

I. INTRODUCTION GENERALE	9
II. SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	15
A. Le cadmium et le sélénium : deux polluants largement répandus et toxiques pour les plantes.....	17
1. <i>Le cadmium</i>	17
a) Toxicité chez les mammifères et moyens de détoxification	17
b) Voie d'assimilation, toxicité et moyens de détoxification chez la plante	19
(1) Transport du Cd^{2+} dans la plante.....	19
(2) Séquestration du Cd^{2+} sous forme libre et chélaté	20
(a) Influx du Cd^{2+} libre dans la vacuole via les transporteurs tonoplastiques.....	20
(b) Séquestration des complexes phytochélatine-Cd dans la vacuole	22
(c) Autres acteurs impliqués dans la séquestration du Cd^{2+}	24
(3) Transfert du Cd^{2+} vers les parties aériennes.....	24
(4) Remobilisation du Cd^{2+}	25
c) Influence d'un stress induit par le Cd^{2+} sur la voie d'assimilation du soufre	26
2. <i>Le sélénium</i>	28
a) Le sélénium chez les mammifères.....	28
(1) Un élément essentiel incorporé au niveau des protéines.....	28
(2) Carence et toxicité.....	29
b) Voie d'assimilation, toxicité et bénéfices chez les plantes.....	29
(1) Toxicité	29
(2) Bénéfices	30
(3) Voie d'assimilation	31
(a) Entrée du sélénium dans la plante	31
(b) Du séléniate et du sélénite aux sélénocystéines	32
(c) Des sélénocystéines aux autres composés sélénés	33
B. La protéine « Selenium Binding Protein 1 » (SBP1)	36
1. <i>Les protéines contenant du Se</i>	36
2. <i>Identification de SBP1</i>	36
3. <i>SBP1 chez les mammifères</i>	37
a) Un suppresseur de tumeurs chez l'homme	37
b) La surexpression de SBP1 au niveau des cellules cérébrales apparait comme potentiellement dégénérative	39
c) Autres fonctions potentielles de SBP1	40
d) SBP2 : cible de l'acétaminophène dans le foie.....	40
4. <i>La protéine « Selenium Binding Protein 1 » (SBP1) chez les plantes</i>	41
a) Une protéine conservée	41
b) Localisation cellulaire de SBP1 chez les plantes	41
c) SBP1 est induite en réponse à différents stress.....	43
d) La surexpression de SBP1 augmente la tolérance à différents stress environnementaux.....	46
e) Existence de sites potentiels de liaison aux métaux	48
(1) Conservation des sites de liaison aux métaux.....	48
(2) Conservation de sites potentiels caractéristiques des « Cd binding proteins ».....	49

C. Objectifs de la thèse	51
1. <i>Analyse in vitro</i>	52
2. <i>Analyse in planta</i>	52
III. MATERIEL ET METHODES	53
A. Matériel végétal et conditions de culture	55
B. Techniques de biologie moléculaire	55
1. <i>Transformation de bactéries</i>	55
a) <i>Escherichia coli</i> thermocompétentes	55
b) <i>Agrobacterium tumefaciens</i> électrocompétentes	56
2. <i>Construction de plasmide</i>	56
a) Mutagenèse dirigée	56
b) Clonage dans les vecteurs pGEM-T et pGEM-Teasy	57
c) Ligation	57
d) Vecteurs de bactéries pour la production de protéines recombinantes	58
e) Vecteurs de plantes pour la production de lignées transgéniques	60
3. <i>Visualisation et séparation de fragments d'ADN par électrophorèse</i>	62
C. Biochimie	63
1. <i>Purification de protéines recombinantes</i>	63
a) Purification de protéines étiquetées GST et clivage de l'étiquette	63
b) Purification de protéines étiquetées poly-His et clivage de l'étiquette	64
2. <i>Dosage des protéines</i>	65
3. <i>Séparation des échantillons protéiques par électrophorèse</i>	66
4. <i>Immunodétection de protéines par Western Blot</i>	66
5. <i>Caractérisation biochimique et interactions protéines-ligands</i>	67
a) Analyse de la stabilité de la protéine via le « Thermal Shift Assay » (TSA)	67
(1) Principe	67
(2) Protocole	67
b) Test de capacité de liaison	68
c) Quantification des différents ligands (ICP-MS)	69
(1) Principe	69
(2) Protocole	69
d) Dosage des cystéines réduites accessibles avec le réactif d'Ellman	70
(1) Principe	70
(2) Protocole	71
e) Détermination des paramètres thermodynamiques par microcalorimétrie (ITC)	71
(1) Principe	71
(2) Protocole	71
f) Analyse de la liaison Se-SBP1 par spectrométrie de masse	72
(1) Protocole sur protéine entière	72
(2) Protocole sur protéine digérée	72
g) Etude des structures secondaires par dichroïsme circulaire	73
(1) Principe	73
(2) Protocole	74

h) Détermination de l'affinité du Cd^{2+} à SBP1 par fluorimétrie	74
(1) Principe	74
(2) Protocole	75
i) Caractérisation de l'environnement atomique et de la spéciation du Cd et du Se par spectroscopie d'absorption des rayons X (XAFS)	75
(1) Généralités	75
(2) Principe	75
(3) Préparation des échantillons	77
(4) Réglages de la ligne et mesures	78
6. Analyse structurale	79
(1) Principe	79
(2) Protocole	80
D. Techniques relatives aux analyses <i>in planta</i>	80
1. Transformation et sélection de lignées transgéniques à une insertion	80
2. Analyse de du niveau d'expression de SBP1 par enregistrement de l'activité luciférase	81
3. Etude de la localisation sub-cellulaire de GFP-SBP1 et SBP1-GFP par microscopie confocale	81
4. Analyse d'expression des gènes par PCR quantitative	82
5. Quantification des ligands et analyse de leur spéciation	82
IV. CHAPITRE 1 : CARACTERISATION BIOCHIMIQUE DE LA PROTEINE « SELENIUM BINDING PROTEIN 1 » (SBP1) D'ARABIDOPSIS THALIANA – ETUDE DES PROPRIETES DE LIAISON AUX METAUX ET AUTRES LIGANDS	83
A. Analyse de la capacité de liaison de différents ligands à la protéine SBP1 d'<i>Arabidopsis thaliana</i>	85
1. Purification de la protéine SBP1 d' <i>Arabidopsis thaliana</i>	85
2. Mise en évidence de la capacité de différents ligands à se lier à SBP1	87
a) Identification des ligands capables de stabiliser SBP1	87
b) Validation de la capacité de liaison à SBP1 de différents ligands	89
B. Caractérisation biochimique des liaisons SBP1/ligands et identification des sites de liaison au Cd et au Se	91
1. Caractérisation préliminaire des liaisons SBP1/Cd et SBP1/Se	91
a) Recherche de l'implication des cystéines de SBP1 dans la liaison au Cd^{2+} et au SeO_3^{2-}	91
(1) La liaison au Cd^{2+} n'est pas une liaison de forte affinité impliquant des cystéines réduites accessibles	91
(2) La liaison au SeO_3^{2-} est une liaison covalente ou de forte affinité qui pourrait impliquer deux cystéines réduites accessibles	92
b) La liaison au Cd^{2+} et au SeO_3^{2-} ne modifie pas les structures secondaires	92
2. Caractérisation biochimique et identification des sites de liaison du Cd^{2+} et du SeO_3^{2-} à SBP1	93
a) Caractérisation biochimique et identification des sites de liaison du Cd^{2+} à SBP1	93
(1) Etude de l'affinité du Cd^{2+} pour SBP1	93

(2) La liaison Cd^{2+} /SBP1 est une liaison polaire, thermodynamiquement favorable, et qui ne semble pas faire intervenir de molécules d'eau	95
(3) La liaison Cd^{2+} /SBP1 implique une forte majorité de résidus soufrés.....	98
b) Identification du site de liaison du Se à SBP1.....	101
(1) Le SeO_3^{2-} se lie à SBP1 de façon covalente sous sa forme Se	101
(2) Le peptide impliqué dans la liaison au Se contient le motif $\text{C}^{21}\text{-C}^{22}$	103
(3) La liaison SBP1/Se est de type R-S-Se-S-R	105
C. Discussion	106
V. CHAPITRE 2 : ETUDE DE LA STRUCTURE TRIDIMENSIONNELLE DE LA PROTEINE « SELENIUM BINDING PROTEIN 1 » (SBP1) D'ARABIDOPSIS THALIANA	113
A. Etude structurale de la protéine SBP1 chez <i>Arabidopsis thaliana</i>.....	115
1. <i>SBP1 : une protéine de la famille des bêta-propeller</i>	115
a) Structure de SBP1 chez l'organisme <i>Sulfolobus tokodaii</i>	115
b) Modélisation de la structure tridimensionnelle de SBP1 chez <i>Arabidopsis thaliana</i>	116
2. <i>Dosage des cystéines réduites et identification d'un potentiel pont disulfure</i>	118
3. <i>Importance du tunnel central de SBP1</i>	119
B. Choix de différentes formes de SBP1 afin d'optimiser les conditions de cristallogénèse	122
1. <i>Purification des protéines MAT-SBP1, GGS-SBP1 et GYA-SBP1</i>	123
a) Optimisation des conditions de purification de MAT-SBP1	123
b) Purification de GGS-SBP1 et GYA-SBP1	126
2. <i>Essais de cristallogénèse</i>	127
C. Discussion	129
VI. CHAPITRE 3 : ANALYSE <i>IN PLANTA</i> DE LA PROTEINE « SELENIUM BINDING PROTEIN 1 » (SBP1) CHEZ <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i>	133
A. Analyse de la localisation sub-cellulaire de SBP1	135
B. Identification des motifs de régulation <i>cis</i> en réponse au stress dans le promoteur de SBP1.....	138
1. <i>Lignées bioluminescentes produites pour l'analyse de la régulation du promoteur de SBP1</i>	139
2. <i>Le motif M2 est fortement impliqué dans la régulation de l'expression de SBP1 en réponse à la carence en soufre</i>	139
1. <i>Le motif m2 est fortement impliqué dans la régulation de l'expression de SBP1 en réponse au cadmium, au séléniate et au cuivre</i>	145
C. Impact de la variation de l'expression de SBP1 sur le métabolisme du Sélénium...152	
a) Lignées surexprimant SBP1 ou sous exprimant la famille des SBPs.....	152
b) Analyse de l'accumulation du Se	154
c) Analyse de la spéciation du Se	159
D. Discussion	163
VII. CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	169

A. SBP1, une protéine impliquée dans la détoxification du Cd^{2+} et du Se.....	172
1. <i>Un rôle potentiel dans la chélation du Cd^{2+}</i>	<i>172</i>
2. <i>Un rôle potentiel dans la réduction et la détoxification du SeO_3^{2-}</i>	<i>174</i>
3. <i>Un rôle potentiel dans la chélation de métaux essentiels</i>	<i>175</i>
B. SBP1, une protéine impliquée dans la réponse à une carence en soufre	176
VIII. ANNEXES	179
IX. BIBLIOGRAPHIE	185

Liste des abréviations

ABCC	<u>A</u> TP <u>B</u> inding <u>C</u> assette
amiRNA	<u>micro</u> <u>ARN</u> <u>artificiel</u>
APR2	<u>A</u> dénylyl <u>p</u> hosphosulfate <u>R</u> eductase <u>2</u>
APSe	<u>A</u> dénosine <u>P</u> hospho <u>S</u> éléniate
CAX	<u>C</u> alcium/ <u>H</u> <u>e</u> xchange transporter
CSDB	<u>C</u> ambridge <u>S</u> tructural <u>D</u> atabase
DMDSe	<u>D</u> iméthyl <u>d</u> isélnide
DMSe	<u>D</u> iméthyl <u>s</u> élénide
DMSeP	<u>D</u> iméthyl <u>s</u> élénopropionate
DMSO	<u>D</u> iméthyl <u>s</u> ulfo <u>y</u> de
DMSP	<u>D</u> iméthyl <u>s</u> ulfoniopropionate
dNTP	<u>D</u> ésoxyribo <u>n</u> ucléotide <u>t</u> ri <u>p</u> hosphate
DO	<u>D</u> ensité <u>O</u> ptique
DTNB	acide 5,5'- <u>d</u> ithiobis-(2- <u>n</u> itro <u>b</u> enzoïque)
DTT	<u>D</u> ithiothréitol
EDTA	<u>A</u> cide <u>E</u> thylène <u>D</u> iamine <u>T</u> étraacétique
ERO	<u>E</u> spèce <u>r</u> éactive de l' <u>o</u> xygène
ES-MS	<u>E</u> lectro <u>S</u> pray - <u>M</u> ass <u>S</u> pectrometry, Spectrométrie de Masse par électronébuliseur
FBA	<u>F</u> ructose <u>B</u> iphosphate <u>A</u> ldolase
FW	<u>F</u> or <u>w</u> ard
GAPDH	<u>G</u> lycér <u>a</u> ldéhyde-3- <u>P</u> hosphate <u>D</u> ehydrogénase
GFP	<u>G</u> reen <u>F</u> luorescent <u>P</u> rotein
GPX	<u>G</u> lutathion <u>P</u> éroxidase
GS2-Cd	complexe de thiolate de glutathion et de cadmium
GSH	Glutathion
GST	<u>G</u> lutathion- <u>S</u> - <u>T</u> ransférase
HEPES	acide 4-(<u>H</u> ydroxy <u>e</u> thyl)-1- <u>P</u> ipérazine <u>E</u> thane <u>S</u> ulfonique
HIF1- α	<u>H</u> ypoxia <u>I</u> nducible <u>F</u> actor <u>1</u> - <u>α</u> (Facteur 1- α inductible de l'hypoxie)
HMA	<u>H</u> heavy- <u>M</u> etal <u>A</u> TPase
ICP-MS	<u>I</u> nductive <u>C</u> oupled <u>P</u> lasma <u>M</u> ass <u>S</u> pectrometry Spectrométrie de masse couplée à une torche à plasma
IPTG	<u>I</u> sopropyl β -D-1- <u>t</u> hiogalactopyranoside
IRT	<u>I</u> ron <u>R</u> egulatory <u>P</u> rotein
ITC	<u>I</u> sothermal <u>T</u> itration <u>C</u> alorimetry, Titration Calorimétrique Isotherme
KO	<u>K</u> nock <u>O</u> ut
LB	<u>L</u> uria- <u>B</u> ertani
LC/MS	<u>L</u> iquide <u>C</u> hromatography / <u>M</u> ass <u>S</u> pectrometry Chromatographie liquide / spectrométrie de masse
LCT1	<u>L</u> ow-affinity <u>C</u> ation <u>T</u> ransporter <u>1</u>
LUC	<u>L</u> uciférase
MES	acide 2-(N- <u>M</u> orpholino) <u>E</u> thane <u>S</u> ulfonique
MHX	<u>M</u> agnesium/ <u>H</u> <u>e</u> xchange transporter
MS	<u>M</u> urashige and <u>S</u> koog

MS	<u>M</u> ass <u>S</u> pectrometry, Spectrométrie de masse
MT	<u>M</u> étallo <u>t</u> hionéine
NADP	<u>N</u> icotinamide <u>a</u> denine <u>d</u> inucléotide <u>P</u> hosphate
NB	<u>N</u> itru <u>r</u> e de <u>B</u> ore
NRAMP	<u>N</u> atural <u>R</u> esistant <u>A</u> ssociated <u>M</u> acrophage <u>P</u> rotein
NTB	2- <u>N</u> itro-5- <u>T</u> hi <u>b</u> enzoate
OAS	<u>O</u> - <u>A</u> cétyl <u>s</u> érine
OPH	<u>O</u> - <u>P</u> hospho <u>h</u> omosérine
PBS	<u>P</u> hosphate <u>B</u> uffer <u>S</u> aline, Tampon phosphate salin
PC	<u>P</u> hyto <u>ch</u> élatine
PCR	<u>P</u> olymerase <u>C</u> hain <u>R</u> eaction, réaction de polymérisation en chaîne
PCR1	<u>P</u> lant <u>C</u> admium <u>R</u> esistance 1
PCS	<u>P</u> hyto <u>ch</u> élatine <u>S</u> ynthase
PDB	<u>P</u> rotein <u>D</u> ata <u>B</u> ank
ppm	<u>p</u> arties <u>p</u> ar <u>m</u> illion
PSA	<u>P</u> ersulfate d' <u>A</u> mmonium
RT-PCR	<u>R</u> eal- <u>T</u> ime <u>P</u> olymerase <u>C</u> hain <u>R</u> eaction Réaction de polymérisation en chaîne en temps réel
RV	<u>R</u> e <u>v</u> erse
SBP1-3	<u>S</u> elenium <u>B</u> inding <u>P</u> rotein 1-3
SDS	<u>S</u> odium <u>D</u> odecyl <u>S</u> ulfate
SDS-PAGE	<u>S</u> odium <u>D</u> odecyl <u>S</u> ulfate - <u>P</u> oly <u>a</u> crylamide <u>G</u> el
SiR	<u>S</u> ulfite <u>R</u> éductase
SLIM1	<u>S</u> ulfur <u>L</u> im <u>i</u> tation 1
TAE	<u>T</u> ris <u>A</u> cétate <u>E</u> DTA
TBS	<u>T</u> ris <u>B</u> uffer <u>S</u> aline, Tampon salin tris
TCEP	<u>T</u> ris(2- <u>c</u> arboxy <u>e</u> thyl) <u>p</u> hosphine
TEMED	<u>T</u> étra <u>m</u> éthyl <u>e</u> thylène <u>d</u> iamine
TSA	<u>T</u> hermal <u>S</u> hift <u>A</u> ssay
UV	<u>U</u> ltra <u>V</u> iolet
VDU	p <u>V</u> HL-interacting <u>d</u> e <u>u</u> biquitin enzyme
VHL	<u>V</u> on <u>H</u> ippel <u>L</u> indau
WT	<u>W</u> ild- <u>T</u> ype (sauvage)
X-gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D- <u>g</u> alactopyranoside
ZIP	<u>Z</u> RT1- <u>I</u> RT1 like <u>P</u> rotein
ZRP	<u>Z</u> inc <u>R</u> egulatory <u>P</u> rotein

I. INTRODUCTION GENERALE

Une industrialisation et une urbanisation croissantes entraînent une forte contamination des sols par différents composés toxiques tels que les métaux lourds. Cette pollution constitue actuellement un risque majeur pour l'environnement, l'agriculture et la santé humaine. Les plantes sont des organismes sessiles qui absorbent et accumulent ces composés toxiques et qui, face à ceux-ci, ont développé des mécanismes de tolérance. Ainsi, de nombreuses équipes de recherche travaillent actuellement sur la compréhension de ces mécanismes afin de développer des approches biotechnologiques qui permettraient de dépolluer les sols.

Parmi les polluants les plus fréquemment retrouvés dans les sols figure le Cadmium (Cd). Ce métal lourd a été découvert par Magnus Martin af Pontin en 1809. Le Cd, polluant fortement présent dans l'industrie, est utilisé lors de la fabrication de colorants (CdS, CdO), de piles et de batteries (Cd-Ni), et également dans certains procédés de traitement de surfaces (bonne résistance du Cd à la corrosion) et de production d'alliages. Le Cd se retrouve également dans les engrais phosphatés. Concernant l'ensemble de la population humaine, il existe plusieurs sources environnementales de contamination, mais la principale source est l'alimentation provenant de terres agricoles contaminées. L'ensemble des sources de contamination est illustré dans la figure 1.

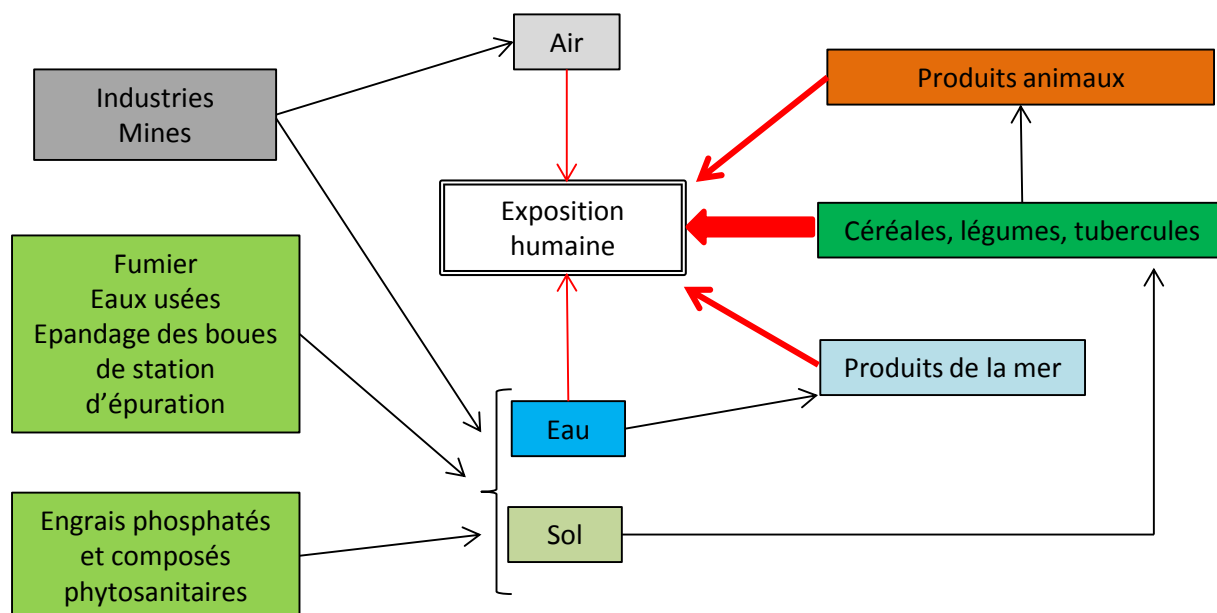


Figure 1 : Sources environnementales d'exposition au Cd pour la population non-fumeuse. Les activités industrielles et minières sont les principales sources de contamination au niveau de l'air, de l'eau et du sol. Le fumier, l'épandage de boues, les eaux usées ainsi que l'utilisation d'engrais phosphatés participent à l'accumulation du Cd au niveau des sols agricoles et de l'environnement aquatique. La proportion de Cd ne peut être quantifiée car celle-ci est trop variable en fonction des régions (flèches noires). L'épaisseur des flèches rouges indique la contribution relative d'exposition au Cd des différentes sources pour la population humaine. D'après Clemens et al. (2012) modifié.

