubilise partiellement dans un tampon Tris-HCl 1 M pH 8,5. Une analyse par spectroscopie de masse du précipité montre que parmi les contaminants à petits poids moléculaires, se trouve la protéine où seulement 3 des 4 ponts (M=5684,9 Da) sont formés, et une extrémité pyroglutamine. Ce contaminant a dû être entrainé par la précipitation des autres contaminants présents en solution.

Le surnageant est purifié sur une colonne HPLC semi-préparative C18. Les pics 1 et 2 collectés peuvent ensuite être rassemblés parce que la forme glutamique évolue lentement en forme pyroglutamique. Le mélange est lyophilisé (100 µg) puis resuspendu afin de l'analyser sur une colonne HPLC analytique C18 (Figure 41).

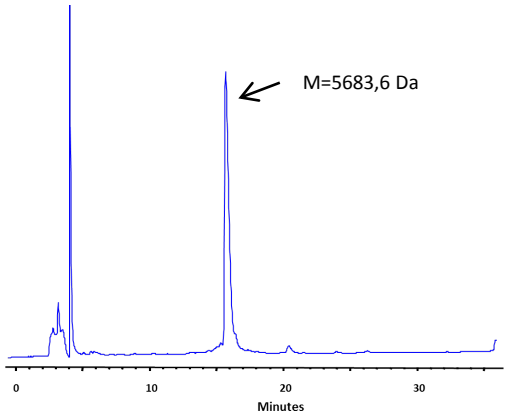


Figure 41 – Chromatogramme HPLC du produit oxydé purifié sur une colonne analytique C18 avec un gradient de 20 à 40 % d'acétonitrile/0,1 % TFA en 30 min

L'analyse sur une colonne analytique HPLC C18 montre un pic majoritaire (Figure 41) correspondant à la protéine oxydée avec le premier résidu sous sa forme pyroglutamique. A partir des 5 L de culture, on obtient environ 100 µg de protéine pure oxydée. Ce rendement est très faible.

Un spectre RMN 1D-^{1}H est enregistré (Figure 42), mais il n'y a pas suffisamment de signal pour enregistrer un spectre TOCSY.

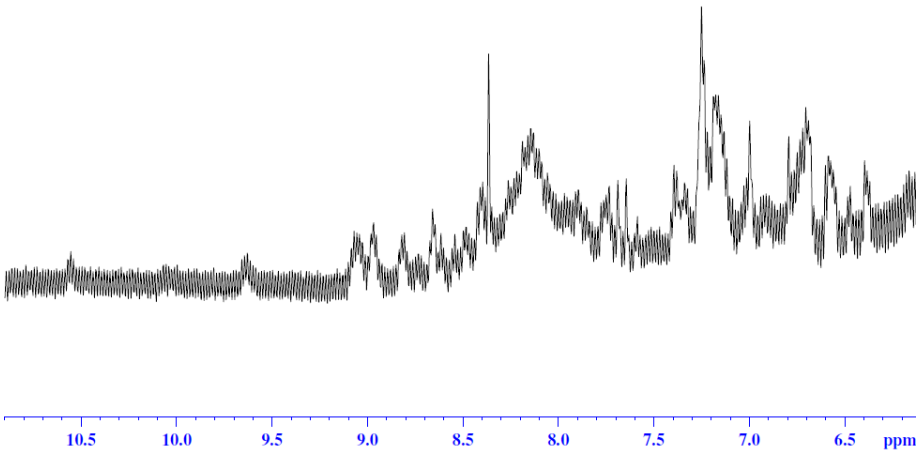


Figure 42 – Spectre 1D ^{1}H de la protéine AhPDF1 (0,05mM) issue de la production dans la bactérie *Escherichia coli* (Varian 600 MHz, pH 4,5, 25 °C)

Etant donné la très faible quantité de protéine présente dans les fractions d'élution de la colonne Sep-Pack, nous avons analysé la fraction non retenue par HPLC.

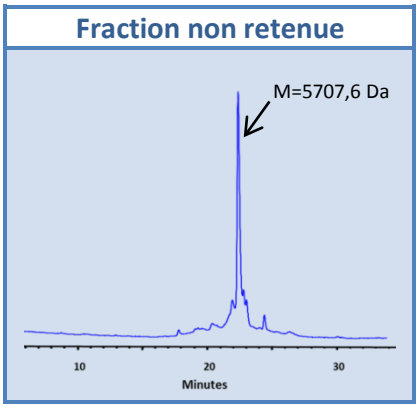


Figure 43 – Analyse de la fraction non retenue de la colonne Sep-Pack sur une colonne HPLC analytique C18 avec un gradient de 20 à 40 % d'acétonitrile/0,1 % TFA en 30 min

Le chromatogramme HPLC montre un pic majoritaire correspondant à la protéine AhPDF1 réduite (Figure 43). La protéine réduite semble ne pas être retenue par la colonne Sep-Pack dans les conditions utilisées. Nous avons essayé de purifier cette fraction mais sans succès. En effet lors de l'augmentation du pH, un précipité apparaît peut-être à cause de la formation de ponts intermoléculaires. Malgré l'ajout de réducteur comme le TCEP, le précipité ne s'est pas resolubilisé. Le traitement du surnageant s'est avéré impossible du fait d'une constante précipitation.

La colonne Sep-Pack ne permet pas de concentrer la protéine comme nous le pensions parce que cette dernière n'est pas retenue par la colonne lorsqu'elle est sous sa forme réduite. De plus la protéine est difficile à manipuler lorsqu'elle est à l'état réduit, elle est très sensible aux variations de pH qui induisent la formation de ponts intermoléculaires.

I. 2) Améliorations apportées

Le protocole initial ne donnant pas assez de protéine oxydée et pure pour faire des études par RMN (100 µg/5 L de culture), il a fallu l'optimiser en réduisant le nombre d'étapes de purification.

Le début du protocole initial est conservé jusqu'à l'étape de la purification sur une colonne d'affinité au nickel. La protéine solubilisée des corps d'inclusion est chargée sur une colonne de Nickel. La résine est lavée avec deux tampons de lavage (50 mM Tris HCl pH 8 ; 150 mM NaCl ; 6 M GuCl ; 1 mM PMSF ; 10 mM et 20 mM imidazole). Des essais ont été réalisés afin de trouver la concentration d'imidazole nécessaire à l'élution de la protéine AhPDF1 en testant plusieurs niveaux de concentrations d'imidazole : 50, 100, 250 et 500 mM. Les différents essais ont montré que la protéine était décrochée de la résine avec un tampon d'élution contenant au minimum 100 mM d'imidazole.

Lors de cette étape de purification, on collecte une fraction d'élution (40 mL). On vérifie l'absorbance de cette fraction à 280 nm. On estime la quantité de protéine obtenue à environ 19,77 mg (2,1 µmol) de protéine taguée à partir de 5 L de culture.

Au lieu de faire l'étape supplémentaire de dialyse contre de l'acide acétique, la coupure au bromure de cyanogène est faite directement dans le tampon d'élution contenant du chlorure de guanidinium et de l'imidazole (Andreev et al., 2010) (décrit dans Partie 2 – Matériel et Méthodes). L'acide chlorhydrique (8 M) et le bromure de cyanogène (5 M) sont ajoutés au milieu afin d'obtenir une concentration finale en HCl de 0,3 M et de 500 équivalents de CNBr. Le mélange est laissé sous agitation à l'abri de la lumière pendant la nuit. Après lyophilisation, le lyophilisat est resuspendu dans 35 mL de volume final (27,5 mL H_2O + 7,5 mL isopropanol). L'isopropanol diminue l'agrégation des protéines en inhibant leurs interactions intermoléculaires. Afin d'éliminer le chlorure de guanidinium, le milieu est dialysé sur une membrane de 1 kDa contre une solution de Tris-HCl 100 mM pH 7 et isopropanol (3/1). Des essais préliminaires de dialyse sans isopropanol ont été réalisés mais la protéine précipitait. De plus on s'affranchit du passage sur la colonne Sep-Pack C18. Après la dialyse, on vérifie la coupure du TAG par spectroscopie de masse (Figure 44). L'analyse par spectrométrie de masse montre la présence de la protéine oxydée (3 ponts) et d'éléments de plus petits poids moléculaires qui correspondent à des morceaux du TAG.

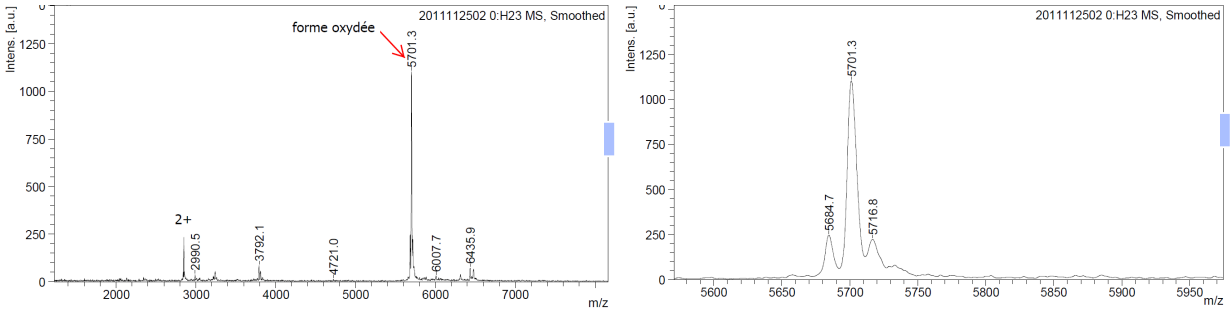


Figure 44 – Spectre de masse de la protéine AhPDF1 après la coupure du TAG

On contrôle également par HPLC la coupure du TAG. On obtient un massif avec deux pics majoritaires (Figure 45), correspondant à la protéine réduite sous sa forme glutamique et pyroglutamique.

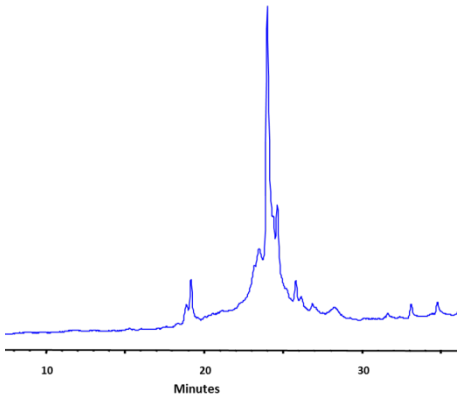


Figure 45 – Chromatogramme HPLC de la protéine réduite (ajout de TCEP) obtenue après la coupure du TAG sur une colonne C18 avec un gradient 20 à 40 % d'acétonitrile en 30 min

A partir des 5 L de cultures bactériennes, on obtient environ 400 µg de protéine. Nous pouvons donc proposer ce protocole optimisé (Figure 46) qui permet de diminuer le nombre d'étapes de purification et donc les pertes de protéine.

Expression de la protéine pET-28-(a+)::AhPDF1 dans *E. Coli Rosetta*
↓
Sonication et solubilisation de la protéine avec du chlorure de guanidinium
↓
Purification sur colonne d'affinité au nickel
↓
Coupure du TAG avec du CNBr dans le chlorure de guaninidium et lyophilisation
↓
Dialyse contre Tris/iPrOH (75/25)
↓
Repliement oxydatif
↓
Purification sur colonne HPLC C8

Figure 46 – Nouveau protocole de purification optimisé

Malgré les améliorations apportées, le rendement reste encore trop faible pour pouvoir réaliser nos études par RMN. C'est pourquoi nous nous sommes également tournés vers un autre système biologique pour avoir la protéine marquée ^{15}N : la levure *Pichia pastoris*. Il sera décrit dans la section V (p112), après la production par synthèse peptidique.

Nous allons maintenant nous intéresser à la synthèse de la protéine par voie chimique qui, rappelons-le, nous offre l'avantage d'obtenir une protéine avec des cystéines marquées sélectivement. Nous commençons par réaliser une synthèse classique de la protéine AhPDF1.

II. Synthèse peptidique de la protéine AhPDF1

II. 1) Protocole

J'ai effectué la synthèse chimique de la protéine AhPDF1 dans l'équipe Chimie des Protéines de Synthèse, dirigée par Agnès Delmas, au CBM.

Pour réaliser la synthèse de la protéine, la synthèse peptidique en phase solide (SPPS) avec la stratégie Fmoc/tBu actuellement la plus utilisée a été retenue. Elle présente l'avantage d'éviter l'utilisation de l'acide fluorydrique (HF) nécessaire pour la coupure du peptide lors de l'utilisation de la stratégie Boc/Bzl. De plus, l'adduit dibenzofulvène-pipéridine formé lors de l'étape de déprotection des α-NH_2 peut être dosé par UV et ainsi, donner une information sur le rendement du couplage de l'acide aminé. Etant donné la taille de la protéine (51 acides aminés), nous avons choisi d'utiliser une résine polaire constituée de polyéthylène glycol (PEG) et fonctionnalisée avec des groupements aminométhyl (Aminomethyl-ChemMatrix®). Le bras acide méthylphénoxy propionique (MPPA) choisi dans un premier temps est un bras de type « Wang » qui permet un décrochage du peptide en présence d'acide trifluoroacétique (TFA). Les groupements protecteurs des chaînes latérales doivent être stables aux traitements à la pipéridine nécessaire pour libérer les α-NH_2 et être éliminés, simultanément au décrochage du peptide, par l'acide trifluoroacétique (TFA).

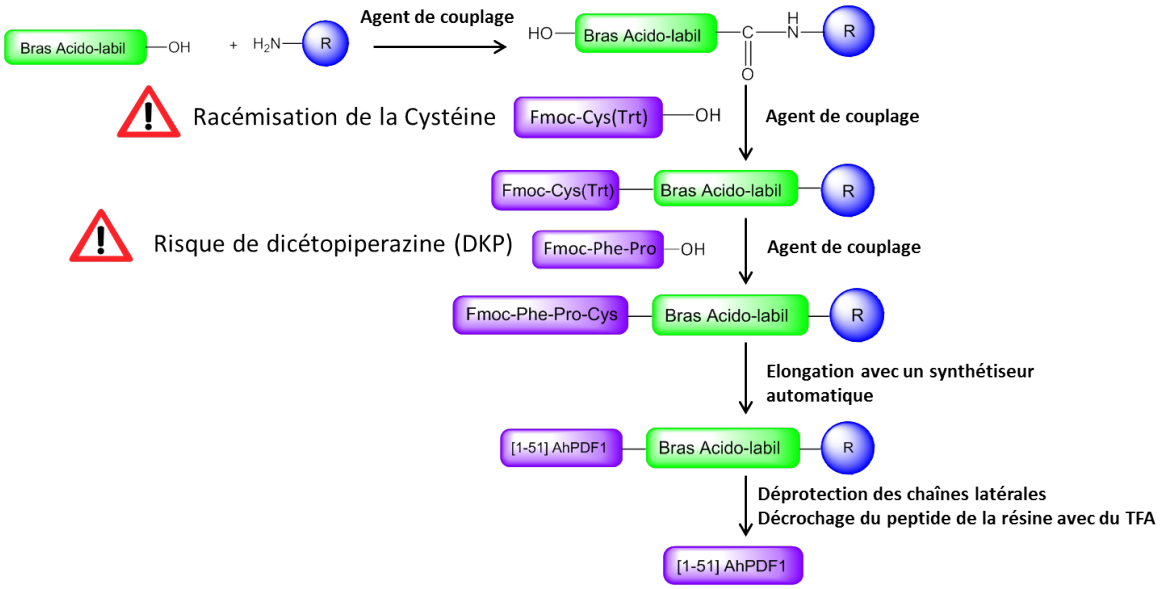


Figure 47 – Protocole de la synthèse peptidique de la protéine AhPDF1

Le synthétiseur utilisé est un Applied 433A. Il effectue l'élongation (enchaînement successif des acides aminés) de manière automatique en présence de 10 équivalents d'acides aminés, 10 équivalents d'agents de couplage et 20 équivalents de diisopropylethylamine (DIEA). Il est équipé d'un détecteur UV permettant d'estimer la quantité de Fmoc libérée après chaque étape de déprotection de l'α-NH_2. Le résultat obtenu à la fin de la synthèse permet une évaluation de la qualité de l'élongation. Bien que la synthèse se fasse de l'extrémité C-terminale vers l'extrémité N-terminale, la numérotation conventionnelle est conservée (1 pour l'acide aminé N-terminal, 51 pour l'acide aminé C-terminal).

Etant donné les spécificités de la séquence C-terminal, la stratégie de synthèse décrite dans la Figure 47 a été choisie.

II. 1) 1) Préparation manuelle du produit de départ : Fmoc-Phe-Pro-Cys(Trt)-MPPA-ChemMatrix®

- Tout d'abord le bras MPPA (3 équivalents) est fixé sur la résine Aminomethyl-ChemMatrix® (1 équivalent) en présence de 3 équivalents d'hexafluorophosphate de 2-(1H-7-azabenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetraméthylaminium (HATU) et de 6 équivalents de DIEA dans 30 mL de NMP (Figure 48). L'HATU est un activateur puissant de carboxyle (COOH).
  Après 3 h de réaction et des lavages de la résine, un test de Kaiser négatif indique que tous les NH_2 de la résine ont réagi soit un rendement de la réaction proche de 100%.

- L'accrochage de l'acide aminé par estérification sur le MPPA-ChemMatrix® est une réaction difficile à double titre. En effet, elle doit être effectuée manuellement en milieu parfaitement anhydre et les risques de racémisation du carbone asymétrique de l'acide aminé sont importants, notamment lorsqu'il s'agit de l'histidine et de la cystéine. Le Fmoc-Cys(Trt)-OH (5 équivalents) est fixé en utilisant du 1-(mesitylène-2-sulfonyl)-3-nitro-1H-1,2,4-triazole (MSNT, 5 équivalents) comme activateur et du 1-méthylimidazole (3,75 équivalents) dans du DCM pendant 2 h, ce sont des conditions décrites dans la littérature comme étant peu épimérisantes (Blankemeyer and Menge, 1990) (réalisé par Dominique Lelièvre, CBM).

  Pour mesurer le rendement de la réaction, on dose l'adduit dibenzofulvène-pipéridine obtenu après un traitement à la pipéridine effectué sur un aliquot de résine pesé précisément. On obtient un rendement d'estérification de 96 %. Pour bloquer les OH résiduels, un traitement avec de l'anhydride benzoïque a été effectué.

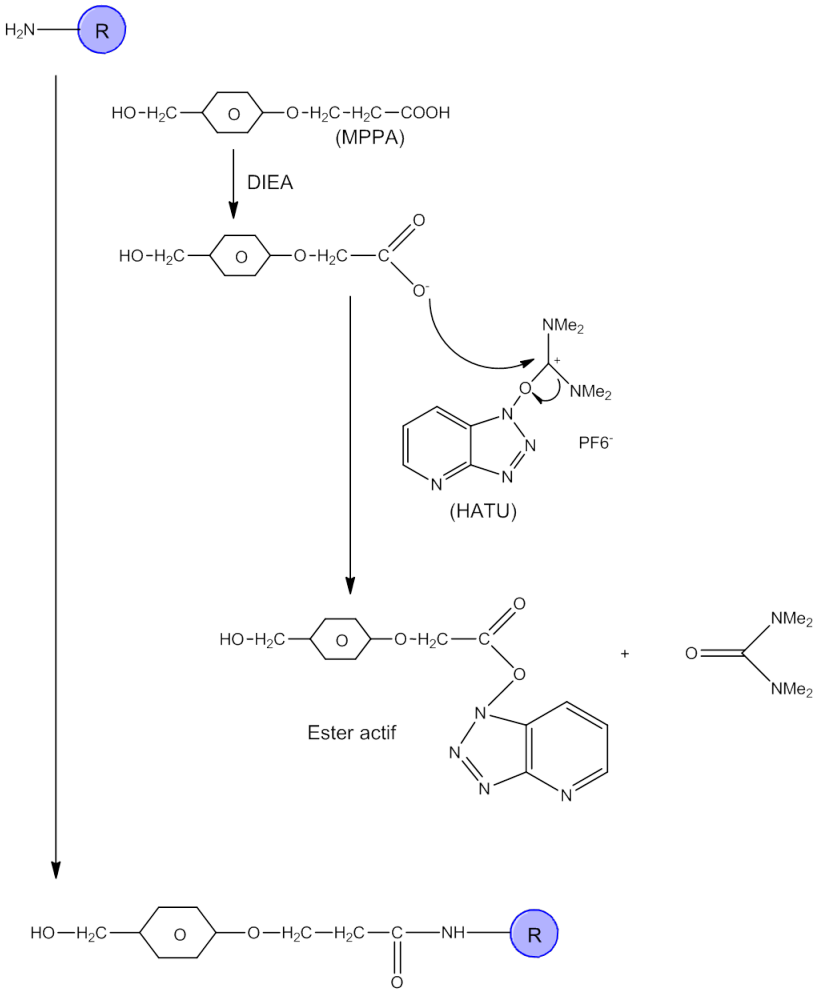


Figure 48 – Schéma de fixation du bras MPPA sur la résine

- Pour éviter la formation de dicétopiperazine (Dkp pour diketopiperazine), réaction secondaire importante lorsqu'une proline est en position C ou C-1 terminal (Figure 49), le dipeptide commercial Fmoc-Phe-Pro est couplé manuellement dans des conditions identiques à un couplage de Fmoc-acide aminé réalisé sur le synthétiseur (Figure 50). En effet, la proline favorise la cyclisation du dipeptide Pro-XX ou XX-Pro provoquant un décrochage prématuré du dipeptide. Un test de Kaiser négatif indique un rendement de la réaction proche de 100 %.

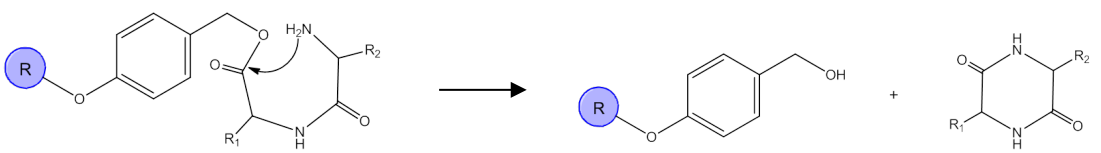


Figure 49 – Schéma de formation de la dicétopiperazine

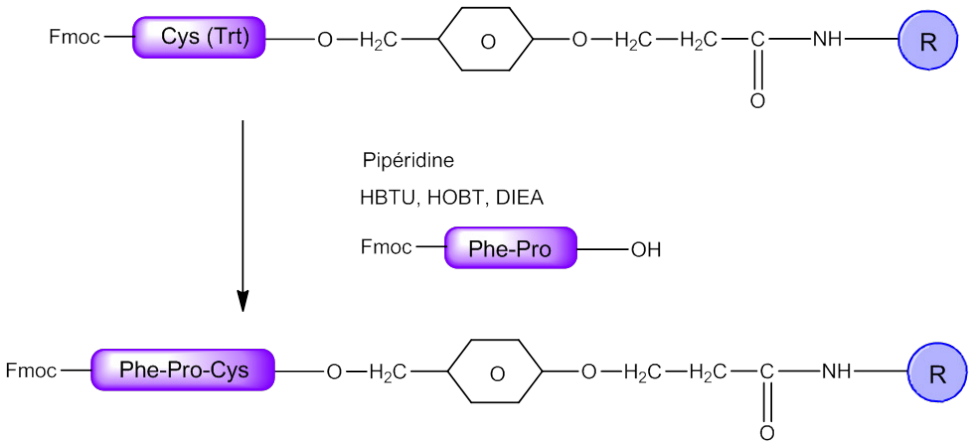


Figure 50 – Schéma du couplage du dipeptide Phe-Pro sur le MPPA-résine

Un aliquot du Fmoc-Phe-Pro-Cys(Trt)-MPPA-résine a été prélevé et soumis à un traitement TFA. Le produit Fmoc-Phe-Pro-Cys a été analysé sur une colonne HPLC C18 avec un gradient de 15 à 40 % d'acétonitrile/0,1 % TFA en 40 min. Le chromatogramme montre la présence d'un seul pic, ce qui semble indiquer l'absence d'épimérisation. Cependant, des études fines sur l'épimérisation du couplage de la cystéine ont été effectuées après la synthèse de la protéine AhPDF1 et ont montré un taux d'épimérisation de 30 %. Une explication possible de la présence d'un pic unique sur le chromatogramme HPLC du Fmoc-tripeptide serait que le Fmoc-Phe-Pro-(L)Cys et le Fmoc-Phe-Pro-(D)Cys ne sont pas séparés dans le gradient utilisé.

II. 1) 2) Elongation

L'étape d'élongation (ajout des acides aminés 48 à 1) est réalisée avec 0,1 mM de Fmoc-Phe-Pro-Cys(Trt)-MPPA-ChemMatrix® à l'aide d'un synthétiseur automatique en utilisant un programme standard légèrement modifié pour tenir compte des propriétés de gonflement de la ChemMatrix®. Un simple couplage par acide aminé et une étape d'acétylation après chaque couplage sont effectués. L'acide aminé N-terminal a été introduit sous la forme pyroglutamique. L'histogramme constitué à partir de l'enregistrement des dosages successifs de l'adduit dibenzofulvène-pipéridine montre une élongation de bonne qualité.

II. 1) 3) Décrochage du peptide de la résine

Pour piéger les carbocations très réactifs formés lors du traitement acide utilisé pour le décrochage et la déprotection des chaînes latérales, des agents piégeants sont ajoutés au TFA dans les proportions suivantes : TFA/phénol/H_2O/TIS (88/5/5/2). Le TIS est un réducteur qui diminue la durée de vie des carbocations et diminue le risque d'oxydation des méthionines et

des cystéines. Après précipitation à l'éther, le produit brut est récupéré par centrifugation, séché et pesé.

Le produit brut est analysé par HPLC (Figure 51) et les pics obtenus sont caractérisés par spectrométrie de masse. Les composés correspondants aux 2 pics principaux possèdent la masse attendue (M=5683,6 Da).

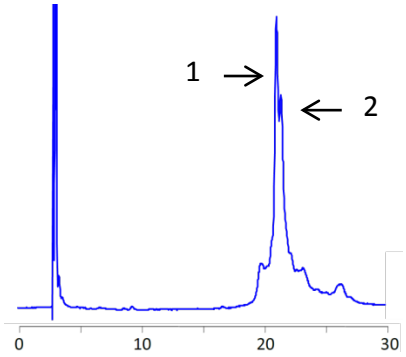


Figure 51 – Chromatogramme HPLC du produit brut réduit sur une colonne C18 analytique avec un gradient de 20 à 40 % d'acétonitrile/0,1 % TFA en 30 min

Plusieurs expériences ont été réalisées afin d'éliminer certaines hypothèses pouvant expliquer la présence de deux pics HPLC possédant une masse identique (équilibre conformationnel, N→O shift, etc). L'hypothèse probable est que le produit 2 correspond majoritairement à la protéine comportant une D-cystéine en position C-terminale. Cette hypothèse est d'autant plus vraisemblable que des études fines, réalisées après la synthèse de la protéine AhPDF1, avec le produit Cys(Trt)-MPPA-ChemMatrix® ont montré une épimérisation de 27 % de la cystéine.

Lors de la purification par HPLC utilisant une colonne semi-préparative, les 2 pics sont collectés indépendamment. La pureté du pic 1 collecté est analysée par HPLC sur une colonne C18 analytique dans le même gradient que pour l'analyse du produit brut.

Le rendement global de la synthèse (élongation, décrochage, purification) est évalué à 9 %. Ceci est un rendement correct pour une synthèse chimique d'un peptide d'une cinquantaine d'acides aminés.

II. 2) Améliorations apportées

Suite aux problèmes d'épimérisation identifiés à la fin de la première synthèse, une deuxième synthèse a été effectuée avec un bras Trityl (Trt). Dans ce cas, la réaction pour fixer l'acide aminé C-terminal sur le composé Trt-résine ne doit pas générer d'épimérisation sur le carbone asymétrique. Le composé H-Cys(Trt)-TRT-ChemMatrix® est commercialisé.

De plus ce bras minimise la formation de dicétopiperazine du fait de l'encombrement stérique du groupement trityl. Le produit H-Cys-(Trt)-ChemMatrix® a été directement introduit dans le réacteur du synthétiseur et l'élongation (ajout des acides aminés 50 à 1) a été effectuée dans des conditions semblables à la première synthèse mis à part l'utilisation de 2-(6-chloro-1H-benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tétraméthylaminium hexafluorophosphate (HCTU) comme activateur à la place du couple HBTU/HOBT. Avant le couplage du dernier acide aminé, la résine a été séparée en deux. Une moitié a été couplée avec l'acide pyroglutamique comme pour la première synthèse et l'autre moitié avec de l'acide glutamique dans le but de faire des études sur l'influence de l'acide aminé N-terminal sur le repliement oxydatif de la protéine. Les deux composés ont été analysés, caractérisés et purifiés de la même manière que pour la protéine obtenue lors de la première synthèse. Le chromatogramme obtenu (Figure 52) est très similaire à celui obtenu lors de la première synthèse. Etonnamment une analyse par spectrométrie de masse a montré que les 2 pics possèdent une masse identique (Figure 53). On retrouve donc un pic équivalent au pic 2 (Figure 52) dans une proportion de 26%. Cette valeur élevée peut s'expliquer par des racémisations partielles des différentes cystéines lors des couplages avec l'HCTU au cours de l'élongation.

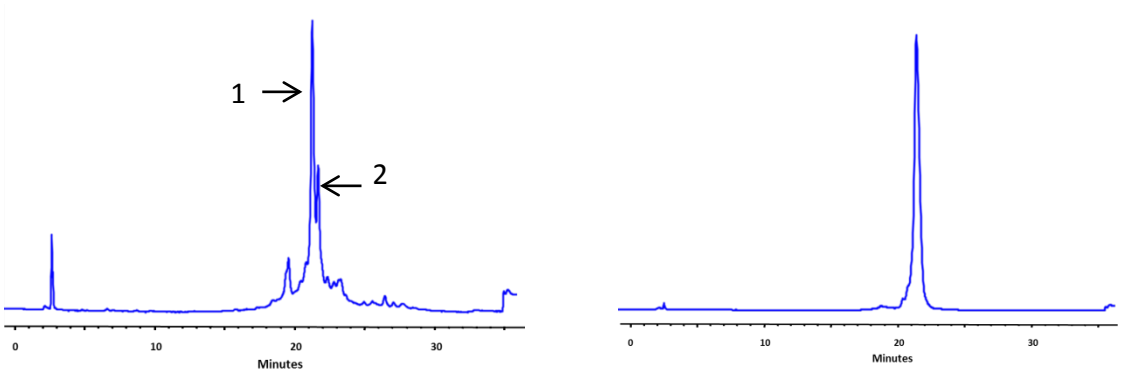


Figure 52 – Chromatogrammes HPLC de la protéine AhPDF1 obtenue avec l'utilisation de la résine Trytil (Colonne C18 avec un gradient de 20 à 40 % d'acétonitrile/0,1 % TFA en 30 min). Chromatogrammes HPLC du produit brut (gauche) et purifié (pic 1) (Colonne C18 avec un gradient de 20 à 40 % d'acétonitrile/0,1 % TFA en 30 min)

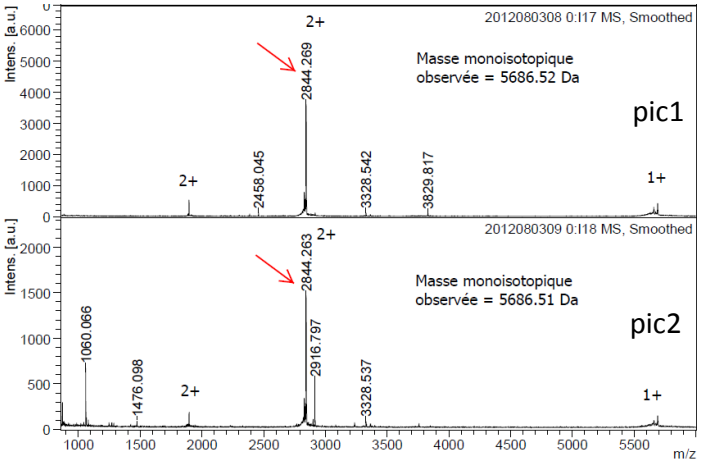


Figure 53 – Spectre de masse MALDTI-TOF des pics 1 et 2 collectés par HPLC

Le rendement global de la synthèse (élongation, décrochage, purification) est évalué à 11 %. Le rendement est légèrement amélioré par rapport à la synthèse précédente.

III. Repliement oxydatif

Les protéines riches en cystéines forment généralement des ponts disulfure intramoléculaires. Les ponts disulfure intramoléculaires sont importants pour la fonction et/ou la stabilité des protéines.

Les ponts disulfure au sein des protéines ont plusieurs rôles :

- Ils permettent d'influencer la thermodynamique des protéines, en effet ils stabilisent la conformation native de la protéine en diminuant l'entropie de la forme dépliée.
- Ils maintiennent l'intégrité des protéines. En stabilisant la structure, les ponts disulfure protègent la protéine contre les enzymes.
- Ils peuvent également jouer un rôle dans la fonction de la protéine, selon l'état d'oxydation des cystéines, la protéine pourra être active ou non par exemple.

Chez les procaryotes et eucaryotes, la formation des ponts disulfure (oxydation et les étapes de réappariement) est catalysée exclusivement dans les compartiments extra cytoplasmiques. Chez les eucaryotes, le repliement des protéines et la formation des ponts disulfure sont des processus qui se produisent de manière co- et post-traductionnelle dans le réticulum endoplasmique (RE). Les protéines sont synthétisées par le ribosome dans le RE qui est le site de modification post-traductionnelle des protéines sécrétées et membranaires (Figure 54). La formation d'un pont disulfure à partir des groupements thiols de deux cystéines nécessite le retrait de deux électrons, par conséquent, les ponts disulfure ne peuvent pas se former spontanément. Un oxydant est nécessaire pour jouer le rôle d'accepteur d'électrons. Dans des

conditions aérobies, l'accepteur d'électrons est généralement l'oxygène, mais l'oxygène seul n'est pas suffisant pour l'oxydation des thiols de la protéine *in vivo*. Par conséquent, il est nécessaire d'avoir une molécule jouant le rôle d'oxydo-réducteur tel que le couple ascorbate/déshydroascorbate ou GSH/GSSH qui permet le transfert des électrons à partir de la lumière du RE (Bánhegyi et al., 2003).

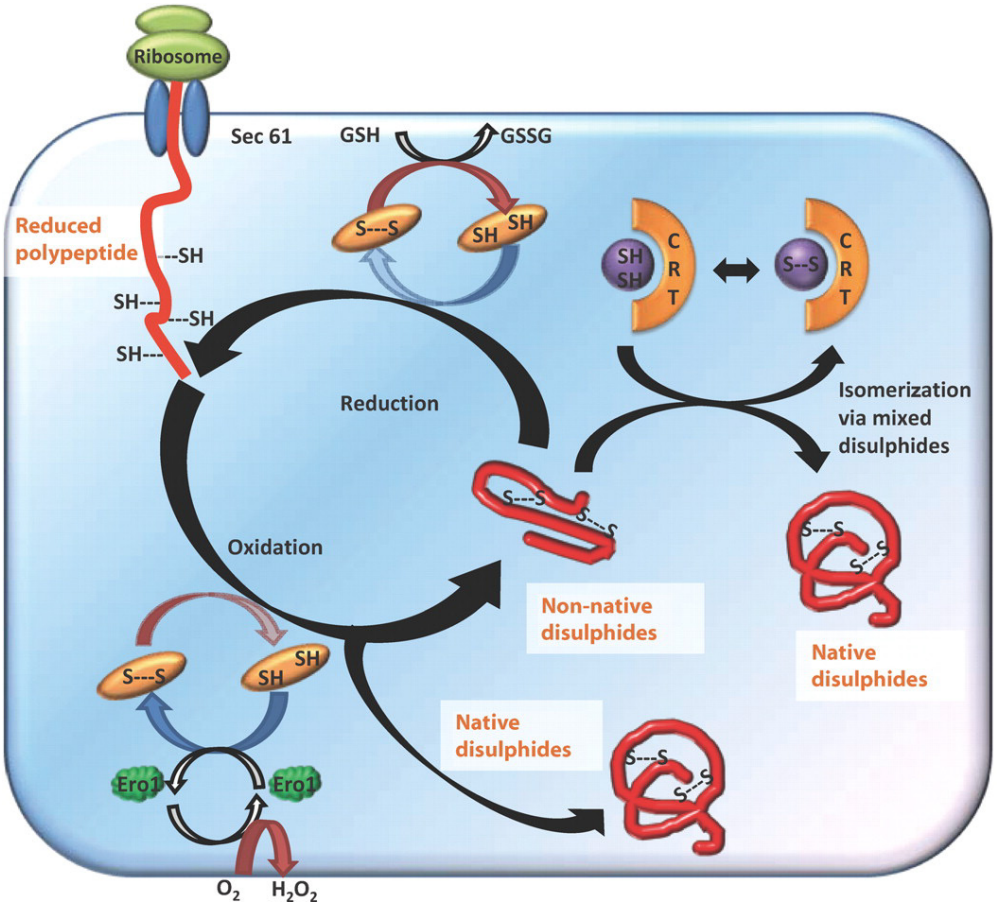


Figure 54 – Schéma représentatif du repliement oxydatif des protéines au sein du réticulum endoplasmique. Ero1 est une oxydoréductase qui catalyse la formation et l'isomérisation des ponts disulfure des protéines. La CRT (calreticuline) est une protéine chaperonne qui permet le maintien des protéines non totalement repliées dans le réticulum endoplasmique. Sec61 est une protéine membranaire qui permet l'entrée des protéines dans le RE (Oxford University Press, 2013)

La structure native de la protéine avec ses ponts disulfure est le résultat d'un processus complexe de réactions d'oxydations (formation de ponts disulfure), de réductions (cassure des ponts disulfure) et de réarrangements des ponts.

L'oxydation, la réduction et le réappariement des ponts sont basés sur une réaction d'échange thiol/disulfure. Cet échange passe par un état de transition dans lequel la charge négative est délocalisée sur les trois atomes de soufre (Figure 55) (Narayan et al., 2000).

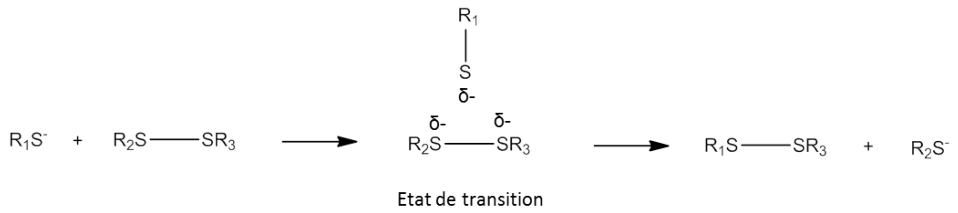


Figure 55 – Schéma d'un réappariement des ponts disulfure qui passe par un état de transition (δ, la charge)

Les ponts disulfure des protéines sont formés et réduits par deux réactions d'échange de thiol/disulfure à l'aide d'un agent oxydo-réducteur. La première est la formation d'une liaison disulfure mixte entre la protéine et le glutathion (Figure 56) (Narayan et al., 2000).

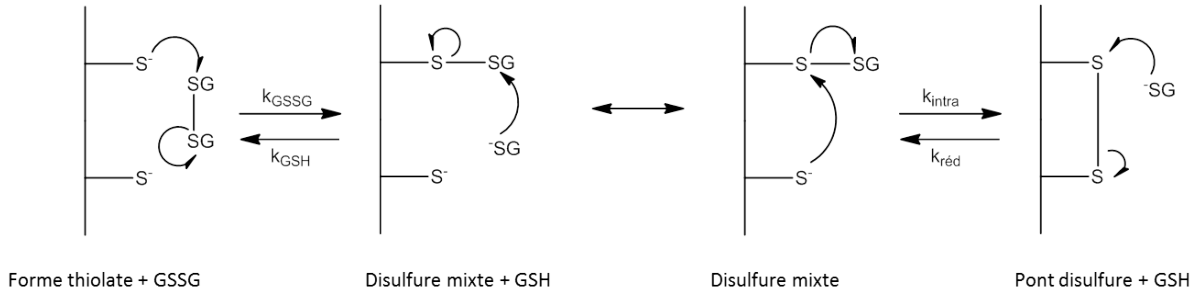


Figure 56 – Schéma du principe de formation d'un pont disulfure à l'aide d'un couple oxydo-réducteur GSH/GSSG

La deuxième est la réaction d'échange de thiol/disulfure qui peut également se produire de manière intramoléculaire, par exemple, un anion thiolate d'une cystéine de la protéine peut attaquer un pont disulfure de la même protéine et engendrer un réappariement du pont disulfure (Figure 57) (Narayan et al., 2000).

