



Identification of plant ferredoxin protein partners

Responsable scientifique : Jérémy COUTURIER, UMR Interactions Arbres/Micro-organismes (IAM)

Collaborations : *Olivier Keech (Umeå Plant Science Centre, Suède), Stéphane Lemaire et Christophe Marchand (Institut de Biologie Physico-Chimique, Paris)*

Contexte — Les ferrédoxines (FDXs) sont des protéines fer-soufre (Fe-S) impliquées dans des carrefours métaboliques. Dans les chloroplastes, elles fournissent les électrons à diverses voies métaboliques fondamentales comme la fixation du carbone, l'assimilation du soufre et de l'azote. Dans les mitochondries, elles participent à la maturation des protéines Fe-S, et à la biosynthèse du coenzyme Q. Les FDXs reconnaissent leurs partenaires au travers de la formation d'interactions électrostatiques. Dans le passé, cette propriété a été exploitée afin de réaliser des chromatographies d'affinité en utilisant ces protéines comme appât. Néanmoins, ces expériences n'ont pas bénéficié des récentes avancées protéomiques permettant d'identifier des protéines présentes en très faible quantité. Les FDXs ayant un rôle central dans beaucoup de processus liés à la physiologie et au développement des plantes, comprendre leurs fonctions est essentiel avant d'envisager de créer des plantes avec de meilleurs rendements et une tolérance au stress accrue.

Objectifs — Ce projet visait à identifier de nouvelles protéines partenaires des deux ferrédoxines mitochondriales (mFDXs) pour lesquelles aucune étude n'avait encore été réalisée.

Démarche — Nous avons combiné une approche de chromatographie d'affinité en utilisant la ferrédoxine comme appât à des technologies de protéomique beaucoup plus sensibles permettant d'identifier des protéines partenaires présentes en très faible quantité, encore inconnues. Les partenaires potentiels des mFDXs ont été isolés en utilisant une approche de type « pull down » à partir d'extraits protéiques solubles de feuilles d'*Arabidopsis thaliana* (extraits enrichis ou non en protéines mitochondriales) et de tubercules de pommes de terre, en utilisant les protéines recombinantes avec étiquette poly-histidine mFDX1 et mFDX2 immobilisées sur une résine de type IMAC. Pour certaines protéines partenaires, des expériences de double hybride en levure ont été menées afin de confirmer *in vivo* leur interaction avec mFDX1 et mFDX2.

Résultats marquants —

- Quelque soit l'extrait protéique initial utilisé, les profils protéiques obtenus après élution différaient selon l'isoforme mFDX fixée sur la résine, indiquant que notre approche était adéquate pour identifier partenaires potentielles spécifiques à chaque mFDX. Ceci a ensuite été confirmé par des analyses de spectrométrie de masse qui ont révélé 513 cibles communes potentielles et 334 et 266 partenaires spécifiques pour mFDX1 et mFDX2 respectivement.
- L'utilisation de protéines issues d'extraits enrichis en mitochondries a permis de réduire l'isolement de protéines non-mitochondriales, d'augmenter la proportion des protéines mitochondriales et d'isoler de nouvelles protéines cibles potentielles.
- Des protéines impliquées dans la maturation des protéines Fe-S au niveau de la mitochondrie ont été isolées comme cibles potentielles des mFDXs.
- Etant donné les phénomènes d'autoactivation, la méthode de double hybride en levure n'a pas permis de confirmer les interactions entre les mFDXs et certaines protéines isolées.

Principales conclusions incluant des points-clés de discussion — Outre les 513 protéines cibles communes et malgré la forte homologie de séquence entre les deux isoformes (86% d'identité de séquence entre mFDX1 et mFDX2), 334 et 266 partenaires spécifiques de mFDX1 et mFDX2 ont été identifiés respectivement. Ces résultats suggèrent que mFDX1 et mFDX2 auraient des fonctions non redondantes. D'autre part, le protocole visant à enrichir les extraits protéiques en protéines mitochondriales a permis de favoriser l'identification de protéines partenaires des mFDXs, en dépit de la présence résiduelle de protéines non-mitochondriales.