Actuellement, le niveau d'exposition au Cd pour la population humaine est compris entre 1 et 5 µg de Cd par kg de masse corporelle (Clemens *et al.*, 2012) et la population européenne est une des plus exposées. D'après l'EFSA (European Food Safety Authority), cette exposition doit être diminuée à 2,5 µg de Cd par kg de masse corporelle (EFSA, 2009), ce qui nécessite la mise en place de dispositifs permettant à l'homme d'être moins exposé au Cd. Parmi les dispositifs pouvant être mis en place figure l'utilisation des biotechnologies telle que la phytoremédiation. En effet, la production de plantes hypertolérantes et hyperaccumulatrices pouvant accumuler le Cd dans les parties aériennes permettrait de dépolluer les sols contaminés. Une autre approche biotechnologique pourrait consister à produire des plantes hypertolérantes non accumulatrices (par exemple des plantes n'accumulant pas de composés toxiques au niveau des parties aériennes). Celles-ci pourraient alors être utilisées pour la consommation humaine et animale.

Parmi les composés toxiques pour la plante figure également le Sélénium (Se), élément essentiel chez les mammifères. Le Se est un non métal du groupe VIA des chalcogènes découvert en 1817 par Jakob Berzelius. D'un point de vue chimique, il est similaire au soufre (S) et présente 5 états de valence : sélénide (-II), sélénium élémentaire (0), thioséléniate (+II), sélénite (+IV) et séléniat (+VI) (Lauchli, 1993). La spéciation du Se dans les sols dépend des conditions d'oxydo-réduction et du pH mais le Se est majoritairement présent sous la forme séléniat (Terry *et al.*, 2000; Sors *et al.*, 2005; Missana *et al.*, 2009). La contamination des sols par le Se peut provenir de différentes sources : irrigation des sols riches en Se, industrie du charbon, mines et raffinerie (Lemly *et al.*, 2002; Hamilton, 2004; Lemly, 2004; Wu, 2004). Le Se, de la même façon que le Cd, est ensuite bioaccumulé puis se retrouve dans la chaîne alimentaire. Les besoins actuels en Se pour un adulte en bonne santé sont de 55 µg par jour et la limite de toxicité est de 400 µg par jour. Chez l'homme, le Se est un antioxydant qui joue un rôle dans la prévention du cancer (Jung *et al.*, 2010). Ainsi, certaines approches biotechnologiques sont développées afin de générer des plantes riches en Se qui pourraient être utilisées dans la prévention de certains cancers (Banuelos *et al.*, 2011). Certaines plantes hyperaccumulatrices pourraient également être utilisées dans une démarche de phytoremédiation de sols pollués (Van Huysen *et al.*, 2004; Banuelos *et al.*, 2005a; Banuelos *et al.*, 2005b).

Une des thématiques de l'équipe « Réponse de la plante aux stress environnementaux et métaux lourds » est de mieux comprendre la réponse de la plante aux éléments polluants et d'identifier de nouveaux mécanismes mis en place par la plante pour lutter contre le stress induit par les métaux lourds et autres toxiques et les chaînes de signalisation associées.

Afin d'étudier la réponse de la plante au Cd, de nombreuses études globales chez différents organismes tels que *Populus trumula* (Kieffer *et al.*, 2009), *Brassica juncea* (Alvarez *et al.*, 2009), *Oriza sativa* (Hajduch *et al.*, 2001; Ahsan *et al.*, 2007; Aina *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2010), *Lycopersicon esculentum* (Rodriguez-Celma *et al.*, 2010), *Glycine max* (Sobkowiak *et al.*, 2006), *Thlaspi caerulescens* (Tuomainen *et al.*, 2006), *Lepidium sativum* (Gianazza *et al.*, 2007), *Arabidopsis thaliana* (Sarry *et al.*, 2006; Semane *et al.*, 2010), *Spinacia oleacea* (Fagioni *et al.*, 2009) et *Linum usitatissimum* (Hradilova *et al.*, 2010) ont été menées ces dernières années. Au sein de l'équipe, des approches globales de protéomique (Sarry *et al.*, 2006; Villiers *et al.*, 2011), métabolomique (Ducruix *et al.*, 2006; Sarry *et al.*, 2006; Ducruix *et al.*, 2008; Villiers *et al.*, 2011) et transcriptomique (Herbette *et al.*, 2006; Villiers *et al.*, 2012) ont été réalisées sur le modèle *Arabidopsis thaliana*. Ces analyses ont montré que le Cd pouvait modifier plusieurs fonctions cellulaires et voies métaboliques telles que la photosynthèse, l'assimilation du soufre (S), la synthèse des acides aminés, la détoxification et la compartimentation, le métabolisme des carbohydrates, la protéolyse et le contrôle redox. Les modifications qui interviennent au niveau de la voie d'assimilation du soufre seront détaillées au cours de la synthèse bibliographique.

Les analyses protéomiques différentielles réalisées au laboratoire (Sarry *et al.*, 2006) sur des cellules d'*Arabidopsis thaliana* traitées ou non au Cd ont permis de mettre en évidence l'accumulation précoce et dose-dépendante d'une protéine homologue à la « Selenium Binding Protein 1 » (SBP1) humaine connue pour sa capacité à lier le Se. Les données bibliographiques actuellement disponibles concernant cette protéine chez les plantes mettent en évidence un rôle potentiel de celle-ci dans la réponse de la plante au stress et dans différents mécanismes de détoxification (Agalou *et al.*, 2005; Dutilleul *et al.*, 2008; Hugouvieux *et al.*, 2009). Il est donc paru intéressant de réaliser une analyse fonctionnelle intégrée de SBP1. Au cours de ma thèse, une caractérisation biochimique *in vitro* ainsi qu'une étude *in planta* de cette protéine dans le fonctionnement de la plante ont donc été entreprises.

La synthèse bibliographique présentée va se diviser en trois parties. La première permettra de décrire la toxicité du Cd chez l'homme et la plante et de caractériser les mécanismes d'assimilation et de tolérance de ce toxique chez la plante. Ensuite, une démarche similaire sera réalisée dans le cas du Se, essentiel pour l'homme mais pas pour la plante. La troisième partie consistera en un état de l'art concernant SBP1 chez les mammifères puis plus particulièrement chez les plantes. L'ensemble de ces données a permis de déterminer les objectifs de ma thèse qui seront présentées à la fin de cette synthèse bibliographique.

II. SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

A. Le cadmium et le sélénium : deux polluants largement répandus et toxiques pour les plantes

1. Le cadmium

Le cadmium (Cd) est un métal non essentiel qui ne présente aucune fonction physiologique. Il existe tout de même une espèce de diatomée marine, *Thalassiosira weissflogii*, qui utilise le Cd en tant que catalyseur dans son activité d'anhydrase carbonique (Lane *et al.*, 2005; Xu *et al.*, 2008). Cette enzyme peut également utiliser le Zinc (Zn) mais celui-ci étant très peu présent dans les océans, *Thalassiosira weissflogii* utilise le Cd. Cette diatomée est le seul exemple connu d'organisme pour lequel le Cd intervient dans un processus biochimique.

a) Toxicité chez les mammifères et moyens de détoxification

La Cd présente une toxicité importante chez les mammifères et son accumulation dans l'organisme peut conduire à différents troubles de la santé. Les principaux organes touchés sont les reins où sa demi-vie va de 10 à 30 ans (Jarup *et al.*, 2009). Le Cd peut également toucher les os provoquant une ostéomalacie, voire de l'ostéoporose lors d'expositions plus importantes (Jarup *et al.*, 1998). Ces différentes affections ont été mises en évidence à partir des années 1950 au Japon suite au rejet de fortes quantités de Cd résultant de l'activité minière dans la rivière Jinzu, dont l'eau était utilisée pour l'irrigation des rizières mais également pour la consommation humaine (Schenk *et al.*, 2000). Cette pollution est à l'origine de la maladie « itaï-itaï » qui se caractérise par de multiples fractures, une distorsion des os et un dysfonctionnement rénal. Le Cd est également à l'origine de plusieurs cancers (Byrne *et al.*, 2009) et depuis les années 1990, à partir d'études réalisées sur des travailleurs exposés au Cd, celui-ci est considéré en tant qu'élément cancérigène de 1^{ère} classe. Une étude menée en 2008 a également montré une corrélation entre l'exposition au Cd et l'infarctus du myocarde (Everett *et al.*, 2008).

Afin de faire face à ce type d'intoxication, les cellules des mammifères ont développé un système de détoxification utilisant des protéines appelées métallothionéines (MTs) dont une des propriétés principales est de chélater le Cd. Ces protéines sont également impliquées dans la lutte contre le stress oxydant et dans l'homéostasie de certains métaux essentiels (Sutherland *et al.*, 2011). Les principales caractéristiques des MTs sont leur petite taille (0,5 à 14 kDa) et une quantité importante de cystéines (30% des acides aminés) responsables de la capacité de liaison aux métaux (Kojima, 1991). Concernant les caractéristiques structurales et biochimiques des MTs (Figure 2), celles-ci sont constituées de deux sous-unités (alpha et bêta) chacune capable de lier les métaux (Robbins *et al.*, 1991). Les MTs réalisent une coordination tétraédrique du Cd²⁺ (4 cystéines sont

impliquées dans la liaison de chaque Cd^{2+}) et chaque MT est capable de lier 7 atomes de Cd^{2+} (4 au niveau du domaine alpha et 3 au niveau du domaine bêta). Cette coordination est la même pour d'autres atomes divalents tels que le Zn^{2+} , le Fe^{2+} et le Co^{2+} (Vasak *et al.*, 1980; Nielson *et al.*, 1985; Good *et al.*, 1986). Concernant le Cd^{2+} , cette liaison se fait au niveau des cellules hépatiques, les complexes MTs- Cd^{2+} sont ensuite transportés vers les cellules rénales (Chan *et al.*, 1993) puis accumulés, d'où le caractère néphrotoxique du Cd^{2+} même lorsque celui-ci est chélaté aux MTs. Des études ont montré que des souris mutantes ne possédant pas de MTs accumulent seulement 7 % de Cd^{2+} de plus que les souris sauvages mais sont hypersensibles au Cd^{2+} , ce qui suggère une accumulation du Cd^{2+} libre directement au niveau des reins ainsi qu'une capacité des MTs à réduire les effets toxiques du Cd^{2+} sur l'organisme (Liu *et al.*, 1998).

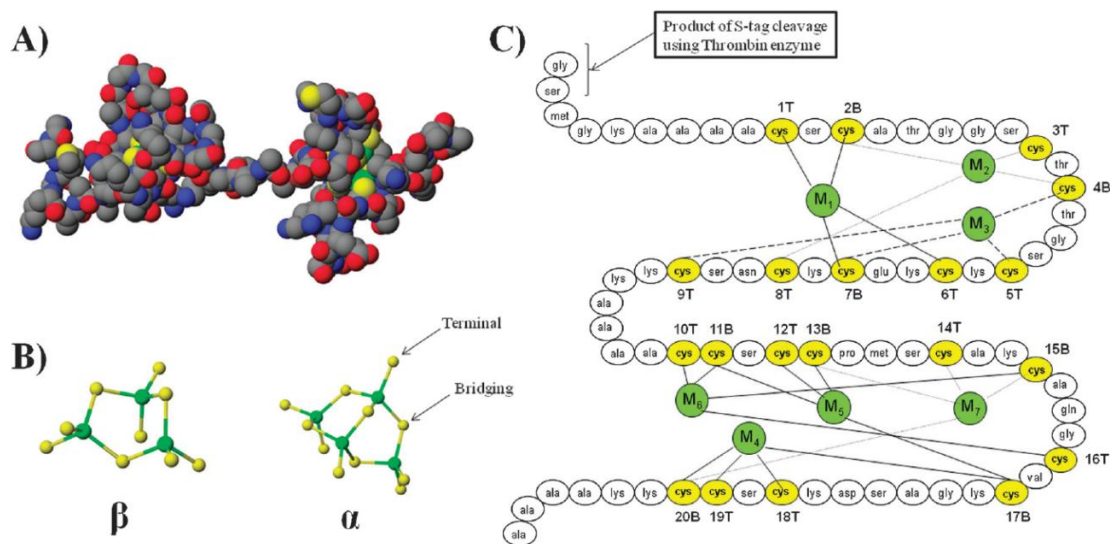


Figure 2 : Les métallothionéines. A : Représentation de la structure de la métallothionéine humaine 1a lorsque le Cd^{2+} est lié à la protéine. La structure a été obtenue par modélisation par l'équipe de Chan *et al.* (2007). La partie N-terminale qui correspond au domaine β est à gauche et la partie C-terminale qui correspond au domaine α est à droite. **B : Liaisons entre les atomes de Cd^{2+} et les groupements thiol au niveau du domaine β et du domaine α de la métallothionéine humaine 1a.** Chaque cystéine peut être impliquée dans la liaison à un atome de Cd^{2+} (Terminal) ou deux atomes (Bridging). **C : Schéma des liaisons du Cd^{2+} de la métallothionéine humaine 1a.** M1-7 représente chacun des sept atomes de Cd^{2+} , les cystéines sont représentées en jaune et la lettre B signifie « Bridging » tandis que la lettre T signifie « Terminal ». La partie β se situe au-dessus et la partie α se situe en dessous. D'après Sutherland *et al.* (2011).

b) Voie d'assimilation, toxicité et moyens de détoxification chez la plante

Le Cd^{2+} est un élément toxique pour la plante qui entraîne une réduction de la biomasse, une chlorose, une inhibition de la croissance racinaire, des altérations au niveau morphologique ainsi qu'une dérégulation des activités photosynthétiques (Faller *et al.*, 2005; Kupper *et al.*, 2007; Solti *et al.*, 2008; Fagioni *et al.*, 2009; Verbruggen *et al.*, 2009a; Janik *et al.*, 2010; Lin *et al.*, 2012; Molins *et al.*, 2013). La principale cause de la toxicité du Cd^{2+} provient du fait qu'il puisse se substituer à la place de métaux essentiels divalents tels que le Zn^{2+} , le Ca^{2+} , le Fe^{2+} , le Mg^{2+} et le Cu^{2+} (Moulis, 2010). Ainsi le Cd^{2+} peut prendre la place de ces différents métaux au niveau des métalloprotéines et interférer dans l'homéostasie de ces différents éléments.

Les plantes utilisent différentes stratégies pour lutter contre la toxicité du Cd^{2+} (Lin *et al.*, 2012) :

- chélation du Cd^{2+} au niveau du cytosol
- séquestration du Cd^{2+} sous forme libre ou liée au niveau de la vacuole
- exclusion du Cd^{2+} *via* des transporteurs vers les parties aériennes

Certaines plantes appelées hyperaccumulatrices vont être capables naturellement d'accumuler et de tolérer une concentration de Cd^{2+} supérieure à 100 mg/kg matière sèche (Verbruggen *et al.*, 2013). Actuellement neuf espèces hyperaccumulatrices de Cd^{2+} ont été identifiées (Meyer *et al.*, 2012).

(1) Transport du Cd^{2+} dans la plante

L'entrée du Cd^{2+} dans la plante se fait de façon non-spécifique au niveau des racines *via* différents transporteurs de métaux (particulièrement les transporteurs de Zn^{2+} , Fe^{2+} et Ca^{2+}) (Clemens, 2006) (Figure 3). Chez les plantes, le premier transporteur caractérisé pour son implication dans le transport du Cd^{2+} a été LCT1 (Low affinity Cation Transporter 1), un transporteur de Ca^{2+} présent chez le blé. Des levures surexprimant la protéine LCT1 montrent une hypersensibilité au Cd^{2+} (Clemens *et al.*, 1998). Il apparaît donc comme un bon candidat impliqué dans l'absorption du Cd^{2+} par la plante mais le transport *in planta* du Cd^{2+} *via* LCT1 n'a actuellement pas été confirmé. Il n'y a pas d'homologue de cette protéine chez *Arabidopsis thaliana*, mais les transporteurs de Ca^{2+} présents au niveau des feuilles semblent impliqués dans l'absorption du Cd^{2+} (Perfus-Barbeoch *et al.*, 2002). En effet, des feuilles exposées à une solution de Cd^{2+} pendant quelques secondes puis rincées montrent un phénotype de dérégulation des cellules de garde. Ce phénotype observé en présence de

Cd^{2+} disparaît en présence d'inhibiteurs des canaux calciques. Il semblerait donc que le Cd^{2+} puisse mimer le Ca^{2+} et entrer dans les cellules de garde *via* les canaux calciques.

Chez *Arabidopsis thaliana*, le transport des différents cations au niveau des racines est assuré par les transporteurs de la famille ZIP (ZRT1/IRT1-like Proteins) (Guerinot, 2000; Vert *et al.*, 2002; Kramer *et al.*, 2007). Des lignées surexprimant IRT1 (transporteur de Fe^{2+} appartenant à la famille ZIP) ont été décrites comme accumulant plus de Cd^{2+} et de Zn^{2+} dans un milieu carencé en Fe^{2+} (Connolly *et al.*, 2002). Les transporteurs de Zn^{2+} ZIP1, ZIP2 et ZIP3 semblent également impliqués dans le transport du Cd^{2+} . En effet, chez le modèle levure, il a été mis en évidence que l'entrée du Zn^{2+} dans la cellule *via* ces trois transporteurs de la famille ZIP était bloquée en présence de Cd^{2+} (Grotz *et al.*, 1998). Chez *Oriza sativa*, la protéine NRAMP5 (Natural Resistance Associated Macrophage Protein 5) dont la fonction physiologique est l'absorption du Mn^{2+} représente la principale voie d'entrée du Cd^{2+} dans la plante (Sasaki *et al.*, 2012). En effet, des lignées *nramp5*, en présence de Cd^{2+} , accumulent moins de ce toxique au niveau de la tige et de la graine. Le transporteur NRAMP1, connu pour son rôle en tant que transporteur de Fe^{2+} chez *Arabidopsis thaliana* (Curie *et al.*, 2000) est également impliqué dans le transport du Cd^{2+} chez *Oriza sativa* (Takahashi *et al.*, 2011a; Takahashi *et al.*, 2011b). NRAMP1 est localisé au niveau de la membrane plasmique des cellules de l'épiderme. Ceci a été montré par l'utilisation de lignées surexprimant NRAMP1 et dont le phénotype présente une hypersensibilité au Cd^{2+} et une accumulation de celui-ci au niveau des feuilles.

(2) Séquestration du Cd^{2+} sous forme libre et chélaté

(a) Influx du Cd^{2+} libre dans la vacuole via les transporteurs tonoplastiques

Le transporteur de métaux lourds Heavy Metal ATPase 3 (HMA3), qui appartient à la famille des ATPase $\text{P}_{1\text{B}}$, est impliqué dans la compartimentation vacuolaire de plusieurs métaux tels que le Zn^{2+} et le Pb^{2+} (Gravot *et al.*, 2004; Morel *et al.*, 2009; Ueno *et al.*, 2009; Ueno *et al.*, 2010; Miyadate *et al.*, 2011). Des études menées chez *Oryza sativa* et *Arabidopsis thaliana* montrent que HMA3 apparaît comme un élément essentiel dans la séquestration du Cd^{2+} sous forme libre au niveau de la vacuole (Morel *et al.*, 2009; Ueno *et al.*, 2009; Ueno *et al.*, 2010). HMA3 est localisé uniquement au niveau de la membrane vacuolaire et sa surexpression augmente la tolérance au Cd^{2+} ainsi que son accumulation chez la plante *Arabidopsis thaliana* (Morel *et al.*, 2009). Ce transporteur semble permettre la séquestration du Cd^{2+} au niveau de la vacuole. HMA3 apparaît donc comme un transporteur impliqué dans la détoxification du Cd^{2+} (Figure 3).