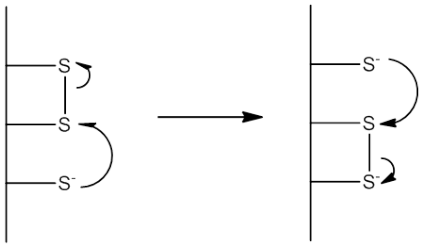


Figure 57 – Schéma du principe d'échange de ponts disulfure intramoléculaires

Le repliement oxydatif d'une protéine *in vitro* est une réaction chimique contrôlée de la formation des ponts disulfure. Elle se fait sur une protéine réduite à l'aide d'un couple redox tel que le glutathion (GSH/GSSG) ou le couple cystéine/cystine. Les ponts disulfure se forment et se réarrangent jusqu'à ce que la protéine soit repliée dans une conformation identique à l'état natif de la protéine *in vivo*. L'évolution d'un repliement oxydatif est affectée par plusieurs facteurs qui ont pu être identifiés à partir d'autres études : la proximité, la réactivité et l'accessibilité des

groupements thiols et des ponts disulfure (Arolas et al., 2006). L'accessibilité des thiols et des ponts disulfure est essentielle parce que les réactions d'échange ne peuvent se faire que lorsqu'un thiol et un pont disulfure réagissent. S'ils sont enfouis, cela bloque la réaction. **La cinétique du repliement oxydatif est influencée par plusieurs paramètres : le tampon, le pH, la force ionique et le potentiel redox.**

Le repliement d'une protéine peut être symbolisé par un entonnoir, où le haut de l'entonnoir représente la protéine dépliée qui est une population hétérogène. Ensuite, pendant le repliement, la protéine se replie et adopte différentes conformations en évoluant vers des états de moindre énergie. L'espace conformationnel exploitable par la protéine se restreint de plus en plus pour finalement converger vers l'état natif de la protéine (Figure 58). Cet état natif correspond à la partie la plus étroite de l'entonnoir. La protéine peut adopter des conformations qui se trouvent dans des minimas énergétiques locaux et ne pas pouvoir se réarranger pour atteindre son état natif (Arolas et al., 2006).

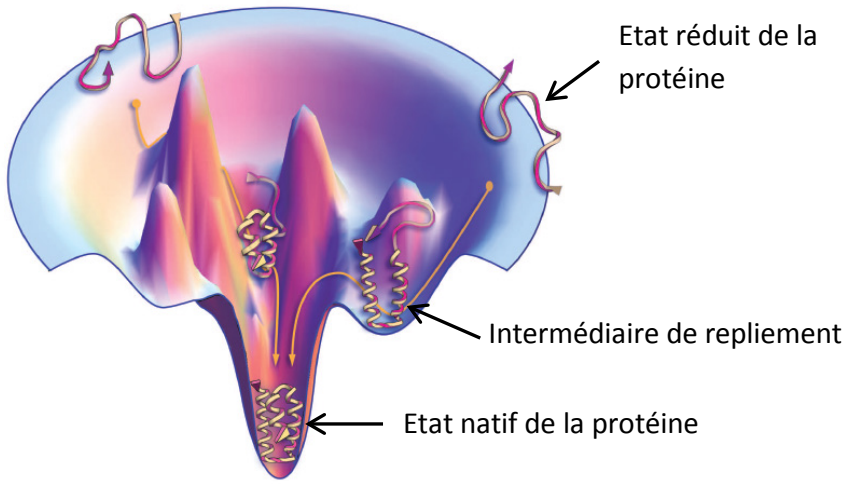


Figure 58 – Schéma représentatif du repliement d'une protéine en fonction de l'état énergétique (Dill and MacCallum, 2012). La largeur de l'entonnoir représente l'entropie, alors que la profondeur (l'ordonné) représente l'énergie.

La protéine AhPDF1 issue d'*E. coli* et celle issue de la synthèse sont obtenues sous la forme réduite. Sous sa forme naturelle, la structure de la protéine est stabilisée grâce à ses 4 ponts disulfure (forme oxydée). Une étape de repliement oxydatif est donc nécessaire pour obtenir la forme oxydée de la protéine. La protéine AhPDF1 possède 8 cystéines ce qui correspond à 105 possibilités d'appariement des cystéines, pour former une protéine totalement oxydée (c'est-à-dire avec les 4 ponts disulfure). Le repliement se fait naturellement sous le contrôle thermodynamique, et converge vers la forme native, unique, la plus stable. C'est en tout cas l'hypothèse la plus communément admise et celle que l'on adopte.

Pour réaliser le repliement oxydatif *in vitro*, nous avons testé l'effet de différents paramètres (pH, température, couple oxydo-réducteur, co-solvant). Nous avons tout d'abord utilisé la protéine issue de la production dans *E. coli*.

III. 1) Mise au point des conditions de repliement sur la protéine de *E. coli*

Certaines protéines peuvent être repliées, en utilisant directement la protéine brute, ce qui évite les étapes de purification, et donc assure un meilleur rendement. Dans notre cas, les tentatives de repliement oxydatif sur une solution brute de la protéine AhPDF1 réduite n'ont pas donné de résultats satisfaisants. Aucune forme majoritaire ne s'est dégagée sur les chromatogrammes HPLC. Nous en avons déduit que la purification de la protéine réduite est nécessaire, avant l'étape de repliement oxydatif.

La purification de la protéine réduite est réalisée en présence de chlorure de guanidinium, ce qui permet de la maintenir solubilisée. Celui-ci est échangé par dialyse contre un tampon Tris-HCl pH 7 et isopropanol (3/1). L'isopropanol sert de co-solvant qui augmente la solubilité de la protéine. Dans ces conditions, la protéine AhPDF1 réduite est stable.

Pour réaliser des cinétiques du repliement oxydatif, des aliquots sont prélevés à différents temps, la réaction est stoppée par l'ajout de TFA puis ils sont analysés par HPLC analytique.

Pour éviter la formation de ponts disulfure intermoléculaires, on se place en condition diluée en protéine (12 µM). Tout d'abord on réalise le repliement dans des conditions classiques décrites dans la littérature (Da Silva et al., 2009) (Tableau 6) :

Solution	Concentration finale
AhPDF1	12 µM
Tris pH 8,3	100 mM
EDTA	1 mM
GSH	1,2 mM
GSSG	0,12 mM
H_2O	Qsp

Tableau 6 – Conditions de repliement oxydatif de la protéine AhPDF1

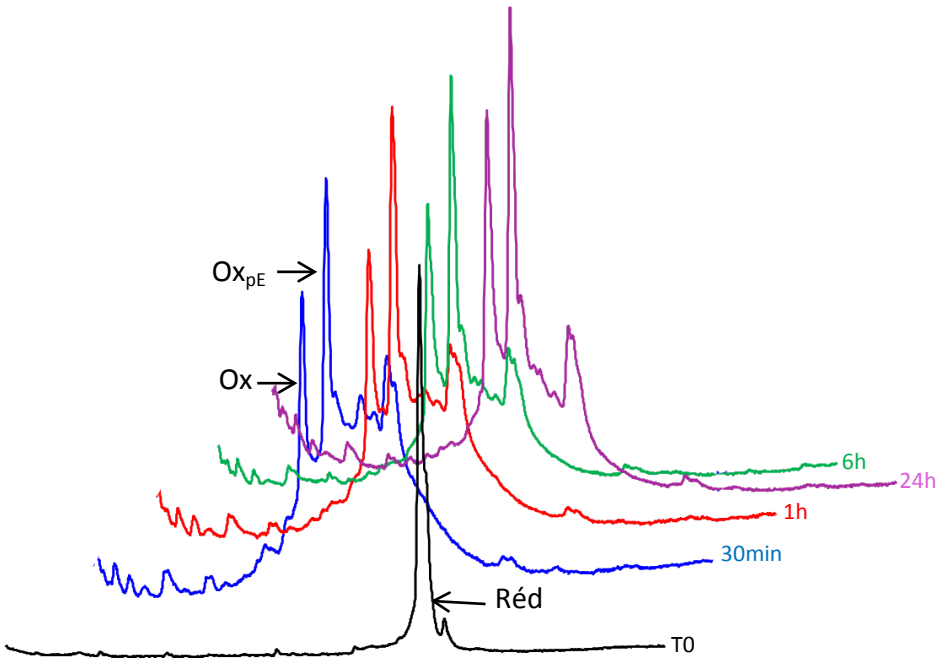


Figure 59 – Suivi par chromatographie HPLC de la protéine AhPDF1 au cours du repliement oxydatif (Colonne C18 avec un gradient de 20 à 40 % d'acétonitrile/0,1 % TFA en 30 min)

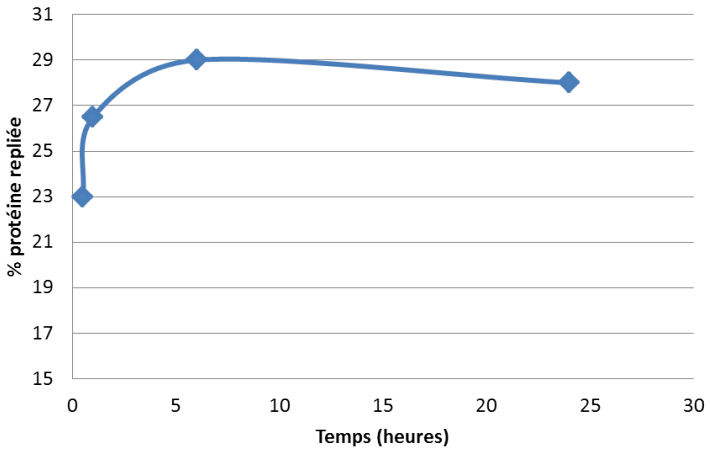


Figure 60 – Cinétique du repliement oxydatif de la protéine AhPDF1 (conditions décrites dans le Tableau 6)

Sur une colonne C18 avec un gradient de 20 à 40 % d'acétonitrile/0,1 % TFA en 30 min, la protéine AhPDF1 réduite est éluée après un temps de rétention de 22 min environ et la protéine AhPDF1 oxydée est éluée après environ 16 min.

Après 30 minutes de réaction à température ambiante on observe la disparition complète de la forme réduite au profit de 2 pics majoritaires correspondant à la protéine totalement oxydée (avec 4 ponts disulfure) avec un composé correspondant à la forme glutamique en position N-terminal (Ox) et l'autre à la forme pyroglutamique (Ox_{pE}) (Figure 59).

La formation de pyroglutamine à partir d'une glutamine située en position N terminal est un phénomène connu notamment à pH basique.

L'effet de « bosse » visible sur le chromatogramme correspond aux espèces possédant 1, 2, 3 ou 4 ponts et aux ponts mal appariés. Ces espèces se réarrangent au cours du temps. Après 6 h, il n'y a plus d'évolution du repliement oxydatif, on observe même une diminution de la quantité de protéine probablement due à une légère précipitation de la protéine. C'est pourquoi différents co-solvants sont testés pour réaliser le repliement oxydatif afin d'augmenter la solubilité de la protéine au cours du repliement oxydatif.

III. 1)1) Influence d'un co-solvant

Le co-solvant joue un rôle important dans le repliement oxydatif des protéines. Par exemple, le repliement oxydatif de la protéine kalata B1 a été réalisé avec différent co-solvant tel que l'acétonitrile, le méthanol, l'éthanol et l'isopropanol. Il existe une corrélation entre la polarité du co-solvant et la quantité de protéine repliée. Pour la protéine kalata B1, lorsque la polarité diminue comme pour l'isopropanol, la quantité de protéine correctement repliée augmente. L'isopropanol permet la stabilisation des résidus hydrophobes (Daly et al., 1999b). Pour la protéine MCoTI, où le DMSO est utilisé comme co-solvant. Plusieurs concentrations de DMSO ont été testées pour finalement choisir un mélange de DMSO, d'acétonitrile, de TFE (pour stabiliser les structures secondaires) (Reinwarth et al., 2013).

Le méthanol et l'isopropanol ont été testés comme co-solvant pour replier AhPDF1 (Tableau 7).

Solution	Concentration finale	
AhPDF1	12 µM	
Tris pH 8,3	100 mM	
EDTA	1 mM	
GSH	1,2 mM	
GSSG	0,12 mM	
H_2O	qsp	
Co-solvant qsp 25%	MetOH	iPrOH

Tableau 7 – Conditions de repliement oxydatif de la protéine AhPDF1 avec ajout d'un co-solvant (isopropanol, méthanol)

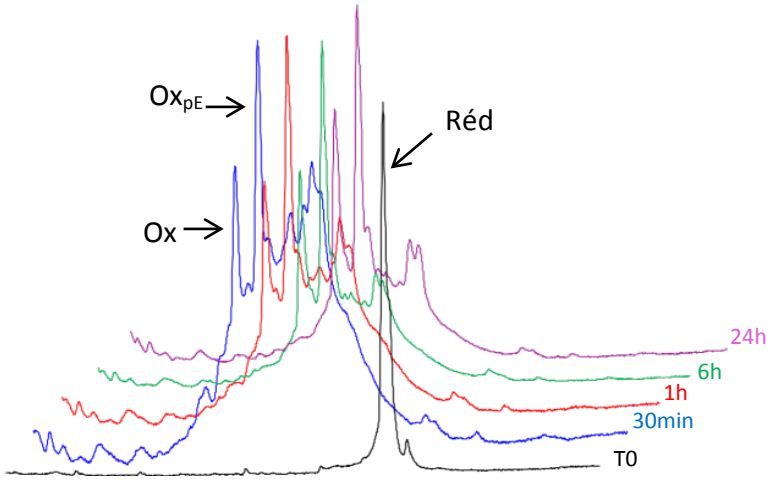


Figure 61 – Suivi par chromatographie HPLC de la protéine AhPDF1 au cours du repliement oxydatif en présence d'**isopropanol** comme co-solvant (Colonne C18 avec un gradient de 20 à 40 % d'acétonitrile/0,1 % TFA en 30 min)

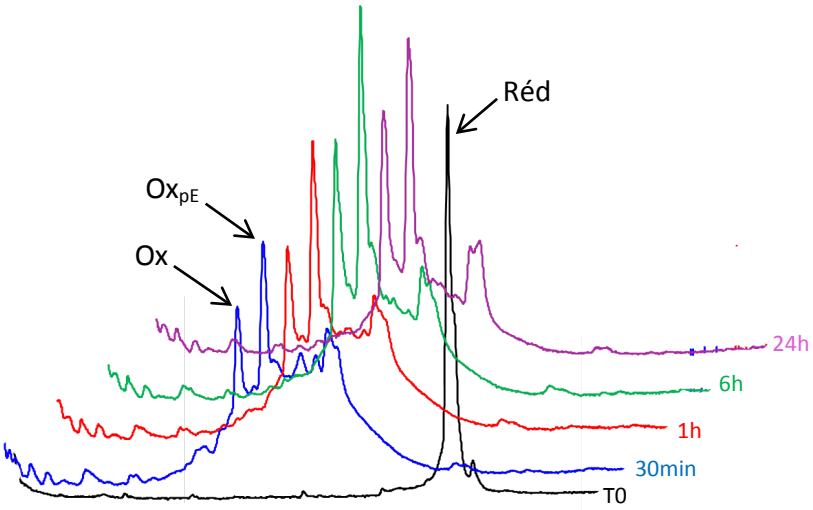


Figure 62 – Suivi par chromatographie HPLC de la protéine AhPDF1 au cours du repliement oxydatif en présence de **méthanol** comme co-solvant (Colonne C18 avec un gradient de 20 à 40 % d'acétonitrile/0,1 % TFA en 30 min)

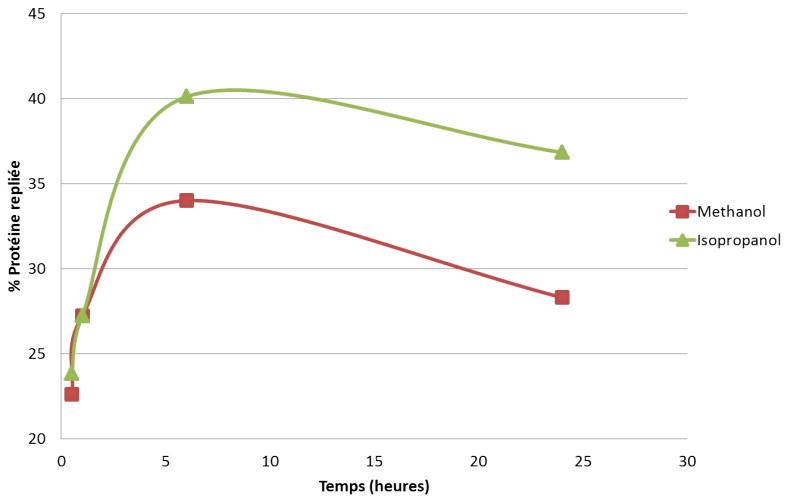


Figure 63 – Cinétique du repliement oxydatif de la protéine AhPDF1 en fonction du co-solvant (isopropanol, méthanol)

L'isopropanol, et dans une moindre mesure, le méthanol permettent d'augmenter légèrement la formation de protéine totalement oxydée (après 6 h de réaction et sans co-solvant on obtenait 29 % de protéine oxydée, avec 25 % de méthanol : 34 %, et avec 25 % d'isopropanol : 41 % (Figure 63). Cependant on observe toujours l'effet de « bosse » et une précipitation-agrégation de la protéine oxydée avec le temps (Figure 61 et Figure 62).

D'autres co-solvants peuvent favoriser le repliement, comme le DMF, l'urée et le chlorure de sodium (NaCl) (Arolas et al., 2006). L'utilisation de NaCl permet d'augmenter la cinétique du repliement et l'urée est un agent dénaturant qui permet le réarrangement des ponts et évite l'agrégation de la protéine.

Le repliement est réalisé à température ambiante avec les conditions suivantes (Tableau 8) :

Solution	Concentration finale		
AhPDF1	12 µM		
Tris pH 8,3	100 mM		
EDTA	1 mM		
GSH	1,2 mM		
GSSG	0,12 mM		
H_2O	Qsp		
Co-solvant qsp 25%	DMF	Urée	NaCl

Tableau 8 – Conditions de repliement oxydatif de la protéine AhPDF1 avec ajout d'un co-solvant (DMF, urée, NaCl)

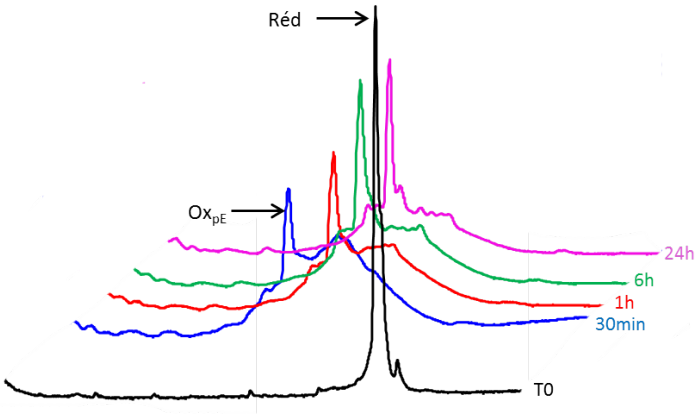


Figure 64 – Suivi par chromatographie HPLC de la protéine AhPDF1 au cours du repliement oxydatif en présence de **DMF** comme co-solvant (Colonne C18 avec un gradient de 20 à 40 % d'acétonitrile/0,1 % TFA en 30 min)

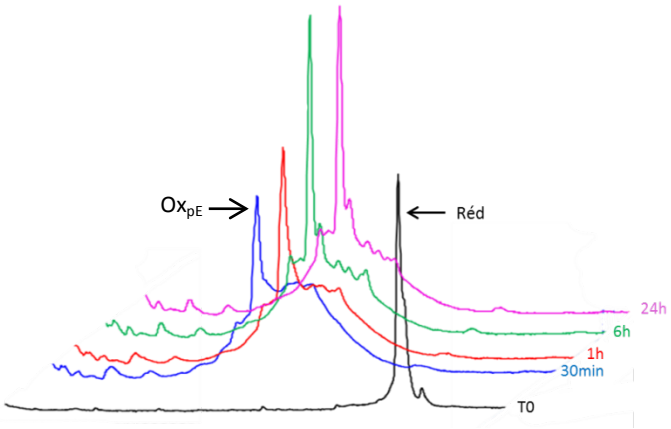


Figure 65 – Suivi par chromatographie HPLC de la protéine AhPDF1 au cours du repliement oxydatif en présence d'**urée** comme co-solvant (Colonne C18 avec un gradient de 20 à 40 % d'acétonitrile/0,1 % TFA en 30 min)

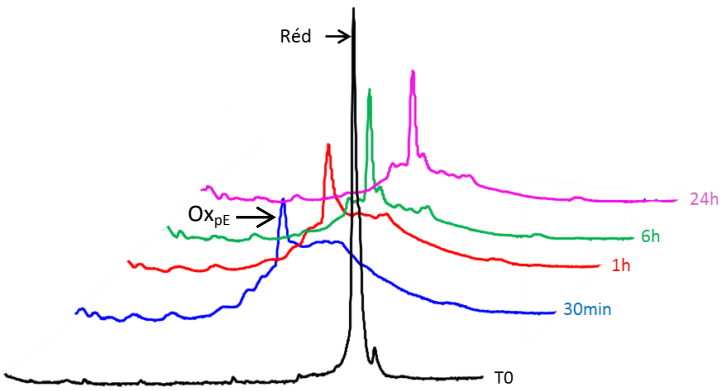


Figure 66 – Suivi par chromatographie HPLC de la protéine AhPDF1 au cours du repliement oxydatif en présence de **NaCl** comme co-solvant (Colonne C18 avec un gradient de 20 à 40 % d'acétonitrile/0,1 % TFA en 30 min)

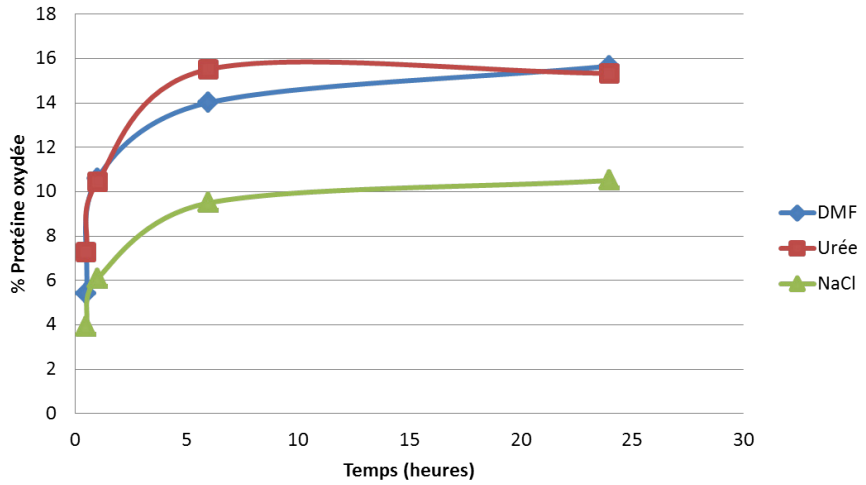


Figure 67 – Cinétique du repliement oxydatif de la protéine AhPDF1 **en fonction du co-solvant (DMF, urée, NaCl)**

Les rendements du repliement effectué sur la protéine AhPDF1 ne dépassent pas 16 % en présence d'urée ou de DMF, et 10 % en présence de chlorure de sodium. Ils sont inférieurs à ceux obtenus avec l'isopropanol (41 %, Figure 67). Le pic majoritaire correspond à la forme pyroglutamine de la protéine (Figures 64, 65 et 66).

III. 1)2) Influence de la température

Dans la littérature, on trouve plusieurs exemples de protéine repliée par repliement oxydatif en fonction de la température (Kubo et al., 1996). Par exemple, le repliement de la protéine TxIB est influencé par la température. En effet, des essais de repliement ont été réalisés dans un tampon Tris-HCl à pH 6, à 4 °C la protéine ne se replie pas, à température ambiante on observe un rendement de repliement de 16 % et à 37 °C un rendement de 31 % (Wu et al., 2013). En général, l'augmentation de la température augmente le rendement de repliement de la protéine. Il existe néanmoins des cas où une température basse favorise le repliement comme pour la protéine PA1b qui se replie mieux à 4 °C. La diminution de la température permettrait de ralentir les mouvements de la protéine durant le réappariement des ponts et diminuerait l'agrégation de celle-ci (Da Silva et al., 2009).

Les essais de repliement sont réalisés en présence d'isopropanol et 3 températures différentes sont testées : 4 °C, température ambiante (environ 20 °C) et 37 °C (Tableau 9).

Solution	Concentration finale
AhPDF1	12 µM
Tris pH 8,3	100 mM
EDTA	1 mM
GSH	1,2 mM
GSSG	0,12 mM
Co-solvant Isopropanol	Qsp 25 %
H_2O	Qsp

Tableau 9 – Conditions de repliement oxydatif de la protéine AhPDF1

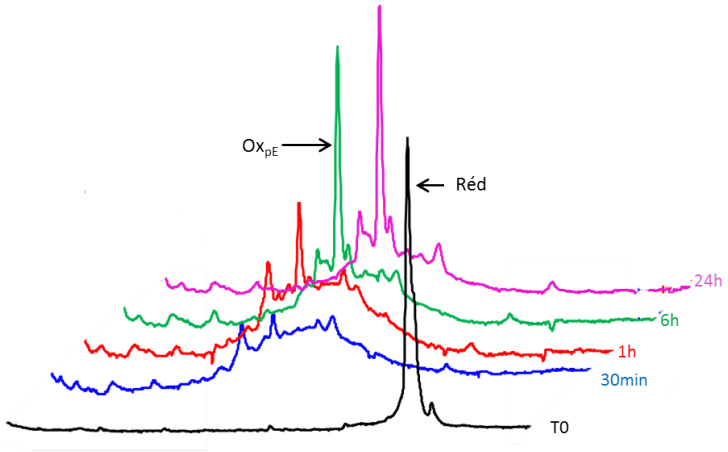


Figure 68 – Suivi par chromatographie HPLC de la protéine AhPDF1 au cours du repliement oxydatif à **4 °C** (Colonne C18 avec un gradient de 20 à 40 % d'acétonitrile/0,1 % TFA en 30 min)

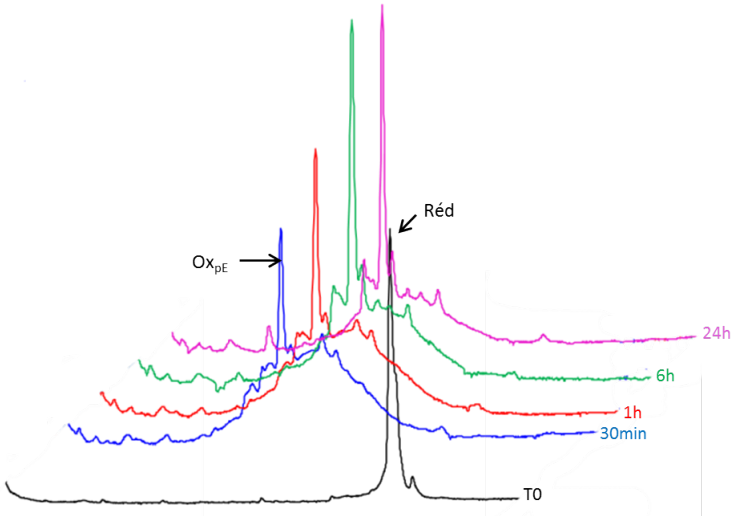


Figure 69 – Suivi par chromatographie HPLC de la protéine AhPDF1 au cours du repliement oxydatif à **20 °C (température ambiante)** (Colonne C18 avec un gradient de 20 à 40 % d'acétonitrile/0,1 % TFA en 30 min)

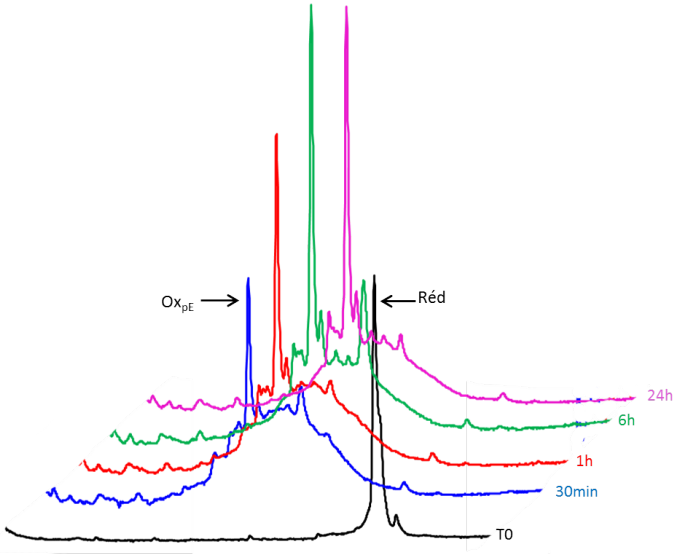


Figure 70 – Suivi par chromatographie HPLC de la protéine AhPDF1 au cours du repliement oxydatif à **37 °C** (Colonne C18 avec un gradient de 20 à 40 % d'acétonitrile/0,1 % TFA en 30 min)

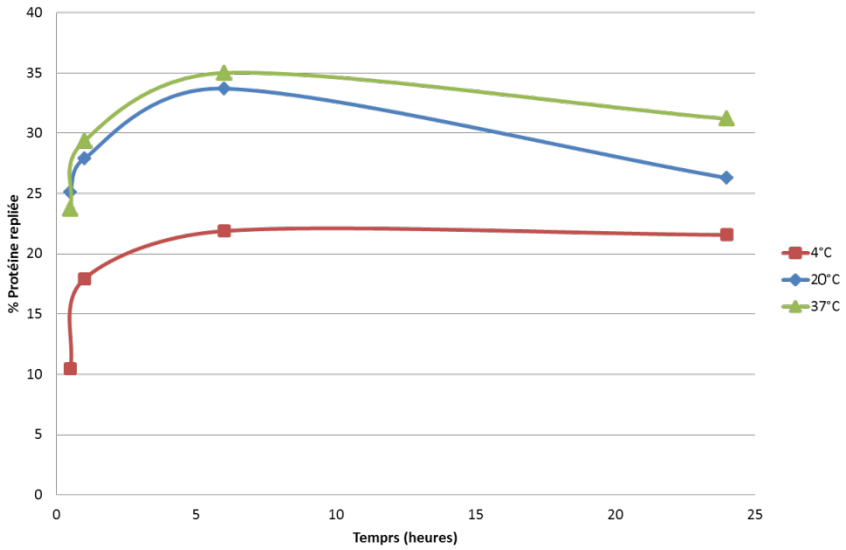


Figure 71 – Cinétique du repliement oxydatif de la protéine AhPDF1 **en fonction de la température (4 °C, 20 °C et 37 °C)**

La température a un effet sur le repliement de la protéine. Plus la température est élevée, plus la quantité de protéine oxydée augmente. Une température élevée favorise les mouvements moléculaires, cela augmente la vitesse de réappariement des ponts disulfure et diminue donc le nombre d'intermédiaires mal repliés (Figure 71).

Le repliement se fait de manière optimale à 37 °C avec un rendement de 35 % après 6 h de réaction.

III. 1)3) Influence du couple oxydo-réducteur

Le choix du couple oxydo-réducteur influence le repliement de la protéine. Il permet d'augmenter le rendement du repliement. Par exemple, pour la protéine TxIB, en absence de couple oxydo-réducteur le rendement de repliement est de 66% contre 77% avec le couple GSH/GSSG (Wu et al., 2013). Plusieurs couples oxydo-réducteurs existent comme le couple GSH/GSSG utilisé pour replier des cyclotides (Aboye et al., 2011), la protéine pA1b (Da Silva et al., 2009), ou le couple DTT_{red}/DTT_{ox} utilisé pour replier la protéine ONC de la famille des ribonucléases (Gahl and Scheraga, 2009).

Nous avons testé deux couples oxydo-réducteurs : $glutathion_{red}/glutathion_{ox}$ et cystéine/cystine. A pH 7 et 25 °C, le couple GSH/GSSG a un potentiel d'oxydo-réduction (E'_0) de -0,24 V, dans les mêmes conditions le couple CSH/CSSC a un potentiel de -0,23 V. Les deux couples sont très proches en terme de valeur de potentiel d'oxydo-réduction (Jocelyn, 1967).

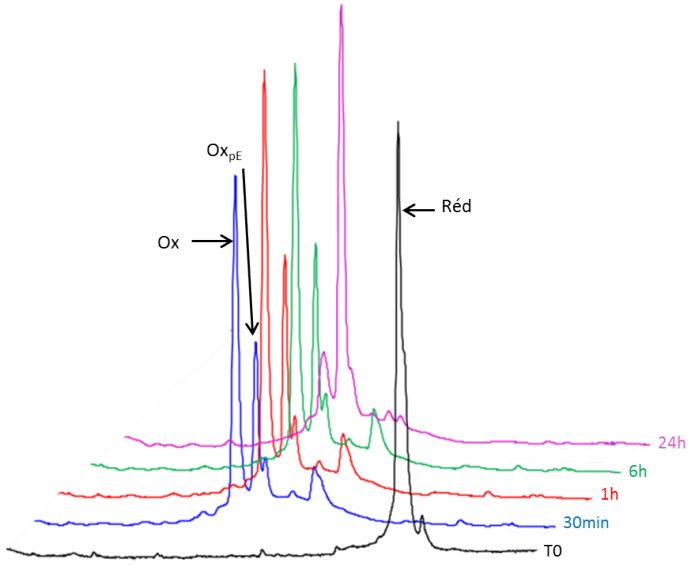


Figure 72 – Suivi par chromatographie HPLC de la protéine AhPDF1 au cours du repliement oxydatif en présence du **couple oxydo-réducteur GSH/GSSG** (Colonne C18 avec un gradient de 20 à 40 % d'acétonitrile/0,1 % TFA en 30 min)

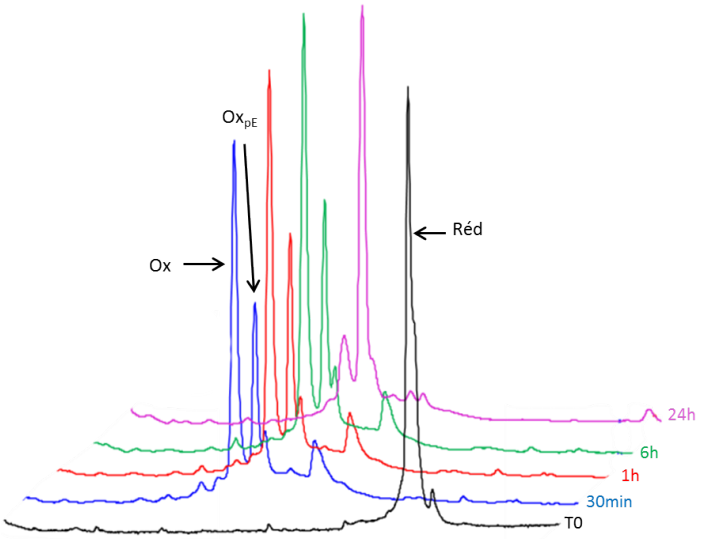


Figure 73 – Suivi par chromatographie HPLC de la protéine AhPDF1 au cours du repliement oxydatif en présence du **couple oxydo-réducteur CSH/CSSC** (Colonne C18 avec un gradient de 20 à 40 % d'acétonitrile/0,1 % TFA en 30 min)

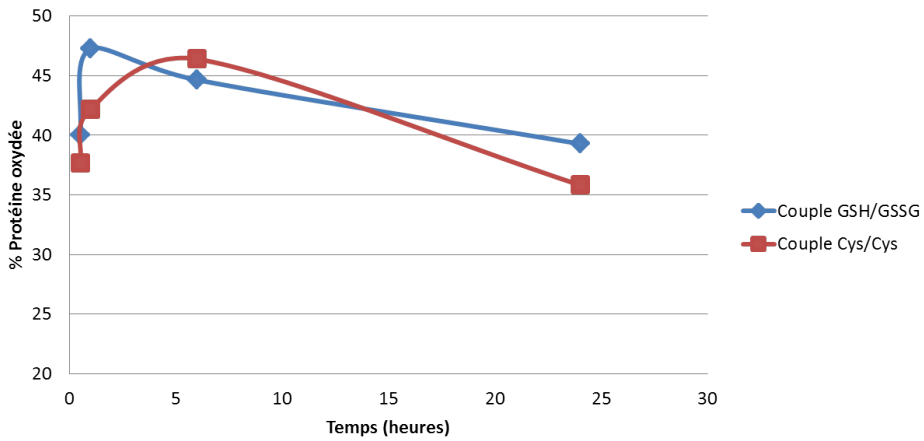


Figure 74 – Cinétique du repliement oxydatif de la protéine AhPDF1 **en fonction du couple oxydo-réducteur (GSH/GSSG, CSH/CSSC)**

Le couple cystéine/cystine n'améliore pas la quantité de protéine repliée (Figure 74). Pour des raisons pratiques, l'utilisation du couple glutathion (GSH/GSSG) est conservée.

III. 2) Mise au point des conditions de repliement sur la protéine synthétique

La protéine issue de la synthèse se comporte différemment, afin d'étudier les meilleures conditions de repliement sur la protéine synthétique, les expériences de repliement oxydatif sont réalisées avec la protéine issue de la synthèse.

III. 2)1) Influence du pH

Solution	Concentration finale
AhPDF1	12 µM
Tris pH 7 à 8,5	100 mM
EDTA	1 mM
GSH	1,2 mM
GSSG	0,12 mM
H_2O	qsp

Tableau 10 – Conditions de repliement oxydatif de la protéine AhPDF1

Il est connu que le pH influence le repliement oxydatif des protéines. L'effet du pH a été testé sur la protéine TxIB. A pH 6, la protéine ne se replie pas, alors qu'entre pH 7 et 9, la protéine TxIB se replie. Elle atteint un rendement de repliement maximal de 91% à pH 8 (Wu et al., 2013). Le pH a été testé entre 7 et 8,5 pour la protéine AhPDF1, à température ambiante.