Perspectives — Au cours de ce projet, nous avons isolé un nombre relativement important de protéines partenaires potentielles. Une analyse approfondie est maintenant nécessaire afin de d'identifier et de confirmer la spécificité des partenaires envers mFDX1 ou mFDX2. Une attention toute particulière sera portée sur les protéines ayant la capacité de transférer des électrons, ou dont la fonction nécessite un transfert d'électrons. L'isolement de protéines chloroplastiques comme cibles des FDXs mitochondriales est incohérent physiologiquement. Néanmoins, ces protéines pourraient représenter des partenaires putatifs pour les FDXs chloroplastiques. Ainsi, la comparaison entre nos analyses et celles réalisées avec des FDXs chloroplastiques pourraient mener à l'identification de nouveaux partenaires des FDXs chloroplastiques. Au cours de ce projet, nous avons notamment isolé des protéines impliquées dans la maturation des protéines Fe-S dans les mitochondries. La méthode de double hybride en levure s'étant avérée inappropriée, ces interactions seront validées en utilisant d'autres approches telles que le BiFC ou la co-immunoprécipitation. Les anticorps spécifiques nécessaires pour cette méthode seront générés à partir des protéines recombinantes utilisées dans ce projet. D'autre part, produire les protéines recombinantes correspondant aux partenaires des mFDXs, permettra d'explorer les mécanismes moléculaires de ces interactions protéiques. En effet, étant donné le rôle essentiel des protéines Fe-S dans les cellules vivantes, comprendre les mécanismes impliqués dans leur biogenèse représente un champ d'investigation important dans la biologie des plantes.

Valorisation —

Ces travaux ont fait l'objet d'une présentation sous la forme d'un poster, lors du congrès « International Symposium on Iron Nutrition and Interaction in Plants » qui s'est déroulé à Madrid du 30 mai au 3 juin 2016.

Hego E, Przybyla-Toscano J, Roret T, Couturier J, Rouhier N. Identification of mitochondrial ferredoxin partners from *Arabidopsis thaliana* leaves. 18th International Symposium on Iron Nutrition and Interaction in Plants (Madrid, Espagne, 30 mai-3 juin 2016).

Effet levier du projet —

Au travers de ce projet et de la collaboration avec Olivier Keech (Umeå Plant Science Centre, Suède), nous avons acquis les outils méthodologiques permettant d'obtenir des extraits protéiques enrichis en protéines mitochondriales. Très utile pour ce projet, l'acquisition de cette technique nous offre également d'autres perspectives nécessitant l'utilisation d'extraits enrichis en mitochondries pour d'autres projets développés actuellement au sein de notre équipe.

Ce projet, au travers des analyses protéomiques effectuées, a en outre permis de renforcer les liens existants entre notre équipe et celle de Stéphane Lemaire (Institut de Biologie Physico-Chimique, Paris). Cela se traduit actuellement par un projet commun visant à identifier les partenaires de protéines impliquées dans le transfert de soufre chez les plantes (Projet ANR SULTRAF Jeune Chercheur, Coordinateur J. Couturier).

Enfin, d'un point de vue strictement scientifique, les résultats obtenus au cours de ce projet suggèrent que les FDXs mitochondriales pourraient être impliquées dans plusieurs processus biologiques et notamment la biogenèse des centres Fe-S. Ce processus fait l'objet de recherche intense dans le cadre d'autres projets de recherche menés au sein de notre équipe. Ainsi, les résultats obtenus au travers du projet FERPAR ouvrent de nouvelles perspectives concernant les travaux à mener afin d'identifier les mécanismes moléculaires gouvernant la biogenèse des centres Fe-S au sein des mitochondries.