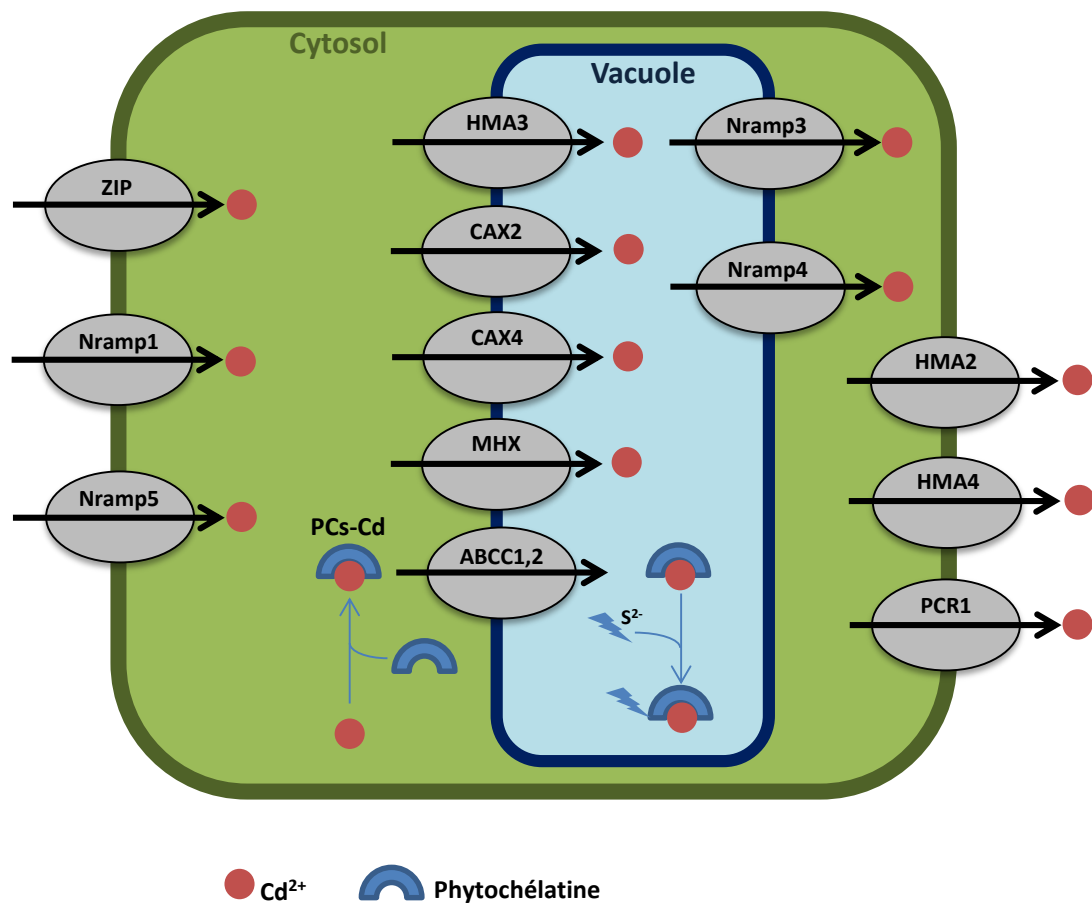


Figure 3 : Mécanismes moléculaires de la cellule végétale en réponse au Cd^{2+} . Le Cd^{2+} entre dans la cellule végétale via les transporteurs ZIP, Nramp1 et Nramp5. Le Cd^{2+} sous forme libre peut être transloqué dans la vacuole via HMA3, CAX2, CAX4 et MHX puis remobilisé via Nramp3 et Nramp4. Le Cd^{2+} peut également être chélaté dans le cytosol par des phytochélatines pour former des complexes PCs-Cd qui sont ensuite transloqués dans la vacuole via les transporteurs ABCC1 et ABCC2. Le sulfure (S^{2-}) se lie ensuite à ces complexes pour les stabiliser. Le Cd^{2+} libre dans le cytosol peut être transporté en dehors de la cellule par HMA2 et HMA4 afin d'être transloqué vers les parties aériennes. Le transporteur PCR1 peut également exporter le Cd^{2+} en dehors de la cellule afin d'en réduire la teneur. Inspiré de Lin et al. (2012).

Trois autres transporteurs tonoplastiques ayant une activité antiport $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ ou $\text{Mg}^{2+}/\text{H}^{+}$ ont été identifiés en tant qu'acteurs dans la séquestration du Cd^{2+} . CAX2 (Cation eXchanger 2), CAX4 (Cation eXchanger 4) et MHX (Magnesium H^{+} eXchanger) (Koren'kov et al., 2007; Korenkov et al., 2007; Berezin et al., 2008), localisés au niveau de la racine, augmentent également la tolérance au Cd^{2+} et ne transloquent pas celui-ci vers les parties aériennes (Figure 3).

(b) Séquestration des complexes phytochélatine-Cd dans la vacuole

Le Cd^{2+} peut être séquestré au niveau du cytosol puis de la vacuole par les phytochélatines (PCs) qui sont synthétisées à partir du glutathion (GSH). Les PCs constituent un moyen important de détoxification majoritaire du Cd^{2+} . Ce mécanisme a été caractérisé suite à l'identification de mutants hypersensibles au Cd^{2+} qui ne produisaient plus de GSH (Cobbett *et al.*, 1998) ou de PCs (Howden *et al.*, 1995b). Ceci met bien en évidence l'importance du GSH et des PCs dans la tolérance au Cd^{2+} . Les PCs sont immédiatement produites dans les cellules lorsque celles-ci sont exposées aux métaux lourds tel que le Cd^{2+} (Rauser, 1995; Ramos *et al.*, 2007; Mendoza-Cozatl *et al.*, 2008).

(i) Généralités et structure des phytochélatines

Les PCs ont été identifiées pour la première fois chez *Schizosaccharomyces pombe* (Kondo *et al.*, 1984) puis chez différentes variétés de plantes incluant les monocotylédones, les dicotylédones, les gymnospermes et les algues (Gekeler *et al.*, 1989). Les PCs sont des peptides constitués de trois acides aminés : le glutamate (Glu), la cystéine (Cys) et la glycine (Gly). Les résidus Glu et Cys sont reliés par une liaison γ -carboxylamide. La formule générale des PCs est $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}$ avec n variant généralement de 2 à 5 et ne pouvant être supérieur à 11 (Cobbett, 2000). En fonction de l'espèce végétale, la nature de l'acide aminé terminal, généralement une glycine, peut varier. Ainsi, différentes isophytochélatines ayant pour acide aminé terminal une alanine (Ala), une sérine (Ser), un glutamate (Gln) ou un acide glutamique (Glu) ont été identifiées (Klapheck *et al.*, 1992; Meuwly *et al.*, 1993; Rauser, 1995) : $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Ala}$, $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Ser}$, $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gln}$ et $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Glu}$. La synthèse des PCs à partir du GSH est représentée dans la figure 4. Des analyses globales de métabolomique (Ducruix *et al.*, 2006) et de protéomique (Sarry *et al.*, 2006) réalisées au sein de l'équipe ont mis en évidence que ces différentes isophytochélatines étaient synthétisées chez *Arabidopsis thaliana* lors d'un stress induit par le Cd^{2+} . Ces isophytochélatines sont produites lorsque la voie de synthèse des PCs semble être limitée par le fonctionnement de la glutathione synthase suite à un manque de glycine disponible. Les PCs contiennent un grand nombre de groupement thiols *via* la présence de cystéines. Ces groupements thiols sont impliqués dans la chélation de métaux divalents tel que le Cd^{2+} ou de métaux trivalents tel que l' As^{3+} . Les PCs sont synthétisées pour former des complexes PCs-Cd appelés complexes de bas poids moléculaire. Ceux-ci sont transportés dans la vacuole par deux transporteurs de type ABC (ATP Binding Cassette) appelés ABCC1 et ABCC2 (Park *et al.*, 2012). L'utilisation de lignées mutantes *abcc1×abcc2* a montré que l'absence de ces deux transporteurs entraînait une hypersensibilité au Cd^{2+} et une accumulation de celui-ci dans le cytosol. Une fois dans la vacuole, du sulfide S^{2-} se lie aux complexes de bas poids moléculaire PCs-Cd pour

former des complexes de haut poids moléculaire (Cobbett, 2000; Clemens, 2006) plus stables que les précédents complexes (Figure 3).

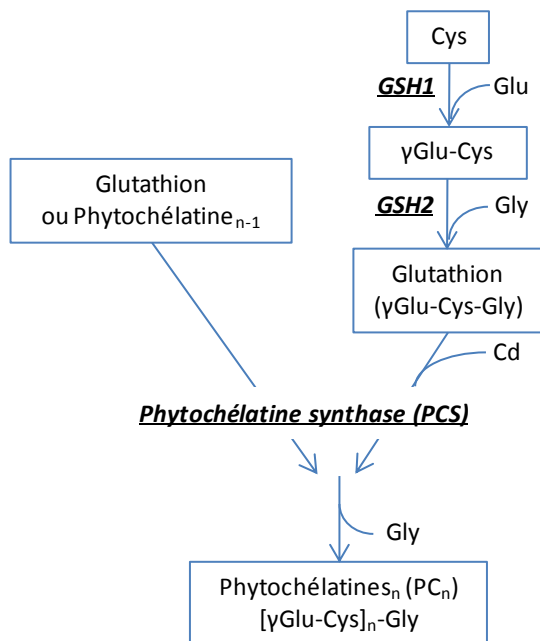


Figure 4 : Synthèse des phytochélatines.

Le glutathion (GSH) est synthétisé à partir de d'une cystéine (Cys), d'un glutamate (Glu) et d'une glycine (Gly) sous l'action de deux enzymes : GSH1 et GSH2. Sous l'action de la phytochélatine synthase (PCS), des « polymères » de GSH de formule $[\gamma\text{Glu-Cys}]_n\text{-Gly}$ sont formés.

(ii) Synthèse des phytochélatines

Ces peptides sont synthétisés enzymatiquement par la phytochélatine synthase (PCS) et sont connus pour leur implication dans la détoxification et l'accumulation des métaux lourds (Pal *et al.*, 2010). Il existe deux isoformes de PCS chez *Arabidopsis thaliana*, clonées respectivement en 1999 et 2001 : PCS1 (Clemens *et al.*, 1999; Ha *et al.*, 1999; Vatamaniuk *et al.*, 1999) et PCS2 (Cazale *et al.*, 2001). La surexpression de PCS1 chez *Saccharomyces cerevisiae* augmente la tolérance au Cd^{2+} (Vatamaniuk *et al.*, 1999) tandis que la mutation du gène codant pour PCS1 chez *Arabidopsis thaliana* augmente la sensibilité à ce composé toxique (Howden *et al.*, 1995b; Ha *et al.*, 1999). Le processus d'activation de la PCS1 est actuellement discuté dans la littérature. Il se pourrait que ce soit la formation de thiolate de GSH auquel est lié le Cd^{2+} (GS2-Cd) qui entraînerait l'activation de la PCS1 par le Cd^{2+} (Vatamaniuk *et al.*, 2000). En effet, des expériences réalisées sur PCS1 purifiée d'*Arabidopsis thaliana* montrent que l'augmentation de la concentration de GS2-Cd augmente la synthèse de PCs par PCS1. En 2011, il a été suggéré que l'activation de PCS1 se faisait *via* une liaison avec deux atomes de Cd^{2+} (Ogawa *et al.*, 2011). Cette étude, réalisée à partir de PCS1 recombinante d'*Arabidopsis thaliana*, montre qu'en présence d'une concentration croissante de Cd^{2+} libre, l'activité de PCS1 augmente puis diminue. Les auteurs proposent donc que PCS1 puisse être activée *via* un premier site de liaison au Cd^{2+} , puis inhibée lorsque le Cd^{2+} se lie au second site dont l'affinité pour ce métal est plus faible que dans le cas du premier site. Peu de travaux ont été réalisés sur PCS2. Les

données actuellement disponibles montrent que la surexpression du gène codant pour PCS2 ne restaure pas la tolérance au Cd chez le mutant *pcs1* (Lee *et al.*, 2005). Cette enzyme semblerait donc avoir un rôle moins important que PCS1 dans la réponse au stress induit par le Cd²⁺.

(c) *Autres acteurs impliqués dans la séquestration du Cd²⁺*

D'autres chélateurs tels que les MTs peuvent être impliqués dans la séquestration du Cd²⁺. Cette protéine a été identifiée pour la première fois, dans le cas des plantes, chez le blé (Lane *et al.*, 1987). Il existe quatre familles de MTs qui se différencient selon les domaines riches en cystéines (Cobbett *et al.*, 2002). La quantité de Cd²⁺ pouvant se lier aux MTs de plantes actuellement caractérisées varie de 3 à 6 (Freisinger, 2011). Des expériences de sensibilité au Cd²⁺ ont été réalisées sur des lignées mutantes d'*Arabidopsis thaliana cad 1-3* (lignées déficientes en PCs) pour lesquelles les gènes codant pour les MTs ont été mutés ou non. Les résultats ont montré que l'absence de MTs, lorsque celle-ci est combinée à une déficience en PCs, augmentait la sensibilité au Cd²⁺ (Guo *et al.*, 2008). Ceci met bien en évidence l'importance des MTs dans la détoxification du Cd *via* ses propriétés de chélation. La nicotianamine ainsi que des acides organiques (citrate et malate) sont également impliqués dans la chélation du Cd²⁺ (Clemens, 2006; Verbruggen *et al.*, 2009b; Lin *et al.*, 2012). Dans le cas du citrate et du malate, la formation de complexes avec les métaux ne peut se faire qu'en milieu acide, ce qui suggère que les complexes se forment uniquement au niveau de la vacuole (Haydon *et al.*, 2007).

(3) Transfert du Cd²⁺ vers les parties aériennes

La détoxification du Cd²⁺ chez les plantes peut se faire par le transfert de celui-ci vers les parties aériennes. La protéine Heavy Metal ATPase 4 (HMA4), de la famille des P_{1B}-ATPase, a été caractérisée pour son rôle dans l'efflux du Zn²⁺ ainsi que du Cd²⁺ (Mills *et al.*, 2003; Hussain *et al.*, 2004; Verret *et al.*, 2004) (Figure 3). Ce transporteur localisé au niveau de la membrane plasmique des cellules entourant le système vasculaire (Verret *et al.*, 2004) apparaît comme un élément majeur dans la translocation du Cd²⁺ des racines vers les parties aériennes de la plante. Le mutant *hma4* transloque moins de Cd²⁺ au niveau des parties aériennes tandis que la surexpression de *HMA4* augmente la quantité de Cd²⁺ transférée dans les parties aériennes ainsi que la tolérance au Cd²⁺ (Verret *et al.*, 2004). Le transporteur HMA4 est donc impliqué dans la translocation du Cd²⁺, *via* le xylème, vers les feuilles. Dans le système levure, par des expériences de mutagenèse dirigée, il a été montré que les résidus cystéine et glutamate présents dans le domaine de liaison aux métaux situé en N-terminal étaient importants dans la fonction de transport du Cd²⁺ (Verret *et al.*, 2005). De la même façon, il a été mis en évidence que le domaine C-terminal de HMA4 constitué de 11 histidines

était essentiel à l'activité de translocation du Cd^{2+} (Verret *et al.*, 2005). HMA2, également une $\text{P}_{1\text{B}}$ -ATPase, est activée par le Zn^{2+} , ainsi que par le Cd^{2+} (Eren *et al.*, 2004). Ce transporteur est localisé au niveau de la membrane plasmique (Hussain *et al.*, 2004) et les lignées *hma2* présentent une augmentation de la sensibilité au Cd^{2+} (Hussain *et al.*, 2004) ainsi qu'une augmentation de l'accumulation du Cd^{2+} (Eren *et al.*, 2004). HMA2 semble donc avoir un rôle identique à HMA4 (Figure 3). Une analyse fonctionnelle des domaines de liaison aux métaux de HMA2 a été réalisée grâce à la production de lignées et les résultats ont montré que le domaine N-terminal de liaison aux métaux, contrairement au domaine C-terminal, était essentiel à la translocation du Cd^{2+} des racines vers les parties aériennes (Wong *et al.*, 2009).

Un autre transporteur impliqué dans l'efflux du Cd^{2+} a été caractérisé : Plant Cadmium Resistance 1 (PCR1). Cette protéine située au niveau de la membrane plasmique augmente la tolérance au Cd^{2+} en exportant celui-ci à l'extérieur de la cellule (Song *et al.*, 2004).

(4) Remobilisation du Cd^{2+}

La remobilisation du Cd^{2+} , phénomène favorisant sa toxicité, correspond à son transfert de la vacuole vers le cytosol. Les transporteurs NRAMP3 et NRAMP4 dont la fonction est le transfert des métaux de la vacuole vers le cytosol (Thomine *et al.*, 2000; Thomine *et al.*, 2003; Lanquar *et al.*, 2005) sont localisés au niveau de la membrane vacuolaire (Thomine *et al.*, 2003; Lanquar *et al.*, 2005). Ces deux transporteurs semblent impliqués dans la remobilisation du Cd^{2+} (Thomine *et al.*, 2000) (Figure 3). Dans le système levure, la surexpression de *NRAMP3* et *NRAMP4* augmente la sensibilité au Cd^{2+} ainsi que son accumulation (Thomine *et al.*, 2000). Il est intéressant de noter que les lignées possédant la double mutation *nramp3×nramp4* montrent également un phénotype de sensibilité au Cd^{2+} (Oomen *et al.*, 2009). Il semblerait donc que l'hypersensibilité induite par la surexpression de ces deux transporteurs soit due à une forte remobilisation du Cd^{2+} , tandis que l'hypersensibilité induite chez les lignées *nramp3×nramp4* viendrait d'un défaut dans l'homéostasie d'autres métaux essentiels mobilisés par ces deux transporteurs. Très récemment, il a été montré que les lignées *nramp3×nramp4* étaient fortement affectées au niveau de différentes fonctions photosynthétiques en présence de Cd^{2+} . L'hypersensibilité des lignées *nramp3×nramp4* à ce métal lourd a mis en évidence l'importance de la séquestration des métaux dans la vacuole afin de maintenir la photosynthèse en conditions de stress suite à une exposition au Cd^{2+} (Molins *et al.*, 2013).

c) Influence d'un stress induit par le Cd^{2+} sur la voie d'assimilation du soufre

La principale voie de détoxification en réponse à un stress induit par le Cd^{2+} est la production de PCs dans le cytosol et la séquestration des complexes PCs-Cd au niveau de la vacuole. La synthèse des PCs dépend directement de celle du GSH, et donc de la quantité de celui-ci dans le cytosol. La synthèse du GSH se fait à partir de trois acides aminés : la cystéine, le glutamate et la glycine (Figure 4). La cystéine étant un acide aminé soufré, sa synthèse dépend directement de la disponibilité du soufre (S). Ainsi, ce paramètre va également influencer la synthèse du GSH, des PCs et donc la capacité de la plante à détoxifier le Cd^{2+} .

Des analyses transcriptomiques ont permis de mettre en évidence les variations d'expression génique observées au niveau de l'absorption et de l'assimilation du soufre ainsi qu'au niveau du métabolisme du GSH lors d'un stress induit par le Cd^{2+} chez *Arabidopsis thaliana* (Figure 5) (Herbette *et al.*, 2006). En effet, un des mécanismes mis en place par la plante pour lutter contre la toxicité des métaux lourds tels que le Cd^{2+} est la chélation par les PCs ou le GSH qui sont des composés soufrés (Cobbett, 2000). Les résultats obtenus ont montré qu'une exposition des plantules au Cd^{2+} entraînait une augmentation de l'expression de plusieurs transporteurs de S (6 parmi les 14 identifiés : *SULTR1;1*, *SULTR2;1*, *SULTR3;4*, *SULTR4;1*, *SULTR3;5* et *MOT1*) et conduisait donc à une accumulation du S (Herbette *et al.*, 2006). La première étape de la voie d'assimilation du S correspond aux réactions enzymatiques permettant la transformation du sulfate en sulfide. Les analyses transcriptomiques ont montré que les enzymes impliquées dans cette étape, l'ATP sulfurylase et l'APS reductase, étaient induites en réponse à un stress induit par le Cd^{2+} . Ces résultats avaient été observés auparavant chez *Arabidopsis thaliana* (Harada *et al.*, 2002), *Brassica juncea* (Heiss *et al.*, 1999) et *Saccharomyces cerevisiae* (Vido *et al.*, 2001; Fauchon *et al.*, 2002). Il est intéressant de noter que les gènes impliqués dans la voie de biosynthèse des glucosinolates, métabolites secondaires contenant du S, sont réprimés lors d'une exposition de la plante au Cd^{2+} . Ceci suppose que pour supporter la demande en S nécessaire pour la synthèse des PCs, la synthèse des glucosinolates est limitée. En parallèle, la plante redirige le soufre intracellulaire vers la synthèse de cystéines destinées à la production de GSH. Des analyses protéomiques différentielles réalisées sur des cellules d'*Arabidopsis thaliana* exposées au Cd^{2+} ont montré une augmentation de l'expression des différentes enzymes impliquées dans la biosynthèse des trois acides aminés impliqués dans la biosynthèse du GSH : glutamate, cystéine et glycine (Sarry *et al.*, 2006). L'ensemble de ces analyses globales montre donc que le stress induit par la présence de Cd^{2+} modifie la voie d'assimilation du S en activant les premières enzymes de celle-ci et en activant également la synthèse du GSH, notamment destiné à la production de PCs.