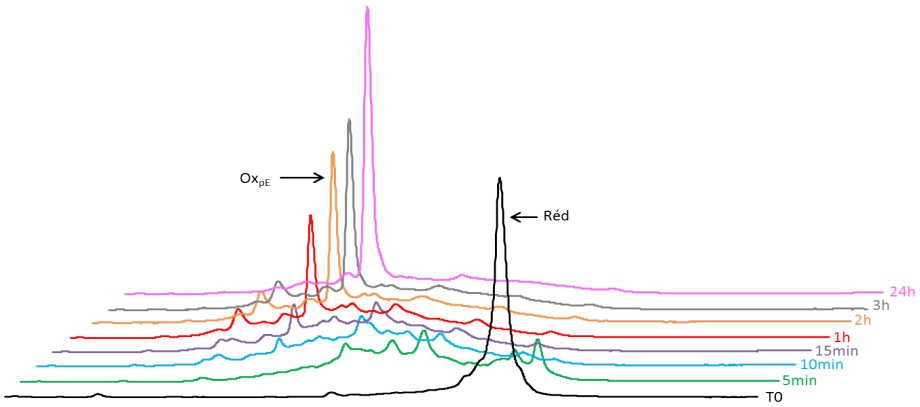


Figure 75 – Suivi par chromatographie HPLC de la protéine AhPDF1 au cours du repliement oxydatif à **pH 7** (Colonne C18 avec un gradient de 20 à 40 % d'acétonitrile/0,1 % TFA en 30 min)

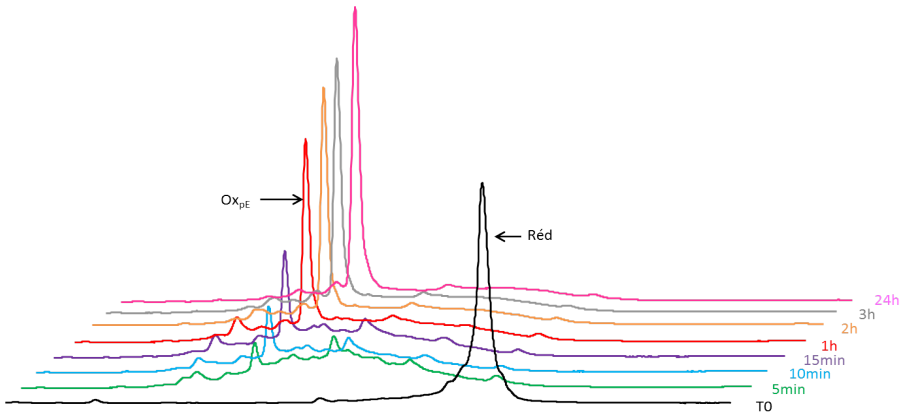


Figure 76 – Suivi par chromatographie HPLC de la protéine AhPDF1 au cours du repliement oxydatif à **pH 7,5** (Colonne C18 avec un gradient de 20 à 40 % d'acétonitrile/0,1 % TFA en 30 min)

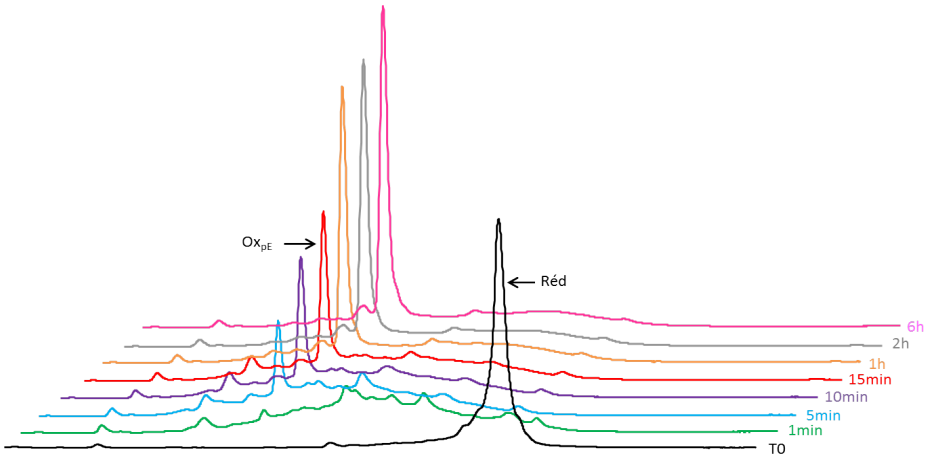


Figure 77 – Suivi par chromatographie HPLC de la protéine AhPDF1 au cours du repliement oxydatif à **pH 8** (Colonne C18 avec un gradient de 20 à 40 % d'acétonitrile/0,1 % TFA en 30 min)

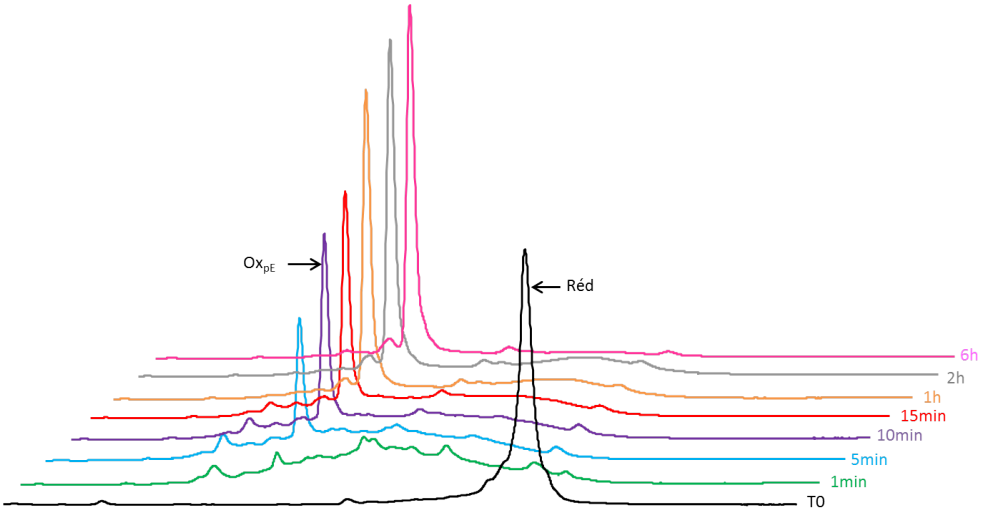


Figure 78 – Suivi par chromatographie HPLC de la protéine AhPDF1 au cours du repliement oxydatif à **pH 8,5** (Colonne C18 avec un gradient de 20 à 40 % d'acétonitrile/0,1 % TFA en 30 min)

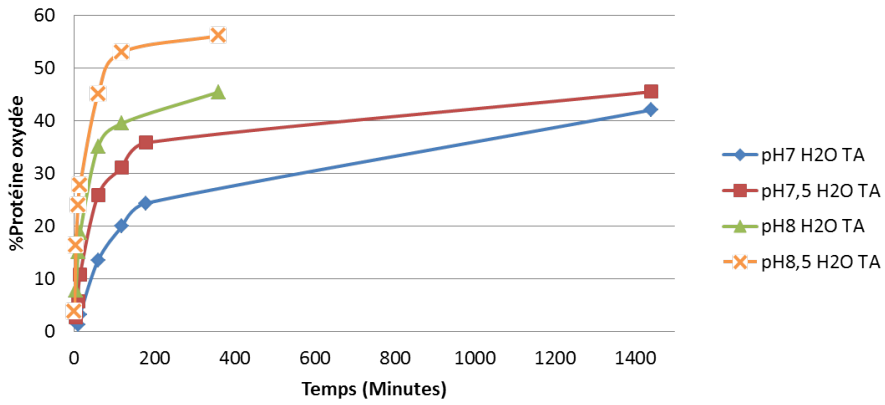


Figure 79 – Cinétique du repliement oxydatif de la protéine AhPDF1 en fonction du pH (7 ; 7,5 ; 8 ; 8,5)

Plus le pH est élevé, plus la quantité de protéine repliée augmente et plus la vitesse du repliement augmente. Sans ajout de co-solvant à température ambiante et à pH 8,5 le repliement oxydatif atteint un rendement de 57 % en 6 h (Figure 79). Comme la protéine issue des bactéries, la protéine synthétique se replie mieux à pH élevé. **Pour les prochains repliements oxydatifs, on se placera donc à pH 8,5.**

III. 2) 2) Influence du co-solvant

Solution	Concentration finale	
AhPDF1	12 µM	
Tris pH 8,5	100 mM	
EDTA	1 mM	
GSH	1,2 mM	
GSSG	0,12 mM	
isopropanol	---	Qsp 25 %
H_2O	Qsp 100 %	

Tableau 11 – Conditions de repliement oxydatif de la protéine AhPDF1

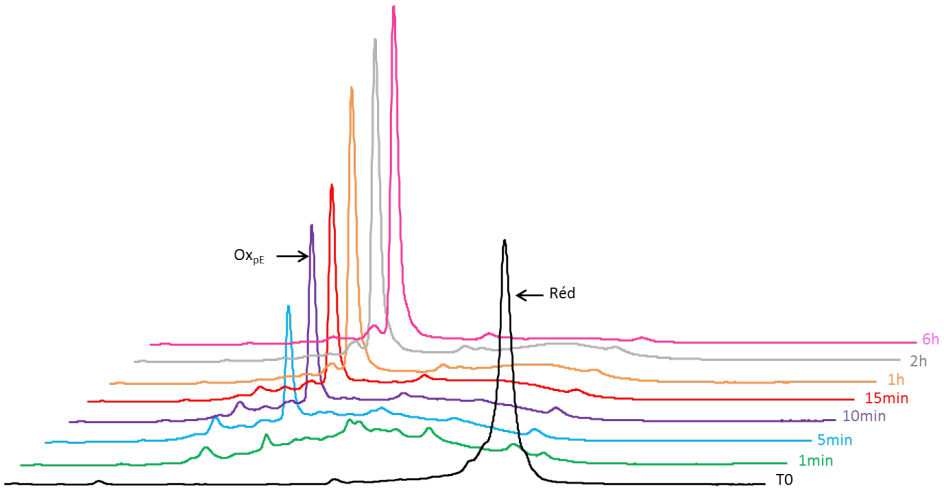


Figure 80 – Suivi par chromatographie HPLC de la protéine AhPDF1 au cours du repliement oxydatif **sans co-solvant** (Colonne C18 avec un gradient de 20 à 40 % d'acétonitrile/0,1 % TFA en 30 min)

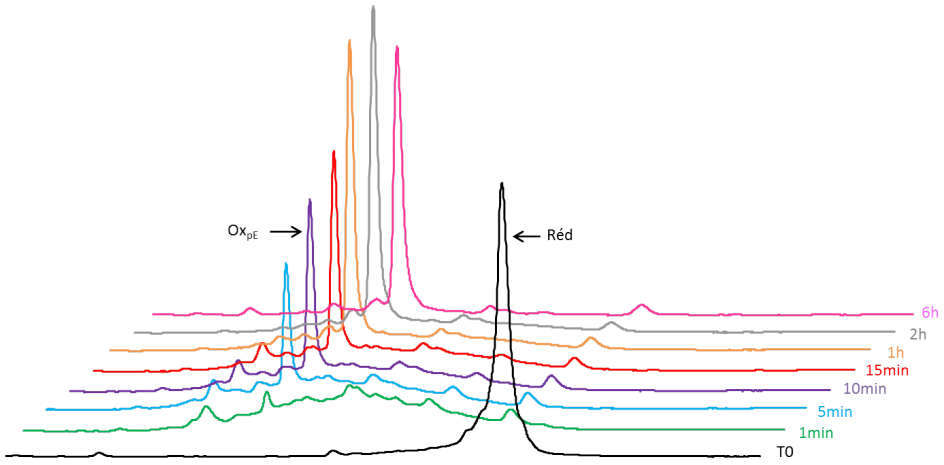


Figure 81 – Suivi par chromatographie HPLC de la protéine AhPDF1 au cours du repliement oxydatif **en présence d'isopropanol comme co-solvant** (Colonne C18 avec un gradient de 20 à 40 % d'acétonitrile/0,1 % TFA en 30 min)

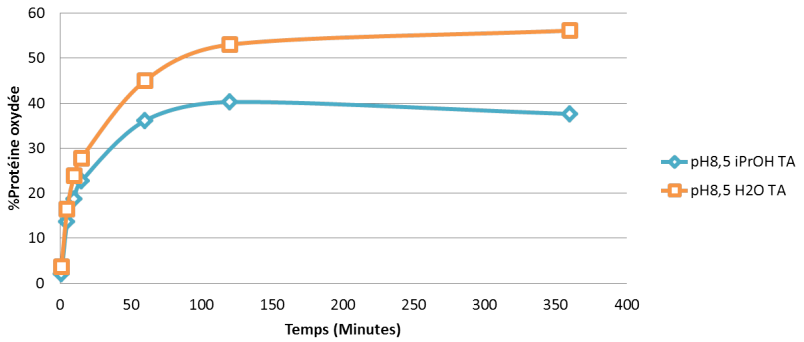


Figure 82 – Cinétique du repliement oxydatif de la protéine AhPDF1 **en fonction du co-solvant (isopropanol)**

Contrairement à ce que l'on avait observé avec la protéine issue des bactéries, l'isopropanol comme co-solvant n'augmente pas la quantité de protéine repliée. Le rendement de la réaction de repliement oxydatif ne dépasse pas 40 % en présence de ce co-solvant (Figure 82). Pour la protéine AhPDF1 issue des bactéries, l'isopropanol aiderait à solubiliser d'autres protéines présentes malgré la purification. Ceci est confirmé par le fait que lors de la purification par HPLC sur une colonne semi-préparative C18, on rencontre de nombreux problèmes d'obstruction de la colonne qui vont jusqu'à devoir la régénérer. C'est pourquoi pour purifier la protéine d'*E. coli*, une colonne HPLC semi-préparative C8 est utilisée. De plus, durant le repliement de la protéine synthétique en présence d'isopropanol on observe un léger précipité. **Pour les prochains repliements oxydatifs, on n'utilisera donc pas de co-solvant.**

III. 2) 3) Influence de la température

Solution	Concentration finale
AhPDF1	12 µM
Tris pH 8,5	100 mM
EDTA	1 mM
GSH	1,2 mM
GSSG	0,12 mM
H_2O	Qsp

Tableau 12 – Conditions de repliement oxydatif de la protéine AhPDF1

Des essais de repliement ont été réalisés à 37, 45 et 60 °C. On observe une petite amélioration de la quantité de protéine repliée à 45 °C (rendement = 60 % en 2 h). Puis entre 45 °C et 60 °C il n'y a pas d'amélioration du repliement. C'est pourquoi on se place à 45 °C.

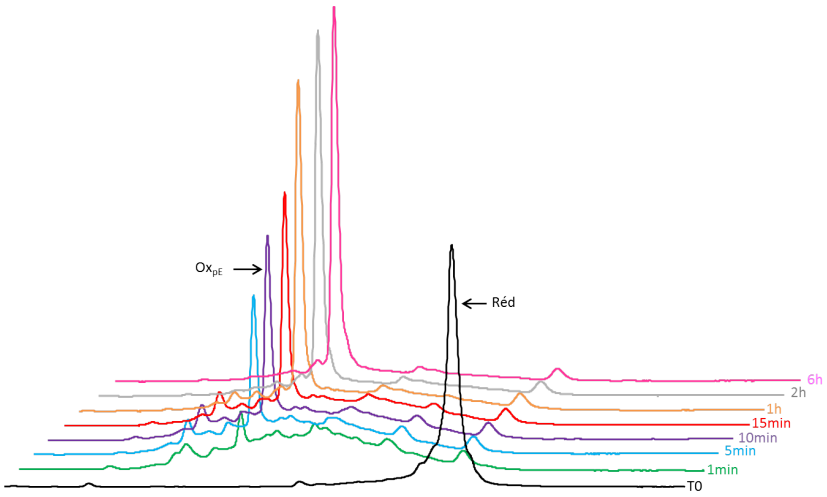


Figure 83 – Suivi par chromatographie HPLC de la protéine AhPDF1 au cours du repliement oxydatif à **20 °C (température ambiante)** (Colonne C18 avec un gradient de 20 à 40 % d'acétonitrile/0,1 % TFA en 30 min)

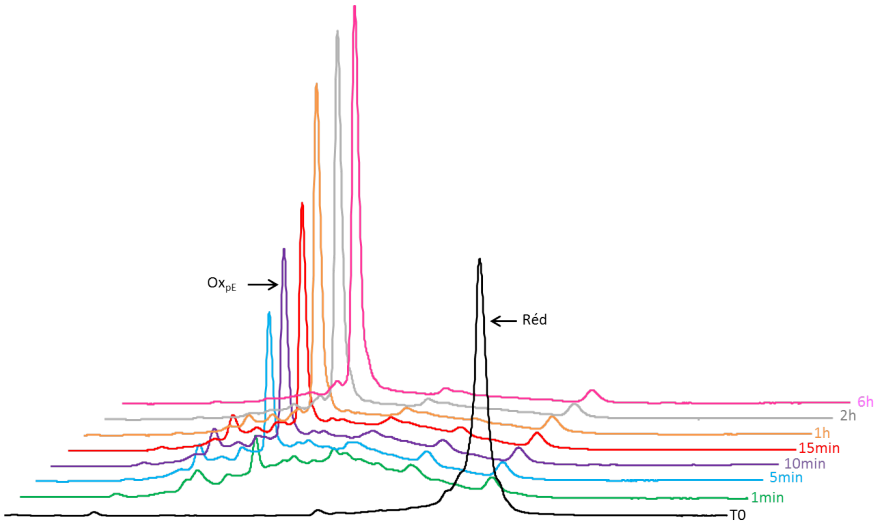


Figure 84 – Suivi par chromatographie HPLC de la protéine AhPDF1 au cours du repliement oxydatif à **45 °C** (Colonne C18 avec un gradient de 20 à 40 % d'acétonitrile/0,1 % TFA en 30 min)

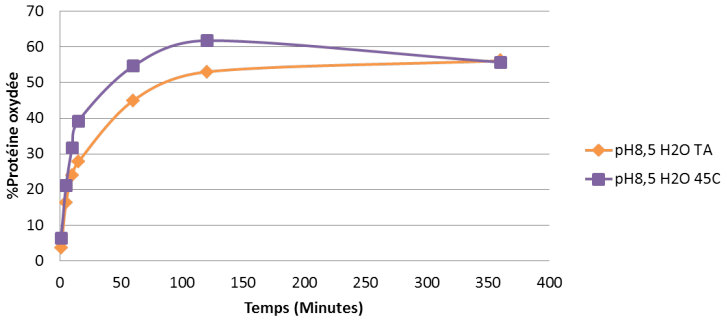


Figure 85 – Cinétique du repliement oxydatif de la protéine AhPDF1 **en fonction de la température (20 °C et 45 °C)**

L'augmentation de la température augmente la quantité de protéine repliée : 62% après 2 h à 45 °C contre 53% à température ambiante. La température active l'agitation moléculaire et augmente la vitesse de rappariement des cystéines au cours du repliement. Cependant après 6h de réaction à 45 °C on observe une diminution de la quantité de protéine, ce qui correspond à la précipitation de la protéine (Figure 85). **C'est pourquoi il faut arrêter le repliement après 3 h-3 h 30 min.**

III. 2) 4) Influence de la nature du premier résidu Gln ou pGln

Afin de tester si la nature du premier résidu a une influence sur le repliement oxydatif, nous choisissons de réaliser le repliement oxydatif à pH 7,5 et sans couple oxydo-réducteur. Nous avons vu précédemment qu'à ce pH, le repliement est lent, cela va nous permettre d'observer des différences, s'il y en a, entre les deux expériences.

Solution	Concentration finale
AhPDF1 pGlu/Gln	25 µM
Tris pH 7,5	100 mM
EDTA	1 mM
GSH	---
GSSG	---
H_2O	qsp

Tableau 13 – Conditions de repliement oxydatif de la protéine AhPDF1

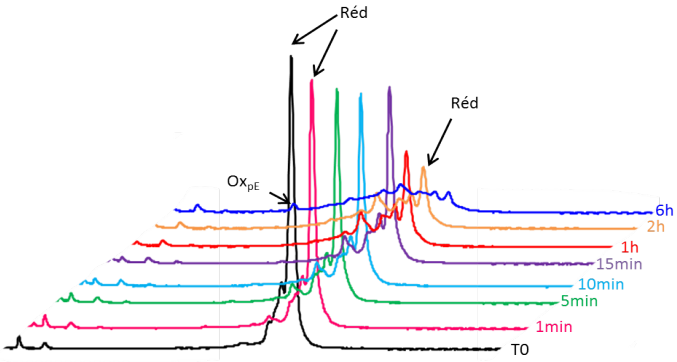


Figure 86 – Suivi par chromatographie HPLC de la protéine AhPDF1 au cours du repliement oxydatif (sans couple oxydo-réducteur) **avec une pyroglutamine comme premier résidu** (Colonne C18 avec un gradient de 20 à 40 % d'acétonitrile/0,1 % TFA en 30 min)

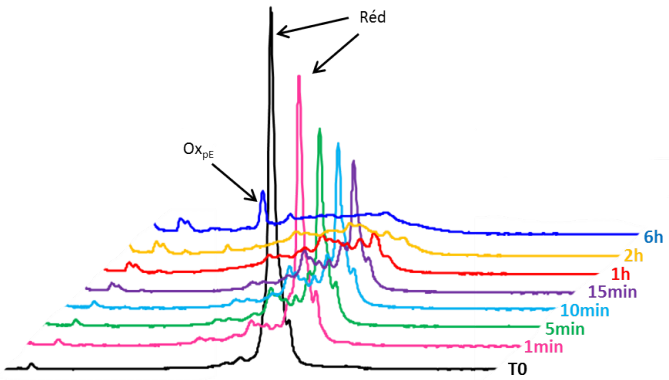


Figure 87 – Suivi par chromatographie HPLC de la protéine AhPDF1 au cours du repliement oxydatif (sans couple oxydo-réducteur) **avec une glutamine comme premier résidu** (Colonne C18 avec un gradient de 20 à 40 % d'acétonitrile/0,1 % TFA en 30 min)

A pH 7,5 le repliement de la protéine se fait lentement, on remarque que la quantité de protéine réduite pour les deux formes diminue entre le début de la réaction et 2 h. Pour la forme pyroglutamique, après 6 h, on n'observe plus de protéine réduite, mais une « bosse » correspondant à la protéine en cours de réarrangements (Figure 86). Après 6 h, il y a une petite quantité de protéine oxydée pyroglutamique présente.

Concernant la protéine glutamique, la forme réduite disparait après 2 h de réaction (Figure 87). De plus, après 6 h on observe la formation d'une plus grande quantité de protéine oxydée pyroglutamique et d'un peu de protéine oxydée glutamique.

On n'observe donc pas d'influence du premier résidu lors du repliement sans couple oxydo-réducteur. Nous réalisons à nouveau cette expérience mais en rajoutant le couple GSH/GSSG.

Solution	Concentration finale
AhPDF1 pGlu/Gln	25 µM
Tris pH 7,5	100 mM
EDTA	1 mM
GSH	2,5 mM
GSSG	0,25 mM
H_2O	qsp

Tableau 14 – Conditions de repliement oxydatif de la protéine AhPDF1

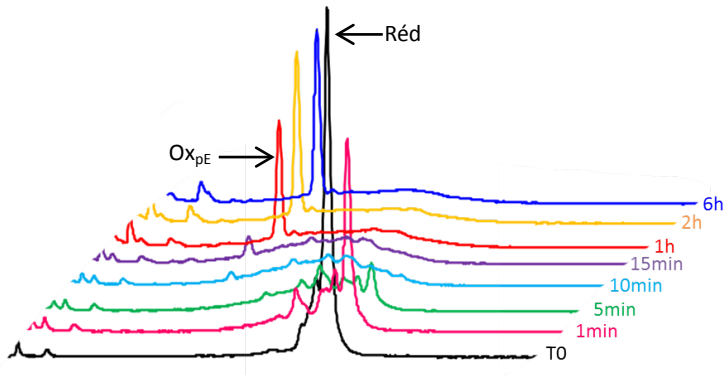


Figure 88 – Suivi par chromatographie HPLC de la protéine AhPDF1 au cours du repliement oxydatif (avec couple oxydo-réducteur GSSG/GSH) **avec une pyroglutamine comme premier résidu** (Colonne C18 avec un gradient de 20 à 40 % d'acétonitrile/0,1 % TFA en 30 min)

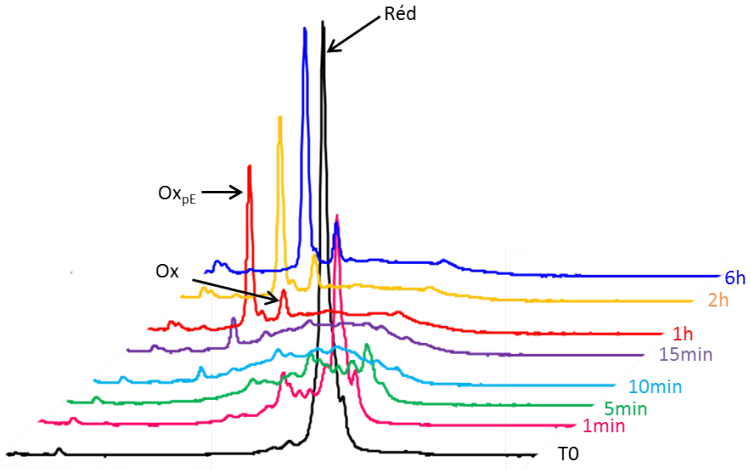


Figure 89 – Suivi par chromatographie HPLC de la protéine AhPDF1 au cours du repliement oxydatif (avec couple oxydo-réducteur GSSG/GSH) **avec une glutamine comme premier résidu** (Colonne C18 avec un gradient de 20 à 40% d'acétonitrile/0,1% TFA en 30 min)

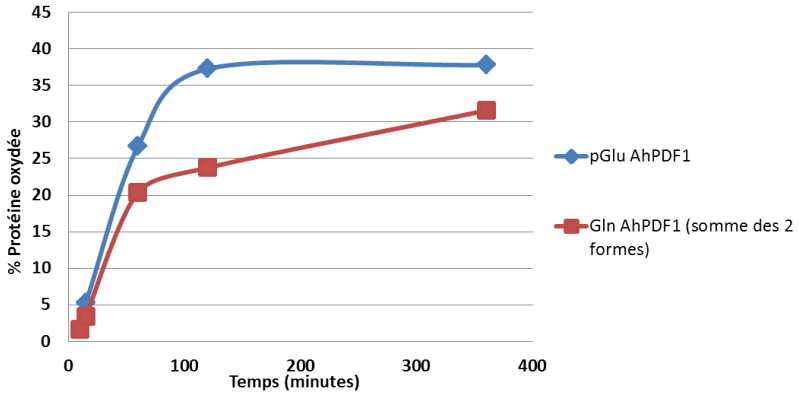


Figure 900 – Cinétique du repliement oxydatif de la protéine AhPDF1 **en fonction de la nature du premier résidu (pGlu et Gln)**. La quantité de protéine AhPDF1 oxydée à partir de Gln-AhPDF1 réduite, est calculée en ajoutant les deux formes oxydées Gln et pGlu.

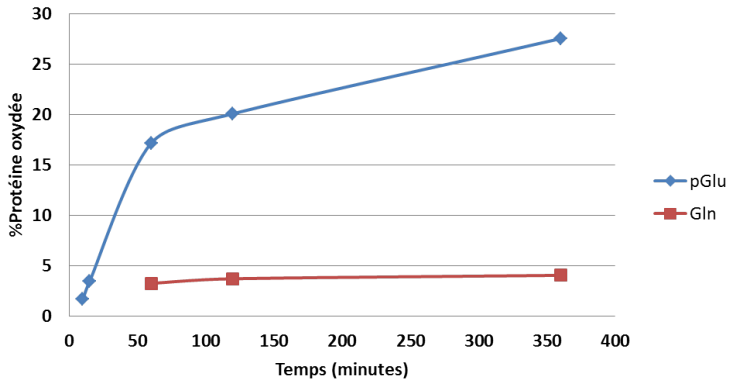


Figure 911 – Quantité de protéine AhPDF1 pGlu et Gln oxydée obtenue au cours du repliement oxydatif de la protéine Gln-AhPDF1 (calculée à partir de la Figure 89)

On remarque qu'après 2 h, 24 % de la protéine AhPDF1 sous la forme Glutamine est repliée contre 38 % de protéine AhPDF1 sous la forme pyroglutamine (Figure 90). Après 6 h, on observe que la quantité de protéine AhPDF1 glutamique oxydée est de 32 % et de 38 % pour la protéine AhPDF1 pyroglutamique. La quantité de protéine oxydée glutamique augmente entre 2 h et 6 h alors que la quantité de protéine pyroglutamique reste constante. La glutamine se transforme en pyroglutamine au cours du temps (Dick et al., 2007), c'est pourquoi au cours du repliement on observe peu de protéine sous la forme glutamique (Figure 91). La différence entre les quantités de protéine repliée en fonction de la présence de la pyroglutamine n'est pas significative pour pouvoir conclure sur l'effet du premier résidu sur le repliement de la protéine AhPDF1.

III. 3) Conditions optimales de repliement

Le repliement oxydatif des protéines se fait au cas par cas. En effet, chaque protéine réagit différemment aux facteurs modulables du repliement. C'est pourquoi chaque protéine nécessite une étude particulière afin de trouver les conditions de repliement qui lui sont propres.

Les conditions optimales pour réaliser le repliement oxydatif de la protéine AhPDF1 ont été mises au point sur la protéine issue de deux origines. Chacune réagit différemment, certainement à cause de leur degré de pureté différent, il est probable que d'autres protéines produites par la bactérie soient entrainées lors de la purification de AhPDF1. Plus la protéine réduite est pure, plus elle se replie facilement et rapidement. Le repliement oxydatif de la protéine issue des bactéries est réalisé en présence du couple oxydo-réducteur GSH/GSSG dans un tampon Tris/25 % iPrOH à pH 8,5 et à 45 °C pendant 3 h.

Les meilleures conditions de repliement oxydatif pour les protéines synthétique et recombinante d'*Escherichia coli* sont les suivantes :

	Concentration finale	
Solution	**Pour la protéine synthétique**	**Pour la protéine d'*Escherichia coli***
AhPDF1	12 µM	12 µM
Tris pH 8,5	100 mM	100 mM
EDTA	1 mM	1 mM
GSH	1,2 mM	1,2 mM
GSSG	0,12 mM	0,12 mM
isopropanol	---	**Qsp 25% du volume total**
H_2O	Qsp volume total	Qsp volume total
Température	45 °C	45 °C
Temps	3 h 30	3 h

Tableau 15 – Conditions optimales de repliement oxydatif de la protéine AhPDF1

Lors du repliement de la protéine synthétique, il n'est pas nécessaire d'ajouter un co-solvant comme l'isopropanol.

Nous savons maintenant maîtriser le repliement de la protéine AhPDF1, ainsi que la formation de pyroglutamine. Cette étude nous a permis de trouver les conditions optimales du repliement de la protéine issue des bactéries et de la synthèse chimique.

IV. Test d'activité antifongique

Un test antifongique de la défensine synthétique AhPDF1 sous ses deux formes (réduite et oxydée) a été réalisé par nos collaborateurs de Montpellier sur le champignon filamenteux *Fusarium oxysporum f.* sp*. melonii* (Figure 92). Lors de ce test, on recherche la concentration minimale de protéine inhibitrice de la croissance du champignon (MIC). Le mycélium du champignon a une couleur rouge naturelle permettant de visualiser les puits dans lesquels le champignon a poussé. On observe que le champignon pousse lorsque la concentration en défensine AhPDF1 est inférieure à 2 µM. Pour les deux échantillons testés, la MIC est donc égale à 2 µM. La MIC est égale à 0,6 µM pour la protéine issue de la bactérie d'*Escherichia coli* (Marquès et al., 2009). Nous avons vu précédemment que la protéine AhPDF1 réduite, s'oxyde très vite. Nous pouvons donc supposer que la défensine réduite s'est oxydée au cours du test (durée 4 jours à 30 °C). Ce test positif sert à confirmer que la protéine synthétique possède une activité antifongique.

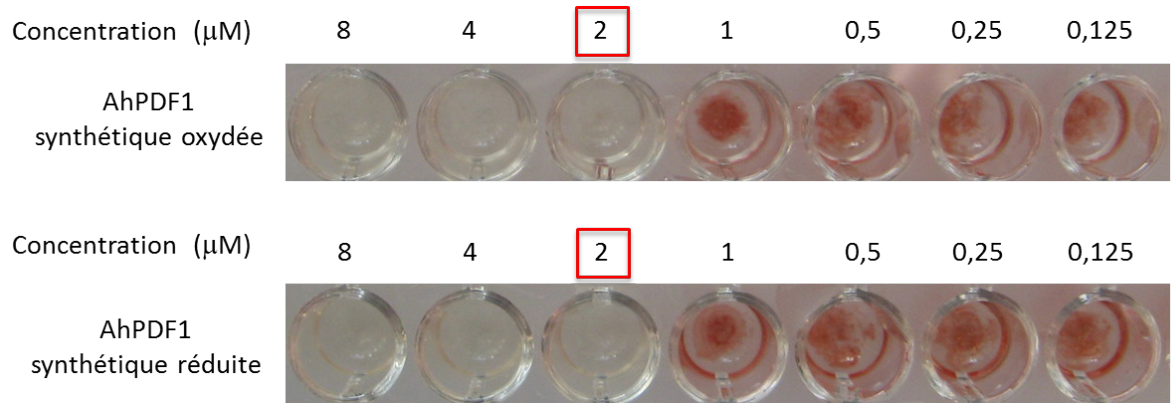


Figure 92 – Test antifongique de la défensine synthétique AhPDF1 sur le champignon filamenteux *Fusarium oxysporum*

V. Production de la protéine AhPDF1 dans *Pichia pastoris*

La production dans le système bactérien *Escherichia coli* ne donnant pas suffisamment de protéine (voir p.77), nous avons décidé de produire la protéine AhPDF1 dans la levure *Pichia pastoris*. En effet, la levure permet également d'obtenir la protéine marquée ^{15}N et ^{13}C mais elle présente aussi l'avantage de former les ponts disulfure de la protéine.

V. 1) Production et purification de la protéine

La levure *Pichia pastoris* permet de produire la protéine sous sa forme oxydée. Ceci est un grand avantage puisque l'on s'affranchit de l'étape du repliement oxydatif. Grâce à un signal de sécrétion introduit par le plasmide pICZα, la protéine AhPDF1 est normalement la seule protéine secrétée dans le milieu de culture.

Après centrifugation du milieu de culture (750 mL) et lyophilisation du surnageant (300 mL), le lyophilisat est repris dans 150 mL d'eau ultra-pure. Afin de purifier la protéine, le mélange est passé sur une colonne échangeuse de cations HiPrep SP FF 16/10. La protéine est éluée avec une concentration croissante en NaCl avec un gradient de 5 à 100 % de tampon d'élution (Tris 20 mM, EDTA 10 mM, NaCl 1 M, pH 7) en 500 mL avec un débit de 3 mL/min (Figure 93).

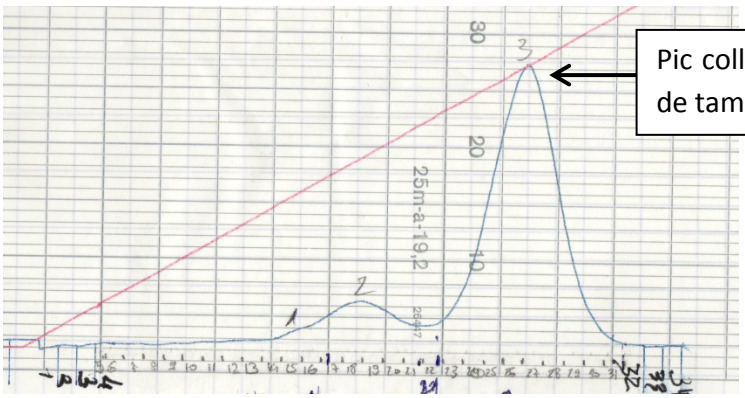


Figure 93 – Chromatogramme de purification sur une colonne échangeuse de cations

Grâce à la présence d'un tryptophane et de deux tyrosines, la protéine AhPDF1 absorbe à 280 nm. Seules les fractions du pic majoritaire présentent une absorbance positive à 280 nm. Ces fractions sont contrôlées en HPLC analytique sur une colonne C18 (Figure 94) et 10 d'entre elles sont rassemblées. Chaque fraction ayant un volume de 5 mL, la quantité totale de protéine est estimée à environ 5 mg (0,87 µmol) de protéine. Enfin le mélange est purifié par HPLC en phase inverse. Afin d'obtenir un produit suffisamment pur pour réaliser des études par RMN, on collecte le haut du pic en HPLC.

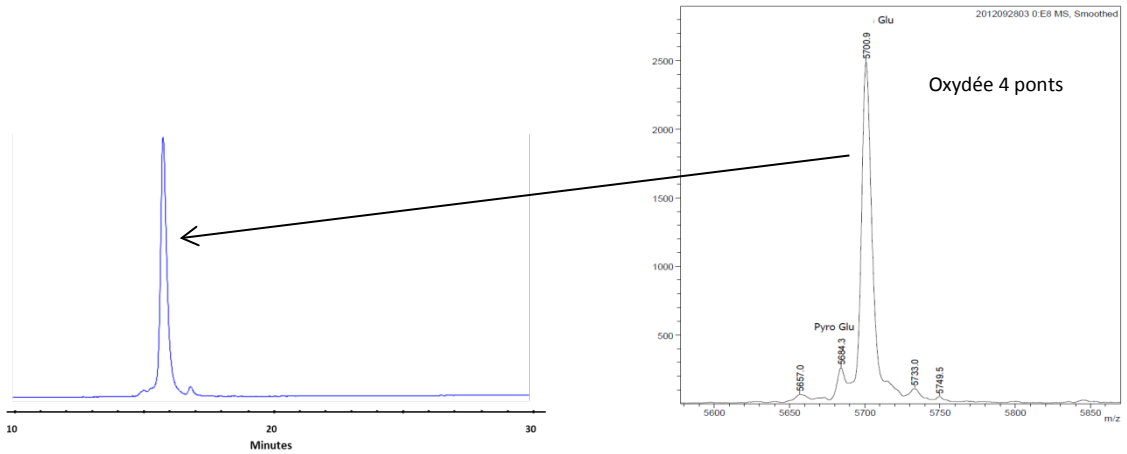


Figure 94 – Chromatogramme HPLC du pic collecté à la sortie de la colonne échangeuse de cations (gauche) (Colonne C18 avec un gradient de 20 à 40 % d'acétonitrile/0,1 % TFA en 30 min). Analyse par spectrométrie de masse MALDI-TOF du pic collecté en HPLC (droite)

Le produit est bien purifié avec un pic majoritaire présent sur le chromatogramme HPLC, l'analyse par spectrométrie de masse confirme qu'il s'agit de la protéine AhPDF1 sous sa forme oxydée avec les 4 ponts sous la forme glutamine (M=5700 Da).

A partir des 750 mL de culture, nous avons produit 1,3 mg (0,23 µmol) de protéine pure.

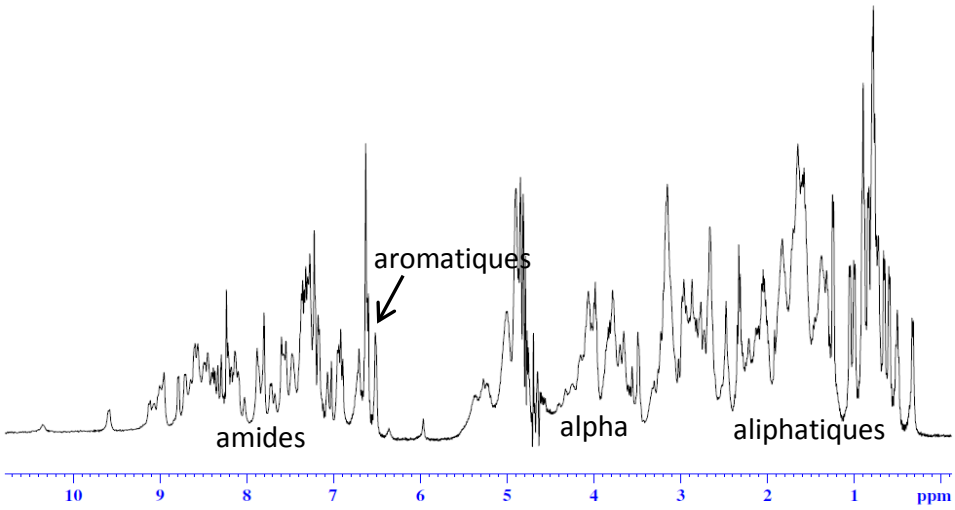


Figure 95 – Spectre RMN 1D-^{1}H de la protéine AhPDF1 issue de la production dans *Pichia pastoris* enregistré sur un spectromètre Varian 600 MHz : AhPDF1 (0,73 mM) dans 300 µL H_2O, 10 % D_2O (pH 4,5) à 25 °C

Le spectre 1D ^{1}H montre la grande pureté de l'échantillon et la bonne dispersion des pics dans la région des amides indique que la protéine est bien structurée (Figure 95).

V. 2) Essai de production de la protéine avec du zinc

D'après les travaux de nos collaborateurs, on sait que la protéine AhPDF1 est impliquée dans la tolérance au zinc (Mirouze et al., 2006). C'est pourquoi nous avons réalisé un essai de production de la protéine AhPDF1 dans *Pichia pastoris* en présence de zinc. Nous avons augmenté la quantité de zinc dans le milieu de culture (750 mL) de $1{,}5x10^{-2}$ mM à 2 mM pour tester si la protéine le chélate lors de sa production. Le surnageant (350 mL) lyophilisé contenant la protéine est dissout dans 500 mL d'eau ultra-pure. Il est ensuite purifié sur une colonne échangeuse de cations HiPrep SP FF 16/10. La protéine est éluée avec une concentration croissante en NaCl avec un gradient de 5 à 50% de tampon d'élution (Tris 20 mM, EDTA 10 mM, NaCl 1 M, pH 7) en 250 mL avec un débit de 5 mL/min. D'après l'absorbance à 280 nm, on obtient deux pics. Chacun est contrôlé en HPLC et en spectrométrie de masse (Figure 96).

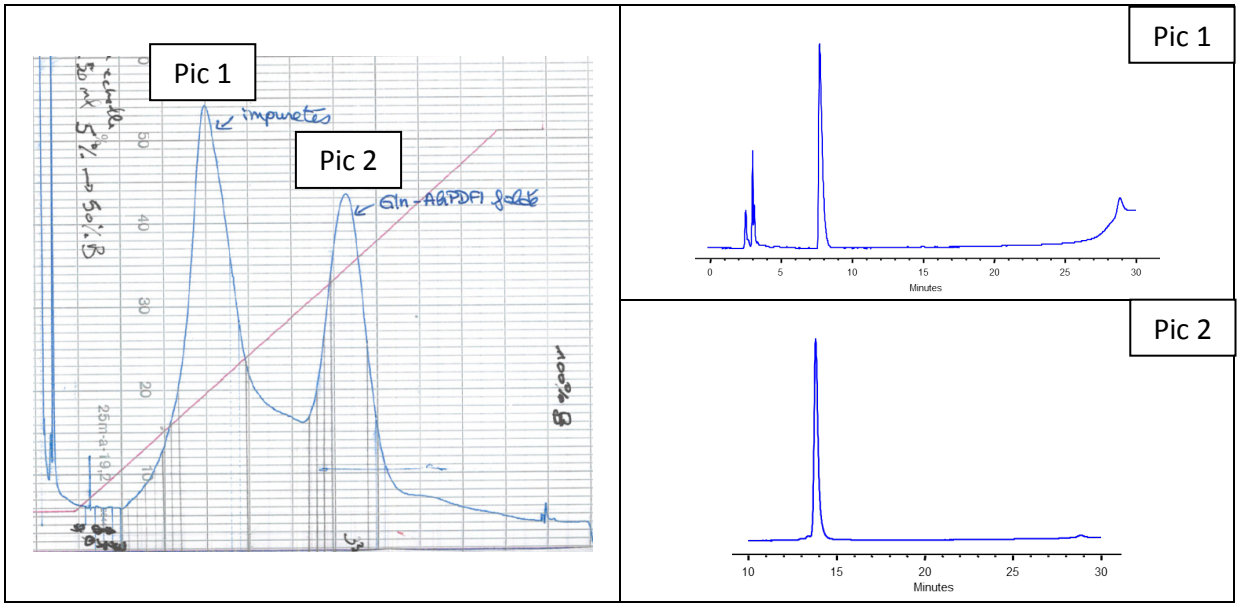


Figure 96 – Chromatogramme de purification sur une colonne échangeuse de cations (gauche). Chromatogrammes HPLC des pics d'intérêts collectés (droite) (Colonne C18 avec un gradient de 20 à 40 % d'acétonitrile/0,1 % TFA en 30 min)

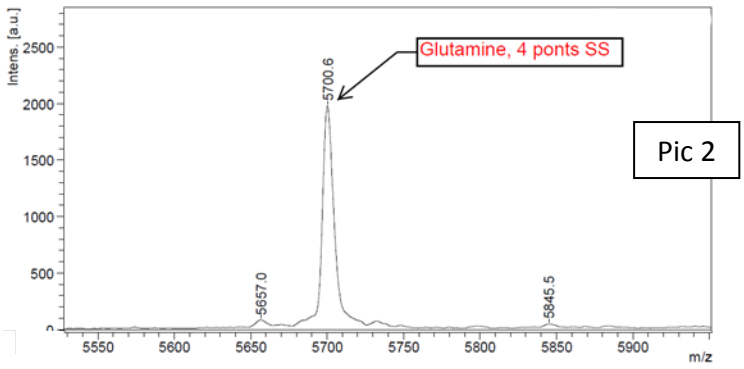


Figure 97 – Analyse par spectrométrie de masse MALDI-TOF du pic 2 HPLC

Le pic 1 correspond à des impuretés, le maximal de son spectre d'absorbance se situe à 266 nm. Le pic 2 correspond à la protéine repliée avec ses 4 ponts avec une glutamine N-terminale (Figure 97). D'après l'absorbance à 280 nm, on obtient environ 1,5 mg (0,26 µmol) de protéine dans le pic 2.

La protéine est ensuite dessalée sur une colonne HPLC semi-préparative C18, on obtient après la purification environ 1 mg (0,17 µmol) de protéine oxydée pure. Lors de la production de la protéine dans la levure sans le zinc, on obtient 1,3 mg (0,23 µmol) de protéine AhPDF1. Les quantités obtenues étant très proches, nous pouvons dire que les rendements sont équivalents.

Les échantillons ont également été analysés en spectroscopie de masse native afin d'observer une éventuelle chélation du zinc mais dans les conditions utilisées aucune présence de zinc n'a pu être mise en évidence sur la protéine. Ce résultat n'est pas très surprenant car la levure *Pichia pastoris* est connue pour produire les protéines riches en cystéines repliées avec les ponts disulfure. La littérature n'offre d'ailleurs pas d'exemple de production de protéines recombinantes à doigts de zinc dans la levure *Pichia pastoris*, par contre elle en offre dans *Escherichia coli* (Kandias et al., 2009).

Des essais préliminaires ont été réalisés par nos collaborateurs de Montpellier afin de vérifier la chélation du zinc sur la protéine AhPDF1. Lors de la production de la protéine AhPDF1, du zinc a été ajouté dans le milieu de croissance de la bactérie *Escherichia coli* au cours de la phase d'induction (à t=1, 2 ou 4 h). Les ions zinc sont directement détectés dans le gel avec une sonde PAR (4-(2-pyridylazol)résorcinol) comme décrit par Lee and Helmann, 2006. La protéine P1 qui lie le zinc a été utilisée comme contrôle positif. On observe une bande sur le gel indiquant que la protéine AhPDF1 chélate du zinc (Figure 98). De plus, on observe que la production de la protéine AhPDF1 augmente lorsque la concentration en zinc augmente. Le zinc joue donc un rôle essentiel pour la protéine AhPDF1. L'hypothèse émise est que le zinc est chélaté par 4 cystéines de la protéine AhPDF1, ce qui en ferait un site de zinc structural.

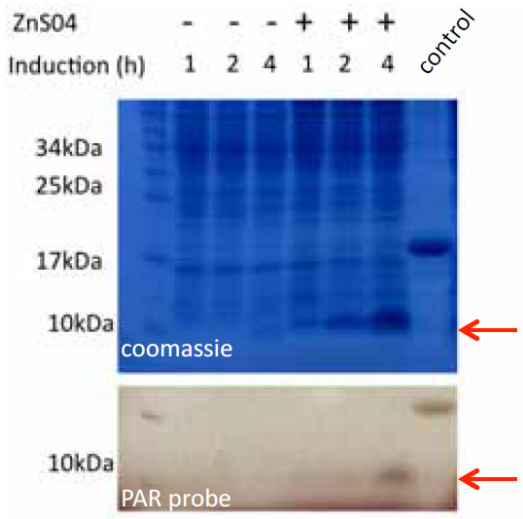


Figure 98 – Mise en évidence de la chélation du zinc par la protéine AhPDF1 par gel d'électrophorèse et sonde PAR. La protéine de contrôle est la protéine P1. (Marquès., L., communication personnelle)

V. 3) Production de la protéine marquée ^{15}N

Contrairement à la synthèse chimique où un marquage uniforme serait inaccessible financièrement, la levure *Pichia pastoris* permet d'obtenir une protéine uniformément marquée ^{15}N et d'envisager des études de dynamique interne par RMN.

Les 150 mL du milieu de *Pichia pastoris* non lyophilisés issus de la culture en blastulor sont dilués dans un volume final de 500 mL d'eau ultra-pure. Le mélange est ensuite chargé sur une colonne échangeuse de cations HiPrep SP FF 16/10. La protéine est éluée avec une concentration croissante en NaCl avec un gradient de 5 à 50 % de tampon B en 250 mL avec un débit de 3 mL/min. D'après l'absorbance à 280 nm, on obtient trois pics sur le chromatogramme (Figure 99). Chaque fraction correspondant à une absorbance positive à 280 nm est analysée en HPLC et spectrométrie de masse (Figure 100).

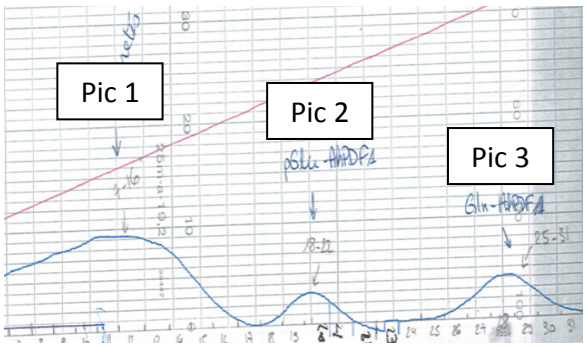


Figure 99 – Chromatogramme de purification sur une colonne échangeuse de cations

Le marquage ^{15}N n'est malheureusement ni uniforme ni complet, il est au maximum de 50 % des NH de la protéine, ceci provient certainement d'une autre source d'azote ^{14}N que celle apportée par le sulfate d'ammonium ^{15}N et l'ammoniac ^{15}N. Les fractions contenant la protéine sous la forme glutamine et pyroglutamine sont rassemblées puisque la glutamine se transforme en pyroglutamine au cours du temps (voir III.2)4). A partir de 150 mL de culture de départ, on obtient environ 0,6 mg de protéine oxydée partiellement marquée ^{15}N. A cette faible concentration, le spectre ^{15}N-HSQC enregistré n'est pas exploitable. Il faudrait optimiser la méthode de production de la protéine en présence d'azote 15.

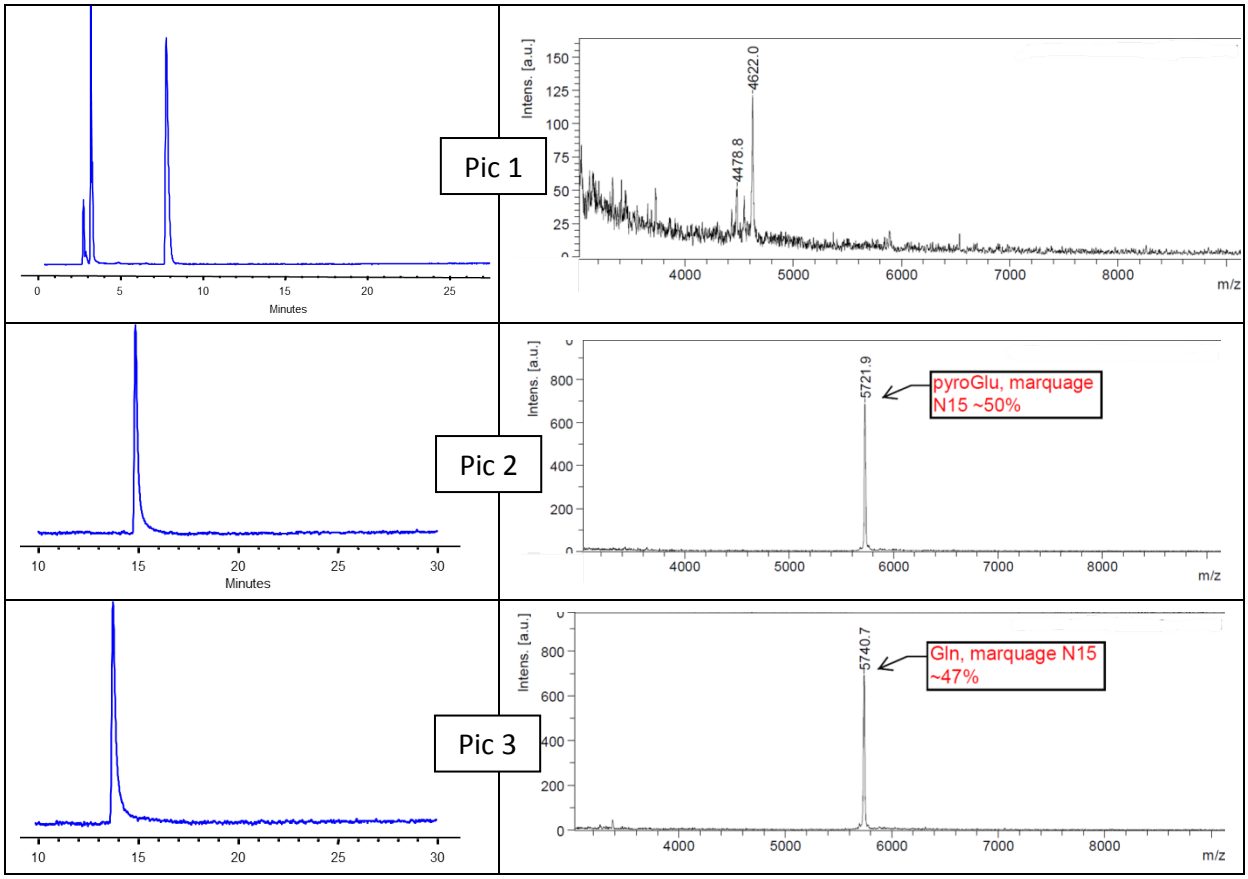


Figure 100 – Chromatogrammes HPLC des pics d'intérêts collectés sur une colonne analytique (Colonne C18 avec un gradient de 20 à 40 % d'acétonitrile/0,1 % TFA en 30 min) (gauche). Analyse par spectrométrie de masse de chaque pic collecté en HPLC (droite)

La littérature offre plusieurs exemples de production de protéines marquées ^{15}N dans *Pichia pastoris*. Par exemple, la production de la protéine PsD1 est réalisée en erlenmeyer d'1 L. Les cellules poussent dans un milieu contenant une dose minimale de glycérol afin de produire de la biomasse. Puis elles sont remises en suspension dans un milieu contenant du chlorure d'ammonium marqué ^{15}N, ensuite l'induction est réalisée avec du méthanol (Cabral et al., 2003).

La protéine interferon-tau (rOvIFN-tau) du mouton est également produite dans la levure *Pichia pastoris*. Pour réaliser un marquage ^{15}N de la protéine, du chlorure d'ammonium marqué ^{15}N est utilisé. Il est ajouté dès le début de la croissance des levures puis en continu à raison de 1 % (Rodriguez and Krishna, 2001).

Un autre exemple est la production de la protéine de transfert des lipides du blé (LTP) qui se fait en fermenteur avec du sulfate d'ammonium marqué ^{15}N comme source d'azote. Le sulfate d'ammonium est ajouté dès le début de la phase de production de biomasse à raison de 0,9 % w/v puis la quantité de sulfate d'ammonium est augmentée au cours de la phase d'induction (0,36% w/v) (de Lamotte et al., 2001).

VI. Avantages des différentes techniques de production

Lors de ce travail sur la production de la protéine AhPDF1, trois méthodes de production ont été testées, chacune présentant leurs avantages et inconvénients qui sont reportés dans le Tableau 16 d'une manière non exhaustive.

	Avantages	Inconvénients
E. coli	• Protéine produite sous forme réduite • Protocole déjà publié • Facilité de mise en place	• Etape de repliement oxydatif nécessaire pour obtenir la forme oxydée • Transformation lente de la glutamine en pyroglutamine • Beaucoup de contaminants difficiles à éliminer lors de la purification • Rendement très faible • Marquage ^{15}N, ^{13}C inenvisageable avec le protocole actuel
Synthèse peptidique	• Protéine produite sous la forme réduite • Pureté du produit • Possibilité de marquer sélectivement des résidus • Choix de la forme pyroglutamine	• Etape de repliement oxydatif nécessaire pour obtenir la forme repliée • Coût élevé
Pichia pastoris	• Protéine produite sous la forme oxydée et repliée • Bon rendement • Possibilité de marquage ^{15}N, ^{13}C	• Transformation lente de la glutamine en pyroglutamine • Purification à améliorer • Etape de réduction nécessaire pour obtenir la forme réduite

Tableau 16 – Avantages et inconvénients des différents moyens de production de la protéine AhPDF1

En théorie la production de notre protéine dans *E. coli* avait beaucoup d'avantages dont les deux principaux sont :

- de produire la protéine sous forme réduite pour les études de chélation
- de pouvoir marquer uniformément la protéine ^{15}N et ^{13}C pour les études structurales

Cependant nous avons fini par abandonner cette technique qui donnait, après repliement oxydatif, une quantité trop faible de protéine oxydée pure pour envisager une étude structurale. Il était, en effet, impossible d'envisager de faire une production de la protéine marquée vu les rendements déjà très faibles obtenus en milieu riche.

Nous nous sommes alors tournés vers la production dans la levure *Pichia pastoris* qui permet également d'avoir la protéine marquée ^{15}N. Elle offre en plus l'avantage d'obtenir AhPDF1 directement repliée avec les 4 ponts disulfure. Nous nous affranchissons donc de l'étape de repliement oxydatif. Après optimisation du protocole en milieu marqué, on pourra obtenir la protéine marquée ^{15}N afin de faire des études sur la dynamique interne de la protéine.

La synthèse chimique présente l'avantage de produire en quantité importante la protéine AhPDF1 pure sous sa forme réduite. L'obtention de la forme réduite est nécessaire pour étudier le repliement de la protéine AhPDF1 en présence de zinc. D'autre part la synthèse chimique permettra de marquer sélectivement les cystéines afin de déterminer le potentiel redox de chaque pont disulfure par RMN.

Chaque technique utilisée présente un atout pour l'étude de la protéine.

VII. Etude structurale de la protéine AhPDF1 oxydée

VII. 1) Détermination de la structure de la protéine AhPDF1 oxydée par RMN

VII. 1) 1) Attribution des déplacements chimiques

La protéine oxydée AhPDF1 obtenue par voie synthétique (2,3 mg/0,4 µmol) et repliée oxydativement comme décrit précédemment est dissoute dans 280 µL d'eau ultra-pure auxquels sont rajoutés 20 µL de D_2O, le pH est ajusté à 4,5. Un spectre 1D-^{1}H est enregistré, il montre une bonne dispersion des pics dans la région des amides (Figure 101). Ceci indique que la protéine est bien structurée.

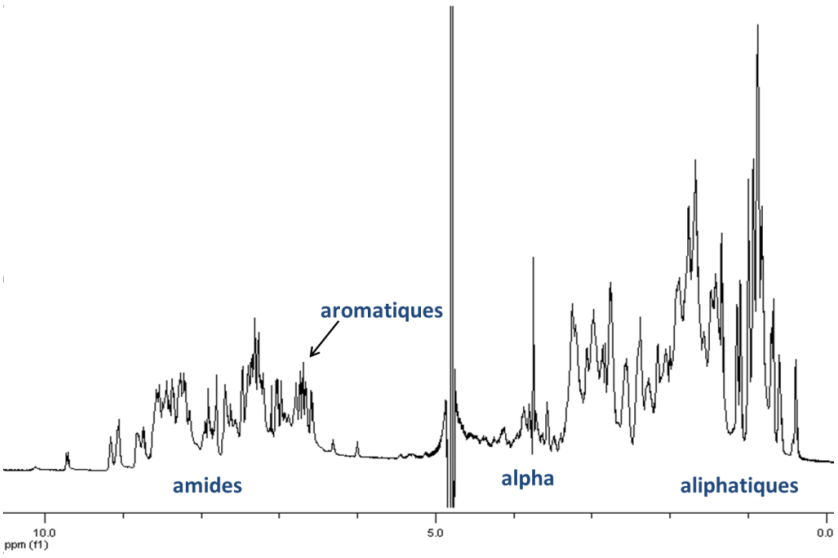


Figure 101 – Spectre RMN 1D de la protéine AhPDF1 synthétique enregistré sur un spectromètre Varian 600 MHz : AhPDF1 (1,3 mM) dans 300 µL H_2O, 10% D_2O (pH 4,5) à 25 °C

Tous les systèmes de spin ont été identifiés grâce aux spectres COSY et TOCSY. L'attribution séquentielle des résidus a été réalisée avec les spectres NOESY en utilisant les interactions intra et inter-résidus. Tous les protons de chaque résidu ont été attribués. Les spectres ont été enregistrés à deux températures : 25 °C et 35 °C pour faciliter l'attribution et lever les ambiguïtés en cas de superposition des pics. L'analyse des spectres ^{15}N-HSQC et ^{13}C-HSQC (Figures 102 et 103) enregistrés en abondance naturelle permettent d'attribuer une partie du squelette peptidique (50 % des N^{H}, 70 % des Cα). Les déplacements chimiques ont été déposés à la BRMB (Biological Magnetic Resonance Data Bank) sous le code 19237 et sont reportés en annexe (Annexe 4).

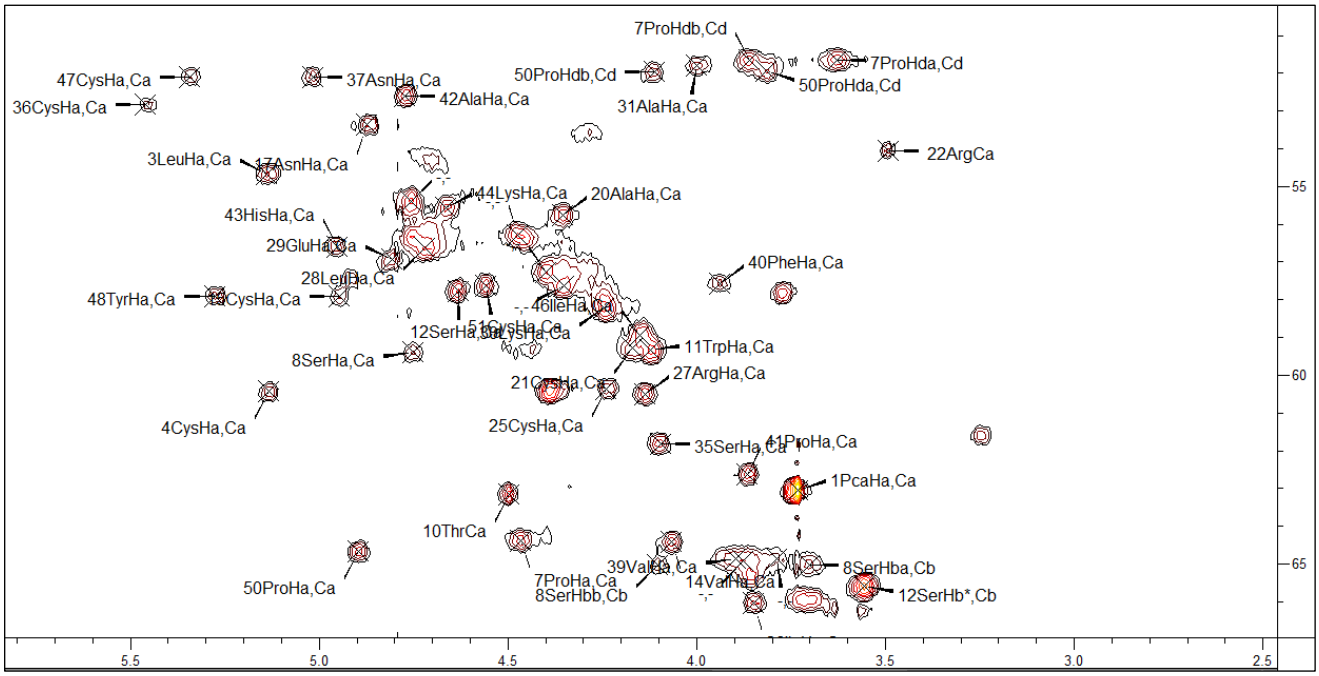


Figure 102 – Région Cα-Hα du spectre ^{13}C-HSQC de la protéine synthétique AhPDF1 enregistré en abondance naturelle sur un spectromètre Varian 600 MHz : AhPDF1 (1,3 mM) dans 300 µL H_2O, 10 % D_2O (pH 4,5) à 25 °C

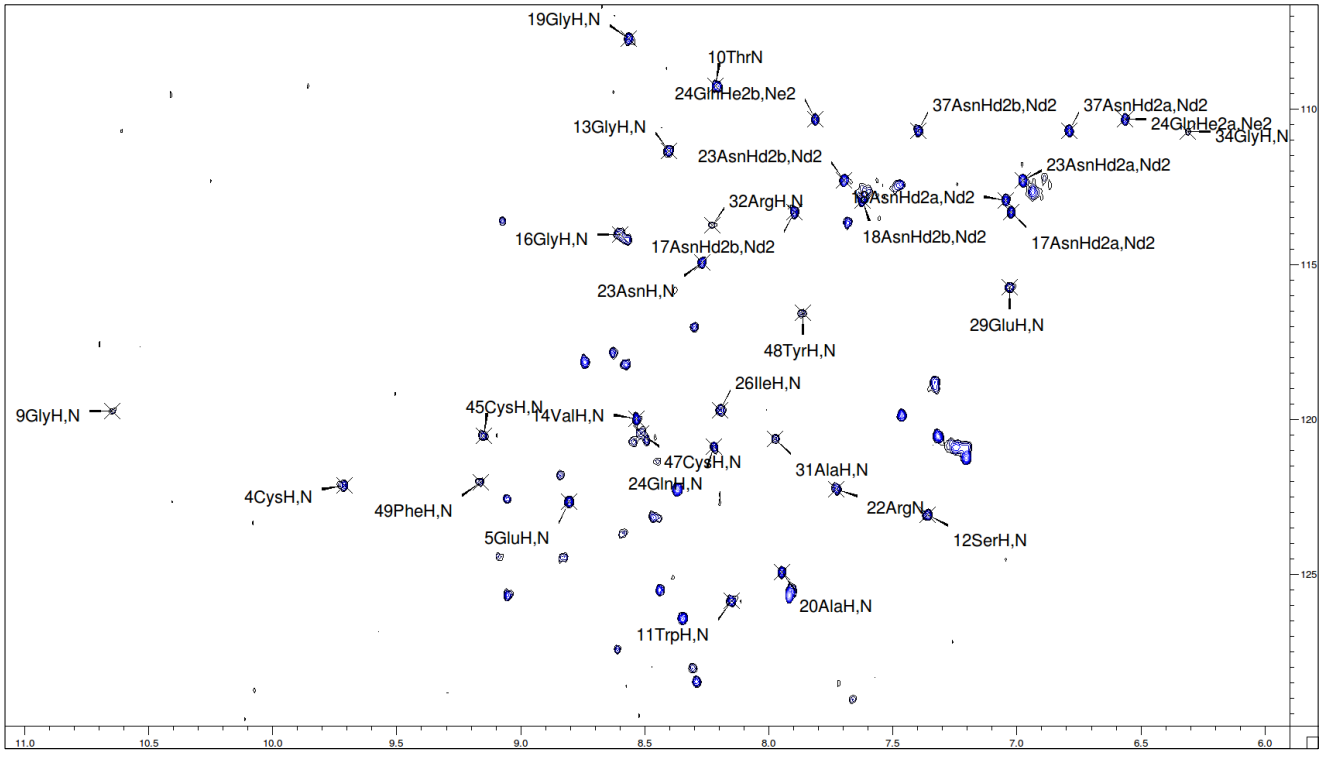


Figure 103 – Spectre ^{15}N-HSQC de la protéine synthétique AhPDF1 enregistré en abondance naturelle sur un spectromètre Varian 600 MHz : AhPDF1 (1,3 mM) dans 300 µL H_2O, 10 % D_2O (pH 4,5) à 25 °C

VII. 1) 2) Attribution des éléments de structure secondaire

Sur la carte 2D ^{1}H NOESY, 859 signaux NOEs ont été attribués de manière non ambiguë et 84 de manière ambiguë.

Une hélice α est caractérisée par des NOEs à moyenne distance entre les résidus $d_{\alpha N}(i, i+3)$ et $d_{\alpha N}(i, i+4)$ (Figure 104). On observe des connectivités NOEs entre les résidus : Ala20(HA)/Asn23(HN) ; Arg22(HA)/Cys25(HN) ; Arg22(HA)/Ile26(HN) ; Asn23(HA)/Ile26(HN) ; Cys25(HA)/Leu28(HN) et Cys25(HA)/Glu29(HN).

Figure 104 – Représentation des NOE à courte et moyenne distance de la protéine AhPDF1

Un feuillet β a été caractérisé à l'aide des connectivités NOEs visibles sur le spectre NOESY (Figure 105). Ce feuillet est constitué de 3 brins antiparallèles β-1 (environ Leu3-Ser8), β-2 (environ Arg32-Val39) et β-3 (environ His43- Cys51), le brin β-3 étant situé au centre du feuillet. On observe également des NOEs entre Phe40, Pro41 et Ala42 qui stabilisent le tour entre les brins β-2 et β-3.

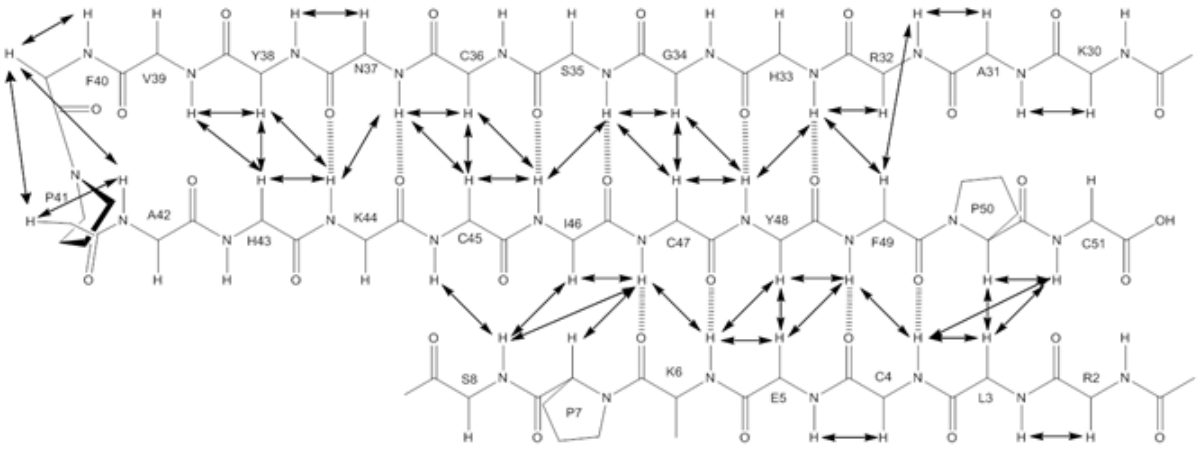


Figure 105 – Interactions NOEs entre les trois brins β de la protéine AhPDF1

Enfin des NOEs sont observés entre les cystéines : Cys4(HN)/Cys51(HN) ; Cys15(HB)/Cys36(HA) ; Cys25(HB)/Cys47(HA) ; Cys21(HB)/Cys45(HA) allant dans le sens d'un repliement CSαβ avec 4 ponts disulfure identique à celui observé chez la défensine RsAFP1 du radis.

VII. 1) 3) La conformation de la proline 41

Une proline peut adopter deux conformations cis ou trans. Selon cette conformation, les signaux diffèrent sur un spectre NOESY. Lorsque la proline est en conformation trans, on observe une interaction NOE entre les deux protons HD de la proline et le proton HA et HN du résidu précédent (Figure 106A). Quand la proline est en conformation cis, on observe des interactions NOE différentes : entre le proton HA de la proline et les protons HA et HN du résidu précédent (Figure 106B).

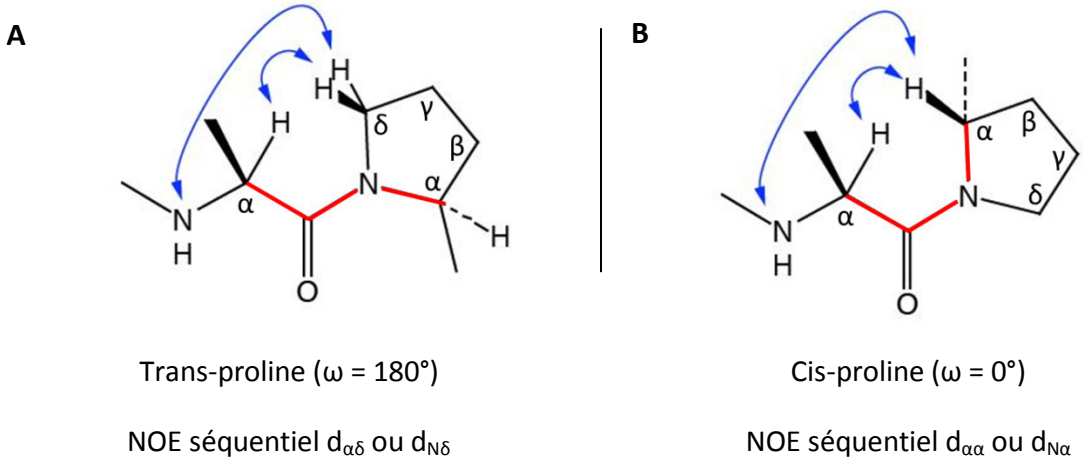


Figure 106 A et B – Schéma de la conformation de la trans-proline et de la cis-proline (Wüthrich, 1986)

Sur le spectre NOESY, on observe des interactions NOE entre le proton HA de la Pro41 et les protons HA et HN de la Phe40 caractéristiques d'une conformation cis de la proline (Figures 107 et 108). On détecte également des pics de faible intensité caractéristiques d'une proline en conformation trans (environ 15 %). La Pro41 se trouve donc majoritairement en conformation cis dans AhPDF1. D'ailleurs chez le radis, on trouve également une cis-proline en position 41 (Fant et al., 1998).

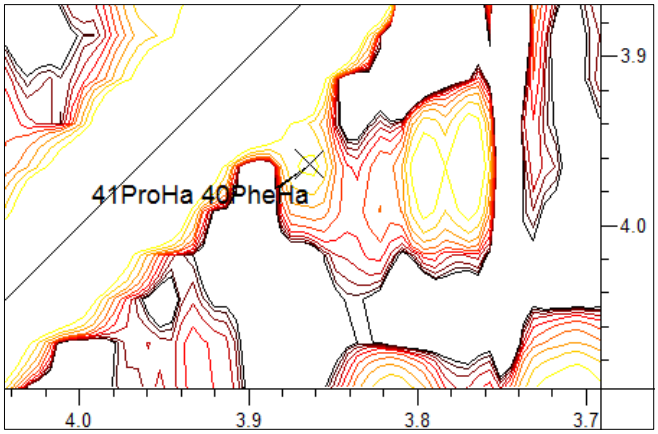


Figure 107 – NOE entre 41Pro(HA) et 40Phe(HA)

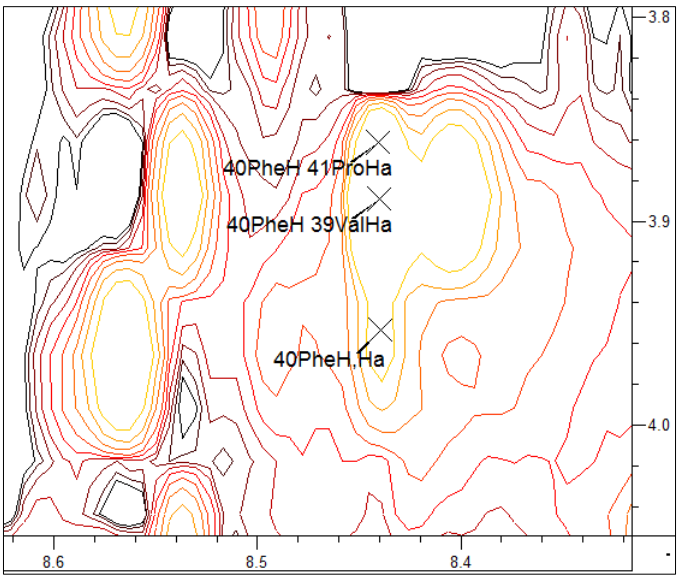


Figure 108 – NOE entre 41Pro(HA) et 40Phe(HN)

VII. 2) Modélisation moléculaire

La structure tridimensionnelle de la protéine AhPDF1 oxydée a été déterminée par modélisation moléculaire dans le logiciel ARIA 2.3 à l'aide des 943 contraintes de distances NOE (Tableau 17). Dans un premier temps le calcul a été fait en n'imposant aucun pont disulfure, seules les distances NOE entre les cystéines ont été introduites dans le calcul. Les structures ainsi obtenues sont comparables à celles de RsAFP1 avec un réseau de ponts conservé (4-51/15-36/21-45/25-47). C'est pourquoi les ponts ont ensuite été imposés par des liaisons covalentes. La proline 41 apparaissant majoritairement en conformation cis sur le spectre NOESY, nous avons imposé que sa conformation soit cis. S'agissant de la protéine synthétique, la structure a été calculée avec un pGlu en position 1.

Contraintes utilisées		
NOE		
	Non ambiguë	859
	Ambiguë	84
Nombre de violations par structure		
	Distance > 0,3Å	0,1
Diagramme de Ramachandran (%) (Laskowski et al., 1993)		
	Zones très favorables	85,85
	Zones autorisées	14,15
	Zones autorisées étendues	0
	Zones interdites	0
RMSD (Å)		
	Squelette	Tous les atomes
2-51	0,68 ± 0,12	1,51 ± 0,33
3-51	0,58 ± 0,11	**1,14 ± 0,11**
Hélice α	0,48 ± 0,18	1,10 ± 0,32
Brin β-1	0,66 ± 0,46	1,10 ± 0,53
Brin β-2	0,37 ± 0,12	0,89 ± 0,21
Brin β-3	0,33 ± 0,08	0,73 ± 0,19

Tableau 17 – Contraintes et statistiques structurales obtenues sur l'ensemble des 10 structures représentatives de la protéine AhPDF1

La structure finale a été déterminée à partir de 500 structures aléatoires. A chaque itération les 200 structures de plus faible énergie de contrainte sont conservées et 300 autres sont calculées, et ainsi de suite jusqu'à la huitième et dernière itération où les 50 meilleures structures classées en fonction de leur énergie de contrainte sont affinées dans l'eau. Parmi ces 50 structures, 10 structures sont sélectionnées en fonction de leur énergie (Figure 109). Les structures sont déposées dans la « Protein Data Bank » sous le code pdb 2M8B.

Parmi les 10 structures déposées, aucune ne présente de violation de distance supérieure à 0,5 Å et seulement une structure possède une violation à 0,3 Å (Tableau 17). Les 10 meilleures structures affinées dans l'eau ont été analysées par le logiciel PROCHECK (Laskowski et al., 1996) et tous les résidus se trouvent dans les zones très favorables et autorisées du diagramme de Ramachandran (Tableau 17 et Figure 111).

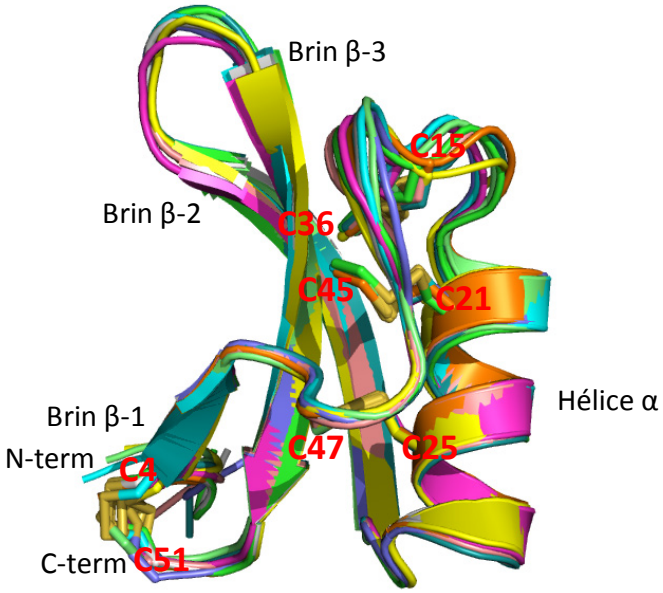
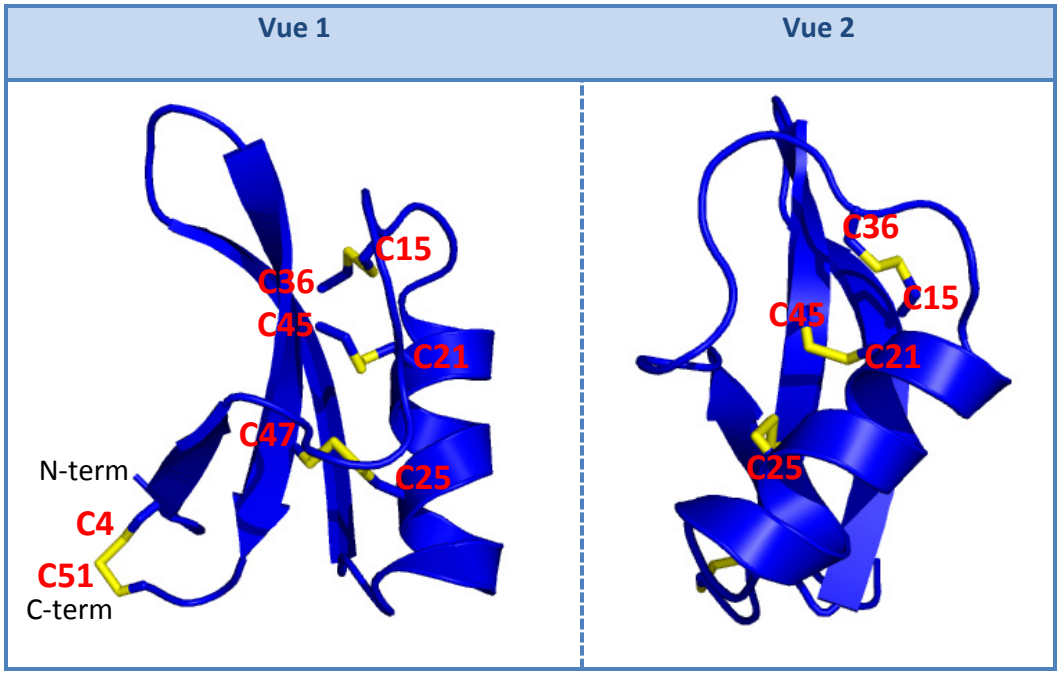


Figure 109 – Superposition des 10 structures de AhPDF1 déposées dans la pdb (2M8B) (image réalisée avec le logiciel Pymol)



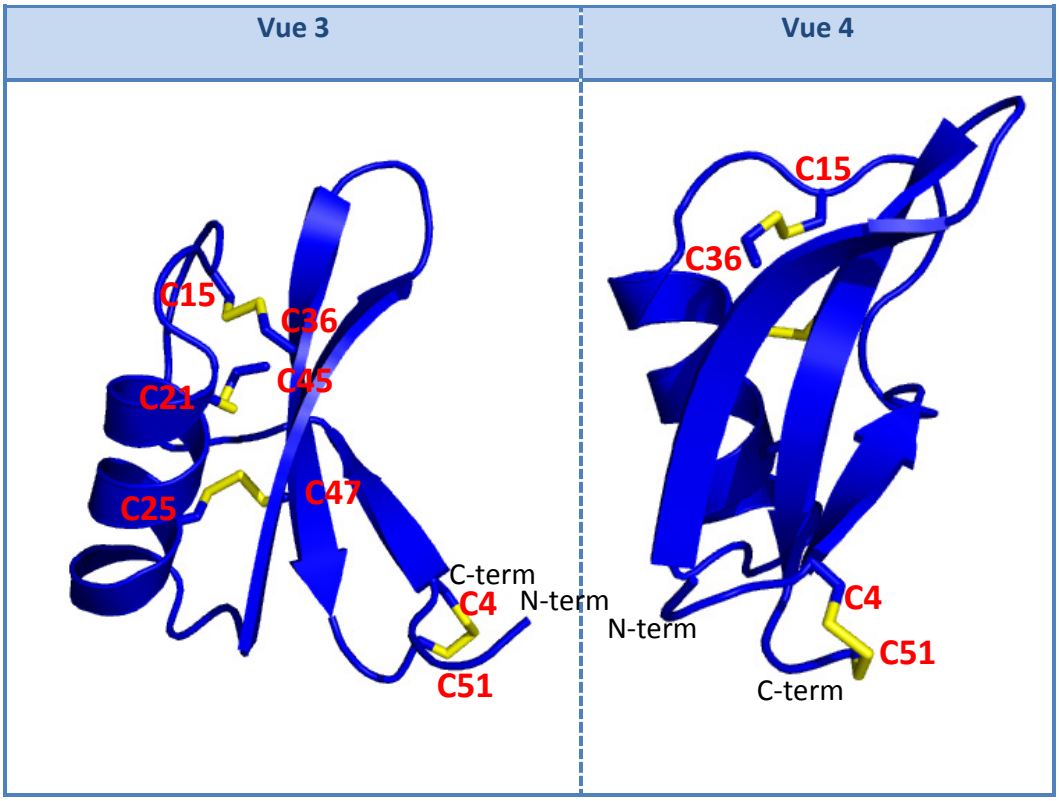


Figure 110 – Structure tridimensionnelle de la protéine AhPDF1 avec une rotation de 90° entre chaque vue (vues réalisées avec le logiciel Pymol)

Comme la séquence de la protéine le laissait envisager, AhPDF1 adopte une structure CSαβ (Figures 109 et 110) avec 4 ponts disulfure.