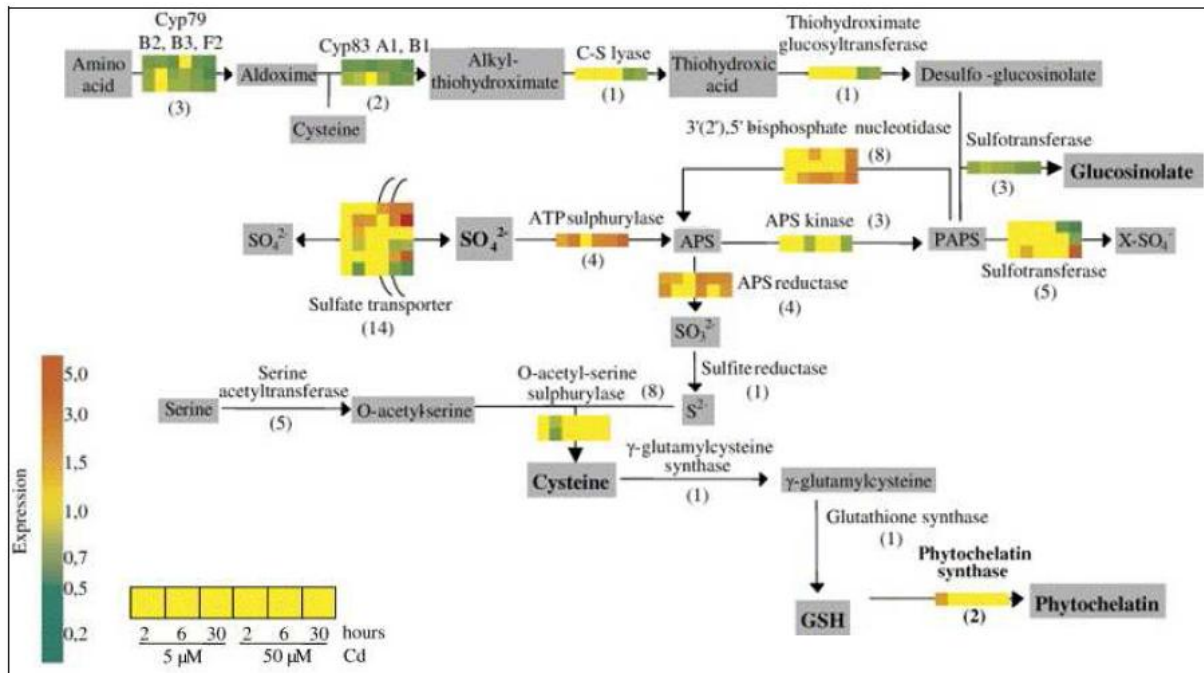


Figure 5 : Modification transcriptionnelle des gènes impliqués dans la voie d'assimilation du soufre en réponse à un stress induit par le Cd^{2+} . Les plantules d'*Arabidopsis thaliana* ont été exposées à 5 μM et 50 μM de Cd^{2+} pendant 2, 6 et 30 heures. Les ARNm ont été hybridés sur des puces « CATMA » (Complete Arabidopsis Transcriptome MicroArray) et les rapports d'expression (Contrôle/traitement Cd^{2+}) de 24576 gènes ont été mesurés. Les différents métabolites sont représentés dans des carrés gris, les flèches représentent les réactions enzymatiques, les enzymes sont notées au dessus, en dessous ou à côté des flèches, le chiffre entre parenthèses indique le nombre d'isoformes pour chacune des enzymes et les barres de couleurs montrent la tendance générale du rapport d'expression pour chacune des familles d'enzymes. D'après Herbette et al. (2006).

2. Le sélénium

a) *Le sélénium chez les mammifères*

(1) Un élément essentiel incorporé au niveau des protéines

Le sélénium (Se) est un micronutriment essentiel chez les mammifères ainsi que chez les bactéries et certaines algues (Stadtman, 1990, 1996; Fu *et al.*, 2002). Il entre dans la composition de plusieurs protéines appelées sélénoprotéines *via* son incorporation sous forme de sélénocystéines (SeCys). L'incorporation de SeCys peut se faire par l'utilisation du codon UGA, normalement utilisé en tant que codon STOP. La présence de facteurs de transcription spécifiques ainsi que d'un ARN messager en structure tige-boucle situé dans la région 3' non traduite vont permettre au codon UGA d'être reconnu en tant que codon codant pour une sélénocystéine (Low *et al.*, 1996). Il existe une deuxième voie de biosynthèse des SeCys au cours de laquelle une Ser se lie à l'ARN de transfert puis celle-ci est transformée en SeCys par une réaction d'incorporation du Se *via* le sélénophosphate (Berry *et al.*, 1997). Une des premières sélénoprotéines identifiée est la glutathion peroxydase (GPX), enzyme antioxydante dont le site actif contient une SeCys (Rotruck *et al.*, 1973). La GPX catalyse la réduction du peroxyde d'hydrogène en eau et protège ainsi la cellule des dommages oxydants. La plupart des sélénoprotéines ont une action antioxydante. Plusieurs d'entre elles ainsi que leur fonction biologique sont présentées dans le tableau 1 (Navarro-Alarcon *et al.*, 2008). D'autres protéines capables de lier le Se mais ne possédant pas de SeCys ont été identifiées. Ce cas particulier sera discuté plus tard au cours de cette synthèse bibliographique.

Tableau 1 : Fonctions biologiques de sélénoprotéines chez les mammifères. D'après Navarro-Alarcon *et al.*, (2008).

Sélénoprotéine	Fonction biologique
Glutathion peroxydase	Enzyme antioxydante protégeant du stress oxydant : détoxification d' H_2O_2 , de lipides et d'hydroperoxydes phospholipidiques.
Iodothyronine déiodinase	Synthèse et régulation métabolique des hormones thyroïdiennes
Thioredoxines réductases	Régulation redox de la cellule
Sélénoprotéine P	Antioxydant extra-cellulaire associé à l'endothélium vasculaire
Sélénoprotéine W	Nécessaire à la fonction musculaire mais sa fonction biologique n'est pas connue
Sélénophosphate synthétase	Biosynthèse de sélénophosphate
Sélénoprotéine de la capsule mitochondriale du spermatozoïde	Protection des spermatozoïdes contre le stress oxydant
Sélénoprotéine de l'épithélium de prostate	Protection des cellules épithéliales de la prostate contre le stress oxydant
Sélénoprotéine 18kDa	Sélénoprotéine essentielle conservée en carence en Se

(2) Carence et toxicité

La principale source de Se chez l'homme provient de son alimentation, et plus particulièrement des produits issus de l'agriculture. Dans certaines régions du nord-est de la Chine, le Se est peu biodisponible car la matière organique présente dans les sols réduit le séléniate (SeO_4^{2-}), facilement assimilé, en sélénite (SeO_3^{2-}), faiblement assimilé et qui complexe avec des oxydes de fer (Navarro-Alarcon *et al.*, 2008). Ceci a de graves conséquences sur la santé de la population et se manifeste par la maladie de Keshan (cardiomyopathie) (Hartikainen, 2005) et la maladie de Kashin-Beck (arthrose et rhumatismes) (Li *et al.*, 2007). La quantité de Se ingérée quotidiennement par les populations touchées est inférieure à 10 μg (55 μg sont nécessaires à un adulte en bonne santé). Le Se peut également être ingéré en trop fortes quantités (supérieur à 400 μg) et conduire à une sélénose (Goldhaber, 2003) qui se caractérise, entre autres, par une chute des cheveux et un fonctionnement anormal du système nerveux.

En Californie, le drainage de sol sélénifère afin d'alimenter la réserve naturelle de Kesterson a eu des conséquences écologiques dramatiques. Une forte mortalité ainsi qu'un grand nombre de déformations embryonnaires ont été observées chez les oiseaux et les poissons vivant dans la réserve (Ohlendorf, 1989). En effet, les effets toxiques du Se chez ces espèces apparaissent dès une ingestion de 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de masse corporelle et ceux-ci ont été retrouvés avec une concentration de Se pouvant aller jusqu'à 390 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de masse corporelle (Wu, 2004).

b) Voie d'assimilation, toxicité et bénéfices chez les plantes

(1) Toxicité

Chez les plantes, contrairement aux mammifères, le Se est un élément non essentiel (Fu *et al.*, 2002; Novoselov *et al.*, 2002; Sors *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2010). En effet, les protéines homologues aux sélénoprotéines humaines possèdent une cystéine à la place d'une SeCys (Novoselov *et al.*, 2002). Le Se, ayant une forte similarité avec le S peut être incorporé de façon non spécifique au niveau des cystéines et des méthionines (Brown *et al.*, 1981, 1982), ce qui entraîne un phénomène de toxicité. Les effets du Se chez la plante se traduisent par une inhibition de la croissance, une chute de la quantité de chlorophylle et un phénomène d'oxydation des protéines (Ohno *et al.*, 2012). Certaines plantes hyperaccumulatrices (Galeas *et al.*, 2007) se développant sur des sols sélénifères sont capables d'accumuler des quantités de sélénium dépassant 10000 mg par kg de matière sèche (MS) sans montrer de signe de toxicité (Neuhierl *et al.*, 1996; Neuhierl *et al.*, 1999; Persans *et al.*, 2000; Ellis *et al.*, 2004; LeDuc *et al.*, 2004). Ces plantes de la famille des brassicacées (*Stanleya pinnata*, *Brassica juncea*), fabacées (*Astragalus bisculatus*) et asteracées

(*Xylorrhizia glabriscula*) accumulent préférentiellement le Se par rapport au S, elles distinguent donc ces deux éléments (White *et al.*, 2007) et semblent posséder une voie d'assimilation spécifique du Se. D'autres plantes, qualifiées d'accumulatrices, assimilent de manière non spécifique le Se et le S et peuvent donc contenir jusqu'à 1000 mg/kg de MS. Les plantes non-accumulatrices (White *et al.*, 2004) ne peuvent accumuler plus de 25 mg/kg de MS. Un des mécanismes potentiel mis en place par la plante pour se défendre face aux protéines contenant des acides aminés sélénisés pourrait être la dégradation de ces protéines (Sabbagh *et al.*, 2012). En effet, des expériences réalisées chez la plante hyperaccumulatrice *Stanleya pinnata* ont montré que l'exposition au SeO_4^{2-} impliquait le protéasome 26S, connu pour son implication dans la dégradation de protéines mal repliées qui s'accumulent en réponse à différents stress abiotiques (Smalle *et al.*, 2004). De plus, des analyses de tolérance au SeO_4^{2-} réalisées chez *Arabidopsis thaliana* ont mis en évidence une diminution de la tolérance chez les lignées possédant une mutation au niveau du protéasome 26S (Sabbagh *et al.*, 2012).

La présence de SeO_4^{2-} dans les sols ou dans le milieu de culture fait chuter le taux de GSH dans la plante (Hugouvieux *et al.*, 2009), connu pour son rôle en tant qu'antioxydant. Des lignées transgéniques ne possédant pas l'adénylylphosphosulfate reductase 2 (APR2), une des premières enzymes impliquée dans la réduction du SO_4^{2-} et donc du SeO_4^{2-} , sont hypersensibles au SO_4^{2-} et au SeO_4^{2-} et accumulent moins de sélénoprotéines (Grant *et al.*, 2011). La toxicité du Se ne peut donc pas être due uniquement à son incorporation non spécifique au niveau des protéines. Cette toxicité est due à la chute de GSH qui entraîne la production de superoxyde. La production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO ou ROS) en présence de SeO_4^{2-} a été observée dans plusieurs cas (Van Hoewyk, 2013).

Le SeO_3^{2-} entraîne également la production de ROS (Van Hoewyk, 2013). Des expériences réalisées *in vitro* ont mis en évidence la production de superoxyde suite à la réaction entre le SeO_3^{2-} et le GSH (Spallholz, 1994). La réduction du SeO_3^{2-} en Se^{2-} peut se faire de manière non enzymatique *via* le GSH. Cette étape génère du sélénodiglutathion (GS-Se-SG) dont la toxicité est plus importante que celle du SeO_3^{2-} (Wallenberg *et al.*, 2010).

(2) Bénéfices

Le Se peut avoir un rôle d'antioxydant chez les plantes (Hartikainen, 2005; Pilon-Smits *et al.*, 2009). Des expériences réalisées sur *Lolium perenne* en présence d'un faible ajout de Se ont entraîné une augmentation de rendement de 13 % (Hartikainen *et al.*, 2000). Ce résultat est corrélé avec une augmentation des capacités antioxydantes telles qu'une diminution de la peroxydation des lipides, une augmentation de l'activité de la GPX et une augmentation de la concentration en tocophérols

(vitamine E), protecteurs d'espèces oxydantes tels que les radicaux formés lors de la peroxydation des lipides. Ceci a été confirmé par des expériences réalisées sur des plantes soumises à des stress abiotiques (Feng *et al.*, 2013) qui ont montré que la présence de Se peut stimuler la production d'antioxydants tels que la GPX et la superoxyde dismutase (SOD) qui vont protéger la plante des ROS produites suite à ces stress. La présence de Se peut également induire des mécanismes généraux de résistance au stress tels que la production d'éthylène et d'acide jasmonique (Tamaoki *et al.*, 2008). Ce processus va permettre à la plante de faire face aux stress induits par la présence d'herbivores ou de pathogènes responsables d'infections fongiques (Quinn *et al.*, 2007). Ceci est un phénomène indirect, mais il existe également un phénomène direct. En effet, lorsque le Se est accumulé par la plante, il rend celle-ci toxique pour l'ensemble des pathogènes. Le Se peut également être volatilisé, ce qui repousse les herbivores (Pilon-Smits *et al.*, 2009). En présence de Se, certaines espèces ont également montré un phénomène de résistance aux ultra-violets (Pilon-Smits *et al.*, 2009).

(3) Voie d'assimilation

La voie d'assimilation du Se est celle du S mais il existe certaines différences concernant les plantes hyperaccumulatrices. Les différentes étapes du métabolisme du Se chez les plantes sont présentées dans la figure 6.

(a) Entrée du sélénium dans la plante

Les formes chimiques du Se présentes dans le sol sont dépendantes de la nature de la rhizosphère (pH, présence de sulfate et de phosphate, oxygénation) mais la forme prédominante biodisponible est le SeO_4^{2-} (Terry *et al.*, 2000; Sors *et al.*, 2005; Missana *et al.*, 2009). Les différents transporteurs de sulfate (SO_4^{2-}) sont théoriquement capables de transporter le SeO_4^{2-} par similitude avec le transport du SO_4^{2-} (Sors *et al.*, 2005) (Figure 6). Cependant, des analyses de sensibilité au SeO_4^{2-} réalisées sur différentes lignées pour lesquelles chaque transporteur a été muté indépendamment par l'insertion de T-DNAs ont montré que seulement l'absence du transporteur de haute affinité SULTR1;2, présent au niveau de l'épiderme racinaire a un phénotype de tolérance au SeO_4^{2-} (El Kassis *et al.*, 2007). Des analyses complémentaires ont également montré que l'absence du transporteur SULTR1;2 entraînait une diminution de l'accumulation du SeO_4^{2-} (El Kassis *et al.*, 2007). L'importance de ce transporteur de haute affinité SULTR1;2 dans le transport du SeO_4^{2-} avait déjà été étudiée en 2002 lors de l'identification d'un mutant résistant au SeO_4^{2-} (Shibagaki *et al.*, 2002). Le transporteur de haute affinité SULTR1;1 joue également un rôle dans l'absorption du SeO_4^{2-} (Barberon *et al.*, 2008). Des expériences réalisées à partir des mutants *sultr1;1*, *sultr1;2* et *sultr1;1×sultr1;2* montrent que les phénotypes de tolérance au SeO_4^{2-} et de diminution d'accumulation du SeO_4^{2-} sont

plus marqués chez le double mutant que chez le simple mutant *sultr1;2*. Ces phénotypes ne sont pas observés chez le simple mutant *sultr1;1*, ceci peut s'expliquer par une faible expression du transporteur SULTR1;1 par rapport au transporteur SULTR1;2. Lorsque le Se est sous forme SeO_3^{2-} dans le sol, il semblerait que celui-ci rentre dans la plante *via* les transporteurs de phosphate (Figure 6) (Broyer *et al.*, 1972; Hopper *et al.*, 1999; Li *et al.*, 2008).

L'absorption du SeO_4^{2-} au niveau des racines est suivie par sa translocation rapide vers les feuilles tandis que dans le cas du SeO_3^{2-} , la translocation est plus faible. En effet, chez les plantes, différentes études ont été menées et ont montré que le ratio Se foliaire/Se racinaire était plus élevé dans le cas d'une exposition au SeO_4^{2-} qu'au SeO_3^{2-} (Arvy, 1993; Zayed *et al.*, 1998; Hugouvieux *et al.*, 2009).

(b) Du séléniate et du sélénite aux sélénocystéines

Le Se, par sa similarité chimique avec le S, emprunte la même voie d'assimilation. Les différentes étapes du métabolisme du Se lorsque celui-ci passe du SeO_4^{2-} ou du SeO_3^{2-} aux SeCys ont lieu majoritairement dans le chloroplaste (Pilon-Smits *et al.*, 1999). Le SeO_4^{2-} est réduit en SeO_3^{2-} *via* l'action de deux enzymes : l'ATP sulfurylase permet de coupler le SeO_4^{2-} à l'ATP pour former l'adénosine phosphoséléniate (APSe), puis l'adénosine phosphosulfate réductase (APS réductase) permet la réduction de l'APSe en SeO_3^{2-} (Figure 6). Les travaux de de Souza *et al.* (1998) ont montré que la réduction du SeO_4^{2-} en SeO_3^{2-} était une étape limitante du métabolisme du Se. En effet, les plantes mises en contact avec du SeO_4^{2-} accumulent une forte quantité de SeO_4^{2-} tandis que lorsqu'elles sont mises en contact avec du SeO_3^{2-} , le Se s'accumule rapidement sous forme organique.

L'étape suivante correspond à la réduction du SeO_3^{2-} en sélénide (Se^{2-}) (Figure 6). Dans la littérature, une voie enzymatique, uniquement plastidiale, faisant intervenir la sulfite réductase ainsi qu'une voie non enzymatique, chloroplastique ou cytosolique, impliquant le GSH (Anderson, 1993; Terry *et al.*, 2000) ont été décrites (Figure 6).

La dernière étape de formation des sélénocystéines correspond au couplage du Se^{2-} et de l'O-acétyl sérine (OAS) (Ng *et al.*, 1978) catalysée par la cystéine synthase (Cys Synthase). Les SeCys peuvent ensuite être incorporées non spécifiquement au niveau des protéines à la place des cystéines ou être métabolisées sous forme d'autres composés sélénés tels que les sélénométhionines (SeMet), le sélénium élémentaire (Se^0), les γ -glutamyl-selenocystéines (γ -Glu-SeCys), le diméthylsélénide (DMSe) et le diméthyldisélénide (DMDSe) (Figure 6).

(c) *Des sélénocystéines aux autres composés séléniés*

(i) *Formation des sélénométhionines*

La conversion de SeCys en SeMet, deuxième acide aminé sélénié, se fait en trois étapes (Figure 6). Les deux premières ont lieu dans le chloroplaste. Les SeCys sont couplées à l'O-phosphohomoserine (OPH) grâce à l'enzyme cystathionine-γ-synthase pour former la sélénocystathionine (Secystathionine) alors transformée en sélénohomocystéine (Sehomocystéine) via l'action de la cystathionine-β-lyase. La troisième étape est cytosolique et correspond à la transformation de la Sehomocystéine en SeMet par l'ajout d'un groupe CH₃ sous l'action enzymatique de la méthionine synthase. La SeMet peut ensuite être incorporée de manière non spécifique dans les protéines soit dans le chloroplaste ou dans le cytosol ou alors métabolisée sous forme de méthyl-sélénométhionine (Méthyl-SeMet).

(ii) *Formation de Se⁰*

Au niveau du chloroplaste, les SeCys peuvent passer sous la forme Se⁰ par l'action de la sélénocystéine lyase (SeCys lyase) et la libération d'une Ala (Figure 6). La SeCys lyase est également appelée CpNifS (cystéine désulfurase chloroplastique) car elle permet la désulfuration des cystéines dans le chloroplaste (Van Hoewyk *et al.*, 2007). Dans le cas du métabolisme du S, cette enzyme apparaît comme l'élément essentiel dans la biosynthèse des centres fer-soufre au niveau du chloroplaste.

(iii) *Formation de méthyl-sélénométhionine, méthyl-sélénocystéine et γ-glutamyl-cystéine synthétase puis volatilisation sous forme de dimethylselenide ou diméthyldiselenide*

Les SeCys et SeMet peuvent être incorporées directement dans les protéines, mais elles peuvent également être méthylées et éviter cette incorporation, conséquence majeure et toxique de la présence de Se chez la plante. Ainsi, des Méthyl-SeCys et des Méthyl-SeMet vont être méthylées grâce à la sélénocystéine méthyltransferase (SeCys méthyltransférase) et à la méthionine méthyltransferase (Met-méthyltransferase) respectivement (Figure 6). Les Méthyl-SeCys vont ensuite être métabolisées sous forme de diméthyldisélenide (DMDS_{Se}) tandis que les Méthyl-SeMet vont être métabolisées sous forme de diméthylsélénio-*propionate* (DMSeP) puis volatilisées sous forme de diméthylsélénide (DMSe) via l'action de la diméthylsulfoniopropionate lyase (DMSP lyase).