Cette structure est constituée :

- D'une hélice α : Asn18 à Glu29,
- De trois brins β anti-parallèles :
  - Brin β-1 : Cys4 à Pro7
  - Brin β-2 : Arg32 à Val39
  - Brin β-3 : Ala42 à Phe49

Et d'une boucle (Ser8 à Asn18) qui contient un

  - β-turn de type IV : Ser8 à Trp11

Après superposition des 10 meilleures structures, la valeur du RMSD global sur tous les atomes de la protéine moins les 2 premiers acides aminés est de 1,14 Å (Tableau 17). Cette valeur montre une bonne définition et une bonne superposition des structures calculées. Le premier brin est un peu moins bien défini mais cela peut s'expliquer par le fait qu'il soit plus court et qu'il comporte moins de liaisons hydrogène que les autres (Figure 109). Toutes les structures secondaires de la protéine sont bien définies.

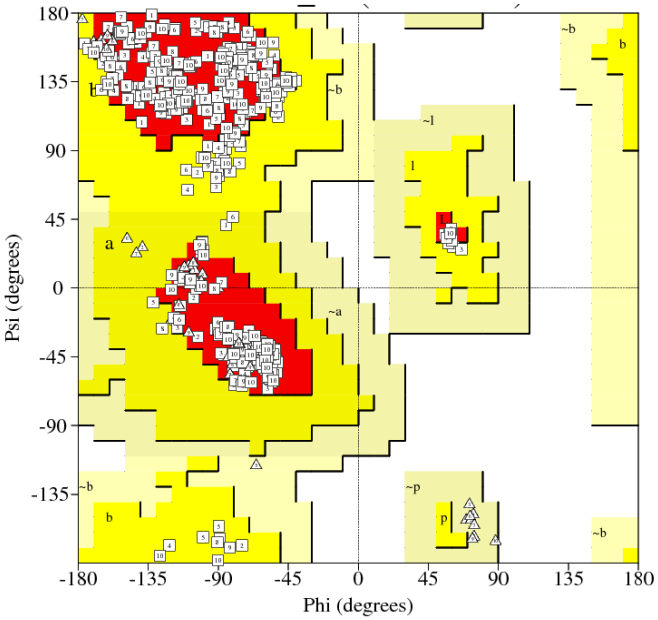


Figure 111 – Diagramme de Ramachandran des 10 meilleures structures de la protéine AhPDF1. Les glycines sont représentées par des triangles. Cette figure est réalisée avec le logiciel PROCHECK (Laskowski et al., 1993)

La structure tridimensionnelle de la protéine est dictée en partie par la présence de ses 4 ponts disulfure. Les cystéines Cys21 et Cys25 sont du même côté de l'hélice et forment facilement des ponts disulfure avec les deux cystéines présentes sur le même côté du brin β-3 (Cys45 et Cys47). Le troisième pont disulfure, qui relie la boucle avec le brin β-2, se situe entre les cystéines Cys15 et Cys36. Le quatrième pont disulfure (Cys4 et Cys51) maintient les extrémités N et C terminales ensemble. Ces 4 ponts disulfure rendent la protéine très compacte et très stable. La protéine mesure environ 36 Å en hauteur et 29 Å en largeur, ceci correspond à une structure globulaire.

La surface de AhPDF1 représentant le potentiel hydrophobe montre que certaines régions sont hydrophiles et d'autres hydrophobes comme la boucle entre les brins β2 et β3. On observe surtout des patchs hydrophobes au milieu de régions hydrophiles ne permettant pas de conclure que la défensine est un peptide amphiphile (Figure 112). Les résidus hydropobes et positifs sont ici repartis de façon plutôt homogène sur toute la surface.

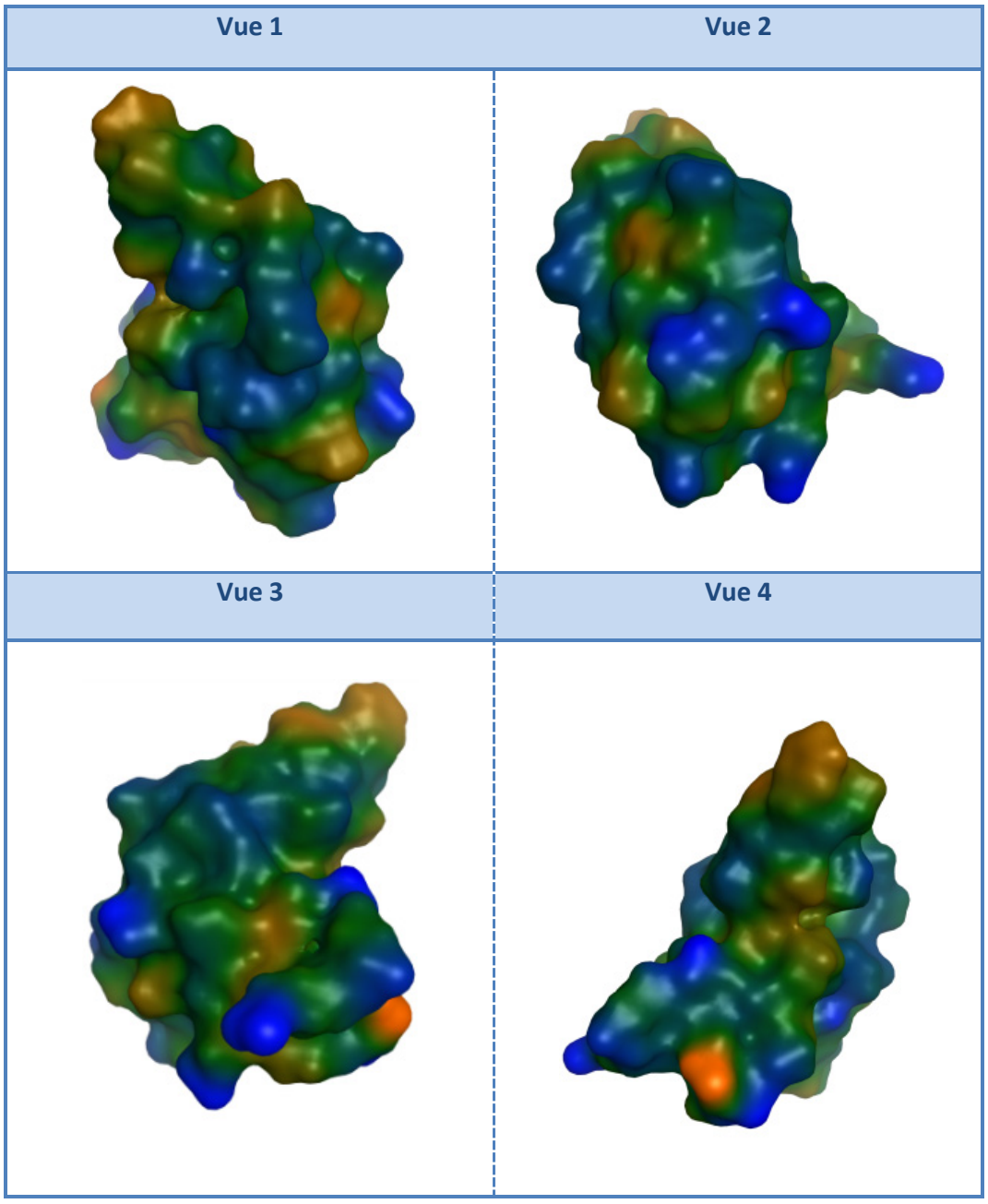


Figure 112 – Potentiel hydrophobe de la protéine AhPDF1 avec une rotation de 90° entre chaque vue. Les parties hydrophiles sont colorées en bleu et les parties hydrophobes en marron. Les surfaces sont calculées à partir des 4 positions du squelette peptidique de la Figure 110 (vues réalisées avec le logiciel MOE)

VII. 3) Comparaison des spectres obtenus avec AhPDF1 issue de la levure et AhPDF1 synthétique

La production de la protéine dans la levure a permis d'obtenir suffisamment de protéine pure (0,7 mM) sous la forme oxydée pour enregistrer un spectre RMN TOCSY. La comparaison des spectres des protéines issues des deux origines différentes confirme que les deux protéines sont identiques. De plus on remarque que les signaux du spectre de la protéine issue de la levure sont mieux définis (Figure 113) et qu'il n'existe pas de pics non résolus et peu intenses entre 7,7 ppm et 8,5 ppm caractéristiques d'une forme non ou mal repliée.

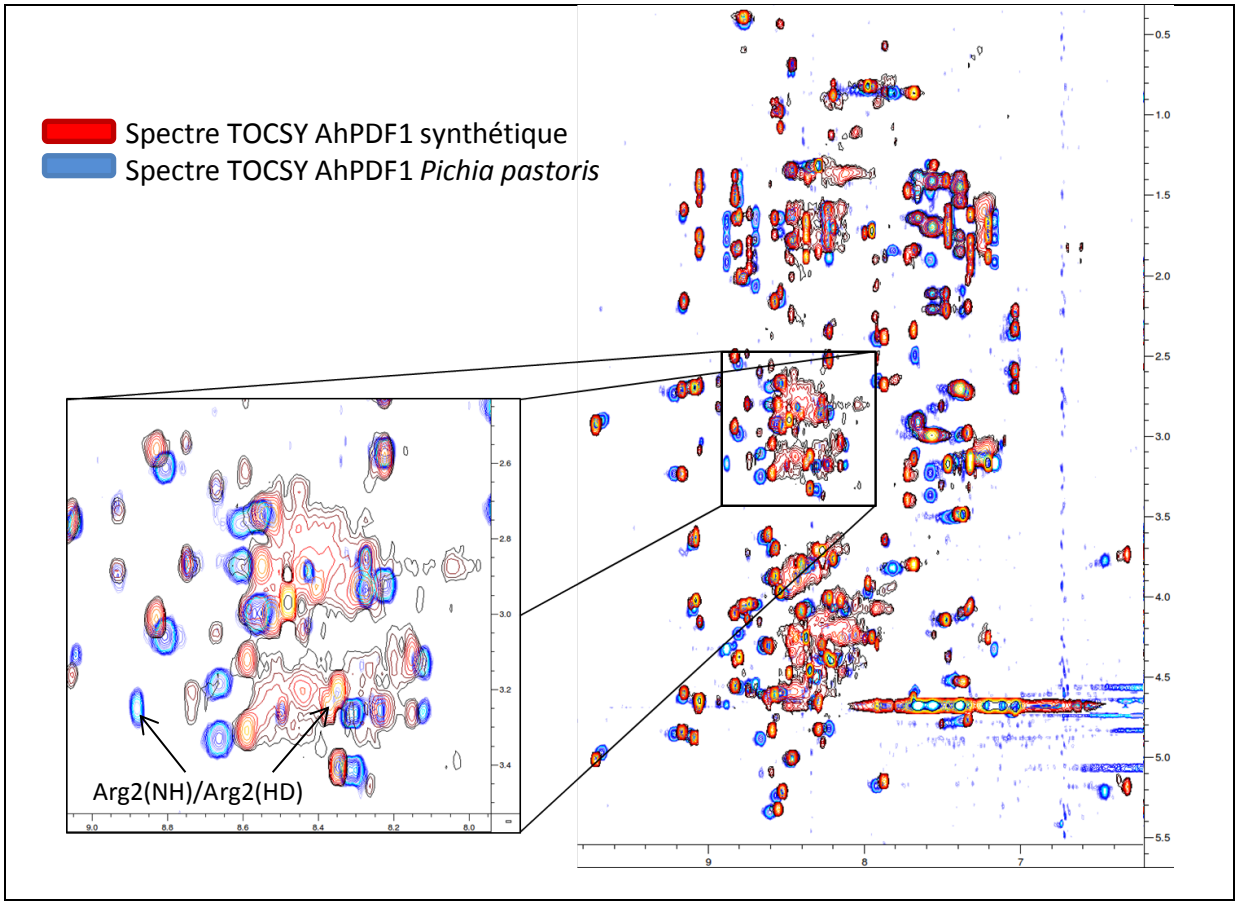


Figure 113 – Superposition des spectres TOCSY de la protéine AhPDF1 synthétique (Varian 600 MHz, 80 ms, 1,3 mM, 25 °C, pH 4,5) et issue de la production en levure *Pichia pastoris* (Bruker 500 MHz, 70 ms, 0,7 mM, 25 °C, pH 4,5)

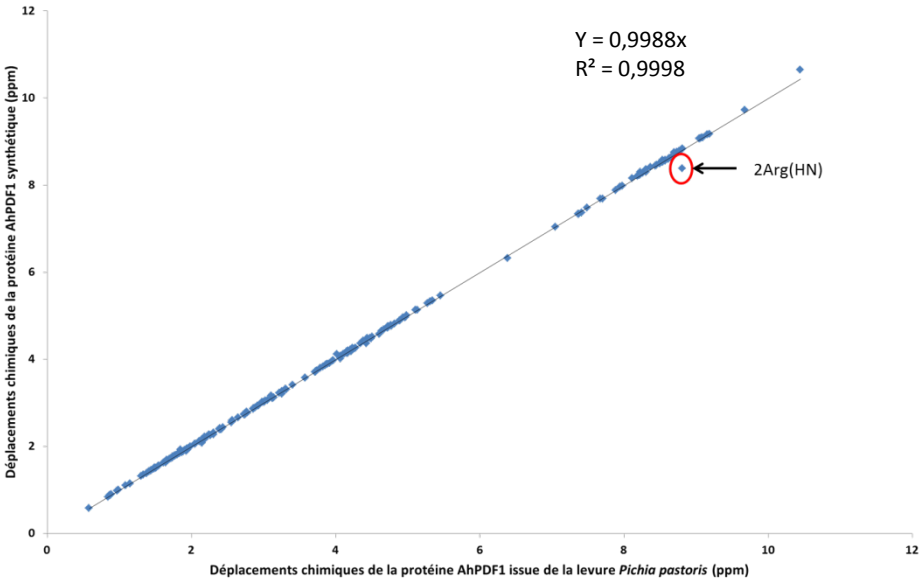


Figure 114 – Déplacements chimiques de la protéine AhPDF1 synthétique en fonction des déplacements chimiques de la protéine issue de la levure *Pichia pastoris*

La comparaison des déplacements chimiques entre les deux spectres montre qu'ils sont quasi identiques, à l'exception du HN de l'Arg2 qui a bougé de 0,4 ppm (Figure 114). Le déplacement important de ce proton est sûrement dû au fait que le premier résidu est une glutamine ou une pyroglutamine en cours de formation. Quelques autres protons, surtout des protons appartenant aux chaînes latérales qui peuvent être plus sensibles à l'environnement comme une légère variation de pH ou à la présence de contre-ions, subissent également de petites variations de déplacement chimique.

Nous pouvons en conclure que les deux protéines synthétique et issue de la production dans *Pichia pastoris* adoptent la même conformation. L'appariement des ponts réalisé par repliement oxydatif sur la protéine synthétique est le même que celui réalisé par la levure *Pichia pastoris*. Cependant il faut noter l'existence de formes minoritaires sur le spectre de la protéine synthétique qui peuvent être dus à des mauvais appariements des 4 ponts ou plus probablement à un faible pourcentage de trans-Pro41 (détectable sur le spectre NOESY). Le spectre de masse de la protéine oxydée synthétique est bon (5682,5 Da ± 1) mais les spectres de mobilité ionique montrent bien que la protéine synthétique repliée spontanément à pH7 est hétérogène. En effet, il y aurait un mélange de différentes espèces de même masse de la protéine à 4 ponts. Par contre les spectres de mobilité ionique de la protéine issue de la levure montrent que les deux formes glutamine et pyroglutamine de la protéine sont homogènes. On observe une seule espèce avec le même appariement de ponts pour chaque forme de la protéine (Gln et pGlu).

VII. 4) Modélisation par homologie des défensines des familles AhPDF1 et AtPDF1

En comparant les séquences des protéines AhPDF1 et AtPDF1 (Figure 115), on remarque qu'elles contiennent un peptide signal de 29 acides aminés à l'extrémité N-terminale suivi du peptide d'intérêt de 51 acides aminés contenant les 8 cystéines caractéristiques des défensines de plantes. Après clivage du peptide signal, le résidu glutamine en N-terminal de la défensine se transforme en pyroglutamine.

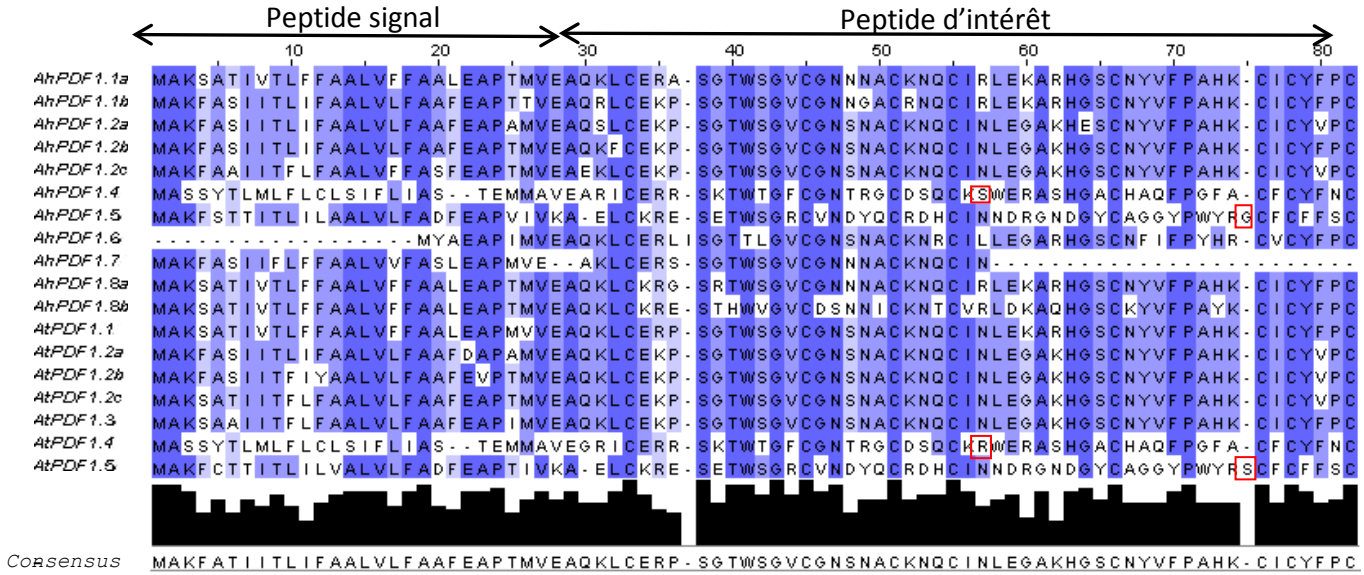


Figure 115 – Alignement de séquences de défensines des familles AhPDF1 et AtPDF1. La conservation des acides aminés est représentée en bleu de différente intensité et sous forme d'histogramme

Les défensines PDF1 peuvent être classées en 3 groupes selon la tolérance qu'elles confèrent à la levure (Shahzad et al., 2013):

- Le groupe A comprend les défensines AhPDF1.a et b ; AhPDF1.2a, b et c ; AhPDF1.8a et b ainsi que celles de la famille AtPDF1 (cerclées en rouge sur la Figure 116). Il est intéressant de noter que toutes les défensines du groupe A confèrent la tolérance au zinc à la levure malgré de nombreuses différences de séquence.
- Le groupe B comprend les défensines AhPDF1.4 et AhPDF1.5 (cerclées en bleu sur la Figure 116). Elles confèrent également une tolérance au zinc à la levure mais moins importante que celles du groupe A. Alors que les défensines AhPDF1.4 et AtPDF1.4 varient seulement de deux acides aminés y compris le résidu N-terminal (S27/R27), cela change leur capacité de tolérance au zinc à la levure. En effet, la défensine AhPDF1.4 prodigue une tolérance au zinc moindre que la défensine AtPDF1.4. Il en est de même pour les défensines AhPDF1.5 et AtPDF1.5 (rend la levure plus tolérante au zinc) où 4 acides aminés diffèrent (G44/S44), dont 3 sont situés dans le peptide signal.

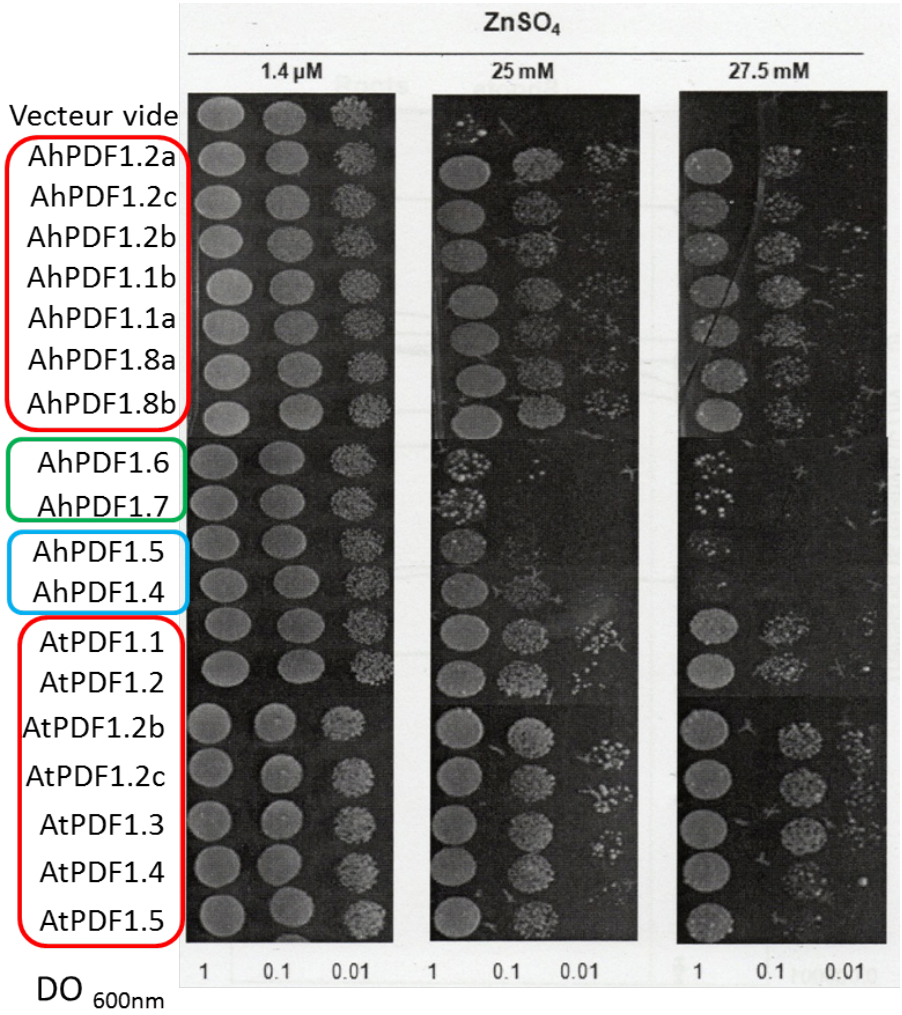


Figure 116 – Tolérance au zinc de la levure *S. cerevisiae* exprimant les protéines de *Arabidopsis* halleri et *Arabidopsis thaliana* (d'après Shahzad et al., 2013)

- Le groupe C comprend les défensines AhPDF1.6 et AhPDF1.7 (cerclées en vert sur la Figure 116) qui ne confèrent pas de tolérance au zinc à la levure. Dans un cas le peptide signal de la défensine AhPDF1.6 est tronqué et dans l'autre cas la séquence même de AhPDF1.7 est tronquée. Ce sont donc des cas particuliers et leur incapacité à conférer la tolérance au zinc à la levure n'est pas surprenante.

MODELLER est un logiciel utilisé pour construire des modèles de structures tridimensionnelles de protéines par homologie. Son principe est de réaliser un alignement de séquence entre la séquence de la protéine à modéliser et une séquence dont la structure 3D est résolue (Sali and Blundell, 1993) (Eswar et al., 2006). A partir de la séquence de AhPDF1.1b et du jeu des 10 structures tridimensionnelles de AhPDF1.1b obtenues par RMN, nous avons pu modéliser par homologie les structures des défensines : AhPDF1.1a, AhPDF1.2a, AhPDF1.2b, AhPDF1.2c, AhPDF1.4, AhPDF1.5, AhPDF1.6, AhPDF1.8a, AhPDF1.8b de la famille d'Arabidopsis halleri et AtPDF1.1, AtPDF1.2, AtPDF1.3, AtPDF1.4 et AtPDF1.5 d'*Arabidopsis thaliana*. Nous n'avons pas modélisé les défensines AhPDF1.7 et AtPDF1.7 qui sont tronquées. Il est important

de noter qu'il est très rare d'avoir une telle collection de séquences dans une famille de protéines d'un même organisme et de pouvoir en obtenir la structure tridimensionnelle.

Ceci nous a permis de faire une étude de la surface de la protéine, de ses potentiels hydrophobes et électrostatiques (avec le logiciel MOE) sur les protéines de la famille AhPDF1 et AtPDF1 (voir Annexes 5 et 6), afin de comprendre si la tolérance au zinc induite par la défensine AhPDF1 pourrait être liée à de petites variations des potentiels hydrophobes ou électrostatiques. Le cas des 2 défensines AhPDF1.4 et AtPDF1.4 est intéressant car la différence provient du seul résidu 27 Ser/Arg. On s'aperçoit que la région C-term de l'hélice α de AtPDF1.4 est plus hydrophile que celle de AhPDF1.4 et que toute la région entourant R27 devient basique (Figure 117).

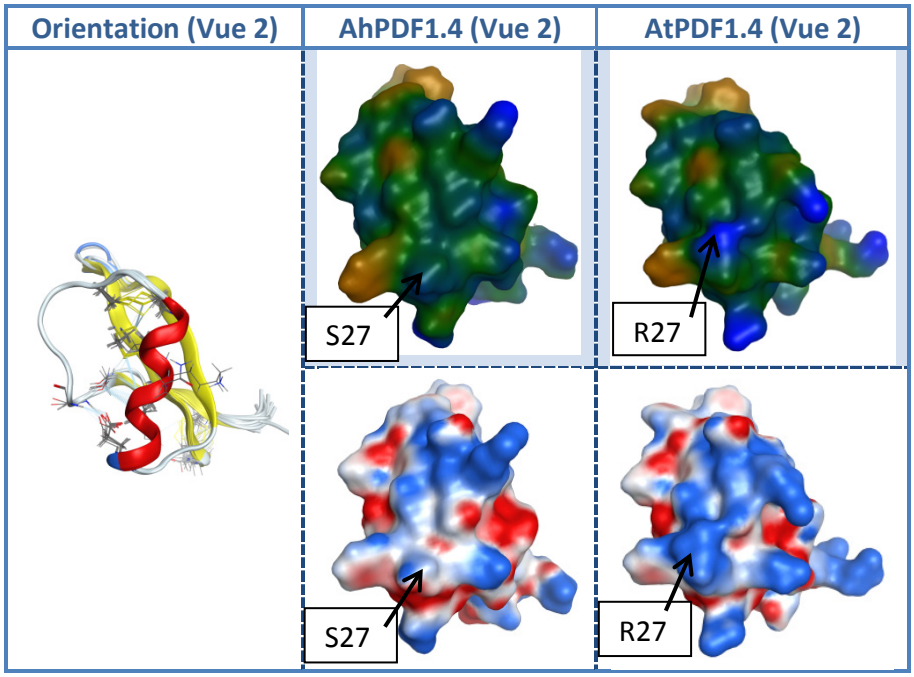


Figure 117 – Influence de la nature du résidu 27 sur l'hydrophobicité et le potentiel électrostatique des défensines AhPDF1. 4 (S27) et AtPDF1.4 (R27) représentées à gauche et à droite respectivement. Les parties positives sont colorées en bleu et les parties négatives en rouge (échelle électrostatique : -40 à +40 V). Les parties hydrophiles sont colorées en bleu et les parties hydrophobes en marron (échelle d'hydrophobicité standard du logiciel MOE).

En fait cette analyse est totalement spéculative car nous ne savons pas si la structure 3D des défensines fixant le zinc aura le même repliement que la structure oxydée avec les ponts disulfure. Lorsque que nous aurons plus d'informations sur la fixation du zinc, nous aurons à disposition cette collection de structures et nous pourrons poursuivre l'étude de la relation structure-fonction.

Pour le moment cela confirme les travaux de nos collaborateurs : c'est le niveau d'expression de la défensine dans la plante qui la rend tolérante au zinc. Il faudrait tester les autres défensines, en les sur-exprimant dans la plante afin de vérifier si cela donne une tolérance au zinc à la plante.

VIII. Réduction contrôlée de la protéine AhPDF1 et essais de chélation du zinc

VIII. 1) Modèles de chélation *in silico*

La coordination du zinc se fait principalement de manière tétraédrique dans les protéines (Lee and Lim, 2008). Si la chélation se fait par l'intermédiaire de 4 cystéines, la réduction de 2 ponts sera suffisante pour réaliser cette chélation au sein de AhPDF1 avec ou sans changement conformationnel. Par contre si la chélation se fait par l'intermédiaire de cystéines et d'histidines, il en existe deux dans la séquence de la protéine AhPDF1, cela impliquera obligatoirement un changement de conformation. En supposant que la protéine ne change pas de conformation lors de la chélation du zinc, deux possibilités de chélation du zinc sont envisageables.

Figure 118 – Représentations des modèles de chélation du zinc *in silico* en position « haute » (gauche) et « basse » (droite) réalisées avec le logiciel Pymol

Un atome de zinc a été inséré *in silico* dans la protéine AhPDF1 entre les Cys21/Cys25/Cys45/Cys47 (position dite basse) puis entre les Cys15/Cys21/Cys36/Cys45 (position dite haute) sans changer sa structure tridimensionnelle (Figure 118). La position « haute » est assez accessible à cause de la boucle flexible située entre le brin β-1 et l'hélice α. La position « basse », quant à elle, est plus enfouie dans le cœur de la protéine, elle est située entre le brin β-3 et l'hélice α, et implique les 4 cystéines du motif structural CSαβ. En moyenne les distances entre l'atome de zinc et les cystéines de la position « basse » sont de 3 Å, et pour la position « haute » les distances sont d'environ 2 Å. Les ponts de la position « basse » semblent a priori plus difficiles à réduire que les ponts de la position « haute » de la protéine (Figure 118).

VIII. 2) Contrôle de la réduction

Dans le cadre d'une collaboration avec l'équipe du Laboratoire de Spectrométrie de Masse BioOrganique (*LSMBO*) dirigée par Alain Van Dorsselaer, je me suis rendue au laboratoire de Strasbourg afin de suivre la réduction de la protéine AhPDF1 et la chélation du zinc par

spectrométrie de masse. Toutes les expériences de réduction de la protéine et de chélation du zinc sont préliminaires.

Nous avons besoin de la protéine AhPDF1 sous son état réduit pour la mettre en présence de zinc et tenter une chélation et un repliement autour du zinc. Nous avons aussi besoin de protéine avec un ou 2 ponts formés parce que selon notre hypothèse, quatre cystéines libres, donc 2 ponts réduits, sont suffisantes pour chélater un atome de zinc.

Les méthodes de production de la protéine AhPDF1 nous ont permis de l'obtenir à l'état réduit par synthèse chimique sur support solide et à l'état oxydé après repliement oxydatif ou directement par production dans la levure *Pichia pastoris*. Nous avons cherché tout d'abord les conditions nécessaires pour conserver la protéine synthétique à l'état réduit. Puis nous avons pratiqué une réduction ménagée de la protéine oxydée issue de la levure afin d'obtenir la protéine avec un ou deux ponts disulfure.

La spectrométrie de masse en conditions natives a été choisie comme méthode d'analyse pour suivre la chélation du zinc. Cette technique permet de savoir avec précision l'état de la protéine et son nombre de ponts. De plus la spectrométrie de masse est peu consommatrice en protéine.

VIII. 2) 1) Obtention de la protéine réduite

Nous avons vu précédemment que la protéine s'oxyde rapidement à partir de pH 7, c'est pourquoi il est nécessaire de travailler en absence totale d'oxygène en dégazant les solutions avec de l'argon et en travaillant continuellement sous atmosphère inerte. Il est de plus indispensable d'ajouter un réducteur (TCEP) afin de conserver la protéine sous son état réduit.

Les masses théoriques (en Da) de la protéine AhPDF1 sous la forme pyroglutamine et glutamine, et sous ses différents états (de l'état réduit à totalement oxydé), avec un ou plusieurs atomes de zinc sont répertoriées dans les Tableaux 18 et 19.

pGlu	AhPDF1	+ 1 Zn	+ 2 Zn	+ 3 Zn
Réduite	5690,5	5755,9	5821,3	5886,7
1 pont SS	5688,5	5753,9	5819,3	5884,7
2 ponts SS	5686,5	5751,9	5817,3	5882,7
3 ponts SS	5684,5	5749,9	5815,3	5880,7
Oxydée 4 ponts SS	5682,5	5747,9	5813,3	5878,7

Tableau 18 – Masses théoriques de la protéine pGlu-AhPDF1 en fonction du nombre de ponts et d'atomes de zinc présents

Gln	AhPDF1	+ 1 Zn	+ 2 Zn	+ 3 Zn
Réduite	5707,5	5772,9	5838,3	5903,7
1 pont SS	5705,5	5770,9	5836,3	5901,7
2 ponts SS	5703,5	5768,9	5834,3	5899,7
3 ponts SS	5701,5	5766,9	5832,3	5897,7
Oxydée 4 ponts SS	5699,5	5764,9	5830,3	5895,7

Tableau 19 – Masses théoriques de la protéine Gln-AhPDF1 en fonction du nombre de ponts et d'atomes de zinc présents

Différentes cinétiques de réduction de la protéine en fonction de la concentration en TCEP sont réalisées (Tableau 20). Toutes les solutions sont dégazées au préalable et la réaction est réalisée sous Argon. La protéine AhPDF1 pGlu synthétique réduite (10 µM) solubilisée dans un tampon acétate d'ammonium (150 mM) à pH 7 est soumise à des concentrations croissantes de TCEP (0, 10, 20, 30 et 40 µM) pendant des temps différents (0, 30 min, 1 h et 2 h), puis est analysée par spectrométrie de masse native.

TCEP	0	30 min	1 h	2 h
0 µM	5687,8 ± 0,2 1 ou 2 ponts SS	5686,3 ± 0,1 2 ponts SS	5686,8 ± 0,1 2 ponts SS	5686,6 ± 0,1 2 ponts SS
10 µM	5687,4 ± 0,6 1 ou 2 ponts SS	5687,4 ± 0,7 1 ou 2 ponts SS	5688,1 ± 0,2 1 pont SS	5686,8 ± 0,4 2 ponts SS
20 µM	5687,6 ± 0,6 1 ou 2 ponts SS	5688,4 ± 0,2 1 pont SS	5688,9 ± 0,2 1 pont SS	5688,9 ± 0,2 1 pont SS
30 µM	5687,7 ± 0,9 1 ou 2 ponts SS	5689,3 ± 0,3 0 ou 1 pont SS	5689,7 ± 0,1 0 ou 1 pont SS	5690,1 ± 0,1 réduite
40 µM	5690,2 ± 0,6 réduite	5690,1 ± 0,1 réduite	5690,3 ± 0,1 réduite	5690,3 ± 0,1 réduite

Tableau 20 – Masses observées de la protéine pGlu-AhPDF1 à différents temps et en présence de concentrations croissantes de TCEP

Le premier constat est que la protéine AhPDF1 synthétique que l'on pensait totalement réduite, est déjà repliée avec 1 ou 2 ponts au début de la cinétique, lorsqu'elle est placée dans l'acétate d'ammonium à pH 7. En effet, la masse observée est de 5687,8 Da (Figure 119) ce qui ne permet pas de trancher entre la forme pGlu AhPDF1 à un pont (masse théorique 5688,5 Da (Tableau 18)) ou à 2 ponts (masse théorique (5686,5Da (Tableau 18)). Au bout de 30 minutes, 2 ponts sont formés (masse observée 5686,3 Da (Tableau 20)).

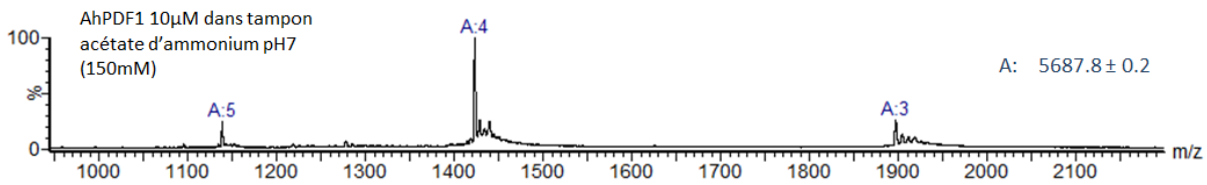


Figure 119 – Spectre de masse de la protéine pGlu-AhPDF1 (10 µM) synthétique dans du tampon acétate d'ammonium (150 mM) au début de la cinétique

L'ajout de 10 µM de TCEP permet de réduire la protéine à un seul pont et de retarder la formation d'un deuxième pont (Tableau 20). Avec 20 µM de TCEP, un seul pont est conservé sur la durée de la cinétique (2 h) (Figure 120). Cette concentration n'est pas suffisante pour obtenir la protéine totalement réduite, il faut augmenter la concentration de TCEP.

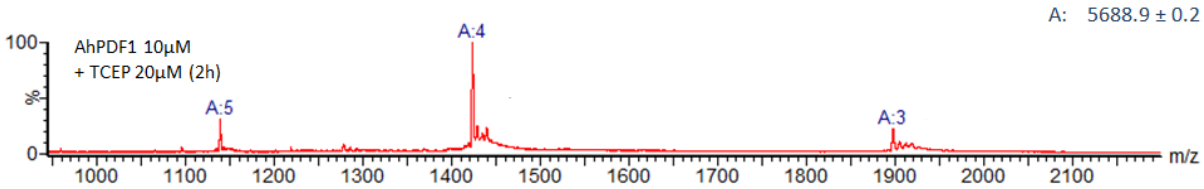


Figure 120 – Spectre de masse de la protéine pGlu-AhPDF1 (10 µM) synthétique incubée pendant 2 h avec 20 µM de TCEP montrant la présence d'un pont disulfure

Avec 30 µM de TCEP, il faut attendre 2 h d'incubation pour que la protéine soit totalement réduite (Tableau 20). Enfin une concentration de 40 µM de TCEP à pH 7 est suffisante pour empêcher toute oxydation de la protéine réduite ou partiellement oxydée (1 ou 2 ponts) pendant au moins 2 h (Figure 121).