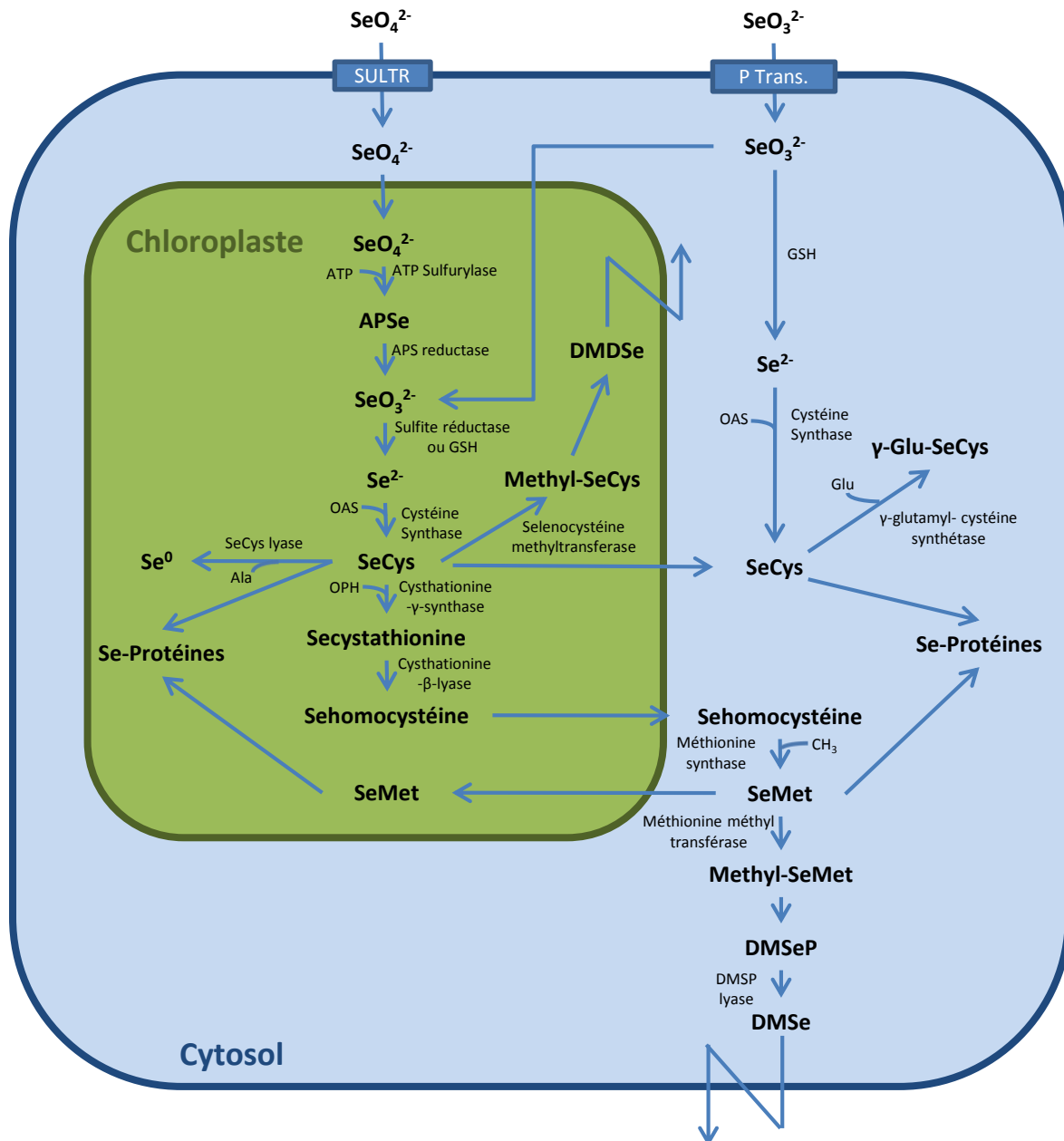


Figure 6 : Métabolisme du sélénium chez la plante. SeO_4^{2-} séléniate, **ATP** adénosine triphosphate, **ATP sulfurylase** adénosine triphosphate sulfurylase, **APSe** adénosine phosphoséléniate, **APS réductase** adénosine phosphosulfate réductase, **Cys Synthase** cystéine synthase, SeO_3^{2-} sélénite, **P Trans.** Transporteur de Phosphate, Se^{2-} séléénide, **OAS** O-acétylsérine, **SeCys** sélénocystéine, **Ala** alanine, **SeCys Lyase** sélénocystéine lyase, Se^0 sélénium élémentaire, **OPH** O-phosphohomosérine, **SeMet** sélénométhionine, **Méthyl-SeCys** méthylsélénocystéine, **DMDSe** diméthyldiséléénide, **Glu** glutamate, **γ-Glu-SeCys** γ-glutamylsélénocystéine, **Méthyl-SeMet** méthyl-sélénométhionine, **DMSeP** diméthylsélénopropionate, **DMSP Lyase** diméthylsulfoniopropionate lyase, **DMSe** diméthylséléénide. D'après Pilon-Smits et al. (2010).

Dans le cas des plantes hyperaccumulatrices, l'activité de la SeCys-méthyltransférase est particulièrement élevée. Ces organismes peuvent donc accumuler une forte quantité de Se sous la forme Méthyl-SeCys qui ne sera pas incorporée dans les protéines et donc moins toxique (Freeman *et al.*, 2006; Sors *et al.*, 2009). Les plantes hyperaccumulatrices peuvent également métaboliser le SeCys sous forme de γ -glutamyl-SeCys par le couplage d'un glutamate sous l'action enzymatique de la γ -glutamyl-cystéine synthétase (Freeman *et al.*, 2006).

(iv) *Approches biotechnologiques*

D'un point de vue biotechnologique, le Se étant un élément essentiel chez l'homme connu pour ses propriétés antioxydantes et anticancéreuses, l'utilisation de plantes riches en Se apparaît comme une nouvelle alternative dans le traitement anticancéreux. Ainsi, des études préliminaires sur des cellules cancéreuses du côlon ont été menées (Banuelos *et al.*, 2011). Celles-ci ont été traitées à partir d'extraits aqueux du cactus *Opuntia ficus-indica* naturellement enrichi en Se organique et une inhibition de la croissance des cellules cancéreuses a été observée. Il a également été montré que des rats se nourrissant de *Brassica oleracea* (plantes accumulatrices) traité au Se présentaient moins de risque de développer un cancer du côlon (Kato *et al.*, 2010). L'accumulation de Se chez certaines plantes pourrait également être utilisée en phytoremédiation. En effet, la surexpression de l'ATP sulfurylase (Pilon-Smits *et al.*, 1999) chez *Brassica Juncea* entraîne une forte accumulation de Se sous forme organique dans les parties aériennes de la plante. Le Se peut également, par des manipulations génétiques, être accumulé préférentiellement sous la forme méthyl-SeCys en surexprimant la SeCys-méthyltransférase (Ellis *et al.*, 2004; LeDuc *et al.*, 2004). Des plantes surexprimant les deux enzymes ATP sulfurylase et SeCys-méthyltransférase accumulent de fortes quantités de Se quasi-totalement sous la forme méthyl-SeCys (Leduc *et al.*, 2006), non incorporable dans les protéines. Des lignées transgéniques accumulant moins de Se ont également été générées. Par exemple, la surexpression de la cystathionine- γ -synthase chez *Brassica juncea* augmente la volatilisation de Se sous la forme de DMSe, ce qui provoque une diminution de la quantité de Se accumulé (Van Huysen *et al.*, 2003).

B. La protéine « Selenium Binding Protein 1 » (SBP1)

1. Les protéines contenant du Se

Différents types de protéines capables de lier le Se ont été décrites dans la littérature et sont regroupées en trois catégories (Behne *et al.*, 2001). La première catégorie correspond aux sélénoprotéines, protéines possédant une sélénocystéine essentielle à leur activité (Tableau 1 page 28). La seconde représente les sélénoprotéines non spécifiques. En effet, lors d'une exposition trop importante au Se sous la forme SeO_3^{2-} ou SeMet, une partie de celui-ci est métabolisé de la même façon que l'ensemble des composés sélénés mais l'excès de Se est incorporé non spécifiquement dans les protéines à la place du S (Behne *et al.*, 1991). La troisième catégorie correspond aux « Selenium Binding Proteins ». Celle-ci sont capables de lier le Se mais il n'est pas incorporé au niveau des sélénométhionines ou des sélénocystéines. Afin d'identifier l'ensemble des sélénoprotéines présentes chez les mammifères, un marquage radioactif au ^{75}Se avait été réalisé sur des cellules hépatiques de souris. Parmi les protéines identifiées figuraient deux protéines ne possédant pas de sélénocystéines : une protéine de 14 kDa (Bansal *et al.*, 1989) et une de 56 kDa (Bansal *et al.*, 1990). Ces deux protéines appelées « Selenium Binding Proteins » sont donc capables de lier le Se de façon post-traductionnelle.

2. Identification de SBP1

La Selenium Binding Protein de 56 kDa correspond à SBP1. Cette protéine est présente et conservée au sein d'un grand nombre d'organismes, aussi bien chez les procaryotes que chez les eucaryotes, ce qui lui suggère un rôle biologique fondamental. Le pourcentage d'identité des différentes SBPs est présenté dans le tableau 2. Celui-ci permet de mettre en évidence l'existence de SBP1 aussi bien chez un procaryote de la famille des archées (*Sulfolobus tokodaii*, St_SBP1) que chez des organismes plus évolués tels que les plantes supérieures (*Arabidopsis thaliana*, At_SBP1; *Zea Mays*, Zm_SBP1; *Oriza sativa*, Os_SBP1 ...), la souris (*Mus musculus*, Ms_SBP1) ou l'homme (*Homo sapiens*, Hs_SBP1). Ce tableau montre également que SBP1 est hautement conservée malgré l'éloignement des espèces. Le pourcentage d'identité est généralement supérieur à 50 % dans le cas de toutes les espèces étudiées excepté pour *Sulfolobus tokodaii*. L'ensemble des résultats qui seront présentés par la suite porteront plus particulièrement sur SBP1 chez *Arabidopsis thaliana*, c'est pourquoi les trois isoformes de SBPs chez *Arabidopsis* sont présentées dans le tableau 2 et que la plupart des SBPs pour lesquelles le pourcentage d'identité a été calculé proviennent d'organismes photosynthétiques. Ces résultats seront commentés ultérieurement au cours de cette synthèse bibliographique. Aucun homologue n'a été identifié chez la levure.

Tableau 2 : Pourcentage d'identité entre les SBPs putatives chez différents organismes. Le calcul du pourcentage d'identité a été effectué par la méthode MUSCLE (MULTiple Sequence Comparison by Log-Expectation). Les noms des organismes ainsi que les numéros d'accèsions sont les suivants : At_SBP1-3, *Arabidopsis thaliana* (TAIR : At4g14030, At4g14040 and At3g23800); Zm_SBP1, *Zea mays* (AY 104661); Os_SBP1, *Oryza sativa* (NP 914832); Pt_SBP1, *Populus trichocarpa* (DS 017279); Ms_SBP1, *Medicago sativa* (CAC 67501); Mt_SBP1, *Medicago truncatula* (CM 001219); Lj_SBP1, *Lotus japonicus* (CAC 67492); Gm_SBP1, *Glycine max* (CAC 67472); Mm_SBP1, *Mus musculus* (NP 033176); Hs_SBP1, *Homo sapiens* (NP 003935); Cr_SBP1, *Chlamydomonas reinhardtii* (XP 001703358); St_SBP1, *Sulfolobus tokodaii* (BAB 65016).

	At_SBP1	At_SBP2	At_SBP3	Zm_SBP1	Os_SBP1	Pt_SBP1	Ms_SBP1	Mt_SBP1	Lj_SBP1	Gm_SBP1	Mm_SBP1	Hs_SBP1	Cr_SBP1	St_SBP1
At_SBP1	100.00	89.32	78.75	76.54	76.32	79.09	78.28	79.10	78.23	74.21	60.93	61.57	57.14	41.76
At_SBP2	89.32	100.00	76.04	76.54	74.78	78.47	76.59	77.21	77.78	74.84	60.30	60.30	56.93	41.40
At_SBP3	78.75	76.04	100.00	75.22	74.34	76.88	74.38	75.21	76.62	74.63	59.66	61.36	54.58	43.44
Zm_SBP1	76.54	76.54	75.22	100.00	92.78	81.58	80.26	79.82	78.73	77.19	61.23	61.67	58.13	42.72
Os_SBP1	76.32	74.78	74.34	92.78	100.00	82.24	79.82	79.39	78.51	76.75	60.79	61.01	58.13	43.43
Pt_SBP1	79.09	78.47	76.88	81.58	82.24	100.00	82.40	81.99	82.99	79.66	62.63	63.27	58.21	43.21
Ms_SBP1	78.28	76.59	74.38	80.26	79.82	82.40	100.00	98.57	87.06	79.04	62.21	62.42	58.21	43.67
Mt_SBP1	79.10	77.21	75.21	79.82	79.39	81.99	98.57	100.00	86.45	79.25	62.63	62.42	58.00	43.67
Lj_SBP1	78.23	77.78	76.62	78.73	78.51	82.99	87.06	86.45	100.00	82.39	60.72	62.00	55.86	43.44
Gm_SBP1	74.21	74.84	74.63	77.19	76.75	79.66	79.04	79.25	82.39	100.00	59.66	60.30	54.37	45.02
Mm_SBP1	60.93	60.30	59.66	61.23	60.79	62.63	62.21	62.63	60.72	59.66	100.00	87.71	55.05	44.34
Hs_SBP1	61.57	60.30	61.36	61.67	61.01	63.27	62.42	62.42	62.00	60.30	87.71	100.00	55.27	42.99
Cr_SBP1	57.14	56.93	54.58	58.13	58.13	58.21	58.21	58.00	55.86	54.37	55.05	55.27	100.00	42.69
St_SBP1	41.76	41.40	43.44	42.72	43.43	43.21	43.67	43.67	43.44	45.02	44.34	42.99	42.69	100.00

3. SBP1 chez les mammifères

Actuellement, la fonction biologique de SBP1 n'est pas encore connue. Le gène codant pour SBP1 chez l'homme est situé sur le chromosome 1q21-22 (Chang *et al.*, 1997). C'est une protéine qui est localisée à la fois dans le cytosol et le noyau (Chen *et al.*, 2004; Stammer *et al.*, 2008; Xia *et al.*, 2011). Elle est présente dans un grand nombre de cellules et de tissus tels que ceux de l'appareil digestif, du cœur, du cerveau et du placenta (Bansal *et al.*, 1990; Chang *et al.*, 1997; Yang *et al.*, 1998). SBP1 peut donc être considérée comme une protéine ubiquitaire. Différentes publications mettent en évidence un rôle potentiel de SBP1 en tant que suppresseur de tumeur. Cette protéine semble également impliquée dans le transport intra-golgi et apparait comme un biomarqueur de la schizophrénie.

a) Un suppresseur de tumeurs chez l'homme

De nombreuses analyses ont été menées sur des cellules cancéreuses ou non et ont permis de mettre en évidence des variations d'expression de certaines protéines. Le Se est un élément essentiel ainsi qu'un potentiel agent anti-carcinogène, c'est pourquoi les protéines capables de lier cet élément et dont l'expression est modifiée dans les cellules cancéreuses sont tout particulièrement intéressantes à étudier.

L'ensemble des études réalisées sur SBP1 chez l'homme ont montré qu'elle était sous exprimée dans les cellules cancéreuses. Ceci a été mis en évidence dans le cas du cancer de la langue (Chen *et al.*, 2004), du côlon (Kim *et al.*, 2006; Pohl *et al.*, 2009), des ovaires (Stammer *et al.*, 2008), de l'œsophage (Silvers *et al.*, 2010), de l'estomac (Xia *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2013a), du foie (Raucci *et al.*, 2011) et du sein (Zhang *et al.*, 2013b). La sous expression de SBP1 a été étudiée par des analyses protéomiques différentielles sur des cellules cancéreuses ou saines ainsi que par des analyses immunohistochimiques. Cette sous expression de SBP1 est corrélée avec une diminution de la prolifération et la migration cellulaire dans le cas du cancer de l'estomac (Zhang *et al.*, 2013a).

Différents mécanismes potentiels pouvant entraîner la sous expression de SBP1 ont été étudiés. Plusieurs régions proches du gène codant pour SBP1 présentent une perte d'hétérozygotie (Luthra *et al.*, 2007; Maru *et al.*, 2009), c'est pourquoi ce phénomène a également été étudié pour SBP1 (Kim *et al.*, 2006) (Silvers *et al.*, 2010). On parle de perte d'hétérozygotie lorsqu'il y a une perte du matériel génétique de l'un des deux parents. Ce mécanisme peut alors entraîner des anomalies au niveau chromosomique telles que la suppression de gènes suppresseurs de tumeurs. Les analyses réalisées ont montré qu'il n'y avait pas de perte d'hétérozygotie du gène codant pour SBP1 dans le cas des cellules cancéreuses sous exprimant SBP1. Des modulations transcriptionnelles ou post-transcriptionnelles semblent donc être à l'origine de la régulation de l'expression de SBP1. Il semblerait que ce soit une hyperméthylation du promoteur qui soit responsable de cette sous expression. Ceci a été observé dans le cas de cellules cancéreuses du côlon (Pohl *et al.*, 2009) et de l'œsophage (Silvers *et al.*, 2010). Par un traitement déméthylant, l'expression de SBP1 est restaurée et l'apoptose des cellules cancéreuses est induite. Ces résultats mettent en évidence une régulation du niveau d'expression de SBP1 au niveau épigénétique et une potentielle fonction pro-apoptotique de cette protéine dans les cellules cancéreuses.

De récentes publications concernant le rôle de SBP1 en cas de cancer ont mis en évidence l'importance de cette protéine dans la réponse aux traitements anti-cancéreux. Dans le cas de traitements reposant sur la production des ROS, le facteur 1- α inductible de l'hypoxie (HIF1- α) est activé, ce qui entraîne une augmentation de l'expression de SBP1 (Scortegagna *et al.*, 2009), capable de se lier à la glutathion peroxydase 1 (GPX1) (Fang *et al.*, 2010). Lors de cette liaison, SBP1 inhibe l'activité de GPX1 qui consiste à protéger la cellule des ROS. Ainsi, lors de la liaison SBP1/GPX1, ces deux protéines forment des corps nucléaires pro-apoptotiques et la présence des ROS au niveau des cellules cancéreuses entraîne alors la mort de celles-ci (Huang *et al.*, 2012). Ce phénomène est illustré dans la figure 7. Le Se est également largement utilisé dans le traitement contre le cancer. Dans le cas du cancer du sein, il a été montré que l'inhibition de la prolifération cellulaire induite par un traitement à base de Se nécessitait SBP1. En effet, la sous expression de celle-ci entraîne une

résistance des cellules au traitement (Zhang *et al.*, 2013b). Ces résultats concernant l'importance de SBP1 lors de traitements utilisant le Se suggèrent que la liaison SBP1-Se pourrait avoir un rôle dans ce cas. La cisplastine, complexe à base de platine, est utilisé en tant qu'anti-cancéreux grâce à ses propriétés apoptotiques. Concernant le cancer du sein, il a été montré que l'apoptose induite par la cisplastine était augmentée lorsque le niveau d'expression de SBP1 était plus élevé (Zhang *et al.*, 2013a).

L'ensemble des résultats obtenus concernant l'importance de SBP1 lors des traitements anti cancéreux montrent que cette protéine apparaît comme un biomarqueur dans différents cancers et que son niveau d'expression dans les cellules cancéreuses est un indicateur de pronostique.