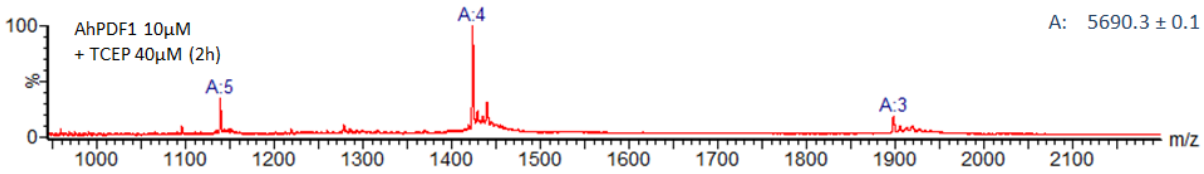


Figure 121 – Spectre de masse de la protéine pGlu-AhPDF1 (10 µM) synthétique incubée pendant 2 h avec 40 µM de TCEP montrant la protéine totalement réduite

Lorsque l'on place la protéine AhPDF1 synthétique et réduite dans le tampon acétate d'ammonium (150 mM) à pH 8, il se forme immédiatement 3 ponts disulfure. Le pH joue un rôle important dans la formation des ponts disulfure, en effet plus le pH est élevé, plus les ponts se forment rapidement. En fait la protéine AhPDF1 réduite est stable à pH acide dans les conditions d'HPLC (0,1 % TFA) et il est absolument nécessaire, au-dessus de pH 6, de la conserver sous atmosphère inerte en présence d'un réducteur.

VIII. 2) 2) Réduction ménagée de la protéine oxydée issue de *Pichia pastoris*

Il est également nécessaire d'avoir de la protéine AhPDF1 avec un ou deux ponts formés. Nous avons vu précédemment que le repliement de la protéine (voir II) se fait rapidement et qu'il est impossible d'isoler les intermédiaires du repliement partiellement oxydés. C'est pourquoi nous entreprenons une réduction ménagée de la protéine oxydée issue de la levure. Les expériences de réduction ménagée consistent en la réduction progressive des ponts disulfure de la protéine.

La protéine Gln-AhPDF1 (10 µM) totalement oxydée, produite dans *Pichia pastoris*, est placée dans un tampon acétate d'ammonium (150 mM) à pH 6 et pH 7. Puis des concentrations croissantes en TCEP (100, 200 et 300 µM) sont ajoutées. Le mélange est laissé pendant 90 min à température ambiante. On n'observe aucune réduction de la protéine aux 3 concentrations de TCEP testées. Il faut une concentration de TCEP plus élevée pour pouvoir réduire la protéine AhPDF1 oxydée.

La concentration de TCEP est augmentée jusqu'au seuil de 1 mM, qui est la concentration maximale à laquelle on peut réaliser les analyses de spectrométrie de masse sans risquer d'endommager le spectromètre. La protéine Gln-AhPDF1 (10 µM) totalement oxydée est placée dans un tampon acétate d'ammonium (150 mM) à pH 7. Puis une concentration de 1 mM de TCEP est ajoutée. Le mélange est laissé pendant 90 min à température ambiante. D'après le tableau 19, on observe un mélange de protéine réduite ou à un pont (5706,5 Da ± 0,6) et surtout d'oxydée (5699,7 Da ± 0,7) (Figure 122). On n'observe pas de protéine partiellement réduite.

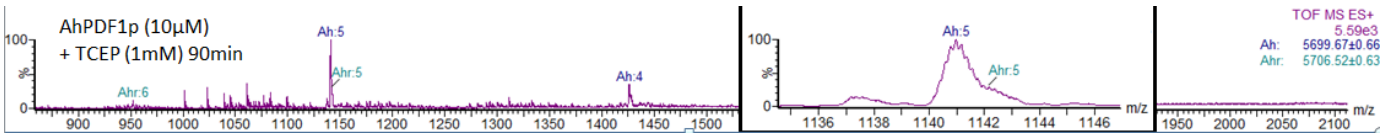


Figure 122 – Spectre de masse de la protéine Gln-AhPDF1 oxydée (10 µM) incubée pendant 90 min avec 1 mM de TCEP montrant un mélange de protéine totalement réduite et totalement oxydée

Soit on ne réduit même pas partiellement la protéine avec 300 µM de TCEP ou alors on obtient un mélange de protéine réduite ou à un pont avec 1 mM de TCEP. Ces expériences étant préliminaires, nous n'avons pas testé une gamme de concentrations de TCEP intermédiaires.

Le TCEP est un réducteur fort, c'est pourquoi nous avons choisi de tester le dithiothréitol (DTT) qui est un réducteur plus doux afin d'obtenir une réduction partielle de la protéine. A cause de contraintes matérielles, cette expérience n'a pas pu être réalisée sur la protéine totalement oxydée de la levure comme précédemment. Le DTT a été testé sur la protéine AhPDF1 (10 µM) synthétique avec 3 ponts déjà formés à pH 7. En ajoutant 100 µM de DTT sous argon et après 1 h d'incubation à température ambiante, on obtient un début de réduction vers une protéine à 2 ponts. L'expérience est reproduite à l'identique mais en chauffant à 55 °C et la protéine est alors totalement réduite. A température ambiante, le DTT n'est pas très efficace parce que la protéine est trop compacte et le DTT ne peut accéder aux ponts disulfure, c'est pourquoi il faut commencer à dénaturer la protéine en la chauffant par exemple. Ces premières expériences avec le DTT méritent d'être approfondies. Elles apparaissent comme la meilleure voie pour réaliser la réduction ménagée de la protéine AhPDF1.

VIII. 3) Essais de chélation de zinc sur la protéine AhPDF1

Tout d'abord un contrôle négatif de chélation du zinc a été réalisé sur la protéine oxydée avec ses 4 ponts (Figure 123). La protéine oxydée (10 µM) issue de la levure placée dans un tampon acétate d'ammonium à pH 7 est incubée avec 100 µM d'acétate de zinc ($Zn(OAc)_2$) à température ambiante pendant 15 minutes. Les masses montrent la présence de la forme glutamine et pyroglutamique de la protéine AhPDF1 (masses observées de 5699,42 Da ± 0,45 et 5682,73 Da ± 0,03 respectivement (Figure 123 haut)) qui correspondent aux masses théoriques décrites dans les tableaux 18 et 19. Comme nous le supposions, aucun atome de zinc ne se fixe sur la protéine AhPDF1 lorsqu'elle est à l'état oxydé (masses observées de 5700,17 Da ± 0,48 et 5682,33 Da ± 0,49 respectivement) (Figure 123 bas).

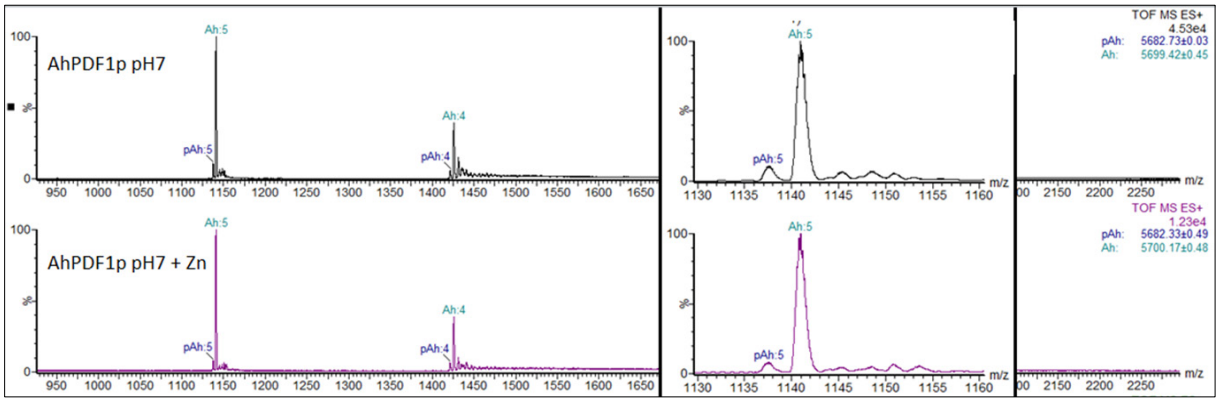


Figure 123 – Spectre de masse de la protéine Gln-AhPDF1 (produite dans la levure) totalement oxydée à pH 7 (haut). Spectre de masse de la protéine Gln-AhPDF1 (produite dans la levure) après ajout de 100 µM de $Zn(OAc)_2$ (bas)

D'après notre hypothèse, il faudrait que la protéine soit sous sa forme réduite ou avec 1 ou 2 ponts pour pouvoir réaliser une chélation. Les essais de chélation ont été réalisés sur ces deux types de populations.

- <u>Essais de chélation sur la protéine AhPDF1 partiellement réduite (deux ponts disulfure)</u>

La protéine AhPDF1 (10 µM) synthétique possédant 3 ponts est incubée dans un tampon acétate d'ammonium (150 mM) à pH7 contenant 40 µM de TCEP pendant 30 minutes. La protéine ainsi obtenue possède 2 ponts disulfure (5686,7 Da ± 0,79) (Figure 124).

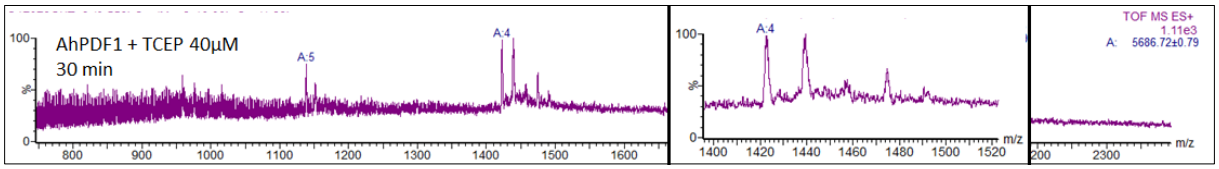


Figure 124 – Spectre de masse de la protéine AhPDF1 synthétique partiellement réduite (2 ponts) avec 40 µM de TCEP ayant agi à température ambiante pendant 30 minutes

Puis on ajoute de l'acétate de zinc (100µM) ($Zn(OAc)_2$) que l'on laisse agir pendant 30 minutes à température ambiante.

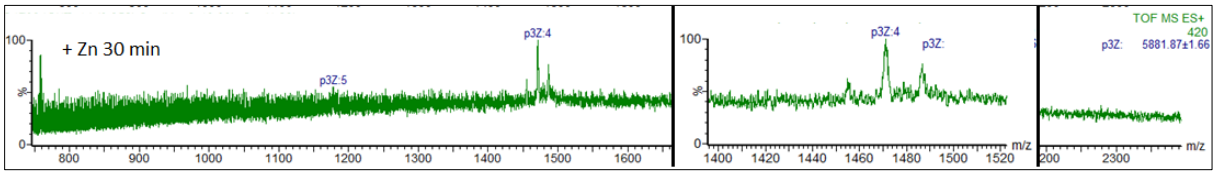


Figure 125 – Spectre de masse de la protéine AhPDF1 synthétique partiellement réduite (2 ponts) avec 40 µM de TCEP, à laquelle 100 µM de $Zn(OAc)_2$ sont ajoutés et incubés à température ambiante pendant 30 minutes

On obtient un mélange de formes à 2 ou 3 ponts avec 3 atomes de zinc fixés sur la protéine (5881,87 Da ± 1,66) (Figure 125). Selon notre hypothèse, un seul atome de zinc aurait dû se fixer sur la protéine à 2 ponts. Or nous observons 3 atomes de zinc sur la protéine, cette fixation n'est donc pas spécifique et correspond plutôt à des adduits de zinc sur la protéine. Pour valider cette hypothèse, il faudrait augmenter la concentration de zinc afin de voir si le nombre d'adduits de zinc augmente également.

- <u>Essais de chélation sur la protéine AhPDF1 totalement réduite</u>

La protéine AhPDF1 (10 µM) totalement oxydée produite dans *Pichia pastoris* est totalement réduite (5689,8 Da et 5707 Da) avec une concentration importante de TCEP (10 mM) puis le milieu est dessalé avec un vivaspin 3,5 kDa contre du tampon d'acétate d'ammonium (150 mM) à pH 7 afin d'éliminer la concentration très importante de TCEP (Figure 126). En effet, le TCEP à cette concentration empêche l'analyse par spectrométrie de masse.

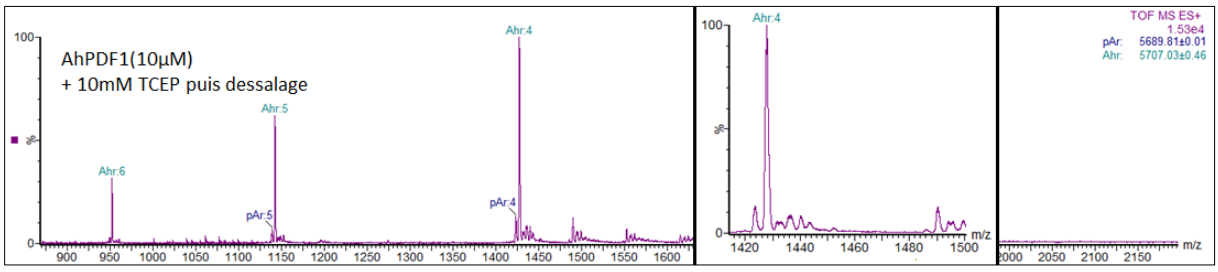


Figure 126 – Spectre de masse de la protéine AhPDF1 synthétique réduite avec 10 mM de TCEP puis dessalée par vivaspin de 3,5 kDa

A la protéine réduite, sont ajoutés 100 µM d'acétate de zinc à température ambiante pendant 30 minutes.

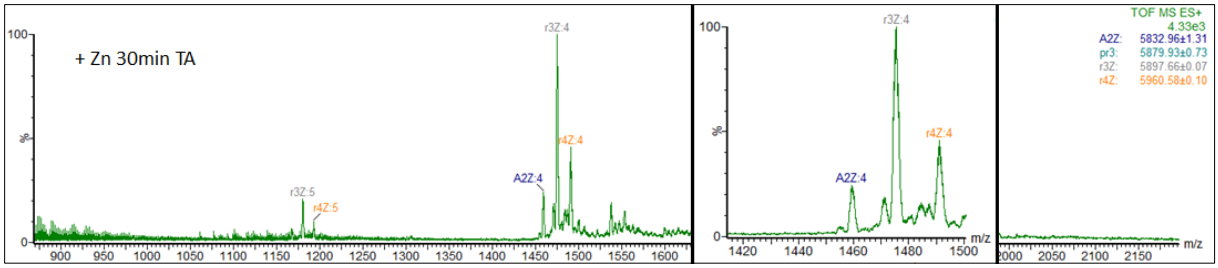


Figure 127 – Spectre de masse de la protéine AhPDF1 synthétique réduite à laquelle 100 µM de $Zn(OAc)_2$ sont ajoutés après 30 minutes d'incubation à température ambiante

On observe plusieurs espèces présentes (Figure 127) :

- Gln-AhPDF1 avec 3 ponts et 2 atomes de zinc (Masse observée 5832,96 Da ± 1,31)
- pGlu-AhPDF1 avec 3 ponts et 3 atomes de zinc (Masse observée 5879,93 Da ± 0,73)
- Gln-AhPDF1 avec 3 ponts et 3 atomes de zinc (Masse observée 5897,66 Da ± 0,07)
- Gln-AhPDF1 avec 4 ponts et 4 atomes de zinc (Masse observée 5960,58 Da ± 0,10)

La fixation du zinc n'est pas spécifique, il est fixé sous forme d'adduits sur la protéine. Il est probable que la protéine se replie tellement rapidement avec ses ponts disulfure que cela ne laisse pas le temps à une chélation. Nous avons voulu connaitre l'influence du zinc sur une cinétique de repliement de la protéine AhPDF1.

Une première expérience de repliement en présence de zinc a été suivie par HPLC (Figure 129). En parallèle, la même expérience a été réalisée en absence de zinc (Figure 128) afin de comparer la vitesse de repliement en présence et en absence de chlorure de zinc ($ZnCl_2$) (Figure 130).

Le repliement de la protéine AhPDF1 réduite est réalisé à température ambiante selon les conditions suivantes :

Solution	Concentration finale
AhPDF1	12 µM
Tris pH 8,5	100 mM
H_2O	qsp
$ZnCl_2$	2 équivalents

Tableau 21 – Conditions de repliement oxydatif de la protéine AhPDF1 avec ajout de chlorure de zinc

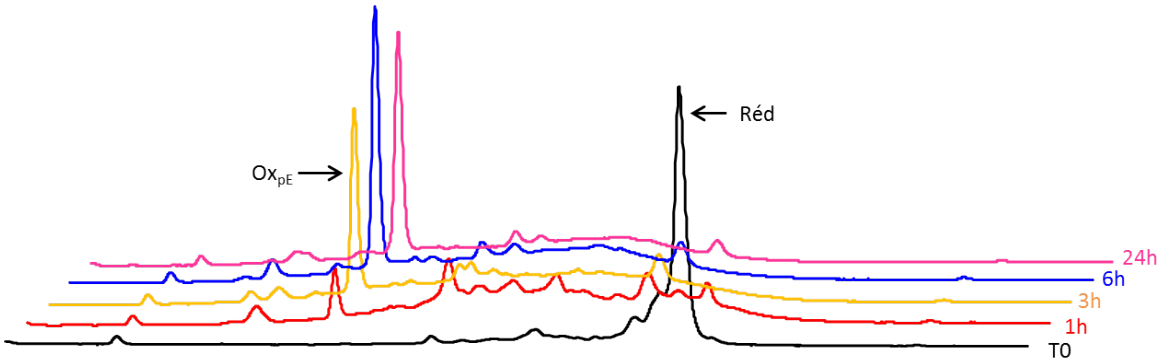


Figure 128 – Suivi par chromatographie HPLC de la protéine AhPDF1 au cours du repliement oxydatif **en absence de chlorure de zinc** (Colonne C18 avec un gradient de 20 à 40 % d'acétonitrile/0,1 % TFA en 30 min)

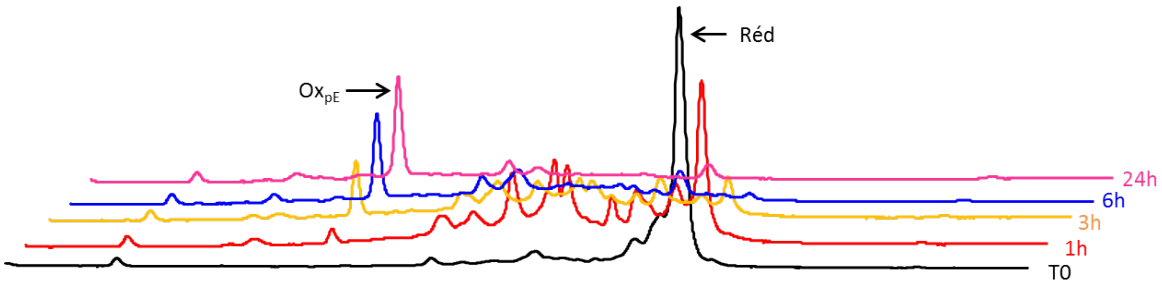


Figure 129 – Suivi par chromatographie HPLC de la protéine AhPDF1 au cours du repliement oxydatif **en présence de chlorure de zinc** (Colonne C18 avec un gradient de 20 à 40 % d'acétonitrile/0,1 % TFA en 30 min)

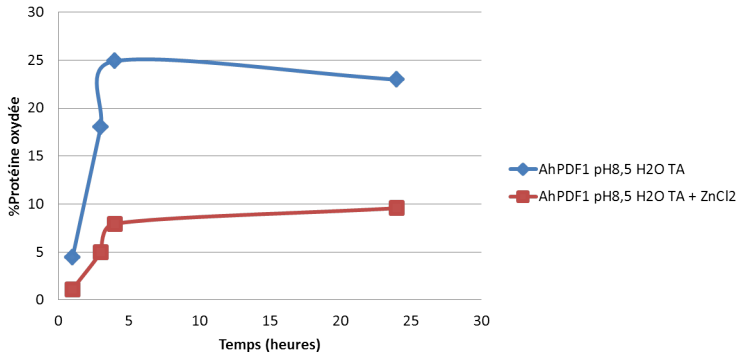


Figure 130 – Cinétique du repliement oxydatif de la protéine AhPDF1 **en fonction de la présence de zinc**

La présence de chlorure de zinc ralentit le repliement de la protéine AhPDF1 et on peut observer des intermédiaires après 1 h de réaction (Figure 129). Malheureusement la présence de 0,1 % de TFA dans les solutions de l'HPLC fait que le zinc ne peut pas rester fixé à la protéine.

Très récemment il a été montré que la défensine humaine HD5 est capable de chélater le zinc (Zhang et al., 2013). Cette α-défensine de 32 acides aminés, possède 6 cystéines formant 3 ponts disulfure lorsque la protéine est oxydée. La défensine HD5 est produite en abondance par les cellules de Paneth (épithélium de l'intestin grêle), qui sont par ailleurs riches en ions Zn^{2+}. La chélation du zinc a été mise en évidence par une expérience d'incubation de la protéine réduite avec du zinc dans un tampon HEPES 75 mM à pH 7,4. L'analyse par LCMS du repliement montre la présence de 4 pics correspondant à la protéine avec un seul pont disulfure formé (Figure 131).

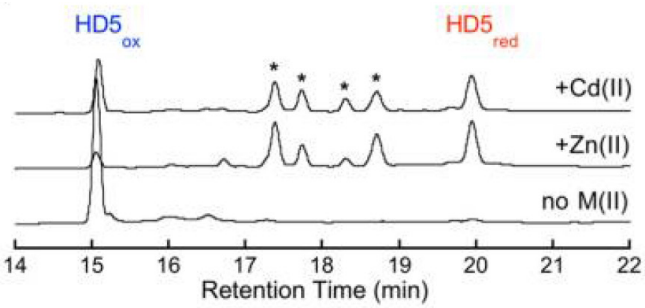


Figure 131 – Chromatogrammes HPLC à 220nm du repliement de la protéine HD5 réduite (50 µM) en absence et en présence d'un équivalent de zinc ou de cadmium (75 mM HEPES, pH 7,4, température ambiante). Le symbole « * » indique les espèces partiellement oxydées identifiées par spectrométrie de masse (Zhang et al., 2013).

Sans ajout de métal, les intermédiaires ne sont pas observés, la fixation du métal perturbe donc le repliement oxydatif de la protéine. De plus, le fait que chaque pic corresponde à un état de la protéine partiellement oxydée (un pont présent) suggère que les 4 autres cystéines sont impliquées dans la coordination du zinc (Zhang et al., 2013). Des spectres d'absorption optiques ont été réalisés sur HD5 en présence de Zn(II), Cd(II) et Co(II) qui montrent clairement que la défensine réduite peut coordiner ces métaux par l'intermédiaire des cystéines (Zhang et al., 2013). Pour le moment nous ne savons pas si la chélation de Zn^{2+} par la défensine HD5 existe *in vivo* et si la défensine réduite a un rôle physiologique. Mais cet article abonde dans le sens de nos premiers résultats sur AhPDF1 et le rôle que pourrait jouer le zinc dans la structure et les bioactivités des défensines de plantes.

L'équipe de recherche d'O. Sénèque utilise également le cobalt pour évaluer l'entourage de liaison du zinc dans les protéines. En raison de similitudes dans leurs propriétés de coordination, le cobalt Co^{2+} est souvent utilisé comme sonde spectroscopique. La chélation du cobalt est suivie en UV-visible en titrant la bande caractéristique de la transition d-d du cobalt à 725 nm (Sénèque and Latour, 2010). Avec cette technique, on peut accéder aux états de transition de la protéine lorsque celle-ci chélate un métal. Pour réaliser cette expérience, il est nécessaire de travailler en conditions strictement anaérobiques comme dans une boite à gants sous argon. Ces précautions sont également prises par l'équipe de E. Nolan qui étudie la protéine HD5 (Zhang et al., 2013). Maintenant que nous savons obtenir la protéine AhPDF1 sous son état réduit, cette expérience est à envisager dans un futur proche.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Conclusion et perspectives

Mon travail de thèse a permis de démarrer un tout nouveau projet dans l'équipe, sur la protéine AhPDF1 de la plante *Arabidopsis halleri*.

La famille des défensines de plantes est bien décrite pour leur forme totalement oxydée, secrétée de la plante, en lien avec leur fonction antifongique. Par contre la fonction de tolérance au zinc nouvellement identifiée serait liée à un état au moins partiellement réduit des protéines, où elles pourraient coordiner le zinc sous sa forme Zn(II), dans certains compartiments internes de la plante où le zinc s'accumule. L'objectif général du projet dans lequel s'intègre ma thèse est donc de comprendre, au niveau atomique et en lien avec l'état d'oxydation des cystéines, le mécanisme par lequel les défensines de plantes confèrent la tolérance au zinc.

Pour réaliser l'étude structurale par RMN de la défensine AhPDF1, la première étape, incontournable, est de produire la protéine en quantité, en qualité, et éventuellement en marquage nécessaire et de maîtriser son repliement oxydatif. Il en est de même pour réaliser l'étude de son interaction avec le zinc, où il faut en plus maîtriser une réduction ou oxydation partielle de la protéine.

Dans une majeure partie de ma thèse j'ai donc travaillé à la production de la défensine AhPDF1. J'ai d'abord travaillé sur la production dans *Escherichia coli*, selon un protocole déjà existant, et sur l'optimisation de ce protocole. En effet, d'après la littérature existante, la production dans *Escherichia coli* apparaissait comme la plus stratégique pour produire en quantité la défensine uniformément marquée, nécessaire à l'étude structurale et dynamique par RMN. Cependant les faibles rendements obtenus même après optimisation nous ont fait nous tourner vers une expression dans *Pichia pastoris*. Dans ce deuxième système, le rendement est meilleur et la production de la protéine marquée devient envisageable.

En parallèle nous avons développé la production par synthèse peptidique, qui offre pour la suite du projet l'avantage de pouvoir sélectivement marquer certains résidus choisis. Nous avons donc mis au point la synthèse de la protéine AhPDF1 et optimisé l'étape la plus délicate, celle du repliement oxydatif.

Après avoir produit la défensine AhPDF1 en quantité et qualité suffisante, j'ai réalisé son étude structurale par RMN. De plus cette structure m'a servi de base pour modéliser, par homologie, toutes les autres défensines actuellement identifiées *d'Arabidopsis halleri* et *Arabidopsis thaliana*.

Enfin, j'ai réalisé les premiers essais de chélation de la défensine avec le zinc. La difficulté réside en un repliement extrêmement rapide de la protéine qui, au moindre contact avec un agent réducteur (par exemple des traces d'oxygène dans l'air) forme les ponts disulfure. Les premières tentatives de chélation avec le zinc et suivi par spectrométrie de masse ne nous ont permis de mettre en évidence qu'une chélation non sélective du zinc sur AhPDF1. Par contre nous avons pu commencer à maîtriser les conditions qui permettent de conserver la protéine

dans un état partiellement réduit. Cette réduction ménagée devra pour la suite des études être combinée à des conditions d'anaérobie stricte.

ANNEXES

Annexes

Composition des milieux	Concentration finale		Solution stock		Volume à pipeter pour 500 mL
Substrat carboné ($g.L^{-1}$)	Glycérol 40 g/L				20 g dans 350 mL de H_2O
Sels minéraux ($g.L^{-1}$)			*Stériliser à l'autoclave*	*(30' 120 °C)*	
H_3PO_4 (d=1.71) 85%	3,5ml		**35 mL**		
K_2SO_4	2,38		**23,8**		
$CaSO_4,2H_2O$	0,15	FM21	**1,5**	**FM21**	**50 mL**
$MgSO_4,7H_2O$	1,95		**19,5**	**(10X)**	
KOH	0,65		**6,5**		
Oligo-éléments ($mg.L^{-1}$)			*Stériliser par filtration*	*HA 0.45µm*	
H_3BO_4	0,020		**2 mg**		
$CuSO_4,5H_2O$	6		**0,6 g**		
KI	0,100		**10 mg**		
$MnSO_4,H_2O$	3	PTM1	**0,3 g**	**PTM1**	**5 mL**
Na_2MoO_4 ($_2H_2O$)	0,200		**20 mg**	**(100X)**	
$Zncl_2$	20		**2 g**		
$Fe(SO_4)$, $7H_2O$	65		**6,5 g**		
H_2S0_4 (d=1,83) 96%	0,02ml		**2 mL**		
Vitamine ($\mu g.L^{-1}$)			*Stériliser par filtration*	*HA 0,45 µm*	
d-Biotine	80		2 mg dans 100 mL H_2O		2 mL

Annexe 1 – Tableau de la composition des milieux de culture en BATCH pour *Pichia pastoris*

Composition des milieux	Concentration finale		Solution stock		Solution à l'alimentation pour 105 mL en final
Substrat carboné ($g.L^{-1}$)	Glucose ou glycérol	400 g/L	Autoclave 120° C		100 mL
Oligo-éléments ($mg.L^{-1}$)			Stériliser par filtration	HA	
H_3BO_4	0,10		**2 mg**		
$CuSO_4,5H_2O$	30		**0,6 g**		
KI	0,5		**10 mg**		
$MnSO_4,H_2O$	15	PTM1	**0,3 g** **1 L**	**PTM1**	**5 mL**
Na_2MoO_4	1		**20 mg**	**(100X)**	
$Zncl_2$	100		**2 g**		
$Fe(SO_4)$, $7H_2O$	325		**6,5 g**		
H_2S0_4 (d=1,83) 96%	0,10ml		**2 mL**		
Vitamine ($\mu g.L^{-1}$)			Stériliser par filtration	HA	
d-Biotine	1000		**20 mg dans 100 mL H_2O**		**0,5 mL**

Annexe 2 – Composition des milieux (PTM1, Vitamine) en culture FED-Batch de *Pichia pastoris*

Composition des milieux	Concentration finale		Solution stock		Volume à pipetter pour 1 L	Volume à pipetter pour 200 mL
Substrat carboné ($g.L^{-1}$)	Glycérol	20 g			900 mL de T5.4 [1] +glycérol	180 mL de T5.4 [1] +glycérol
Sels minéraux ($g.L^{-1}$)			Stériliser à l'autoclave	(30' 120 °C)		
H_2PO_4,NH_4	3 g		**30 g**			
$(^{15}NH_4)_2SO_4$	**1 g**		**10 g**			
H_3PO_4 (d=1.71) 85%	3,5 mL		**35mL**			
K_2SO_4	2,38	FM21 + ^{15}N	**23,8**	**1 L**	**FM21 + ^{15}N**	**100 mL**	**20 mL**
$CaSO_4,2H_2O$	0,15		**1,5**		**(10X)**	
$MgSO_4,7H_2O$	1,95		**19,5**			
KOH	0,65		**6,5**			
Oligo-éléments ($mg.l^{-1}$)			Stériliser par filtration	(HA 0,45µm)		
H_3BO_4	0,020		**2 mg**			
$CuSO_4,5H_2O$	6		**0,6 g**			
KI	0,100		**10 mg**			
$MnSO_4,H_2O$	3	PTM1	**0,3 g**	**1 L**	**PTM1**	**10 mL**	**2 mL**
Na_2MoO_4	0,200		**20 mg**		**(100X)**	
$Zncl_2$	20		**2 g**			
$Fe(SO_4), 7H_2O$	65		**6,5 g**			
H_2S0_4 (d=1,83) 96%	0,02 mL		**2 mL**			
Vitamine ($\mu g.l^{-1}$)			Stériliser par filtration	HA 0,45µm		
d-Biotine	1000		20 mg dans 100 mL H_2O		5 mL	1 mL
Antimousse153K 10%					2 mL	0,4 mL

Annexe 3 – Tableau de composition des milieux nécessaires à la production dans la levure *Pichia pastoris*

Tampon phtalate pH 5,4:

Sol A : Phtalate acide de potassium (0,2 M) 40.84 g/L

Sol B : NaOH (0,2 M) 8 g/L

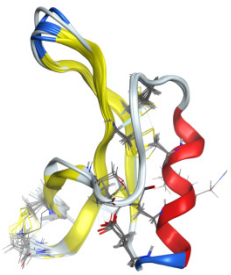
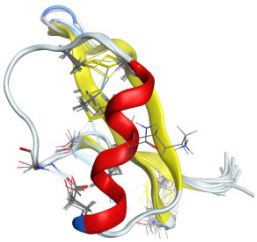
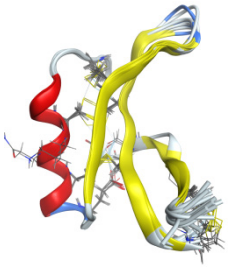
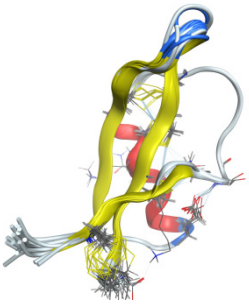
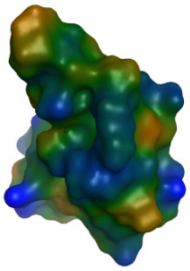
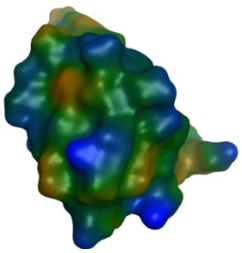
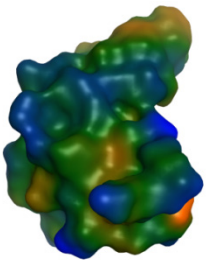
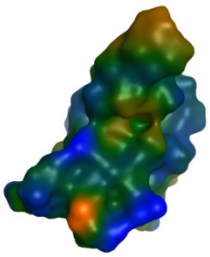
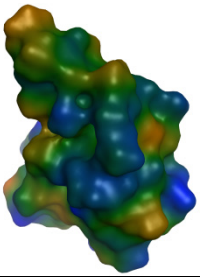
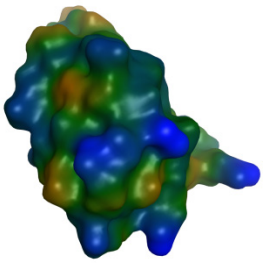
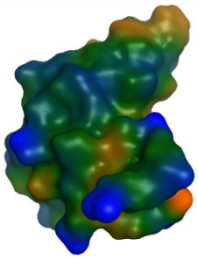
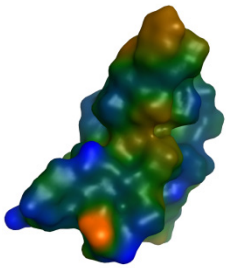
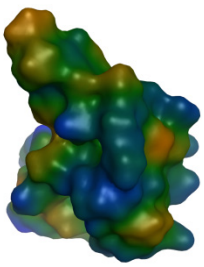
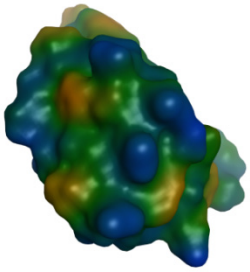
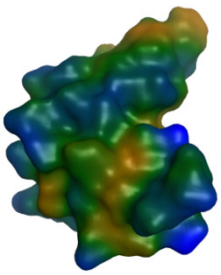
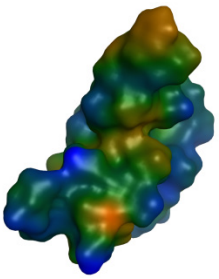
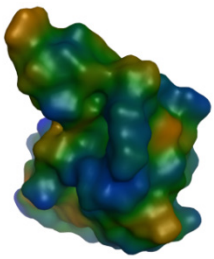
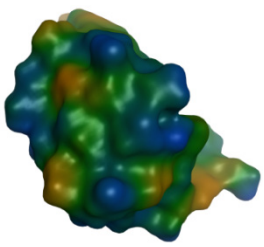
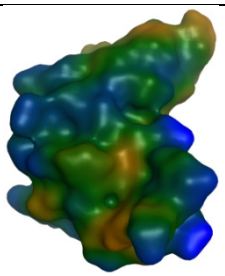
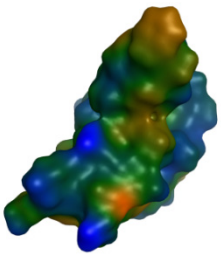
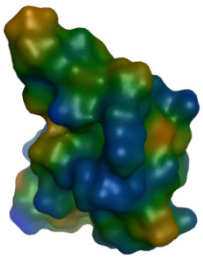
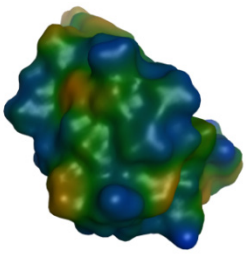
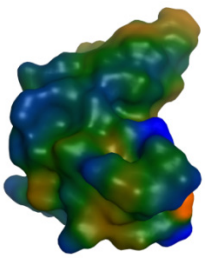
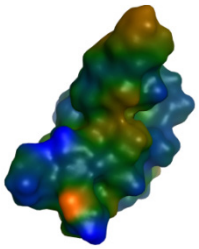
500 ml (20,42 g) de A + 320 mL (2,56 g) de solution B q.s.p. 1000 mL H_2O

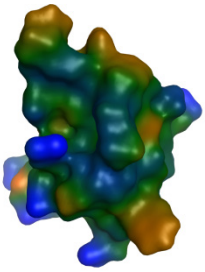
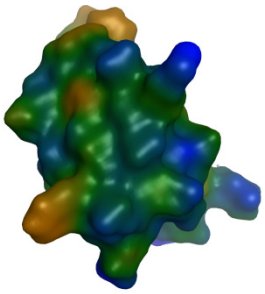
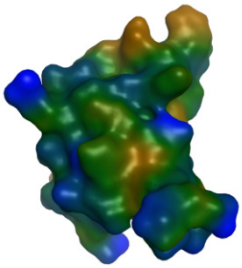
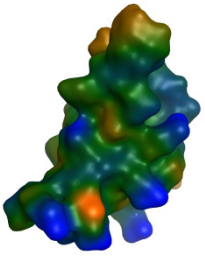
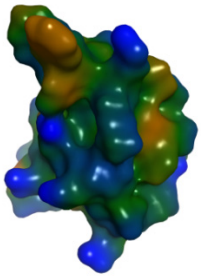
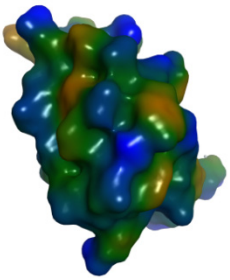
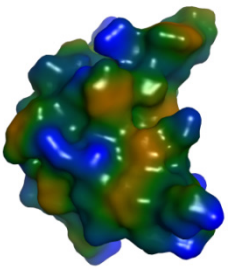
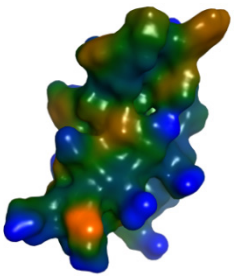
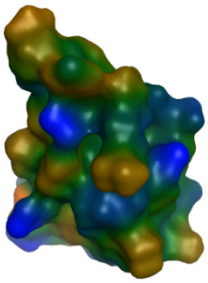
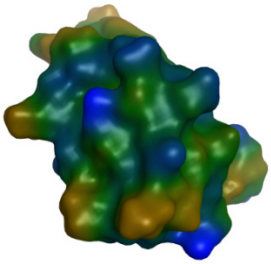
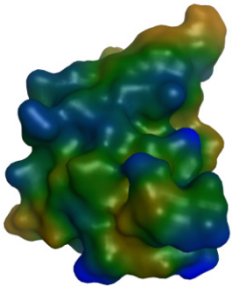
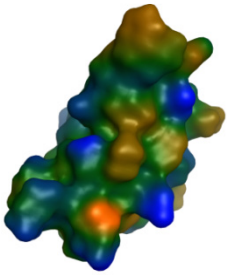
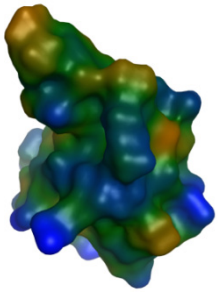
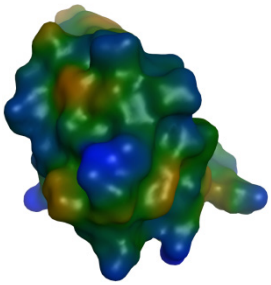
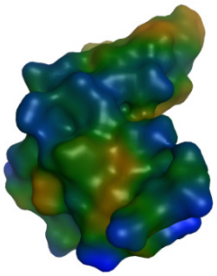
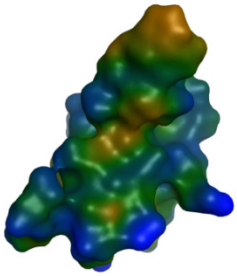
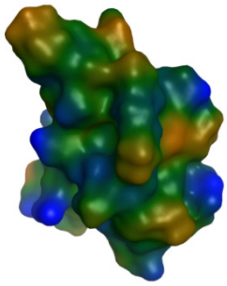
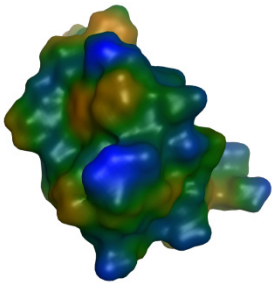
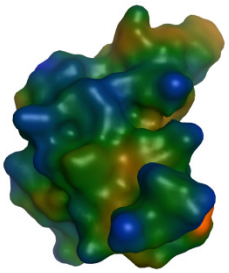
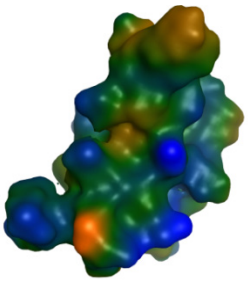
Antimousse 153K (Cognis): 10% : 2mL/L

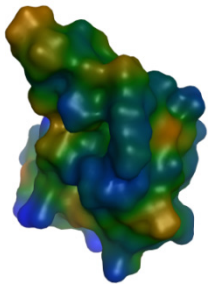
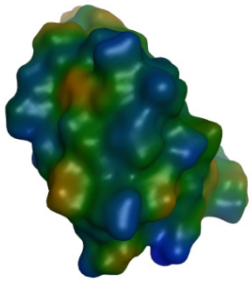
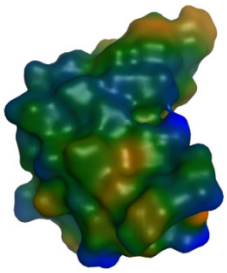
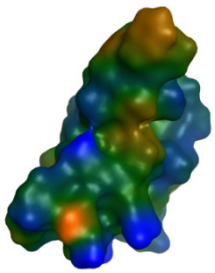
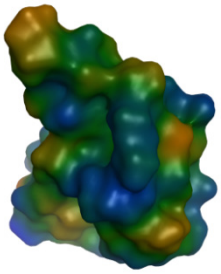
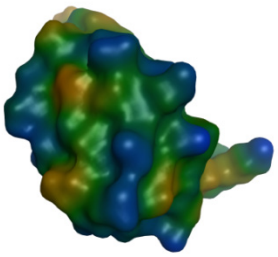
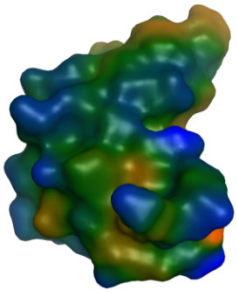
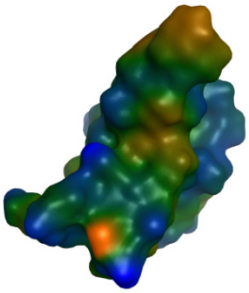
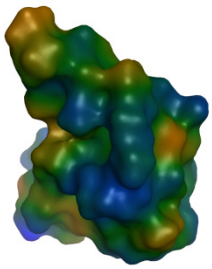
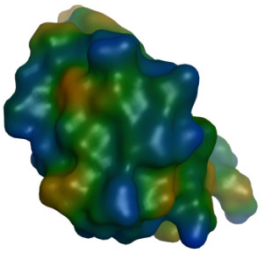
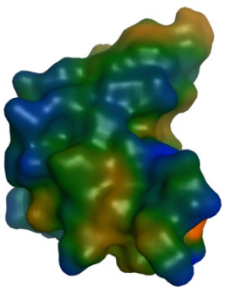
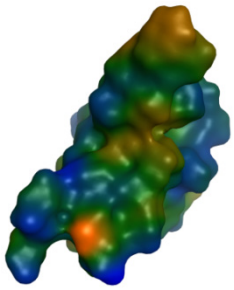
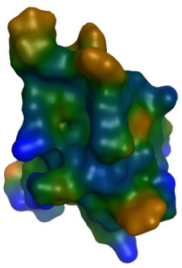
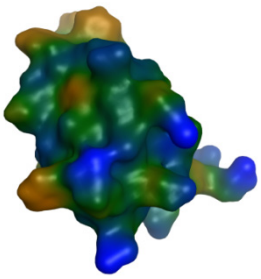
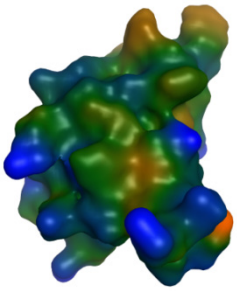
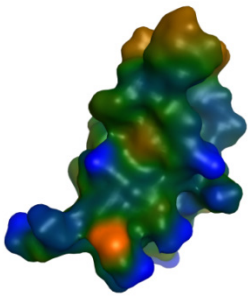
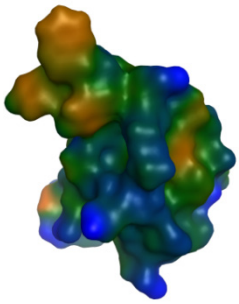
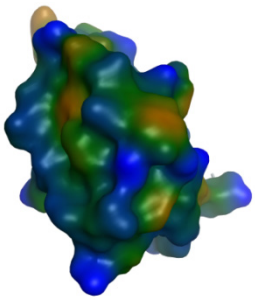
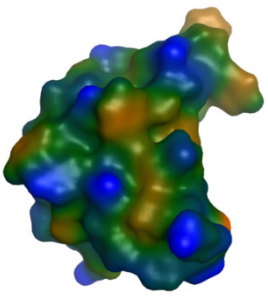
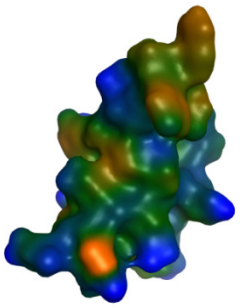
Résidus	H(N^h)	Hα (Cα)	Hβ (Cβ)	Autres (Cγ, Cδ, Cε, Cζ)
Pca1		3,73 (63,04)	1,94 ; 1,94	$0,57^{\gamma1}$; $0,87^{\gamma2}$
Arg2	8,37	4,36	1,92 ; 1,8	$1,7^{\gamma1}$; $1,92^{\gamma2}$ $3,24^{\delta1,2}$ $7,21^{\varepsilon1}$
Leu3	8,46	5,13 (54,67)	1,82 ; 1,37 (46,08)	$1,68^{\gamma}$ $0,68^{\delta1}$; $0,69^{\delta2}$ (24,06*)
Cys4	9,72 (122,13)	5,13 (60,43)	3*	
Glu5	8,8 (122,66)	4,48	1,67*	$1,86^{\gamma1}$; $2,05^{\gamma2}$ (36,91)
Lys6	9,06	4,76	1,88 ; 1,79 (36,96)	$1,41^{\gamma1}$; $1,48^{\gamma2}$ (25,67) $1,48^{\delta1}$; $1,57^{\delta2}$ (30,11) $2,77^{\varepsilon1,2}$ $7,38^{\zeta}$
Pro7		4,47 (64,39)	2,31 ; 1,91 (33)	$2,15^{\gamma1}$; $1,92^{\gamma2}$ (28,88) $3,87^{\delta1}$; $3,63^{\delta2}$ (51,66)
Ser8	8,63	4,75 (59,39)	4,11 ; 3,7 (65,02)	
Gly9	10,64 (119,74)	3,91 ; 4,42 (46,28)		
Thr10	8,2 (109,25)	4,51 (63,15)	4,16 (71,46)	$1,14^{\gamma1,2}$ (22,44)
Trp11	8,15 (125,85)	4,13 (59,33)	3,1 ; 3,26 (30,03)	$7,1^{\delta1}$ $7,36^{\varepsilon1}$; $8,61^{\varepsilon2}$ (115,54) $6,81^{\zeta1}$; $7,83^{\zeta2}$ (121,37 ; 120,47) $7,25^{h}$ (122,03)
Ser12	7,36 (123,08)	4,64 (57,77)	3,57* (65,59)	
Gly13	8,4 (111,34)	4,19 ; 3,89 (44,98)		
Val14	8,54 (119,98)	4,07 (64,42)	2,15 (33,54)	$1,1^{\gamma1}$; $0,99^{\gamma2}$ (22,47 ; 21,86)
Cys15	8,29	4,95 (57,92)	1,89 ; 2,92 (39,66)	
Gly16	8,61 (114,03)	3,71 ; 4,4 (45,81)		
Asn17	7,33	4,88 (53,35)	2,79 ; 3,05	$7,02^{\delta1}$; $7,9^{\delta2}$
Asn18	9,06	4,25	3,16 ; 2,73 (39,48)	$7,04^{\delta1}$; $7,63^{\delta2}$
Gly19	8,57 (107,72)	3,79 ; 3,97 (47,97)		
Ala20	7,95 (124,93)	4,36 (55,76)	1,76 (19,53)	
Cys21	7,33	4,17 (59,28)	2,24 ; 2,07 (37,8)	
Arg22	8,49 (122,24)	3,25 (54,05)	1,92* (29,75)	$1,5^{\gamma1,2}$ (30,4) $3,32^{\delta1}$; $3,48^{\delta2}$ (44,62) $7,72^{\varepsilon1}$
Asn23	8,27 (114,94)	4,4	2,85 ; 2,93	$7,7^{\delta1}$; $6,98^{\delta2}$
Gln24	8,22 (120,89)	4,11	2,41 ; 2,59 (28,96)	$2,58^{\gamma1,2}$ (28,96) $6,57^{\varepsilon1}$; $7,81^{\varepsilon2}$
Cys25	8,75	4,24 (60,36)	2,54 ; 2,86 (38,03)	
Ile26	8,2 (119,7)	3,85 (66,03)	1,73 (40,35)	$0,89^{\gamma1}$; $1,45^{\gamma2}$; $1,73^{\gamma3}$ (17,44) $0,81^{\delta1}$ (15,41)
Arg27	8,74	4,14 (60,51)	1,91 ; 1,65 (32,04)	$1,99^{\gamma1}$; $1,82^{\gamma2}$ $3,26^{\delta1}$; $3,21^{\delta2}$ $7,32^{\varepsilon1}$
Leu28	8,57	4,72 (56,62)	1,67 ; 2,21 (43,72)	$1,78^{\gamma}$ (28,83) $0,93^{\delta1}$; $1^{\delta2}$ (25,86 ; 23,62)
Glu29	7,03 (115,75)	4,81 (56,94)	2,66 ; 2,76 (31,05)	$2,27^{\gamma1}$; $2,38^{\gamma2}$ (39,63)

Lys30	7,47	4,25 (58,2)	2,27 ; 2,16	1,44$^{\gamma 1,2}$ (26,25) 1,74$^{\delta 1,2}$ 3,07$^{\varepsilon 1,2}$ 7,57$^{\zeta}$
Ala31	7,97 (120,62)	4,01 (51,81)	0,83 (14,02)	
Arg32	8,23 (113,74)	4,48	1,84 ; 1,62	1,71$^{\gamma 1}$; 1,77$^{\gamma 2}$ 3,25$^{\delta 1,2}$ (119,3) 7,46$^{\varepsilon}$
His33	7,68	4,75	2,39 ; 3,22 (34,44)	6$^{\delta}$ 7,8$^{\varepsilon}$ (141,28)
Gly34	6,31 (110,72)	3,82 ; 5,32 (47,46)		
Ser35	9,08	4,12 (61,82)	3,71 ; 3,72 (73,32)	
Cys36	8,55	5,45 (52,83)	2,73 ; 2,87 (37,26)	
Asn37	9,08	5 (52,09)	2,76* (42,75)	7,4$^{\delta 1}$; 6,79$^{\delta 2}$
Tyr38	8,83	4,21	2,56 ; 3,01	6,6$^{\delta}$ (133,65) 6,7$^{\varepsilon}$ (118,75)
Val39	7,68	3,89 (64,86)	1,88	0,87$^{\gamma 1,2}$ (21,99 ; 21,21)
Phe40	8,44	3,96 (57,57)	2,88 ; 3,04	7,31$^{\delta}$ (133,2) 7,42$^{\varepsilon}$ (132,77) 7,38$^{\zeta}$ (131,54)
Pro41		3,87 (62,62)	1,98 ; 0,97	1,5$^{\gamma 1}$; 1,72$^{\gamma 2}$ (24,91) 3,28$^{\delta 1}$; 3,35$^{\delta 2}$ (49,88)
Ala42	8,29	4,78 (52,6)	1,34 (23,27)	
His43	8,59	4,95 (56,6)	3,12 ; 3,3 (31,21)	8,25$^{\delta}$ (125,23) 7,28$^{\varepsilon}$ (138,21)
Lys44	8,83	4,67 (55,56)	1,55 ; 1,88 (37,02)	1,51$^{\gamma 1}$; 1,41$^{\gamma 2}$ 1,49$^{\delta 1}$; 1,68$^{\delta 2}$ 2,99$^{\varepsilon}$ (42,84) 7,66$^{\zeta}$
Cys45	9,15 (120,53)	4,71	2,21 ; 1,62 (36,42)	
Ile46	8,77 (133,53)	4,16 (58,95)	2,05 (38,35)	1,31$^{\gamma 1}$; 1,55$^{\gamma 2}$; 1,41$^{\gamma 3}$ (18,31 ; 27,80) 0,6$^{\delta}$ (10,43)
Cys47	8,52 (120,45)	5,34 (52,09)	3,01 ; 2,73	
Tyr48	7,87 (116,57)	5,28 (57,9)	2,43 ; 2,74 (42,52)	6,66$^{\delta}$ (133,35) 6,74$^{\varepsilon}$ (119,92)
Phe49	9,16 (122,03)	4,96	2,77 ; 3,31	7,27$^{\delta}$ (133,04) 7,48$^{\varepsilon}$ (133,45) 7,35$^{\zeta}$ (131,27)
Pro50		4,89 (64,67)	2,11 ; 2,39 (32,92)	2,39$^{\gamma 1}$; 1,95$^{\gamma 2}$ (29,08) 3,82$^{\delta 1}$; 4,12$^{\delta 2}$ (51,96)
Cys51	8,35 (126,42)	4,57 (57,63)	3,2 ; 3,4 (44,54)	

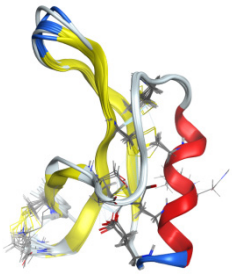
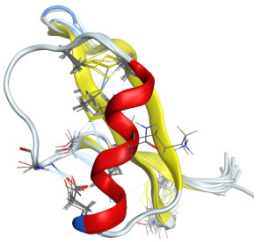
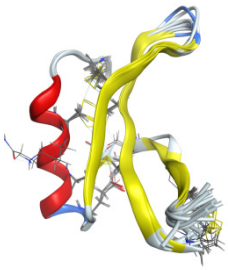
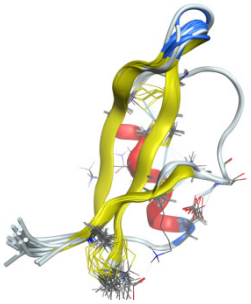
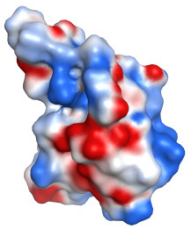
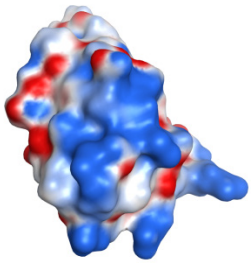
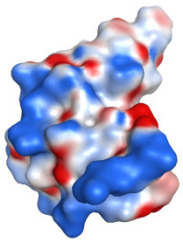
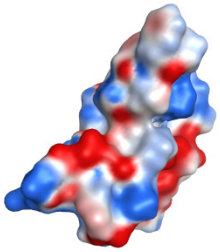
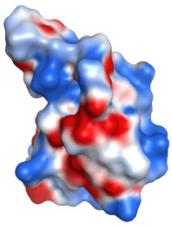
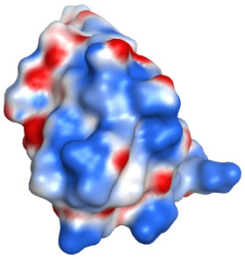
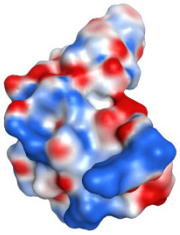
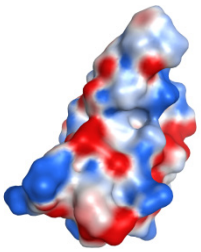
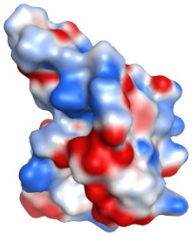
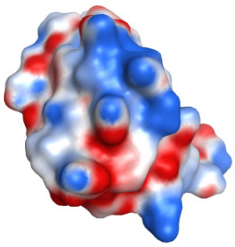
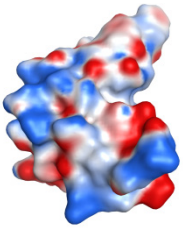
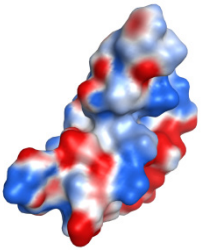
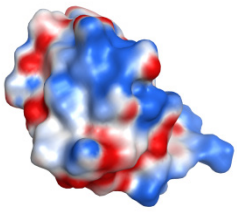
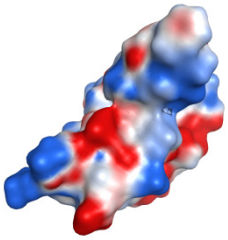
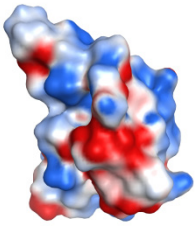
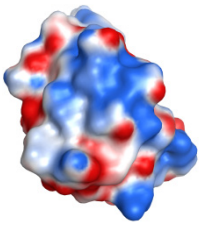
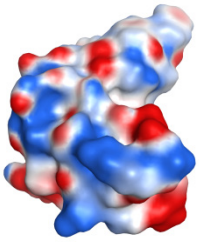
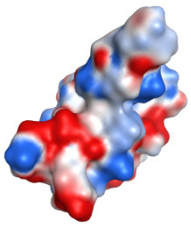
Annexe 4 – Table de déplacement chimique de la protéine AhPDF1 (1,3 mM, pH 4,5, 25 °C)

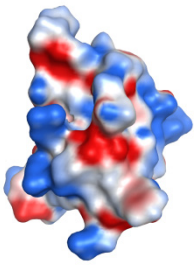
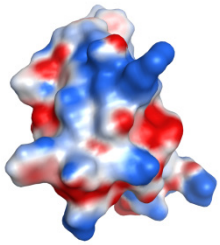
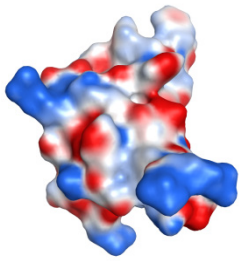
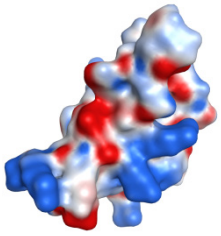
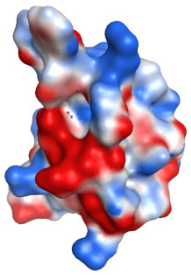
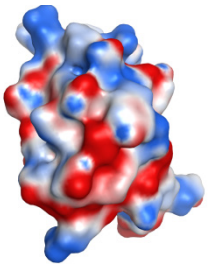
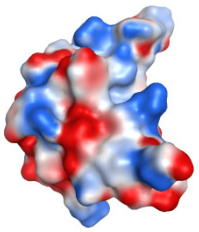
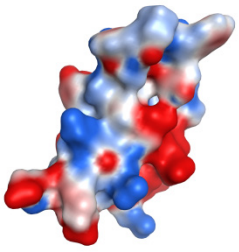
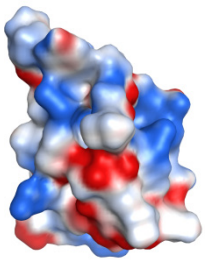
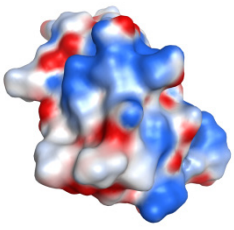
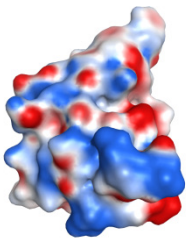
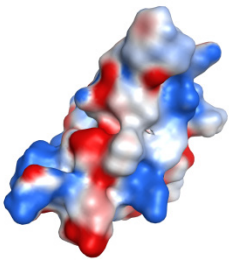
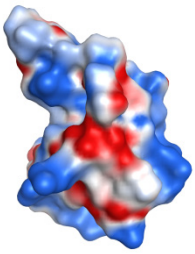
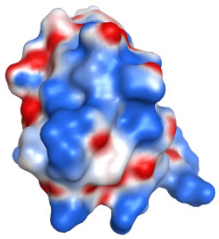
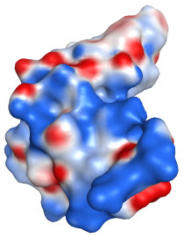
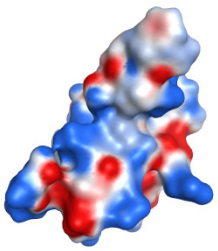
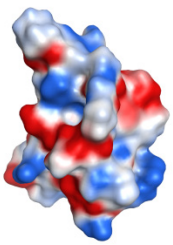
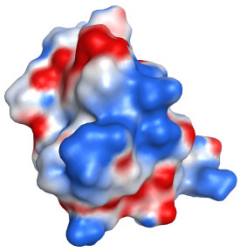
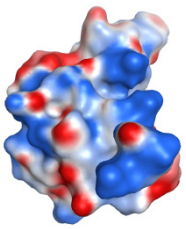
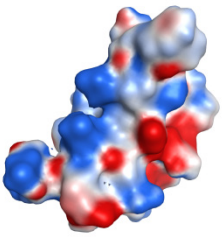
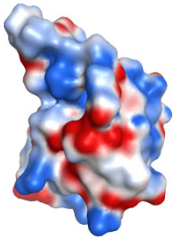
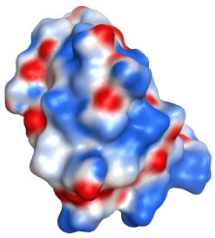
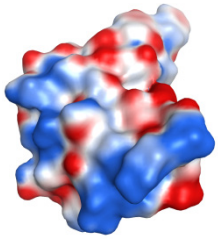
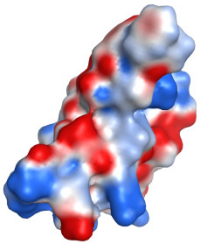
Orientation de la protéine				
AhPDF1.1a				
AhPDF1.1b				
AhPDF1.2a				
AhPDF1.2b				
AhPDF1.2c				

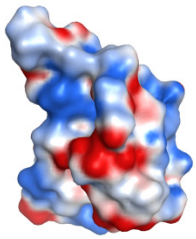
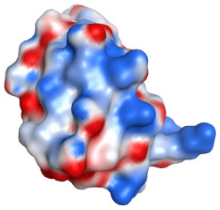
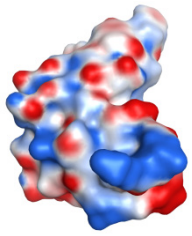
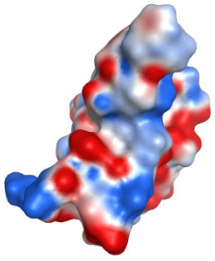
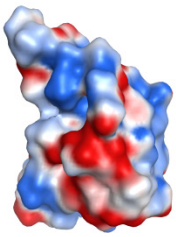
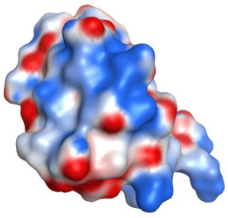
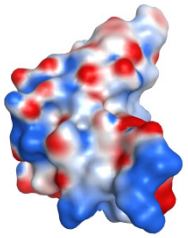
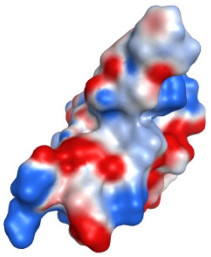
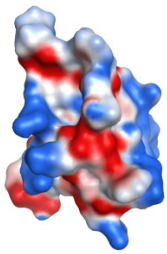
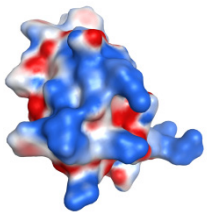
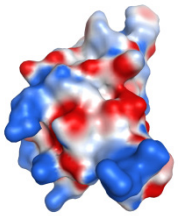
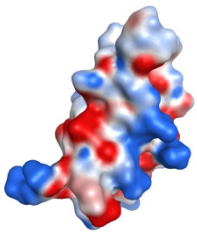
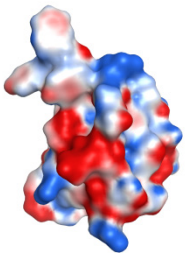
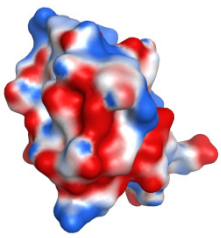
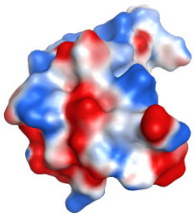
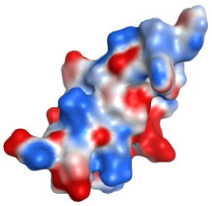
AhPDF1.4				
AhPDF1.5				
AhPDF1.6				
AhPDF1.8a				
AhPDF1.8b				

AtPDF1.1				
AtPDF1.2				
AtPDF1.3				
AtPDF1.4				
AtPDF1.5				

Annexe 5 – Potentiels hydrophobes des protéines PDF1 d'*Arabidopsis halleri* et *Arabidopsis thaliana* avec une rotation de 90° entre chaque vue. Les parties hydrophiles sont colorées en bleu et les parties hydrophobes en marron (échelle d'hydrophobicité standard du logiciel MOE, images réalisées avec le logiciel MOE)

Orientation de la protéine				
AhPDF1.1b				
AhPDF1.1a				
AhPDF1.2a				
AhPDF1.2b				
AhPDF1.2c				

AhPDF1.4				
AhPDF1.5				
AhPDF1.6				
AhPDF1.8a				
AhPDF1.8b				
AtPDF1.1				

AtPDF1.2				
AtPDF1.3				
AtPDF1.4				
AtPDF1.5				

Annexe 6 – Potentiels électrostatiques des protéines PDF1 d'*Arabidopsis halleri* et *Arabidopsis thaliana* avec une rotation de 90° entre chaque vue. Les parties positives sont colorées en bleu et les parties négatives en rouge (échelle électrostatique : -40 à +40 V, images réalisées avec le logiciel MOE)

BIBLIOGRAPHIE

Bibliographie

Abiraj, K., Prasad, H.S., Gowda, A.S.P., and Gowda, D.C. (2004). Design, synthesis and antibacterial activity studies of model peptidess of proline/arginine-rich region in bactenecin7. Protein Pept. Lett. *11*, 291–300.

Aboye, T.L., Clark, R.J., Burman, R., Roig, M.B., Craik, D.J., and Göransson, U. (2011). Interlocking disulfides in circular proteins: toward efficient oxidative folding of cyclotides. Antioxid. Redox Signal. *14*, 77–86.

Aerts, A.M., François, I.E.J.A., Cammue, B.P.A., and Thevissen, K. (2008). The mode of antifungal action of plant, insect and human defensins. Cell. Mol. Life Sci. *65*, 2069–2079.

Aerts, A.M., Bammens, L., Govaert, G., Carmona-Gutierrez, D., Madeo, F., Cammue, B.P.A., and Thevissen, K. (2011). The Antifungal Plant Defensin HsAFP1 from Heuchera sanguinea Induces Apoptosis in Candida albicans. Front. Microbiol. *2*, 47.

Afacan, N.J., Yeung, A.T.Y., Pena, O.M., and Hancock, R.E.W. (2012). Therapeutic potential of host defense peptides in antibiotic-resistant infections. Curr. Pharm. Des. *18*, 807–819.

Alba, A., López-Abarrategui, C., and Otero-González, A.J. (2012). Host defense peptides: an alternative as antiinfective and immunomodulatory therapeutics. Biopolymers *98*, 251–267.

Almeida, M.S., Cabral, K.M., Zingali, R.B., and Kurtenbach, E. (2000). Characterization of two novel defense peptides from pea (Pisum sativum) seeds. Arch. Biochem. Biophys. *378*, 278–286.

Almeida, M.S., Cabral, K.M.S., Kurtenbach, E., Almeida, F.C.L., and Valente, A.P. (2002). Solution structure of Pisum sativum defensin 1 by high resolution NMR: plant defensins, identical backbone with different mechanisms of action. J. Mol. Biol. *315*, 749–757.

Amiche, M., and Galanth, C. (2011). Dermaseptins as models for the elucidation of membrane-acting helical amphipathic antimicrobial peptides. Curr. Pharm. Biotechnol. *12*, 1184–1193.

Andersen, N.H., Cao, B., Rodríguez-Romero, A., and Arreguin, B. (1993). Hevein: NMR assignment and assessment of solution-state folding for the agglutinin-toxin motif. Biochemistry (Mosc.) *32*, 1407–1422.

Andersson, M., Boman, A., and Boman, H.G. (2003). Ascaris nematodes from pig and human make three antibacterial peptides: isolation of cecropin P1 and two ASABF peptides. Cell. Mol. Life Sci. CMLS *60*, 599–606.

Andreev, Y.A., Kozlov, S.A., Vassilevski, A.A., and Grishin, E.V. (2010). Cyanogen bromide cleavage of proteins in salt and buffer solutions. Anal. Biochem. *407*, 144–146.

Arnett, E., and Seveau, S. (2011). The multifaceted activities of mammalian defensins. Curr. Pharm. Des. *17*, 4254–4269.

Arolas, J.L., Aviles, F.X., Chang, J.-Y., and Ventura, S. (2006). Folding of small disulfide-rich proteins: clarifying the puzzle. Trends Biochem. Sci. *31*, 292–301.

Auld, D.S. (2001). Zinc coordination sphere in biochemical zinc sites. Biometals Int. J. Role Met. Ions Biol. Biochem. Med. *14*, 271–313.

Bánhegyi, G., Csala, M., Szarka, A., Varsányi, M., Benedetti, A., and Mandl, J. (2003). Role of ascorbate in oxidative protein folding. BioFactors Oxf. Engl. *17*, 37–46.

Barbault, F., Landon, C., Guenneugues, M., Meyer, J.-P., Schott, V., Dimarcq, J.-L., and Vovelle, F. (2003). Solution structure of Alo-3: a new knottin-type antifungal peptide from the insect Acrocinus longimanus. Biochemistry (Mosc.) *42*, 14434–14442.

Betton, J.-M., and Chaffotte, A. (2005). Repliement et production de protéines recombinantes. MS Médecine Sci. *21*, 613–617.

Blanc, E., Fremont, V., Sizun, P., Meunier, S., Van Rietschoten, J., Thevand, A., Bernassau, J.M., and Darbon, H. (1996). Solution structure of P01, a natural scorpion peptide structurally analogous to scorpion toxins specific for apamin-sensitive potassium channel. Proteins *24*, 359–369.

Blanc, E., Romi-Lebrun, R., Bornet, O., Nakajima, T., and Darbon, H. (1998). Solution structure of two new toxins from the venom of the Chinese scorpion Buthus martensi Karsch blockers of potassium channels. Biochemistry (Mosc.) *37*, 12412–12418.

Blankemeyer, and Menge (1990). An Efficient Method for Anchoring Fmoc-Amino Acids to Hydroxyl-Functionalised Solid Supports. Tetrahedron Lett. 1701–174.

Boman, H.G. (1995). Peptide antibiotics and their role in innate immunity. Annu. Rev. Immunol. *13*, 61–92.

Bontems, F., Gilquin, B., Roumestand, C., Ménez, A., and Toma, F. (1992). Analysis of side-chain organization on a refined model of charybdotoxin: structural and functional implications. Biochemistry (Mosc.) *31*, 7756–7764.

Broekaert, W.F., Terras, F.R., Cammue, B.P., and Osborn, R.W. (1995a). Plant defensins: novel antimicrobial peptides as components of the host defense system. Plant Physiol. *108*, 1353–1358.

Broekaert, W.F., Terras, F.R., Cammue, B.P., and Osborn, R.W. (1995b). Plant defensins: novel antimicrobial peptides as components of the host defense system. Plant Physiol. *108*, 1353–1358.

Brogden, K.A. (2005). Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? Nat. Rev. Microbiol. *3*, 238–250.

Bruix, M., Jiménez, M.A., Santoro, J., González, C., Colilla, F.J., Méndez, E., and Rico, M. (1993a). Solution structure of gamma 1-H and gamma 1-P thionins from barley and wheat endosperm determined by 1H-NMR: a structural motif common to toxic arthropod proteins. Biochemistry (Mosc.) *32*, 715–724.

Bruix, M., Jiménez, M.A., Santoro, J., González, C., Colilla, F.J., Méndez, E., and Rico, M. (1993b). Solution structure of gamma 1-H and gamma 1-P thionins from barley and wheat endosperm

determined by 1H-NMR: a structural motif common to toxic arthropod proteins. Biochemistry (Mosc.) *32*, 715–724.

Cabral, K.M.S., Almeida, M.S., Valente, A.P., Almeida, F.C.L., and Kurtenbach, E. (2003). Production of the active antifungal Pisum sativum defensin 1 (Psd1) in Pichia pastoris: overcoming the inefficiency of the STE13 protease. Protein Expr. Purif. *31*, 115–122.

Cadene, M., and Chait, B.T. (2000). A robust, detergent-friendly method for mass spectrometric analysis of integral membrane proteins. Anal. Chem. *72*, 5655–5658.

Carrega, L., Mosbah, A., Ferrat, G., Beeton, C., Andreotti, N., Mansuelle, P., Darbon, H., De Waard, M., and Sabatier, J.-M. (2005). The impact of the fourth disulfide bridge in scorpion toxins of the alpha-KTx6 subfamily. Proteins *61*, 1010–1023.

Carvalho, A. de O., and Gomes, V.M. (2009). Plant defensins—Prospects for the biological functions and biotechnological properties. Peptides *30*, 1007–1020.

Çelik, E., and Çalık, P. (2012). Production of recombinant proteins by yeast cells. Biotechnol. Adv. *30*, 1108–1118.

Chen, J.-J., Chen, G.-H., Hsu, H.-C., Li, S.-S., and Chen, C.-S. (2004). Cloning and functional expression of a mungbean defensin VrD1 in Pichia pastoris. J. Agric. Food Chem. *52*, 2256–2261.

Conibear, A.C., Rosengren, K.J., Harvey, P.J., and Craik, D.J. (2012). Structural Characterization of the Cyclic Cystine Ladder Motif of θ-Defensins. Biochemistry (Mosc.) *51*, 9718–9726.

Conlon, J.M., Reinert, L.K., Mechkarska, M., Prajeep, M., Meetani, M.A., Coquet, L., Jouenne, T., Hayes, M.P., Padgett-Flohr, G., and Rollins-Smith, L.A. (2013). Evaluation of the skin peptide defenses of the Oregon spotted frog Rana pretiosa against infection by the chytrid fungus Batrachochytrium dendrobatidis. J. Chem. Ecol. *39*, 797–805.

Cook, W.J., Zell, A., Watt, D.D., and Ealick, S.E. (2002). Structure of variant 2 scorpion toxin from Centruroides sculpturatus Ewing. Protein Sci. Publ. Protein Soc. *11*, 479–486.

Cornet, B., Bonmatin, J.M., Hetru, C., Hoffmann, J.A., Ptak, M., and Vovelle, F. (1995). Refined three-dimensional solution structure of insect defensin A. Struct. Lond. Engl. 1993 *3*, 435–448.

Craik, D.J., Cemazar, M., Wang, C.K.L., and Daly, N.L. (2006). The cyclotide family of circular miniproteins: nature's combinatorial peptide template. Biopolymers *84*, 250–266.

Daly, N.L., Koltay, A., Gustafson, K.R., Boyd, M.R., Casas-Finet, J.R., and Craik, D.J. (1999a). Solution structure by NMR of circulin A: a macrocyclic knotted peptide having anti-HIV activity. J. Mol. Biol. *285*, 333–345.

Daly, N.L., Love, S., Alewood, P.F., and Craik, D.J. (1999b). Chemical synthesis and folding pathways of large cyclic polypeptides: studies of the cystine knot polypeptide kalata B1. Biochemistry (Mosc.) *38*, 10606–10614.

De Lano WL (2002). Pymol.

Delaglio, F., Grzesiek, S., Vuister, G.W., Zhu, G., Pfeifer, J., and Bax, A. (1995). NMRPipe: a multidimensional spectral processing system based on UNIX pipes. J. Biomol. NMR *6*, 277–293.

Delepierre, M., Prochnicka-Chalufour, A., Boisbouvier, J., and Possani, L.D. (1999). Pi7, an orphan peptide from the scorpion Pandinus imperator: a 1H-NMR analysis using a nano-NMR Probe. Biochemistry (Mosc.) *38*, 16756–16765.

Dhople, V., Krukemeyer, A., and Ramamoorthy, A. (2006). The human beta-defensin-3, an antibacterial peptide with multiple biological functions. Biochim. Biophys. Acta *1758*, 1499–1512.

Dick, L.W., Jr, Kim, C., Qiu, D., and Cheng, K.-C. (2007). Determination of the origin of the N-terminal pyro-glutamate variation in monoclonal antibodies using model peptides. Biotechnol. Bioeng. *97*, 544–553.

Dill, K.A., and MacCallum, J.L. (2012). The protein-folding problem, 50 years on. Science *338*, 1042–1046.

Easton, D.M., Nijnik, A., Mayer, M.L., and Hancock, R.E.W. (2009). Potential of immunomodulatory host defense peptides as novel anti-infectives. Trends Biotechnol. *27*, 582–590.

Ellis, K.C., Tenenholz, T.C., Jerng, H., Hayhurst, M., Dudlak, C.S., Gilly, W.F., Blaustein, M.P., and Weber, D.J. (2001). Interaction of a toxin from the scorpion Tityus serrulatus with a cloned K+ channel from squid (sqKv1A). Biochemistry (Mosc.) *40*, 5942–5953.

Eswar, N., Webb, B., Marti-Renom, M.A., Madhusudhan, M.S., Eramian, D., Shen, M.-Y., Pieper, U., and Sali, A. (2006). Comparative protein structure modeling using Modeller. Curr. Protoc. Bioinforma. Ed. Board Andreas Baxevanis Al *Chapter 5*, Unit 5.6.

Fadel, V., Bettendorff, P., Herrmann, T., de Azevedo, W.F., Jr, Oliveira, E.B., Yamane, T., and Wüthrich, K. (2005). Automated NMR structure determination and disulfide bond identification of the myotoxin crotamine from Crotalus durissus terrificus. Toxicon Off. J. Int. Soc. Toxinology *46*, 759–767.

Fant, F., Vranken, W., Broekaert, W., and Borremans, F. (1998). Determination of the three-dimensional solution structure of Raphanus sativus antifungal protein 1 by 1H NMR. J. Mol. Biol. *279*, 257–270.

Fant, F., Vranken, W.F., and Borremans, F.A. (1999). The three-dimensional solution structure of Aesculus hippocastanum antimicrobial protein 1 determined by 1H nuclear magnetic resonance. Proteins *37*, 388–403.

Fujitani, N., Kawabata, S., Osaki, T., Kumaki, Y., Demura, M., Nitta, K., and Kawano, K. (2002). Structure of the antimicrobial peptide tachystatin A. J. Biol. Chem. *277*, 23651–23657.

Gabant, G., and Cadene, M. (2008). Mass spectrometry of full-length integral membrane proteins to define functionally relevant structural features. Methods San Diego Calif *46*, 54–61.

Gahl, R.F., and Scheraga, H.A. (2009). Oxidative folding pathway of onconase, a ribonuclease homologue: insight into oxidative folding mechanisms from a study of two homologues. Biochemistry (Mosc.) *48*, 2740–2751.

Gao, G.H., Liu, W., Dai, J.X., Wang, J.F., Hu, Z., Zhang, Y., and Wang, D.C. (2001). Solution structure of PAFP-S: a new knottin-type antifungal peptide from the seeds of Phytolacca americana. Biochemistry (Mosc.) *40*, 10973–10978.

Gennaro, R., and Zanetti, M. (2000). Structural features and biological activities of the cathelicidin-derived antimicrobial peptides. Biopolymers *55*, 31–49.

Hancock, R.E.W., Nijnik, A., and Philpott, D.J. (2012). Modulating immunity as a therapy for bacterial infections. Nat. Rev. Microbiol. *10*, 243–254.

Haney, E.F., and Hancock, R.B.E.W. (2013). Peptide design for antimicrobial and immunomodulatory applications. Biopolymers.

Hanzawa, H., Shimada, I., Kuzuhara, T., Komano, H., Kohda, D., Inagaki, F., Natori, S., and Arata, Y. (1990). 1H nuclear magnetic resonance study of the solution conformation of an antibacterial protein, sapecin. FEBS Lett. *269*, 413–420.

Hao, G., Le, G.-W., Shi, Y.-H., and Ma, D.-Y. (2013). [Molecular design, structural analysis and bactericidal activity of derivatives of antimicrobial peptide buforin II]. Yao Xue Xue Bao *48*, 366–371.