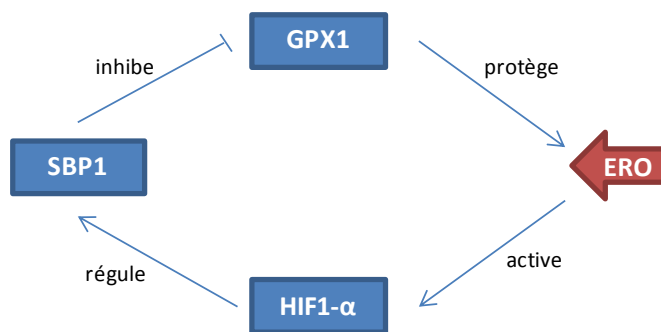


Figure 7 : Schéma hypothétique de mécanisme de réponse aux ERO impliquant HIF1-α, SBP1 et GPX1. Les traitements anticancéreux produisent des ERO qui activent HIF1-α. Ce facteur entraîne une augmentation de l'expression de SBP1 qui va alors inhiber, via une liaison, l'activité de GPX1. Cette dernière ne pourra donc pas protéger la cellule des ERO, ce qui va entraîner un phénomène d'apoptose de la cellule cancéreuse. Si le niveau de SBP1 est trop faible, GPX1 ne sera pas inhibée et les cellules continueront à proliférer malgré le traitement anti-cancéreux. D'après Huang *et al.* (2012).

b) La surexpression de SBP1 au niveau des cellules cérébrales apparaît comme potentiellement dégénérative

SBP1 a également été décrite en tant que biomarqueur de la schizophrénie (Glatt *et al.*, 2005). D'après des analyses de puce à ADN, l'induction du gène codant pour la protéine SBP1 a été mise en évidence chez des patients schizophrènes. Ces résultats ont été confirmés par des analyses de PCR quantitative en temps réel dans des cellules sanguines puis par des analyses immunohistochimiques sur des cellules issues de tissus *post mortem* de cortex préfrontal. L'induction de SBP1 a également été observée chez des patients atteints de troubles bipolaires (Kanazawa *et al.*, 2008). Le Se est connu pour jouer un rôle important au niveau du cerveau et une quantité trop

importante de celui-ci peut avoir des effets toxiques sur les cellules. La surexpression de SBP1, protéine capable de lier le Se, pourrait donc avoir des effets neurodégénératifs. Au niveau des traitements utilisés, il a été remarqué que le traitement à la clozapine faisait diminuer le taux de Se dans le plasma (Vaddadi *et al.*, 2003), ce qui laisse penser que celui-ci est toxique lors de ces pathologies. De plus, le polymorphisme observé chez SBP1 semble important dans le risque de schizophrénie (Kanazawa *et al.*, 2009).

c) *Autres fonctions potentielles de SBP1*

SBP1 pourrait également être impliquée dans le transport intra-golgi (Porat *et al.*, 2000). SBP1 a été localisée dans le cytosol au niveau de la membrane de l'appareil de Golgi de cellules de cerveau de bovin. L'utilisation d'anticorps dirigés contre SBP1 a montré que le transport intra-golgi était moins efficace et des analyses réalisées à partir de cytosol ne contenant pas SBP1 ont montré que ce même transport était moins actif. L'ensemble de ces résultats suggère que SBP1 pourrait être impliquée dans une étape tardive du transport de protéines au niveau de l'appareil de Golgi.

En 2010, il a été montré qu'il existait une liaison covalente séléno-dépendante entre SBP1 et « von Hippel-Lindau protein (pVHL)-interacting deubiquitinating enzyme 1 » (VDU1) (Jeong *et al.*, 2009). La liaison entre SBP1 et VDU1 a été réalisée en conditions non réductrices et réductrices et les résultats montrent que la liaison est moins importante en conditions réductrices. Ceci suggère que le Se est incorporé à SBP1 par une liaison covalente impliquant des groupements thiols et que celle-ci joue un rôle dans la régulation de la voie de signalisation des protéines impliquées dans l'ubiquitination/déubiquitination de façon séléno-dépendante.

d) *SBP2 : cible de l'acétaminophène dans le foie*

Chez les mammifères, la seconde isoforme des SBPs, SBP2, est impliquée dans la détoxification de l'acétaminophène (ou paracétamol) dans le foie *via* une liaison SBP2-acétaminophène (Lanfear *et al.*, 1993; Mattow *et al.*, 2006). Le processus majeur de détoxification de l'acétaminophène fait intervenir le GSH et lorsque le niveau de celui-ci est trop faible, l'acétaminophène se lie à SBP2 (Cohen *et al.*, 1997). Cette protéine pourrait donc jouer un rôle protecteur *via* la séquestration et/ou l'inactivation d'espèces réactives électrophiles. SBP2 est également impliquée dans l'inhibition de la prolifération cellulaire potentiellement carcinogène (Giometti *et al.*, 2000). En effet, le ciprofibrate, employé comme médicament anticholestérolémiant, provoque une prolifération du péroxysome qui entraîne directement une chute du niveau d'expression de SBP2 puis une prolifération cellulaire au niveau du foie. Il semble donc qu'il y ait une redondance de fonction entre SBP1 et SBP2 dans le contrôle de la prolifération cellulaire.

4. La protéine « Selenium Binding Protein 1 » (SBP1) chez les plantes

a) Une protéine conservée

SBP1 a été identifiée chez les organismes photosynthétiques en 2002 (Flemetakis *et al.*, 2002) chez *Glycine max*, *Medicago Sativa*, *Arabidopsis thaliana* et *Lotus Japonicus* par homologie avec SBP1 chez les mammifères. Dans le cas d'*Arabidopsis thaliana*, l'ADNc de deux homologues, *SBP1* et *SBP2*, a été isolé. Ils sont situés en tandem sur le chromosome 4 (Flemetakis *et al.*, 2002). En 2005, un troisième homologue, *SBP3*, a été identifié sur le chromosome 3 lors d'une analyse de BLAST réalisée sur le génome d'*Arabidopsis* à partir de la séquence de SBP1 chez les mammifères (Agalou *et al.*, 2005). SBP1 présente 89,32 % d'identité avec SBP2 tandis que SBP1 a 78,95 % d'acides aminés en commun avec SBP3. Pour ces trois homologues, l'identité de séquence avec la protéine SBP1 des mammifères (souris et homme) varie de 61,57 % à 59,66 %.

Actuellement, au sein du génome de plusieurs plantes, une séquence homologue à la séquence de SBP1 chez *Arabidopsis thaliana* a été identifiée. Chez les organismes photosynthétiques (excepté *Chlamydomonas reinhardtii*), le pourcentage d'identité (ou de conservation) entre les différentes SBPs est élevé. En effet, le tableau 2 (page 37) montre que le pourcentage d'identité entre SBP1 chez *Arabidopsis thaliana* et SBP1 chez les autres organismes photosynthétiques est compris entre 74,21 % et 79,10 %. Parmi l'ensemble des organismes photosynthétiques, ce pourcentage de conservation varie de 74,34 % à 98,57 %. Dans le cas de *Chlamydomonas reinhardtii*, le pourcentage d'identité est de 57,14 %.

b) Localisation cellulaire de SBP1 chez les plantes

Chez les plantes, SBP1 est une protéine ubiquitaire. Ceci a également été montré dans le cas de SBP1 chez les mammifères. L'immunolocalisation de SBP1 chez *Lotus japonicus* ainsi que l'utilisation de lignées rapportrices chez *Arabidopsis thaliana* pour lesquelles le promoteur de SBP1 a été cloné en amont du gène de la luciférase ont montré que SBP1 était exprimée dans différents tissus (Dutilleul *et al.*, 2008) (Figure 8). Cette protéine est particulièrement exprimée et présente dans l'apex racinaire, les jeunes feuilles et les siliques. D'autre part, ces analyses ont montré une forte activité du promoteur dans les jeunes tissus pendant les premières étapes du développement ainsi qu'au niveau des graines (Dutilleul *et al.*, 2008) (Figure 8). Ceci suggère que le niveau d'expression de SBP1 est régulé durant le développement de la plante.

Des analyses par PCR semi quantitative réalisées sur les 3 isoformes de *SBP* (*SBP1-3*) présentes chez *Arabidopsis thaliana* ont permis de déterminer le niveau d'expression de chacun de

ces gènes dans différents tissus (Dutilleul *et al.*, 2008). *SBP1* est l'isoforme la plus exprimée et le profil d'expression de *SBP2* est proche de celui de *SBP1* malgré une expression plus faible au niveau des racines des jeunes plantes et des fleurs des plantes adultes (Figure 9). *SBP3* est faiblement exprimée dans l'ensemble des tissus, son plus haut niveau d'expression est observé au niveau des racines des jeunes plantes. Chez le mutant *sbp1*, *SBP2* est surexprimée, ce qui suggère que la plante met en place des mécanismes de compensation pour maintenir un niveau certain d'expression de *SBP* (Dutilleul *et al.*, 2008).

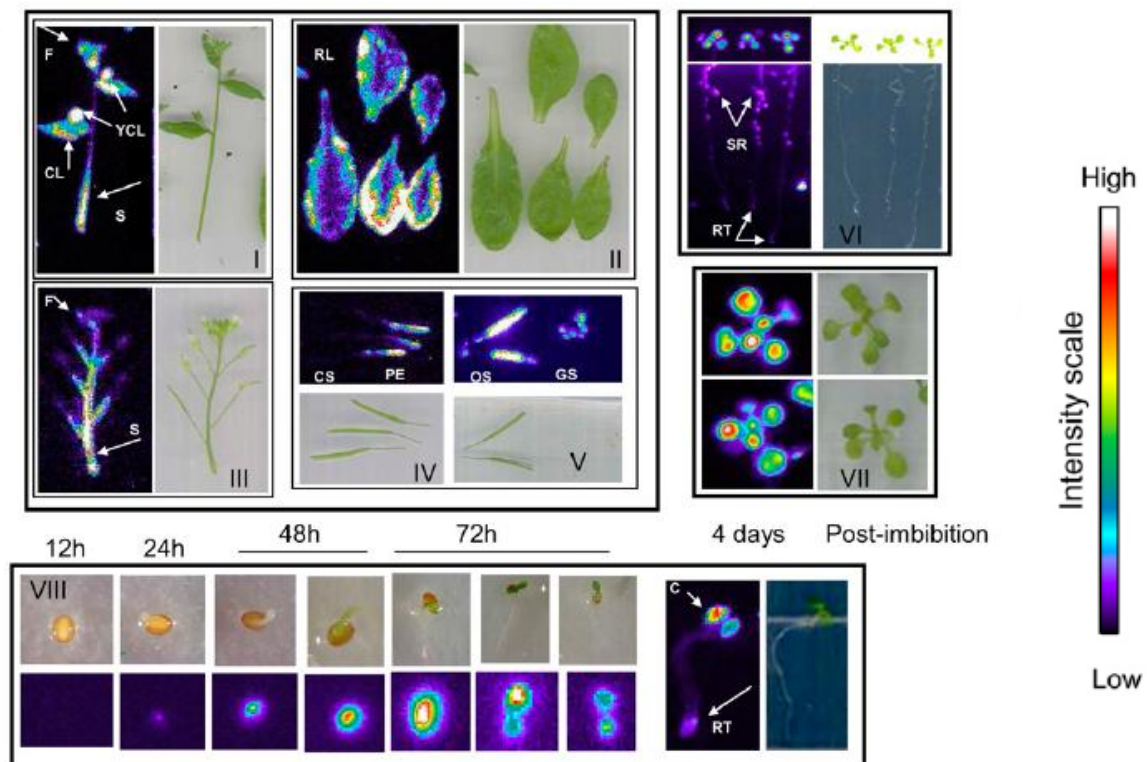


Figure 8 : Analyse de l'activité du promoteur de *SBP1* chez *Arabidopsis thaliana*. L'activité LUC des lignées transgéniques rapportrices *SBP1::LUC* a été enregistrée sur différents tissus à différents stades du développement. L'activité luciférase a été enregistrée sur des plantes adultes de 4 semaines (I-V) (enregistrement : 10 min), des plantules ayant poussé in vitro pendant 7 et 12 jours (respectivement VI et VII) (enregistrement : 5 min) et durant les premières étapes du développement (VIII) (enregistrement : 10 min). D'après Dutilleul *et al.* (2008).

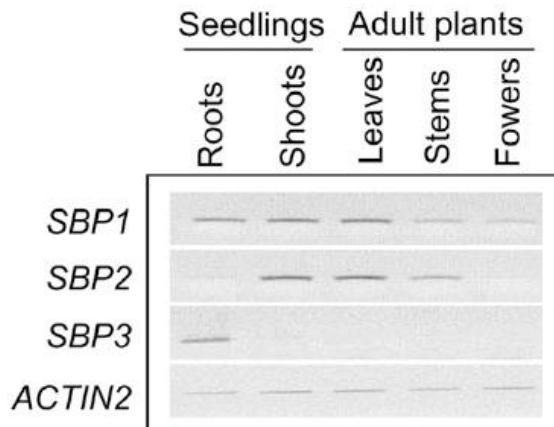


Figure 9 : Etude de l'expression des 3 isoformes de SBP chez *Arabidopsis thaliana* dans différents tissus par PCR semi-quantitative. Les expériences ont été réalisées à partir de cDNA amplifiés à partir d'extraits totaux d'ARN de plantules de 7 jours et de plantes adultes de 4 semaines. Vingt-six cycles PCR ont été réalisés pour SBP1 et SBP2, 33 pour SBP3 et 25 pour le contrôle ACTIN2. D'après Dutilleul et al. (2008).

c) **SBP1 est induite en réponse à différents stress**

Plusieurs travaux ont été menés chez différents organismes photosynthétiques (*Lotus Japonicus*, *Oriza sativa* et *Arabidopsis thaliana*) et ont permis de proposer différentes fonctions potentielles de la protéine SBP1.

Des études réalisées sur SBP1 chez *Lotus Japonicus* (Flemetakis et al., 2002) ont suggéré une implication de SBP1 dans la formation des nodules dans le cas des légumineuses. En effet, lors de la symbiose avec *Rhizobium*, SBP1 est fortement induite au niveau de ces nodules. Des analyses immunohistochimiques supposent que SBP1 est impliquée dans la formation et la fonction des nodules. Les auteurs suggèrent que SBP1 pourrait jouer un rôle dans la synthèse membranaire durant l'infection par *rhizobium* et dans la formation des membranes péri-bactéroïdes. Ces membranes, situées entre les bactéroïdes et le cytoplasme végétal, servent de zone d'échange entre *rhizobium* et *Lotus japonicus*.

Chez *Sorgum bicolor*, des analyses transcriptomiques ont montré que SBP1 était induite en réponse au pathogène *Schizapis graminum* (Zhu-Salzman et al., 2004). Chez *Oriza sativa*, il a été montré que le transcrit de SBP1 s'accumulait en réponse à l'agent pathogène *Magnaporthe grisea* (Sawada et al., 2002). Il semblerait que des molécules signales endogènes telles que l'acide jasmonique et l'acide salicylique, impliquées dans la réponse aux pathogènes, jouent un rôle dans l'induction de SBP1 en réponse à *Magnaporthe grisea* (Sawada et al., 2003). Des analyses de puces à

ADN réalisées chez *Arabidopsis* ont mis en évidence l'induction de SBP1 en réponse au méthyl jasmonate et à l'éthylène (Schenk *et al.*, 2000).

SBP1 semble impliquée dans la réponse au stress oxydant. Chez *Arabidopsis thaliana*, cette protéine est induite et s'accumule en réponse à l' H_2O_2 (Hugouvieux *et al.*, 2009). Ceci a également été observé lors d'analyses transcriptomiques (Desikan *et al.*, 2001). Chez *Lotus Japonicus*, SBP1 est exprimée dans le phloème des racines, les siliques et dans les embryons (Flemetakis *et al.*, 2002). Certaines protéines comme la thioredoxine RPP13-1 du riz localisée dans le phloème, apparaissent comme capables de régénérer des protéines inactivées par un stress oxydant ou pourraient même agir comme molécule de signal transloquée *via* le phloème (Ishiwatari *et al.*, 1998). Les travaux de Flemetakis *et al.* (2002) proposent donc un rôle de SBP1 dans le contrôle des réactions rédox similaire à celui de RPP13-1. Chez *Oriza sativa*, l'induction de SBP1 par l'acide abscissique et la paraquat (générateur du radical superoxyde $O_2^{\cdot-}$) suggère également que cette protéine a un rôle en réponse au stress oxydant (Sawada *et al.*, 2003).

La présence de composés, métalliques ou non, tels que le Cd^{2+} , le Cu^{2+} et le SeO_4^{2-} entraîne également une augmentation du niveau d'expression de SBP1. Ce sont des analyses protéomiques différentielles réalisées sur des cellules d'*Arabidopsis* traitées ou non au Cd^{2+} qui ont révélé une accumulation précoce de SBP1 (Sarry *et al.*, 2006) en réponse au Cd^{2+} . Il est intéressant de noter que lors d'un stress induit par le Cd^{2+} chez le mutant *sbp1*, le gène codant pour *SBP2* est induit plus précocement que dans le cas des lignées sauvages (Dutilleul *et al.*, 2008). Ceci suggère une redondance de fonction, préalablement observée en conditions normales de cultures, entre les deux isoformes SBP1 et SBP2 en présence de Cd^{2+} . L'utilisation de lignées rapportrices bioluminescentes a mis en évidence une augmentation de l'activité du promoteur de SBP1 en réponse au Cu^{2+} et au SeO_4^{2-} . L'utilisation de ces lignées bioluminescentes chez *Arabidopsis thaliana* a permis d'établir le profil d'expression de SBP1 en réponse aux stress suivants : Cd^{2+} , SeO_4^{2-} , SeO_3^{2-} (Sélénite), Cu, Zn et H_2O_2 . Celui-ci a été comparé au profil d'expression de trois autres gènes impliqués dans la réponse au stress engendré par le Cd^{2+} chez *Arabidopsis thaliana* (Herbette *et al.*, 2006; Sarry *et al.*, 2006). Ces trois gènes sont ceux codant pour la 5'-adenylylphosphosulfate réductase 2 (PRH43 ou APR2), enzyme clef impliquée dans la voie d'assimilation du S ; la γ -glutamyl-cystéine synthetase (GSH1), enzyme impliquée dans la première étape de la synthèse du GSH ; et la GSH-S-Transférase (GST1), enzyme impliquée dans la détoxification de xénobiotiques. Le gène codant pour la protéine PRH43 a le même profil d'expression que SBP1 (Figure 10). En effet, les gènes codant pour ces deux protéines sont induits en réponse à un stress provoqué par la présence de Cd^{2+} , de SeO_4^{2-} , de Cu^{2+} et d' H_2O_2 tandis que le stress provoqué par la présence de SeO_3^{2-} ou de Zn^{2+} n'a pas d'effet sur leur niveau d'induction. PRH43 est induite et s'accumule en réponse à la carence en S (Gutierrez-Marcos *et al.*,

1996; Vaublanc *et al.*, 2002). Ces résultats suggèrent que la demande en S de la cellule pourrait être à l'origine de l'induction de SBP1 en réponse aux différents stress inducteurs de son expression. Des analyses réalisées sur des lignées bioluminescentes ont montré que SBP1 était également induite en réponse à la carence en S (Figure 11). Parmi les différentes protéines impliquées dans la réponse à cette carence figure le transporteur de S SULTR1;1. Des études menées sur ce transporteur de haute affinité (Maruyama-Nakashita *et al.*, 2005) ont montré que le motif GAGAC, présent dans la séquence promotrice, était responsable de l'induction de *SULTR1;1* et apparaissait donc comme un élément *cis* de régulation en réponse à la carence en S. Ce motif GAGAC est présent en multicopies dans le promoteur de *SBP1* (positions -68, -217, -400 et -549). L'ensemble de ces données suggère que SBP1 pourrait être un acteur dans la réponse à la carence en S, et son induction pourrait potentiellement être régulée par l'élément *cis* GAGAC.

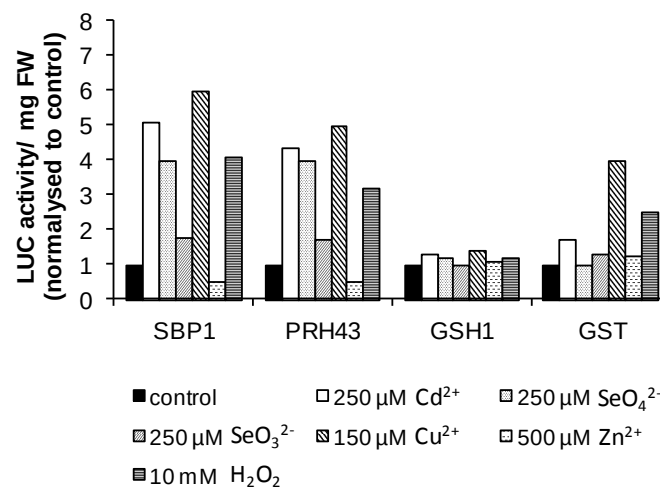


Figure 10 : Profil d'expression de SBP1, PRH43 (APR2), GSH1 et GST en réponse à différents stress. Des plantules de 7 jours ont été transférées sur différents milieux contenant respectivement 250 µM Cd²⁺, 250 µM SeO₄²⁻, 250 µM SeO₃²⁻, 150 µM Cu²⁺, 500 µM Zn²⁺ et 10 mM H₂O₂. Ces plantules ont également été transférées sur un milieu contrôle ne contenant pas de toxique. L'activité luciférase a été enregistrée 72 heures après transfert (enregistrement : 2 min). D'après Hugouvieux *et al.* (2009).

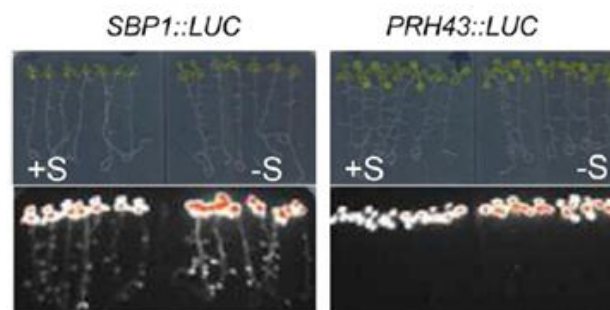


Figure 11 : Analyse de l'activité du promoteur de SBP1 et de PRH43 en réponse à la carence en soufre. Des plantules de 7 jours ayant poussé de manière verticale dans des boîtes de Pétri ont été transférées sur un milieu carencé ou non en soufre. L'activité luciférase a été enregistrée 72 heures après transfert. La coloration orange représente l'intensité de bioluminescence la plus forte. D'après Hugouvieux *et al.* (2009).

d) La surexpression de SBP1 augmente la tolérance à différents stress environnementaux

Dans le cas de l'infection due au pathogène *Magnaporthe grisea* chez *Oriza sativa*, la surexpression de SBP1 augmente la résistance à ce pathogène (Sawada *et al.*, 2004). Ce phénomène semble être dû à une importante production de momilactone A observée chez ces lignées. La momilactone A fait partie de la famille des phytoalexines, molécules connues pour inhiber la croissance des pathogènes.

Concernant le Se, il a été montré que la surexpression de SBP1 chez *Arabidopsis* augmentait la tolérance à ce toxique sous sa forme SeO_3^{2-} (Agalou *et al.*, 2005). Ces résultats ont été complétés par des analyses de sensibilité au SeO_3^{2-} de lignées sous exprimant SBP1. Ces lignées montrent une augmentation de la sensibilité, ce qui est corrélé avec les résultats obtenus grâce aux lignées surexprimant SBP1. L'équipe ayant réalisé cette étude a également caractérisé deux partenaires potentiels de SBP1 chez *Arabidopsis thaliana* : une glyceraldéhyde-3-phosphate déhydrogénase NADP dépendante (GAPDH) et une fructose bisphosphate aldolase (FBA). Ces deux enzymes ont été décrites dans la littérature en tant que protéines liant du Se chez des souches d'*E. coli* ne pouvant pas incorporer le SeO_3^{2-} en sélénoprotéines (Lacourciere *et al.*, 2002). Ces deux protéines sont des enzymes impliquées dans la glycolyse, la glycogénèse et le cycle de Calvin, elles ont donc un rôle central dans la production d'énergie. L'interaction de SBP1 avec GAPDH et FBA pourrait donc avoir de l'importance dans des voies métaboliques de production d'énergie. De plus, ces trois protéines étant décrites comme capables de lier le Se, elles pourraient également former un réseau impliqué dans la régulation du métabolisme du Se.

Chez *Arabidopsis thaliana*, SBP1 est induite en réponse au Cd^{2+} , au SeO_4^{2-} et à l' H_2O_2 . La surexpression de SBP1 dans un fond génétique *cad 2-1* restaure la tolérance au Cd^{2+} (Dutilleul *et al.*, 2008) (Figure 12 A). Les lignées *cad2-1*, caractérisées par une mutation du gène GSH1 codant pour la première enzyme de la voie de synthèse du GSH, présentent une déficience en GSH, et donc en phytochélatines (Howden *et al.*, 1995a; Howden *et al.*, 1995b). La figure 13 montre qu'il existe une liaison Cd^{2+} -SBP1 dont le ratio ligand/protéine est de 3 (Dutilleul *et al.*, 2008). En effet, cette figure montre que lorsque SBP1 est incubée en présence de Cd^{2+} puis que le mélange est déposé sur une colonne d'exclusion stérique permettant de séparer le complexe SBP1- Cd^{2+} du Cd^{2+} libre, il y a une co-élution de la protéine et du métal. Concernant le SeO_3^{2-} et l' H_2O_2 , la sensibilité des lignées sauvages et des lignées *cad2-1* a été comparée et les résultats ont montré que la déficience en GSH augmentait la sensibilité (Figure 12 B et C). Ces deux stress nécessitent donc le GSH dans leur mécanisme de tolérance. La surexpression de SBP1 chez les lignées *cad2-1* restaure également la

tolérance au SeO_4^{2-} et à l' H_2O_2 (Figure 12 B et C). L'ensemble de ces données suggère que SBP1 et le GSH pourraient avoir un rôle agoniste.

Le GSH est un métabolite connu pour son implication dans l'homéostasie rédox et dans les processus de détoxification (Noctor *et al.*, 2012). En condition de stress métallique, le GSH joue un rôle dans la détoxification métallique ainsi que dans l'homéostasie rédox (Jozefczak *et al.*, 2012). SBP1 est induite en réponse à l' H_2O_2 , elle pourrait donc également être impliquée dans la lutte contre le stress oxydant. Le Cd est capable de se lier à SBP1, ce qui laisse penser que SBP1 pourrait avoir une fonction complémentaire aux PCs.

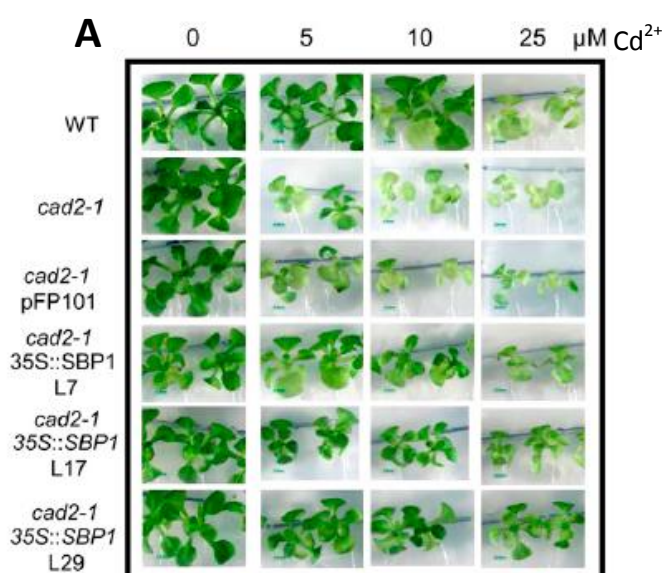
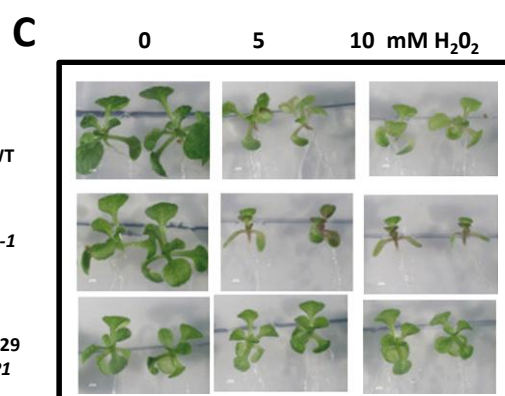
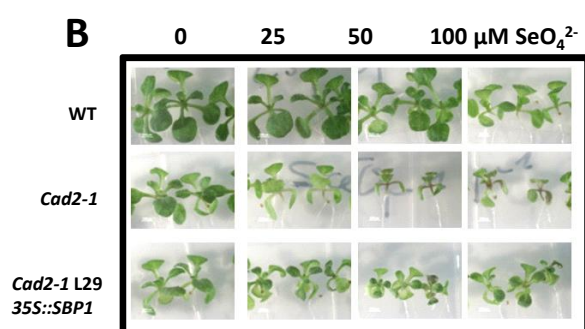


Figure 12 : Analyse de la surexpression de SBP1 en réponse au SeO_4^{2-} (A), à l' H_2O_2 (B) et au Cd^{2+} (C). Phénotype des plantes sauvages (WT), des plantes *cad2-1* hypersensibles au SeO_4^{2-} , à l' H_2O_2 et au Cd^{2+} et des plantes surexprimant SBP1 dans un fond génétique *cad2-1* (*cad2-1 35S::SBP1*). Des plantules de 4 jours ont été transférées sur un milieu contenant le toxique. Le phénotype a été observé 10 jours après contact avec le toxique. D'après Dutilleul *et al.* (2008) et Hugouvieux *et al.* (2009)



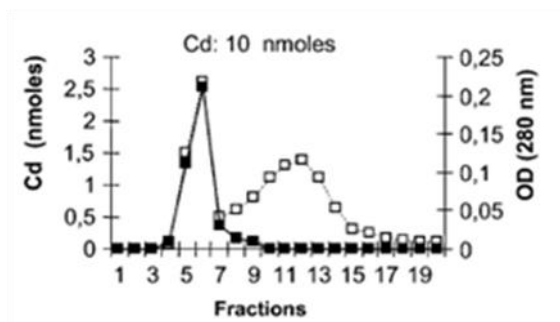


Figure 13 : Capacité de liaison in vitro du Cd²⁺ à SBP1. Le ratio de liaison Cd/SBP1 est de 3. Une nanomole de SBP1 a été incubée avec 10 nmoles de Cd²⁺ préparé à partir de Cd(NO₃)₂. Le complexe SBP1-Cd²⁺ a été séparé par passage sur colonne de chromatographie d'exclusion stérique G25. La présence de SBP1 dans les fractions éluées a été déterminée en suivant l'absorbance à 280 nm (carrés noirs) tandis que la concentration du Cd²⁺ a été suivie par ICP-MS (carrés blancs). D'après Dutilleul et al. (2008).

e) Existence de sites potentiels de liaison aux métaux

L'analyse de la séquence primaire de SBP1 montre l'existence de plusieurs sites de liaison aux métaux et l'alignement de séquence des SBPs de différents organismes montre la conservation de ces sites de liaison (Figure 14).

(1) Conservation des sites de liaison aux métaux

Les cystéines sont des acides aminés connus pour leur implication, souvent sous la forme C-X₂-C, dans les liaisons métalliques non covalentes. C'est souvent le cas des métallothionéines, protéines impliquées dans la détoxification de métaux, qui coordonnent tétraédralement le Cd²⁺ (Sutherland et al., 2011) via deux motifs C-X₂-C. Les phytochélatines, également connues pour leur rôle dans la détoxification, lient également le Cd²⁺ via le soufre des cystéines avec un ratio cystéine/Cd²⁺ allant de 1 à 4 (Pal et al., 2010). Le motif C-X₂-C a également été caractérisé en tant que motif de liaison au Cd²⁺ dans le cas de la protéine Cdl19 (Suzuki et al., 2002). Les cystéines ne sont pas impliquées uniquement dans la liaison au Cd²⁺, mais également dans la liaison à certains métaux essentiels tels que le Zn²⁺. Ceci a été observé dans le cas d'un des sites de liaison au Zn²⁺ de la protéine Fur d'*Helicobacter pylori* où le métal est tétra coordonné par quatre cystéines provenant de deux motifs C-X₂-C (Dian et al., 2011). L'alignement de séquences présenté sur la figure 14 permet d'étudier la conservation des cystéines chez les différents homologues de SBP1. Le motif C-X₂-C (At_SBP1 : C⁹⁷-X₂-C¹⁰⁰) est conservé chez tous les organismes présentés sur la figure 14 sauf chez *Sulfolobus tokodaii* qui a un motif C-X₄-C. Les cystéines 158 et 485 (At_SBP1 : C¹⁵⁸ et C⁴⁸⁵) sont conservées dans toutes les séquences. Un deuxième motif C-X₂-C est présent uniquement dans la séquence des SBPs des deux mammifères étudiés (Hs_SBP1 et Mm_SBP1 : C⁵-X₂-C⁸). Ce deuxième motif di-cystéine n'existe pas chez les SBPs des organismes photosynthétiques qui possèdent à cet endroit deux cystéines côte à côte (At_SBP1 : C²¹-C²²). Les deux motifs impliquant des cystéines

(At_SBP1 : C⁹⁷-X₂-C¹⁰⁰ et At_SBP1 : C²¹-C²²) pourraient avoir un rôle important dans la fonction de la protéine chez la plante.

L'histidine est également un acide aminé connu pour son implication, *via* son groupement imidazole, dans les liaisons métalliques non covalentes. Dans le cas de la protéine Fur (Ferric Uptake Regulator) chez *Helicobacter pylori*, il existe 3 sites de liaison au Zn²⁺ dont un site de géométrie tétraédrale qui implique deux histidines hautement conservées, un aspartate et un glutamate, ainsi qu'un site octaédral qui implique trois histidines conservées, un glutamate et une lysine (Dian *et al.*, 2011). Plusieurs autres métalloprotéines possèdent plusieurs histidines au niveau de leur site de liaison métallique. Les travaux de Rulisek *et al.* (1998) portant sur la géométrie de coordination des différents métaux ont mis ce phénomène en évidence. Plusieurs métalloprotéines listées au cours de ces travaux, telles que l'anhydrase carbonique et la protéase alcaline qui présentent 3 histidines au niveau de leur site de liaison au Zn²⁺, possèdent une majorité de groupement imidazole au niveau de leur site de liaison métallique (Rulisek *et al.*, 1998). Dans le cas des SBPs chez les différents organismes présentés figure 14, le motif H-X₂-H (At_SBP1 : H¹⁵⁴-X₂-H¹⁵⁷), connu en tant que motif participant aux liaisons métalliques (Tainer *et al.*, 1991, 1992), est hautement conservé et plusieurs histidines sont également présentes dans la plupart des organismes (At_SBP1 : H⁷⁸, H⁹⁰, H⁹¹, H²⁷⁵ et H⁴⁷⁵).

(2) Conservation de sites potentiels caractéristiques des « Cd binding proteins »

Une étude concernant les différents types de liaison Cd²⁺-protéine a été réalisée à partir de structures de protéines cristallisées en présence de Cd²⁺ (Jesu Jaya Sudan *et al.*, 2012). L'ensemble des séquences de ces protéines, issues de la Protein Data Bank (PDB), a été aligné. Il a été mis en évidence chez plusieurs de ces protéines des motifs potentiels parmi lesquels figure le motif Y-X-G-X-G présent deux fois chez At_SBP1 (Y²⁸-G-G-P-G³² et Y⁵⁰-T-G-T-G⁵⁴). Le premier motif n'est pas conservé chez les autres organismes, mais dans le cas du deuxième motif, Y⁵⁰ et G⁵⁴ sont conservés dans 90 % des organismes et G⁵² est conservé à 80 %.