He, X.L., Li, H.M., Zeng, Z.H., Liu, X.Q., Wang, M., and Wang, D.C. (1999). Crystal structures of two alpha-like scorpion toxins: non-proline cis peptide bonds and implications for new binding site selectivity on the sodium channel. J. Mol. Biol. *292*, 125–135.

He, X.L., Deng, J.P., Wang, M., Zhang, Y., and Wang, D.C. (2000). Structure of a new neurotoxin from the scorpion Buthus martensii Karsch at 1.76 A. Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr. *56*, 25–33.

Hill, C.P., Yee, J., Selsted, M.E., and Eisenberg, D. (1991). Crystal structure of defensin HNP-3, an amphiphilic dimer: mechanisms of membrane permeabilization. Science *251*, 1481–1485.

Hoover, D.M., Rajashankar, K.R., Blumenthal, R., Puri, A., Oppenheim, J.J., Chertov, O., and Lubkowski, J. (2000). The structure of human beta-defensin-2 shows evidence of higher order oligomerization. J. Biol. Chem. *275*, 32911–32918.

Hoover, D.M., Chertov, O., and Lubkowski, J. (2001). The structure of human beta-defensin-1: new insights into structural properties of beta-defensins. J. Biol. Chem. *276*, 39021–39026.

Housset, D., Habersetzer-Rochat, C., Astier, J.P., and Fontecilla-Camps, J.C. (1994). Crystal structure of toxin II from the scorpion Androctonus australis Hector refined at 1.3 A resolution. J. Mol. Biol. *238*, 88–103.

Ilbert, M., Graf, P.C.F., and Jakob, U. (2006). Zinc center as redox switch--new function for an old motif. Antioxid. Redox Signal. *8*, 835–846.

Ivanova, E., Ball, M., and Lu, H. (2008). Zinc binding of Tim10: evidence for existence of an unstructured binding intermediate for a zinc finger protein. Proteins *71*, 467–475.

Jablonsky, M.J., Jackson, P.L., Trent, J.O., Watt, D.D., and Krishna, N.R. (1999). Solution structure of a beta-neurotoxin from the New World scorpion Centruroides sculpturatus Ewing. Biochem. Biophys. Res. Commun. *254*, 406–412.

Jablonsky, M.J., Jackson, P.L., and Krishna, N.R. (2001). Solution structure of an insect-specific neurotoxin from the New World scorpion Centruroides sculpturatus Ewing. Biochemistry (Mosc.) *40*, 8273–8282.

Janssen, B.J.C., Schirra, H.J., Lay, F.T., Anderson, M.A., and Craik, D.J. (2003). Structure of Petunia hybrida defensin 1, a novel plant defensin with five disulfide bonds. Biochemistry (Mosc.) *42*, 8214–8222.

Jing, W., Hunter, H.N., Tanabe, H., Ouellette, A.J., and Vogel, H.J. (2004). Solution structure of cryptdin-4, a mouse paneth cell alpha-defensin. Biochemistry (Mosc.) *43*, 15759–15766.

Jocelyn, P.C. (1967). The standard redox potential of cysteine-cystine from the thiol-disulphide exchange reaction with glutathione and lipoic acid. Eur. J. Biochem. FEBS *2*, 327–331.

Johnson, K.A., Kim, E., Teeter, M.M., Suh, S.W., and Stec, B. (2005). Crystal structure of alpha-hordothionin at 1.9 Angstrom resolution. FEBS Lett. *579*, 2301–2306.

Kandias, N.G., Chasapis, C.T., Bentrop, D., Episkopou, V., and Spyroulias, G.A. (2009). High yield expression and NMR characterization of Arkadia E3 ubiquitin ligase RING-H2 finger domain. Biochem. Biophys. Res. Commun. *378*, 498–502.

Kant, P., Liu, W.-Z., and Pauls, K.P. (2009). PDC1, a corn defensin peptide expressed in Escherichia coli and Pichia pastoris inhibits growth of Fusarium graminearum. Peptides *30*, 1593–1599.

Karbat, I., Frolow, F., Froy, O., Gilles, N., Cohen, L., Turkov, M., Gordon, D., and Gurevitz, M. (2004). Molecular basis of the high insecticidal potency of scorpion alpha-toxins. J. Biol. Chem. *279*, 31679–31686.

Kavanagh, K., and Dowd, S. (2004). Histatins: antimicrobial peptides with therapeutic potential. J. Pharm. Pharmacol. *56*, 285–289.

Kawano, K., Yoneya, T., Miyata, T., Yoshikawa, K., Tokunaga, F., Terada, Y., and Iwanaga, S. (1990). Antimicrobial peptide, tachyplesin I, isolated from hemocytes of the horseshoe crab (Tachypleus tridentatus). NMR determination of the beta-sheet structure. J. Biol. Chem. *265*, 15365–15367.

Klenk, K.C., Tenenholz, T.C., Matteson, D.R., Rogowski, R.S., Blaustein, M.P., and Weber, D.J. (2000). Structural and functional differences of two toxins from the scorpion Pandinus imperator. Proteins *38*, 441–449.

Koike, M., Okamoto, T., Tsuda, S., and Imai, R. (2002). A novel plant defensin-like gene of winter wheat is specifically induced during cold acclimation. Biochem. Biophys. Res. Commun. *298*, 46–53.

Kokryakov, V.N., Harwig, S.S., Panyutich, E.A., Shevchenko, A.A., Aleshina, G.M., Shamova, O.V., Korneva, H.A., and Lehrer, R.I. (1993). Protegrins: leukocyte antimicrobial peptides that combine features of corticostatic defensins and tachyplesins. FEBS Lett. *327*, 231–236.

Kouno, T., Fujitani, N., Mizuguchi, M., Osaki, T., Nishimura, S., Kawabata, S., Aizawa, T., Demura, M., Nitta, K., and Kawano, K. (2008). A novel beta-defensin structure: a potential strategy of big defensin for overcoming resistance by Gram-positive bacteria. Biochemistry (Mosc.) *47*, 10611–10619.

Kouno, T., Mizuguchi, M., Aizawa, T., Shinoda, H., Demura, M., Kawabata, S., and Kawano, K. (2009). A novel beta-defensin structure: big defensin changes its N-terminal structure to associate with the target membrane. Biochemistry (Mosc.) *48*, 7629–7635.

Kovaleva, V., Krynytskyy, H., Gout, I., and Gout, R. (2011). Recombinant expression, affinity purification and functional characterization of Scots pine defensin 1. Appl. Microbiol. Biotechnol. *89*, 1093–1101.

Kovalskaya, N., and Hammond, R.W. (2009). Expression and functional characterization of the plant antimicrobial snakin-1 and defensin recombinant proteins. Protein Expr. Purif. *63*, 12–17.

Krimm, I., Gilles, N., Sautière, P., Stankiewicz, M., Pelhate, M., Gordon, D., and Lancelin, J.M. (1999). NMR structures and activity of a novel alpha-like toxin from the scorpion Leiurus quinquestriatus hebraeus. J. Mol. Biol. *285*, 1749–1763.

Krishna, S.S., Majumdar, I., and Grishin, N.V. (2003). Structural classification of zinc fingers SURVEY AND SUMMARY. Nucleic Acids Res. *31*, 532–550.

Kristensen, A.K., Brunstedt, J., Nielsen, J.E., Mikkelsen, J.D., Roepstorff, P., and Nielsen, K.K. (1999). Processing, disulfide pattern, and biological activity of a sugar beet defensin, AX2, expressed in Pichia pastoris. Protein Expr. Purif. *16*, 377–387.

Kröncke, K.-D., and Klotz, L.-O. (2009). Zinc fingers as biologic redox switches? Antioxid. Redox Signal. *11*, 1015–1027.

Kubo, S., Chino, N., Kimura, T., and Sakakibara, S. (1996). Oxidative folding of omega-conotoxin MVIIC: effects of temperature and salt. Biopolymers *38*, 733–744.

Lai, Y., and Gallo, R.L. (2009). AMPed up immunity: how antimicrobial peptides have multiple roles in immune defense. Trends Immunol. *30*, 131–141.

Lakshminarayanan, R., Vivekanandan, S., Samy, R.P., Banerjee, Y., Chi-Jin, E.O., Teo, K.W., Jois, S.D.S., Kini, R.M., and Valiyaveettil, S. (2008). Structure, self-assembly, and dual role of a beta-defensin-like peptide from the Chinese soft-shelled turtle eggshell matrix. J. Am. Chem. Soc. *130*, 4660–4668.

Lamberty, M., Caille, A., Landon, C., Tassin-Moindrot, S., Hetru, C., Bulet, P., and Vovelle, F. (2001). Solution structures of the antifungal heliomicin and a selected variant with both antibacterial and antifungal activities. Biochemistry (Mosc.) *40*, 11995–12003.

De Lamotte, F., Boze, H., Blanchard, C., Klein, C., Moulin, G., Gautier, M.F., and Delsuc, M.A. (2001). NMR monitoring of accumulation and folding of 15N-labeled protein overexpressed in Pichia pastoris. Protein Expr. Purif. *22*, 318–324.

Landon, C., Cornet, B., Bonmatin, J.M., Kopeyan, C., Rochat, H., Vovelle, F., and Ptak, M. (1996). 1H-NMR-derived secondary structure and the overall fold of the potent anti-mammal and anti-insect toxin III from the scorpion Leiurus quinquestriatus quinquestriatus. Eur. J. Biochem. FEBS *236*, 395–404.

Landon, C., Sodano, P., Hetru, C., Hoffmann, J., and Ptak, M. (1997). Solution structure of drosomycin, the first inducible antifungal protein from insects. Protein Sci. Publ. Protein Soc. *6*, 1878–1884.

Landon, C., Barbault, F., Legrain, M., Menin, L., Guenneugues, M., Schott, V., Vovelle, F., and Dimarcq, J.-L. (2004). Lead optimization of antifungal peptides with 3D NMR structures analysis. Protein Sci. Publ. Protein Soc. *13*, 703–713.

Laskowski, R.A., Rullmannn, J.A., MacArthur, M.W., Kaptein, R., and Thornton, J.M. (1996). AQUA and PROCHECK-NMR: programs for checking the quality of protein structures solved by NMR. J. Biomol. NMR *8*, 477–486.

Lay, F.T., Schirra, H.J., Scanlon, M.J., Anderson, M.A., and Craik, D.J. (2003a). The three-dimensional solution structure of NaD1, a new floral defensin from Nicotiana alata and its application to a homology model of the crop defense protein alfAFP. J. Mol. Biol. *325*, 175–188.

Lay, F.T., Brugliera, F., and Anderson, M.A. (2003b). Isolation and properties of floral defensins from ornamental tobacco and petunia. Plant Physiol. *131*, 1283–1293.

Lay, F.T., Veneer, P.K., Hulett, M.D., and Kvansakul, M. (2012). Recombinant expression and purification of the tomato defensin TPP3 and its preliminary X-ray crystallographic analysis. Acta Crystallograph. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun. *68*, 314–316.

Lee, J.-W., and Helmann, J.D. (2006). Biochemical characterization of the structural Zn2+ site in the Bacillus subtilis peroxide sensor PerR. J. Biol. Chem. *281*, 23567–23578.

Lee, Y.-M., and Lim, C. (2008). Physical basis of structural and catalytic Zn-binding sites in proteins. J. Mol. Biol. *379*, 545–553.

Lehrer, R.I., Lichtenstein, A.K., and Ganz, T. (1993). Defensins: antimicrobial and cytotoxic peptides of mammalian cells. Annu. Rev. Immunol. *11*, 105–128.

Li, C., Guan, R.J., Xiang, Y., Zhang, Y., and Wang, D.C. (2005). Structure of an excitatory insect-specific toxin with an analgesic effect on mammals from the scorpion Buthus martensii Karsch. Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr. *61*, 14–21.

Lin, K.-F., Lee, T.-R., Tsai, P.-H., Hsu, M.-P., Chen, C.-S., and Lyu, P.-C. (2007). Structure-based protein engineering for alpha-amylase inhibitory activity of plant defensin. Proteins *68*, 530–540.

Liu, Y.-J., Cheng, C.-S., Lai, S.-M., Hsu, M.-P., Chen, C.-S., and Lyu, P.-C. (2006). Solution structure of the plant defensin VrD1 from mung bean and its possible role in insecticidal activity against bruchids. Proteins *63*, 777–786.

Lobo, D.S., Pereira, I.B., Fragel-Madeira, L., Medeiros, L.N., Cabral, L.M., Faria, J., Bellio, M., Campos, R.C., Linden, R., and Kurtenbach, E. (2007). Antifungal Pisum sativum Defensin 1 Interacts with Neurospora crassa Cyclin F Related to the Cell Cycle†. Biochemistry (Mosc.) *46*, 987–996.

Lu, H., and Woodburn, J. (2005). Zinc binding stabilizes mitochondrial Tim10 in a reduced and import-competent state kinetically. J. Mol. Biol. *353*, 897–910.

Maksymiec, W., Wianowska, D., Dawidowicz, A.L., Radkiewicz, S., Mardarowicz, M., and Krupa, Z. (2005). The level of jasmonic acid in Arabidopsis thaliana and Phaseolus coccineus plants under heavy metal stress. J. Plant Physiol. *162*, 1338–1346.

Mandal, K., Pentelute, B.L., Tereshko, V., Thammavongsa, V., Schneewind, O., Kossiakoff, A.A., and Kent, S.B.H. (2009). Racemic crystallography of synthetic protein enantiomers used to determine the X-ray structure of plectasin by direct methods. Protein Sci. Publ. Protein Soc. *18*, 1146–1154.

Mandard, N., Sodano, P., Labbe, H., Bonmatin, J.M., Bulet, P., Hetru, C., Ptak, M., and Vovelle, F. (1998). Solution structure of thanatin, a potent bactericidal and fungicidal insect peptide, determined from proton two-dimensional nuclear magnetic resonance data. Eur. J. Biochem. FEBS *256*, 404–410.

Mandard, N., Bulet, P., Caille, A., Daffre, S., and Vovelle, F. (2002). The solution structure of gomesin, an antimicrobial cysteine-rich peptide from the spider. Eur. J. Biochem. FEBS *269*, 1190–1198.

Mangoni, M.L., Papo, N., Saugar, J.M., Barra, D., Shai, Y., Simmaco, M., and Rivas, L. (2006). Effect of natural L- to D-amino acid conversion on the organization, membrane binding, and biological function of the antimicrobial peptides bombinins H. Biochemistry (Mosc.) *45*, 4266–4276.

Maret, W. (2005). Zinc coordination environments in proteins determine zinc functions. J. Trace Elem. Med. Biol. *19*, 7–12.

Marquès, L., Oomen, R.J.F.J., Aumelas, A., Le Jean, M., and Berthomieu, P. (2009). Production of an Arabidopsis halleri foliar defensin in Escherichia coli. J. Appl. Microbiol. *106*, 1640–1648.

De Medeiros, L.N., Angeli, R., Sarzedas, C.G., Barreto-Bergter, E., Valente, A.P., Kurtenbach, E., and Almeida, F.C.L. (2010). Backbone dynamics of the antifungal Psd1 pea defensin and its correlation with membrane interaction by NMR spectroscopy. Biochim. Biophys. Acta *1798*, 105–113.

Mirouze, M., Sels, J., Richard, O., Czernic, P., Loubet, S., Jacquier, A., François, I.E.J.A., Cammue, B.P.A., Lebrun, M., Berthomieu, P., et al. (2006). A putative novel role for plant defensins: a defensin from the zinc hyper-accumulating plant, Arabidopsis halleri, confers zinc tolerance. Plant J. Cell Mol. Biol. *47*, 329–342.

Mok, W.W.K., and Li, Y. (2013). Therapeutic Peptides: New Arsenal Against Drug Resistant Pathogens. Curr. Pharm. Des.

Mortel, J.E. van de, Villanueva, L.A., Schat, H., Kwekkeboom, J., Coughlan, S., Moerland, P.D., Themaat, E.V.L. van, Koornneef, M., and Aarts, M.G.M. (2006). Large Expression Differences in Genes for Iron and Zinc Homeostasis, Stress Response, and Lignin Biosynthesis Distinguish Roots of Arabidopsis thaliana and the Related Metal Hyperaccumulator Thlaspi caerulescens. Plant Physiol. *142*, 1127–1147.

Mygind, P.H., Fischer, R.L., Schnorr, K.M., Hansen, M.T., Sönksen, C.P., Ludvigsen, S., Raventós, D., Buskov, S., Christensen, B., De Maria, L., et al. (2005). Plectasin is a peptide antibiotic with therapeutic potential from a saprophytic fungus. Nature *437*, 975–980.

Narayan, M., Welker, E., Wedemeyer, W.J., and Scheraga, H.A. (2000). Oxidative folding of proteins. Acc. Chem. Res. *33*, 805–812.

Nguyen, L.T., Haney, E.F., and Vogel, H.J. (2011a). The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action. Trends Biotechnol. *29*, 464–472.

Nguyen, L.T., de Boer, L., Zaat, S.A.J., and Vogel, H.J. (2011b). Investigating the cationic side chains of the antimicrobial peptide tritrpticin: hydrogen bonding properties govern its membrane-disruptive activities. Biochim. Biophys. Acta *1808*, 2297–2303.

Oeemig, J.S., Lynggaard, C., Knudsen, D.H., Hansen, F.T., Nørgaard, K.D., Schneider, T., Vad, B.S., Sandvang, D.H., Nielsen, L.A., Neve, S., et al. (2012). Eurocin, a new fungal defensin: structure, lipid binding, and its mode of action. J. Biol. Chem. *287*, 42361–42372.

Olli, S., and Kirti, P.B. (2006). Cloning, characterization and antifungal activity of defensin Tfgd1 from Trigonella foenum-graecum L. J. Biochem. Mol. Biol. *39*, 278–283.

Oomen, R.J.F.J., Séveno-Carpentier, E., Ricodeau, N., Bournaud, C., Conéjéro, G., Paris, N., Berthomieu, P., and Marquès, L. (2011). Plant defensin AhPDF1.1 is not secreted in leaves but it accumulates in intracellular compartments. New Phytol. *192*, 140–150.

Osborn, R.W., De Samblanx, G.W., Thevissen, K., Goderis, I., Torrekens, S., Van Leuven, F., Attenborough, S., Rees, S.B., and Broekaert, W.F. (1995). Isolation and characterisation of plant defensins from seeds of Asteraceae, Fabaceae, Hippocastanaceae and Saxifragaceae. FEBS Lett. *368*, 257–262.

Pardi, A., Zhang, X.L., Selsted, M.E., Skalicky, J.J., and Yip, P.F. (1992). NMR studies of defensin antimicrobial peptides. 2. Three-dimensional structures of rabbit NP-2 and human HNP-1. Biochemistry (Mosc.) *31*, 11357–11364.

Park, C.B., Yi, K.S., Matsuzaki, K., Kim, M.S., and Kim, S.C. (2000). Structure-activity analysis of buforin II, a histone H2A-derived antimicrobial peptide: the proline hinge is responsible for the cell-penetrating ability of buforin II. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *97*, 8245–8250.

Park, H.C., Kang, Y.H., Chun, H.J., Koo, J.C., Cheong, Y.H., Kim, C.Y., Kim, M.C., Chung, W.S., Kim, J.C., Yoo, J.H., et al. (2002). Characterization of a stamen-specific cDNA encoding a novel plant defensin in Chinese cabbage. Plant Mol. Biol. *50*, 59–69.

Patel, K., Kumar, A., and Durani, S. (2007). Analysis of the structural consensus of the zinc coordination centers of metalloprotein structures. Biochim. Biophys. Acta *1774*, 1247–1253.

De Paula, V.S., Razzera, G., Barreto-Bergter, E., Almeida, F.C.L., and Valente, A.P. (2011). Portrayal of complex dynamic properties of sugarcane defensin 5 by NMR: multiple motions associated with membrane interaction. Struct. Lond. Engl. 1993 *19*, 26–36.

Pelegrini, P.B., and Franco, O.L. (2005). Plant gamma-thionins: novel insights on the mechanism of action of a multi-functional class of defense proteins. Int. J. Biochem. Cell Biol. *37*, 2239–2253.

Pieterse, C.M.J., Leon-Reyes, A., Van der Ent, S., and Van Wees, S.C.M. (2009). Networking by small-molecule hormones in plant immunity. Nat. Chem. Biol. *5*, 308–316.

Pimentel, C., M'Barek, S., Visan, V., Grissmer, S., Sampieri, F., Sabatier, J.-M., Darbon, H., and Fajloun, Z. (2008). Chemical synthesis and 1H-NMR 3D structure determination of AgTx2-MTX chimera, a new potential blocker for Kv1.2 channel, derived from MTX and AgTx2 scorpion toxins. Protein Sci. Publ. Protein Soc. *17*, 107–118.

Pinheiro, C.B., Marangoni, S., Toyama, M.H., and Polikarpov, I. (2003). Structural analysis of Tityus serrulatus Ts1 neurotoxin at atomic resolution: insights into interactions with Na+ channels. Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr. *59*, 405–415.

Pinheiro da Silva, F., and Machado, M.C.C. (2012). Antimicrobial peptides: Clinical relevance and therapeutic implications. Peptides *36*, 308-314.

Pintar, A., Possani, L.D., and Delepierre, M. (1999). Solution structure of toxin 2 from centruroides noxius Hoffmann, a beta-scorpion neurotoxin acting on sodium channels. J. Mol. Biol. *287*, 359–367.

Polikarpov, I., Junior, M.S., Marangoni, S., Toyama, M.H., and Teplyakov, A. (1999). Crystal structure of neurotoxin Ts1 from Tityus serrulatus provides insights into the specificity and toxicity of scorpion toxins. J. Mol. Biol. *290*, 175–184.

Reinwarth, M., Glotzbach, B., Tomaszowski, M., Fabritz, S., Avrutina, O., and Kolmar, H. (2013). Oxidative folding of peptides with cystine-knot architectures: kinetic studies and optimization of folding conditions. Chembiochem Eur. J. Chem. Biol. *14*, 137–146.

Rieping, W., Habeck, M., Bardiaux, B., Bernard, A., Malliavin, T.E., and Nilges, M. (2007). ARIA2: automated NOE assignment and data integration in NMR structure calculation. Bioinforma. Oxf. Engl. *23*, 381–382.

Del Río-Portilla, F., Hernández-Marín, E., Pimienta, G., Coronas, F.V., Zamudio, F.Z., Rodríguez de la Vega, R.C., Wanke, E., and Possani, L.D. (2004). NMR solution structure of Cn12, a novel peptide from the Mexican scorpion Centruroides noxius with a typical beta-toxin sequence but with alpha-like physiological activity. Eur. J. Biochem. FEBS *271*, 2504–2516.

Rodriguez, E., and Krishna, N.R. (2001). An economical method for (15)N/(13)C isotopic labeling of proteins expressed in Pichia pastoris. J. Biochem. (Tokyo) *130*, 19–22.

Roosens, N.H.C.J., Willems, G., and Saumitou-Laprade, P. (2008). Using Arabidopsis to explore zinc tolerance and hyperaccumulation. Trends Plant Sci. *13*, 208–215.

Rosengren, K.J., Daly, N.L., Plan, M.R., Waine, C., and Craik, D.J. (2003). Twists, knots, and rings in proteins. Structural definition of the cyclotide framework. J. Biol. Chem. *278*, 8606–8616.

Sagaram, U.S., Pandurangi, R., Kaur, J., Smith, T.J., and Shah, D.M. (2011). Structure-Activity Determinants in Antifungal Plant Defensins MsDef1 and MtDef4 with Different Modes of Action against Fusarium graminearum. PLoS ONE *6*, e18550.

Sagaram, U.S., El-Mounadi, K., Buchko, G.W., Berg, H.R., Kaur, J., Pandurangi, R.S., Smith, T.J., and Shah, D.M. (2013). Structural and functional studies of a phosphatidic acid-binding antifungal plant defensin MtDef4: identification of an RGFRRR motif governing fungal cell entry. PloS One *8*, e82485.

Sali, A., and Blundell, T.L. (1993). Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. J. Mol. Biol. *234*, 779–815.

Samblanx, G.W.D., Goderis, I.J., Thevissen, K., Raemaekers, R., Fant, F., Borremans, F., Acland, D.P., Osborn, R.W., Patel, S., and Broekaert, W.F. (1997). Mutational Analysis of a Plant Defensin from Radish (Raphanus sativus L.) Reveals Two Adjacent Sites Important for Antifungal Activity. J. Biol. Chem. *272*, 1171–1179.

Samgina, T.Y., Vorontsov, E.A., Gorshkov, V.A., Hakalehto, E., Hanninen, O., Zubarev, R.A., and Lebedev, A.T. (2012). Composition and antimicrobial activity of the skin peptidome of Russian brown frog Rana temporaria. J. Proteome Res. *11*, 6213–6222.

Dos Santos, I.S., Carvalho, A. de O., de Souza-Filho, G.A., do Nascimento, V.V., Machado, O.L.T., and Gomes, V.M. (2010). Purification of a defensin isolated from Vigna unguiculata seeds, its functional expression in Escherichia coli, and assessment of its insect alpha-amylase inhibitory activity. Protein Expr. Purif. *71*, 8–15.

Savarin, P., Romi-Lebrun, R., Zinn-Justin, S., Lebrun, B., Nakajima, T., Gilquin, B., and Menez, A. (1999). Structural and functional consequences of the presence of a fourth disulfide bridge in the scorpion short toxins: solution structure of the potassium channel inhibitor HsTX1. Protein Sci. Publ. Protein Soc. *8*, 2672–2685.

Sawai, M.V., Jia, H.P., Liu, L., Aseyev, V., Wiencek, J.M., McCray, P.B., Jr, Ganz, T., Kearney, W.R., and Tack, B.F. (2001). The NMR structure of human beta-defensin-2 reveals a novel alpha-helical segment. Biochemistry (Mosc.) *40*, 3810–3816.

Scott, M.G., and Hancock, R.E. (2000). Cationic antimicrobial peptides and their multifunctional role in the immune system. Crit. Rev. Immunol. *20*, 407–431.

Segura, A., Moreno, M., Molina, A., and García-Olmedo, F. (1998). Novel defensin subfamily from spinach (Spinacia oleracea). FEBS Lett. *435*, 159–162.

Segura, A., Moreno, M., Madueño, F., Molina, A., and García-Olmedo, F. (1999). Snakin-1, a peptide from potato that is active against plant pathogens. Mol. Plant-Microbe Interact. MPMI *12*, 16–23.

Selsted, M.E., Novotny, M.J., Morris, W.L., Tang, Y.Q., Smith, W., and Cullor, J.S. (1992). Indolicidin, a novel bactericidal tridecapeptide amide from neutrophils. J. Biol. Chem. *267*, 4292–4295.

Sénèque, O., and Latour, J.-M. (2010). Coordination Properties of Zinc Finger Peptides Revisited: Ligand Competition Studies Reveal Higher Affinities for Zinc and Cobalt. J. Am. Chem. Soc. *132*, 17760–17774.

Shahzad, Z., Ranwez, V., Fizames, C., Marquès, L., Le Martret, B., Alassimone, J., Godé, C., Lacombe, E., Castillo, T., Saumitou-Laprade, P., et al. (2013). Plant Defensin type 1 (PDF1): protein promiscuity and expression variation within the Arabidopsis genus shed light on zinc tolerance acquisition in Arabidopsis halleri. New Phytol. *200*, 820-833.

Sharma, M., Ethayathulla, A.S., Jabeen, T., Singh, N., Sarvanan, K., Yadav, S., Sharma, S., Srinivasan, A., and Singh, T.P. (2006). Crystal structure of a highly acidic neurotoxin from scorpion Buthus tamulus at 2.2A resolution reveals novel structural features. J. Struct. Biol. *155*, 52–62.

Sibirny, A.A., Titorenko, V.I., Gonchar, M.V., Ubiyvovk, V.M., Ksheminskaya, G.P., and Vitvitskaya, O.P. (1988). Genetic control of methanol utilization in yeasts. J. Basic Microbiol. *28*, 293–319.

Da Silva, P., Jouvensal, L., Lamberty, M., Bulet, P., Caille, A., and Vovelle, F. (2003). Solution structure of termicin, an antimicrobial peptide from the termite Pseudacanthotermes spiniger. Protein Sci. Publ. Protein Soc. *12*, 438–446.

Da Silva, P., Landon, C., Industri, B., Marais, A., Marion, D., Ponchet, M., and Vovelle, F. (2005). Solution structure of a tobacco lipid transfer protein exhibiting new biophysical and biological features. Proteins *59*, 356–367.

Da Silva, P., Strzepa, A., Jouvensal, L., Rahioui, I., Gressent, F., and Delmas, A.F. (2009). A folded and functional synthetic PA1b: an interlocked entomotoxic miniprotein. Biopolymers *92*, 436–444.

Song, X., Wang, J., Wu, F., Li, X., Teng, M., and Gong, W. (2005). cDNA cloning, functional expression and antifungal activities of a dimeric plant defensin SPE10 from Pachyrrhizus erosus seeds. Plant Mol. Biol. *57*, 13–20.

Syvitski, R.T., Burton, I., Mattatall, N.R., Douglas, S.E., and Jakeman, D.L. (2005). Structural characterization of the antimicrobial peptide pleurocidin from winter flounder. Biochemistry (Mosc.) *44*, 7282–7293.

Taji, T., Seki, M., Satou, M., Sakurai, T., Kobayashi, M., Ishiyama, K., Narusaka, Y., Narusaka, M., Zhu, J.-K., and Shinozaki, K. (2004). Comparative Genomics in Salt Tolerance between Arabidopsis and Arabidopsis-Related Halophyte Salt Cress Using Arabidopsis Microarray. Plant Physiol. *135*, 1697–1709.

Tenenholz, T.C., Rogowski, R.S., Collins, J.H., Blaustein, M.P., and Weber, D.J. (1997). Solution structure for Pandinus toxin K-alpha (PiTX-K alpha), a selective blocker of A-type potassium channels. Biochemistry (Mosc.) *36*, 2763–2771.

Terras, F.R., Schoofs, H.M., De Bolle, M.F., Van Leuven, F., Rees, S.B., Vanderleyden, J., Cammue, B.P., and Broekaert, W.F. (1992). Analysis of two novel classes of plant antifungal proteins from radish (Raphanus sativus L.) seeds. J. Biol. Chem. *267*, 15301–15309.

Terras, F.R., Torrekens, S., Van Leuven, F., Osborn, R.W., Vanderleyden, J., Cammue, B.P., and Broekaert, W.F. (1993). A new family of basic cysteine-rich plant antifungal proteins from Brassicaceae species. FEBS Lett. *316*, 233–240.

Thennarasu, S., Tan, A., Penumatchu, R., Shelburne, C.E., Heyl, D.L., and Ramamoorthy, A. (2010). Antimicrobial and membrane disrupting activities of a peptide derived from the human cathelicidin antimicrobial peptide LL37. Biophys. J. *98*, 248–257.

Thevissen, K., Terras, F.R.G., and Broekaert, W.F. (1999). Permeabilization of Fungal Membranes by Plant Defensins Inhibits Fungal Growth. Appl. Environ. Microbiol. *65*, 5451–5458.

Thevissen, K., Osborn, R.W., Acland, D.P., and Broekaert, W.F. (2000). Specific binding sites for an antifungal plant defensin from Dahlia (Dahlia merckii) on fungal cells are required for antifungal activity. Mol. Plant-Microbe Interact. MPMI *13*, 54–61.

Thevissen, K., Warnecke, D.C., François, I.E.J.A., Leipelt, M., Heinz, E., Ott, C., Zähringer, U., Thomma, B.P.H.J., Ferket, K.K.A., and Cammue, B.P.A. (2004). Defensins from Insects and Plants Interact with Fungal Glucosylceramides. J. Biol. Chem. *279*, 3900–3905.

Thevissen, K., Kristensen, H.-H., Thomma, B.P.H.J., Cammue, B.P.A., and François, I.E.J.A. (2007). Therapeutic potential of antifungal plant and insect defensins. Drug Discov. Today *12*, 966–971.

Thomma, B.P.H.J., Cammue, B.P.A., and Thevissen, K. (2002). Plant defensins. Planta *216*, 193–202.

Torres, A.M., Wang, X., Fletcher, J.I., Alewood, D., Alewood, P.F., Smith, R., Simpson, R.J., Nicholson, G.M., Sutherland, S.K., Gallagher, C.H., et al. (1999). Solution structure of a defensin-like peptide from platypus venom. Biochem. J. *341 (Pt 3)*, 785–794.

Trabi, M., Schirra, H.J., and Craik, D.J. (2001). Three-dimensional structure of RTD-1, a cyclic antimicrobial defensin from Rhesus macaque leukocytes. Biochemistry (Mosc.) *40*, 4211–4221.

Vasudevan, S., Yuan, J., Osapay, G., Tran, P., Tai, K., Liang, W., Kumar, V., Selsted, M.E., and Cocco, M.J. (2008). Synthesis, structure, and activities of an oral mucosal alpha-defensin from rhesus macaque. J. Biol. Chem. *283*, 35869–35877.

Vijayan, S., Guruprasad, L., and Kirti, P.B. (2008). Prokaryotic expression of a constitutively expressed Tephrosia villosa defensin and its potent antifungal activity. Appl. Microbiol. Biotechnol. *80*, 1023–1032.

Vranken, W.F., Boucher, W., Stevens, T.J., Fogh, R.H., Pajon, A., Llinas, M., Ulrich, E.L., Markley, J.L., Ionides, J., and Laue, E.D. (2005). The CCPN data model for NMR spectroscopy: development of a software pipeline. Proteins *59*, 687–696.

Weerden, N.L. van der, Lay, F.T., and Anderson, M.A. (2008). The Plant Defensin, NaD1, Enters the Cytoplasm of Fusarium Oxysporum Hyphae. J. Biol. Chem. *283*, 14445–14452.

Van der Weerden, N.L., Hancock, R.E.W., and Anderson, M.A. (2010). Permeabilization of fungal hyphae by the plant defensin NaD1 occurs through a cell wall-dependent process. J. Biol. Chem. *285*, 37513–37520.

Van der Weerden, N.L., Bleackley, M.R., and Anderson, M.A. (2013). Properties and mechanisms of action of naturally occurring antifungal peptides. Cell. Mol. Life Sci. *70*, 3545-3570.

Winter, J., Linke, K., Jatzek, A., and Jakob, U. (2005). Severe oxidative stress causes inactivation of DnaK and activation of the redox-regulated chaperone Hsp33. Mol. Cell *17*, 381–392.

Winter, J., Ilbert, M., Graf, P.C.F., Ozcelik, D., and Jakob, U. (2008). Bleach activates a redox-regulated chaperone by oxidative protein unfolding. Cell *135*, 691–701.

Won, H.-S., Low, L.Y., Guzman, R.D., Martinez-Yamout, M., Jakob, U., and Dyson, H.J. (2004). The zinc-dependent redox switch domain of the chaperone Hsp33 has a novel fold. J. Mol. Biol. *341*, 893–899.

Wouters, M.A., Fan, S.W., and Haworth, N.L. (2010). Disulfides as redox switches: from molecular mechanisms to functional significance. Antioxid. Redox Signal. *12*, 53–91.

Wu, X., Wu, Y., Zhu, F., Yang, Q., Wu, Q., Zhangsun, D., and Luo, S. (2013). Optimal Cleavage and Oxidative Folding of α-Conotoxin TxIB as a Therapeutic Candidate Peptide. Mar. Drugs *11*, 3537–3553.

Yang, Y.S., Mitta, G., Chavanieu, A., Calas, B., Sanchez, J.F., Roch, P., and Aumelas, A. (2000). Solution structure and activity of the synthetic four-disulfide bond Mediterranean mussel defensin (MGD-1). Biochemistry (Mosc.) *39*, 14436–14447.

Yeung, A.T.Y., Gellatly, S.L., and Hancock, R.E.W. (2011). Multifunctional cationic host defence peptides and their clinical applications. Cell. Mol. Life Sci. CMLS *68*, 2161–2176.

Yount, N.Y., and Yeaman, M.R. (2013). Peptide antimicrobials: cell wall as a bacterial target. Ann. N. Y. Acad. Sci. *1277*, 127–138.

De Zélicourt, A., Letousey, P., Thoiron, S., Campion, C., Simoneau, P., Elmorjani, K., Marion, D., Simier, P., and Delavault, P. (2007). Ha-DEF1, a sunflower defensin, induces cell death in Orobanche parasitic plants. Planta *226*, 591–600.

Zhang, N., Chen, X., Li, M., Cao, C., Wang, Y., Wu, G., Hu, G., and Wu, H. (2004). Solution structure of BmKK4, the first member of subfamily alpha-KTx 17 of scorpion toxins. Biochemistry (Mosc.) *43*, 12469–12476.

Zhang, W., Bevins, M.A., Plantz, B.A., Smith, L.A., and Meagher, M.M. (2000). Modeling Pichia pastoris growth on methanol and optimizing the production of a recombinant protein, the heavy-chain fragment C of botulinum neurotoxin, serotype A. Biotechnol. Bioeng. *70*, 1–8.

Zhang, Y., Cougnon, F.B.L., Wanniarachchi, Y.A., Hayden, J.A., and Nolan, E.M. (2013). Reduction of Human Defensin 5 Affords a High-Affinity Zinc-Chelating Peptide. ACS Chem. Biol. *8*, 1907-1911.

Zhao, F.-J., and McGrath, S.P. (2009). Biofortification and phytoremediation. Curr. Opin. Plant Biol. *12*, 373–380.

Zhu, S., Peigneur, S., Gao, B., Lu, X., Cao, C., and Tytgat, J. (2011). Evolutionary diversification of Mesobuthus {alpha}-scorpion toxins affecting sodium channels. Mol. Cell. Proteomics *11*, M111.012054.

Zhu, S., Gao, B., Harvey, P.J., and Craik, D.J. (2012). Dermatophytic defensin with antiinfective potential. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *109*, 8495–8500.

Fanny MEINDRE

Etudes structurales de la défensine AhPDF1 de la plante *Arabidopsis halleri* impliquée dans la tolérance au zinc

Mon travail de thèse porte sur la protéine AhPDF1 de la plante *Arabidopsis halleri*. AhPDF1 est une défensine de 51 résidus, riche en cystéines qui participe à la défense de la plante en jouant un rôle antifongique. La défensine AhPDF1 possède 8 cystéines impliquées dans ses 4 ponts disulfure, elle présente un repliement en CSαβ. Des travaux récents sur AhPDF1 ont permis d'identifier une nouvelle fonction : la tolérance aux métaux lourds, en particulier la tolérance au zinc.

L'objectif général du projet dans lequel s'intègre ma thèse est donc de comprendre, au niveau atomique et en lien avec l'état d'oxydation des cystéines, le mécanisme par lequel les défensines de plantes confèrent la tolérance au zinc.

Dans une majeure partie de ma thèse j'ai travaillé à la production de la défensine AhPDF1 d'abord dans *Escherichia coli* puis dans *Pichia pastoris*. J'ai ensuite mis au point la synthèse chimique de la protéine AhPDF1 et optimisé l'étape la plus délicate, celle du repliement oxydatif. Après avoir produit la défensine AhPDF1 en quantité et qualité suffisante, j'ai réalisé son étude structurale par RMN. De plus cette structure m'a servi de base pour modéliser, par homologie, toutes les autres défensines actuellement identifiées *d'Arabidopsis halleri* et *Arabidopsis thaliana*. Enfin, j'ai appris à maîtriser les conditions qui permettent de conserver la protéine dans un état partiellement réduit et j'ai réalisé les premiers essais de chélation de la défensine avec le zinc.

Mots clés : défensine de plantes, *Arabidopsis halleri*, antifongique, ponts disulfure, zinc, structure, RMN, repliement oxydatif

Structural studies of the plant defensin AhPDF1 from *Arabidopsis halleri* involved in zinc tolerance

My thesis focuses on the AhPDF1 plant defensin from *Arabidopsis halleri*. AhPDF1 is a 51-residue, cysteine-rich protein involved in the plant defense, and playing an antifungal role. AhPDF1 defensin has eight cysteins involved in its four disulfide bridges, and presents a folding in CSαβ. Recent work on AhPDF1 allowed to identify a new function : the tolerance to heavy metals, especially zinc tolerance.

The overall objective of the project that fits my thesis is to understand, at the atomic level and in relation to the oxidation state of cysteins, the mechanism by which the plant defensins confer zinc tolerance.

In a major part of my thesis I worked on the production of AhPDF1 defensin first in *Escherichia coli* and in *Pichia pastoris*. Then, I developed the chemical synthesis of AhPDF1 and optimized the most delicate step of the oxidative folding. After producing AhPDF1 defensin in sufficient quantity and quality, I realized its structural study by NMR. Furthermore, this structure was used as starting structure, for modeling by homology all other defensins currently identified from *Arabidopsis halleri* and *Arabidopsis thaliana*. Finally, I learnt how to master the conditions that maintain the protein in a partially reduced state in order to achieve the first assay of zinc chelation with defensin.

Keywords : plant defensin, *Arabidopsis halleri*, antifungal, disulfide, zinc, structure, NMR, oxidative folding

Centre de Biophysique Moléculaire
Rue Charles Sadron
45071 Orléans Cedex 02