Synthèse bibliographique

	1	10	20	30	40	50	60	70								
At_SBP1	MATETEVVAPVTVSNGGSKG	CKYGGPGYATPLAAMS.	GFSEKLIYVTAVVTGTG	IDKPDYLATVDVDPSSPSYSSVIHR												
At_SBP2	MATETVLAT..AVSNGKSKG	CKKSG.PGYATPLAAMA.	GREKLIYVTALVYSGTGR	DKPDYLATVDVDPSSPTFSSVIHR												
At_SBP3	..MEAAMNN.....	HDGDCKKSG.PGYATPLLAAMS.	GREKLIYVAAIYVTGTG	QAKPDYLATVDVDPSSSTYSSVIHR												
Zm_SBP1			GREKLIYVTCVYNGTG	INKPDYLATVDVDPSSPTYSQVIHR												
Oa_SBP1			GREKLIYVTCVYNGTG	INKPDYLGTVVDVDPNSPTYSQVIHR												
Pt_SBP1		MATGTEVVSNDNGHG	CKKKG.PGYATPLEAMS.	GRESLLYVTCVYSGTG	IEKPDYLATVDVDPNSPTYSKVIHR											
Ma_SBP1	..MGTVLQHAVVSEKVNQQG	CKKSG.PGYASPLEAMS.	GRETLIYVTAVYAGTG	IEKPDYLATVDVDPNSPTYSKVIHR												
Mt_SBP1	..MGTVLQHAVVSEKVNQHGG	CKKSG.PGYASPLEAMS.	GRETLIYVTAVYAGTG	IEKPDYLATVDVDPNSPTYSKVIHR												
Lj_SBP1	..MATVLDHGVVNEKKS.VNG	CKKSG.PGYASPIESMS.	GRESLIYVTAVYAGTG	IEKPDYLATVDVDPSSPTYSKVIHR												
Gm_SBP1		MNQNRN.MHDCPKTG	PGYSPPLAAMS.	GPKEITLLYVTAIYSGTGR	DKPDYLATVDVDPSSPTYSKVIHR											
Mm_SBP1		MATKCTKCG.PGYSTPLEAMK.	GRESBEIVLPCIVRN	TGEAPDYLATVDVDPKSPQYSCQVIHR												
Ha_SBP1		MATKCGNCG.PGYSTPLEAMK.	GRESBEIVLPCIVRN	TGEAPDYLATVDVDPKSPQYSCQVIHR												
Cr_SBP1		MAPEANS.CAKG.PGYATPLDAYKN	GAREKLIYVPCVVPDHS..	RPDYIATIDVDPEATYQCVIHR												
St_SBP1		MAIVPFKRDPFTFYSPKMAKK.	APPEDLAYVACLVTG	TGINRADEIAYVDVDPKSETYSKLVHK												
	80	90	100	110	120	130	140	150								
At_SBP1	LPMPFVGDELHHS	GWNS	CSS..	CHGDASV.DRRYLVLP	SLISGRIV	YVIDTKEN	NPRAPSLYKYVD	PKBIADKTGLAF	HTA							
At_SBP2	LKMPYIGDELHHT	GWNS	CSS..	CHGDASA.DRRYLVLP	GLISGRIV	YVIDTKD	PKAPSLYKVV	EPKEIAEKTGLAF	HTS							
At_SBP3	LPMPYLEDELHHS	GWNS	CSS..	CYGDSSC.DRRYLVLP	SLISGRIV	YVIDTKN	PREPSLHKFVD	PAEVLKGTGLAY	HQP							
Zm_SBP1	LPVTHIGDELHHS	GWNS	CSS..	CHGDPSA.KRRFLIL	PSLISGRIV	VVDATD	PPRAPSLHKVVE	SEEDIAENTGLGF	HTS							
Oa_SBP1	LPVTHVGDELHHS	GWNA	CSS..	CHGDPSA.SRRFLIL	PSLISGRIV	VVDTLKD	PPRAPALHKVVE	AEEDIAEKTGLGF	HTS							
Pt_SBP1	LPMPNVGDELHHT	GWNS	CSS..	CHGDPSA.ARRYLVLP	SLISGRIV	YVIDTKD	PPRAPSLHKVVE	EPADIVNKTGLAY	HTS							
Ma_SBP1	LPVPYVGDELHHT	GWNS	CSS..	CHGDPSA.QRRFLIV	PGIVSGRIV	YVIDTKN	PPRAPSLHKVVE	PEDISTKTGLAY	HTS							
Mt_SBP1	LPVPYVGDELHHT	GWNS	CSS..	CHGDPSA.QRRFLIV	PGIVSGRIV	YVIDTKN	PPRAPSLHKVVE	PEDISTKTGLAY	HTS							
Lj_SBP1	LPVPYVGDELHHT	GWNS	CSS..	CHGDPSA.ERRFLI	APSLVSGRIV	YVIDTKN	PPRAPSLHKVVD	PADIIQKTGLAY	HTS							
Gm_SBP1	LPVPYLGDELHHT	FWNS	CSS..	CYGDPSA.VRRYLVLP	SLVSGRIV	VVDTRSN	PPRAPSLHKVVE	PEDISTKTGLAY	HTS							
Mm_SBP1	LPMPYLKDELHHS	GWNT	CSS..	CFGDSTK.SRNKIL	LPGLISSRIV	VVDVGS	EPAPKLHKVIE	EASIEIAQACNVSS	HTS							
Ha_SBP1	LPMPNLKDELHHS	GWNT	CSS..	CFGDSTK.SRTKIL	LPGLISSRIV	VVDVGS	EPAPKLHKVIE	PEKDIHAKCELAF	HTS							
Cr_SBP1	LPMPHLGDELHHS	GWNS	CSS..	CHADPSAPK	RKILVLPAL	GSGRIV	GVDTLTD	PPRAPRIGVA	PEPIDIAAATGLSL	HTS						
St_SBP1	VELPYINDELHHT	FWNA	CSSAL	CPNGKPNIE	RRLFIV	PGVLS	SSRIVYID	TKPNPREPKIIVIE	PEBEVKKVSGYS	RLHTV						
	160	170	180	190	200	210	220	230								
At_SBP1	HCLATGEILV	SCIGDEEGNAK	GNGLLLDSD.	FNFKNRWEK	PGHSPFLGYDF	FWYQPRHKT	MISTSG	CAPKAPSKGF	NLQH							
At_SBP2	HCLASGDMVLV	SCIGDEEGNAK	GNGLLLDSD.	FNVKSRWEK	PGHGPLFGYDF	FWYQPRFKT	MISTSG	CAPKAPSKGF	NLQH							
At_SBP3	HCLASGDMVLV	SCIGDEEGNAK	GNGLLLDSD.	FNVKSRWEK	PGHGPLFGYDF	FWYQPRFKT	MISTSG	CAPKAPSKGF	NLQH							
Zm_SBP1	HCLASGDMVLV	SCIGDEEGNAK	GNGLLLDSD.	FNVKSRWEK	PGHGPLFGYDF	FWYQPRHKT	MISTSG	CAPKAPSKGF	NLQH							
Oa_SBP1	HCLASGDMVLV	SCIGDEEGNAK	GNGLLLDSD.	FNVKSRWEK	PGHGPLFGYDF	FWYQPRHKT	MISTSG	CAPKAPSKGF	NLQH							
Pt_SBP1	HCLASGDMVLV	SCIGDEEGNAK	GNGLLLDSD.	FNVKSRWEK	PGHSPFLGYDF	FWYQPRHKT	MISTSG	CAPKAPSKGF	NLQH							
Ma_SBP1	HCLASGDMVLV	SCIGDEEGNAK	GNGLLLDSD.	FNVKSRWEK	PGHSPFLGYDF	FWYQPRHKT	MISTSG	CAPKAPSKGF	NLQH							
Mt_SBP1	HCLASGDMVLV	SCIGDEEGNAK	GNGLLLDSD.	FNVKSRWEK	PGHSPFLGYDF	FWYQPRHKT	MISTSG	CAPKAPSKGF	NLQH							
Lj_SBP1	HCLASGDMVLV	SCIGDEEGNAK	GNGLLLDSD.	FNVKSRWEK	PGHSPFLGYDF	FWYQPRHKT	MISTSG	CAPKAPSKGF	NLQH							
Gm_SBP1	HCLASGDMVLV	SCIGDEEGNAK	GNGLLLDSD.	FNVKSRWEK	PGHSPFLGYDF	FWYQPRHKT	MISTSG	CAPKAPSKGF	NLQH							
Mm_SBP1	HCLASGDMVLV	SCIGDEEGNAK	GNGLLLDSD.	FNVKSRWEK	PGHSPFLGYDF	FWYQPRHKT	MISTSG	CAPKAPSKGF	NLQH							
Ha_SBP1	HCLASGDMVLV	SCIGDEEGNAK	GNGLLLDSD.	FNVKSRWEK	PGHSPFLGYDF	FWYQPRHKT	MISTSG	CAPKAPSKGF	NLQH							
Cr_SBP1	HCLASGDMVLV	SCIGDEEGNAK	GNGLLLDSD.	FNVKSRWEK	PGHSPFLGYDF	FWYQPRHKT	MISTSG	CAPKAPSKGF	NLQH							
St_SBP1	HCLASGDMVLV	SCIGDEEGNAK	GNGLLLDSD.	FNVKSRWEK	PGHSPFLGYDF	FWYQPRHKT	MISTSG	CAPKAPSKGF	NLQH							
	240	250	260	270	280	290	300									
At_SBP1	VADGLYGRHLHVYSWPGGEIK	QLIDL	LGPTGLLPLEIRFL	FLHDP	SKDTGFVVG		SALSSNMIR	FFKN...S	DETWSHEV							
At_SBP2	VADGLYGRHLHVYSWPGGEIK	QLIDL	LGNTGLLPLEIRFL	FLHDP	SKDTGFVVG		SALSSNMIR	FFKN...S	DDTWSHEV							
At_SBP3	VSDGLYGRHLHVYSWPGGELK	QILD	LGDTGLLPLEVRF	FLHDP	SKDTGFVVG		CALSSNLVR	FFKN...D	DETWSHEV							
Zm_SBP1	VQDGLYGRHLHVYSWPGGELK	QTLDL	LGDTGLLPLEVRF	FLHDP	SKDTGFVVG		CALSSNMVR	FFKT...A	DGGSWSHEV							
Oa_SBP1	VQDGLYGRHLHVYSWPGGELK	QTLDL	LGDTGLLPLEVRF	FLHDP	SKDTGFVVG		CALSSNMVR	FFKT...A	DGGSWSHEV							
Pt_SBP1	VADGLYGRHLHVYSWPGGELK	QTLDL	LGDTGLLPLEIRFL	FLHDP	SKDSGFVVG		CALSSNMVR	FFKT...P	DGGSWSHEV							
Ma_SBP1	VADGLYGRHLHVYSWPGGELK	QTLDL	LGDKGLLPLEIRFL	FLHDP	PAKDTGFVVG		SALSSNMIR	FFKT...Q	DGGSWNHEI							
Mt_SBP1	VADGLYGRHLHVYSWPGGELK	QTLDL	LGDKGLLPLEIRFL	FLHDP	PAKDTGFVVG		SALSSNMIR	FFKT...Q	DETWSHEI							
Lj_SBP1	VADGLYGRHLTCIQLAWGELR	QTLDL	LGNTGLLPLEIRFL	FLHDP	PAKDTGFVVG		SALSSNMIR	FFKT...Q	DGGSWSHEI							
Gm_SBP1	VSDGLYGRHLTCIQLAWGELR	QTLDL	LGESGVLPLEVRF	FLHDP	SKDTGFVVG		CALSSNMVR	FLRP...R	DESWSHEV							
Mm_SBP1	VEAGLYGSRIFVVDWQRHEII	QTLQMTD	GLIPL	PLEIRFL	FLHDP	PSATQGFVVG		CALSSNIQ	RFYKN...A	EGTWSVEK						
Ha_SBP1	VEAGLYGSHLYVVDWQRHEIV	QTLSLKD	GLIPL	PLEIRFL	FLHDP	DAAGGFVVG		CALSSSI	QRFYKN...E	GGTWSVEK						
Cr_SBP1	VAE.QYGQSLWVDWAGRKIK	QRIDL	LGDKGLLPLEVRF	FLHDP	TAPHGFVVG		AALSSSV	FHFTPSG	PGEDAPWAANL							
St_SBP1	LKD.RYGPWTKVGG	..WVLP	..ELP	CITDILL	SLNDKFLY	SVSNWLRG	DI	VOFDISD	PAHPK	VAGRVVGG	LVHKDS	PLKV				
	310	320	330	340	350	360	370	380								
At_SBP1	VISV	KPLKVEN..WILP	..EMPGLITD	FLISLDD	RFLYFVNWLHG	DIRQYNI	EDPKNPVL	TGQI	VWGG	LLQKGS	SPVKA					
At_SBP2	VISV	KPLKVEN..WILP	..EMPGLITD	FLISLDD	RFLYFVNWLHG	DIRQYNI	EDPKNPVL	TGQI	VWGG	LLQKGS	SPVKA					
At_SBP3	AISV	EPKLVEN..WILP	..EMPGLITD	FLISLDD	RFLYFVNWLHG	DIRQYNI	EDPKNPVL	TGQI	VWGG	LLQKGS	LVLA					
Zm_SBP1	AISV	KPLKVEN..WILP	..EMPGLITD	FLISLDD	RFLYFVNWLHG	DIRQYNI	EDPKNPVL	TGQI	VWGG	LLQKGS	SDVY					
Oa_SBP1	AISV	KPLKVEN..WILP	..EMPGLITD	FLISLDD	RFLYFVNWLHG	DIRQYNI	EDPKNPVL	TGQI	VWGG	LLQKGS	SEVY					
Pt_SBP1	AISV	KPLKVEN..WILP	..EMPGLITD	FLISLDD	RFLYFVNWLHG	DIRQYNI	EDPKNPVL	TGQI	VWGG	LLQKGS	SVVA					
Ma_SBP1	VISV	EPKLVEN..WFLP	..EMPGLITD	FLISLDD	RFLYFVNWLHG	DIRQYNI	EDVKNPKL	TGQV	WAGG	LLQKGS	SPVA					
Mt_SBP1	VISV	EPKLVEN..WFLP	..EMPGLITD	FLISLDD	RFLYFVNWLHG	DIRQYNI	EDVKNPKL	TGQV	WAGG	LLQKGS	SPVA					
Lj_SBP1	AIPV	KPLKVEN..WILP	..EMPGLITD	FLISLDD	RFLYFVNWLHG	DIRQYNI	EDLKNPVL	TGQI	VWGG	LLQKGS	SPVA					
Gm_SBP1	AISV	KPLKVEN..WILP	..EMPGLITD	FLISLDD	RFLYFVNWLHG	DIRQYNI	EDPKNPVL	TGQI	VWGG	LLQKGS	PIVA					
Mm_SBP1	VICV	PKKVKG..WMLP	..EMPGLITD	LLISLDD	RFLYFVNWLHG	DIRQYNI	EDSNPKPRL	LAGQ	IPLGG	SIVRGS	VQV					
Ha_SBP1	VICV	PKKVKG..WLLP	..EMPGLITD	LLISLDD	RFLYFVNWLHG	DIRQYNI	EDSNPKPRL	LAGQ	IPLGG	SIVRGS	VQV					
Cr_SBP1	VVB	QWTKVGG..WVLP	..ELP	CITDILL	SLNDKFLY	SVSNWLRG	DI	VOFDISD	PAHPK	VAGRVVGG	LVHKDS	PLKV				
St_SBP1	VIE	PAEP	LEGNLP	ELIK	PFKAVP	PLVTD	IDISLDD	KFLYLSL	WLG	GEVRCYD	ISNPF	KPVLT	TGKV	KLGG	FIFHR	

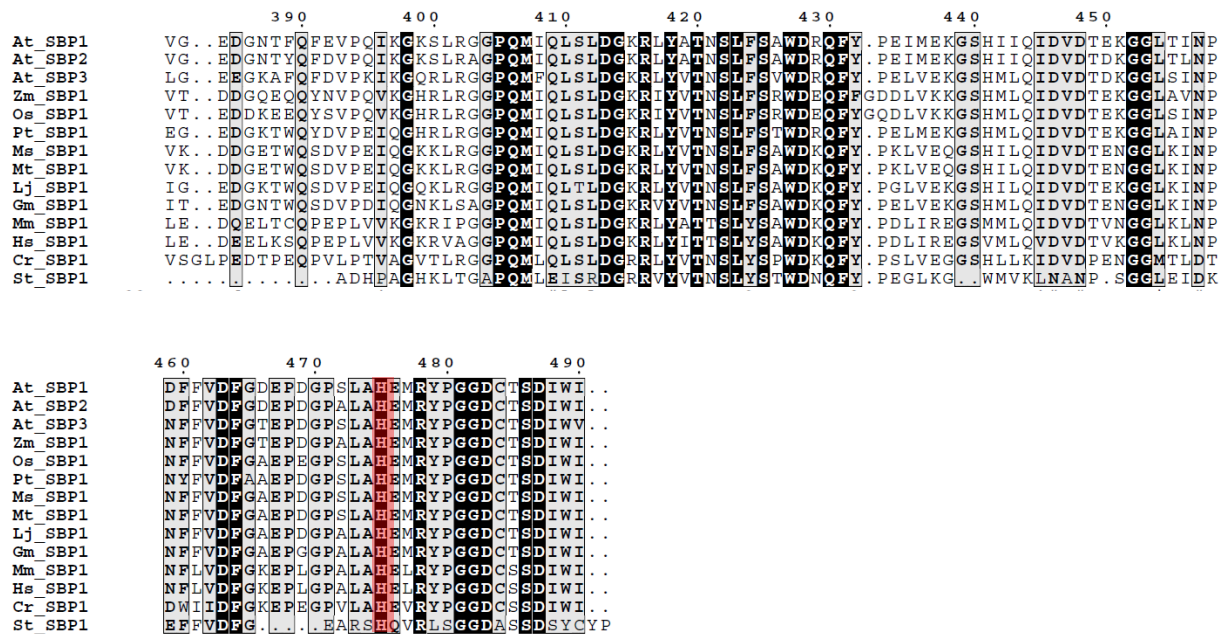


Figure 14 : Comparaison de la séquence de SBPs putatives chez différents organismes. L'alignement a été réalisé par la méthode ClustalW. Les acides aminés surlignés en noir sont conservés chez tous les organismes présentés dans cette figure, les acides aminés surlignés en gris sont présents dans au moins 90 % des organismes présentés sur cette figure. Les noms des organismes ainsi que les numéros d'accessions sont les suivants : At_SBP1-3, *Arabidopsis thaliana* (TAIR : At4g14030, At4g14040 and At3g23800); Zm_SBP1, *Zea mays* (AY 104661); Os_SBP1, *Oryza sativa* (NP 914832); Pt_SBP1, *Populus trichocarpa* (DS 017279); Ms_SBP1, *Medicago sativa* (CAC 67501); Mt_SBP1, *Medicago truncatula* (CM 001219); Lj_SBP1, *Lotus japonicus* (CAC 67492); Gm_SBP1, *Glycine max* (CAC 67472); Mm_SBP1, *Mus musculus* (NP 033176); Hs_SBP1, *Homo sapiens* (NP 003935); Cr_SBP1, *Chlamydomonas reinhardtii* (XP 001703358); St_SBP1, *Sulfolobus tokodaii* (BAB 65016). Les histidines hautement conservées sont surlignées en rouge et les deux motifs contenant des cystéines sont surlignés en vert.

C. Objectifs de la thèse

L'ensemble des données présentées mettent en évidence le rôle potentiel de SBP1 chez l'organisme *Arabidopsis thaliana* dans la réponse aux stress environnementaux tels que le stress induit par les métaux lourds et le stress oxydant. Une des thématiques principales de l'équipe étant la caractérisation des processus mis en place par la plante pour faire face au stress, particulièrement aux métaux lourds, une étude fonctionnelle de SBP1 a donc été initiée. Au cours de ma thèse, deux approches ont été menées en parallèle : une analyse *in vitro* de SBP1 ainsi qu'une analyse *in planta*.

1. Analyse *in vitro*

Un des rôles potentiels de SBP1 dans la détoxification pourrait provenir de la capacité du Cd^{2+} à se lier à SBP1. L'analyse de la structure primaire de SBP1 chez différents organismes a mis en évidence la conservation de sites de liaison à différents ligands. SBP1 pourrait donc également être impliquée dans la détoxification d'autres éléments métalliques ou non comme le Se (ligand capable de se lier à SBP1 chez l'homme et la souris). Ainsi, une caractérisation biochimique des capacités de liaison de différents ligands (métaux essentiels ou non essentiels ainsi que le Se) à SBP1 et l'identification des sites de liaison a été menée. Afin de compléter ces résultats, une analyse structurale de la protéine a également été initiée.

2. Analyse *in planta*

Cette étude a pour but d'élucider certaines caractéristiques de SBP1 dans le contexte cellulaire. Tout d'abord, la localisation subcellulaire de SBP1 a été déterminée par l'utilisation de lignées exprimant la protéine GFP en fusion traductionnelle avec SBP1. Afin d'étudier l'implication de SBP1 dans la sensibilité aux différents ligands identifiés lors de l'approche *in vitro* et leur accumulation, différentes lignées transgéniques sous exprimant la famille des SBPs et surexprimant SBP1 ont été utilisées. SBP1 est induite en réponse à la carence en S et possède dans son promoteur le motif GAGAC. Ce motif est connu pour réguler l'expression d'un gène, *SULTR1;1*, impliqué dans la réponse à la carence en S. L'importance de ce motif dans la régulation de l'expression de SBP1 a été étudiée en réponse à différents stress.

III. MATERIEL ET METHODES

A. Matériel végétal et conditions de culture

Les graines d'*Arabidopsis thaliana* écotype colombia dans un fond génétique *col-0* ou *cad2-1* (ces dernières ont été cordialement fournies par le professeur C. Cobbett, Université de Melbourne) sont stérilisées dans une solution de javel 12 % [v/v]. Les graines sont ensuite semées dans des boîtes de Pétri sur un milieu ½ Murashige and Skoog (MS) (M0404, Sigma) supplémenté de saccharose 0,5 % [p/v], de MES 0,05 % [p/v] pH 5,7 et d'agar 0,8 % [p/v] puis conservées 4 jours à 4°C. Les boîtes sont ensuite placées en chambre de culture dans un environnement contrôlé sous 16 h de jour (120 $\mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, 56 % d'humidité, 21 °C) et 8 h de nuit (56 % d'humidité, 20 °C). Afin d'étudier la réponse de la plante dans une condition particulière (Cd^{2+} , SeO_3^{2-} , SeO_4^{2-} et carence en soufre), les plantules germent pendant 7 jours sur un milieu standard (décrit précédemment) puis sont transférées sur un milieu contenant un des toxiques ou un milieu carencé en soufre. Pour le Cd^{2+} , le SeO_3^{2-} et le SeO_4^{2-} , les solutions ajoutées au milieu gélosé ont été préparées à partir de $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$, Na_2SeO_3 et Na_2SeO_4 . Pour la carence en soufre, le milieu est préparé manuellement. MgSO_4 , ZnSO_4 , MnSO_4 et FeSO_4 sont remplacés par MgCl_2 , ZnCl_2 , MnCl_2 et FeCl_2 . Lors de la sélection des lignées transgéniques, les graines ont été semées en sol. Les pots ont été placés dans un phytotron dans un environnement contrôlé sous 16h de jour (70 $\mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, 80 % d'humidité, 21 °C) et 8 h de nuit (56 % d'humidité 20 °C).

B. Techniques de biologie moléculaire

1. Transformation de bactéries

a) *Escherichia coli* thermocompétentes

Cinquante microlitres de bactéries *E. coli* thermocompétentes (souche Rosetta 2 (résistante au chloramphénicol) pour la production de protéines recombinantes et souche DH5 α pour l'amplification puis l'extraction de plasmide) sont placés dans la glace en présence de 100 ng de plasmide. Le mélange est incubé sur la glace pendant 20 min, subit un choc thermique de 45 s à 42°C puis est replacé à 4°C pendant 1 min. La suspension de bactéries est alors transférée dans 950 μL de milieu Luria-Bertani (LB, 20 g/L) et placée sous agitation orbitale (100 tr/min) à 37°C pendant 1 h. Pour la souche DH5 α , la solution de bactéries est divisée en 3 aliquots (50 μL , 200 μL et 500 μL) et étalée sur 3 boîtes de Pétri différentes contenant un mélange LB/Agar (20 g/L LB, 15 g/L agar) et l'antibiotique de sélection (carbenicilline 100 $\mu\text{g/L}$ ou kanamycine 50 $\mu\text{g/L}$). Dans le cas de la souche Rosetta 2, la solution de bactéries est centrifugée à 13000 g pendant 1 min à température ambiante. Le surnageant (800 μL) est retiré, les bactéries sont resuspendues dans les 200 μL restants puis étalées dans une boîte de Pétri contenant un mélange LB/Agar et l'antibiotique de sélection

(chloramphénicol 34 µg/L et carbenicilline 100 µg/L ou kanamycine 50 µg/L). Les boîtes sont placées 24 heures à 37°C.

b) *Agrobacterium tumefaciens* électrocompétentes

Cent microlitres d'*Agrobacterium tumefaciens* (souche C58 résistante à la carbenicilline et à la rifampicilline) électrocompétentes sont placés en présence de 100 ng de plasmide. Un choc thermique de 2,5 kV est appliqué à l'aide d'un électroporateur (« E. Coli pulser », Biorad) puis 1 mL de milieu LB est ajouté. La solution est incubée pendant 3 h à 28°C sous agitation orbitale (100 tr/min) puis divisée en 3 aliquots (10 µL, 50 µL et 100 µL). Chacun de ces aliquots est étalé sur une boîte de Pétri contenant du milieu LB/Agar et les antibiotiques de sélection (carbenicilline 100 µg/L, rifampicine 50 µg/L et kanamycine 50 µg/L ou spectinomycine 100 µg/L). Les boîtes sont incubées à 28°C pendant 48 h.

2. Construction de plasmide

Les différentes techniques de PCR utilisées sont détaillées dans les sous-chapitres portant sur la mutagenèse dirigée et le clonage dans les vecteurs pGEM-T et pGEM-Teasy.

a) *Mutagenèse dirigée*

La séquence des amorces a été générée grâce au logiciel Quick Change Primer Design d'Agilent Technologie (<http://www.genomics.agilent.com/primerDesign/>).

Le mélange pour la PCR, réalisé dans 50 µL, est le suivant : tampon de l'enzyme Phusion 1X (Phusion buffer HF, Thermo Scientific F-530), 50 ng de vecteur, 125 ng de l'amorce « forward » (FW), 125 ng de l'amorce « reverse » (RV), 1 µM de désoxyribonucléotides (dNTP), 3 à 10 % de diméthylsulfoxyde (DMSO) [v/v] et 1 unité de l'enzyme Phusion (Phusion High Fidelity DNA polymerase, Thermo Scientific F-530). Les amorces FW et RV, ayant des séquences complémentaires et inversées, contiennent la (les) mutation(s) à réaliser. La première étape de la PCR correspond à une dénaturation de 30 s à 98°C. Ensuite, 16 cycles sont réalisés lorsqu'il s'agit du changement d'un acide aminé et 18 cycles lorsqu'il s'agit du changement de plusieurs acides aminés. Chaque cycle se passe de la façon suivante : dénaturation 30 s à 98 °C, hybridation des amorces pendant 1 min à 55°C puis élongation à 72°C (20 kb/s). Une fois les cycles de PCR terminés, une étape finale d'élongation pendant 10 min à 72°C est réalisée. Les plasmides parents ont été synthétisés à partir de bactéries et sont donc méthylés, contrairement aux plasmides mutés qui ont été générés par PCR. Afin de digérer les plasmides parents, le produit de PCR est incubé pendant 1 h à 37°C en présence de 20 unités de

l'enzyme Dpn1 (Biolabs, New England) qui reconnaît uniquement les plasmides méthylés. Ensuite, 3 µL de produit PCR sont utilisés pour réaliser une transformation d'*E. coli* DH5α. Quatre colonies isolées sont chacune ensemencées dans 5 mL de milieu LB contenant l'antibiotique de sélection pendant 15 h à 37°C sous agitation orbitale (100 tr/min). Les plasmides de chacune des cultures sont extraits à l'aide du kit NucleoSpin Plasmid (Macherey-Nagel 740588.250). En général, 1 à 2 plasmides sont séquencés afin d'obtenir un plasmide ne contenant que la mutation attendue (séquençage réalisé par Eurofins, Les Ulis).

b) Clonage dans les vecteurs pGEM-T et pGEM-Teasy

Environ 100 ng de vecteur matrice sont ajoutés à 25 µL du milieu suivant : 0,2 µM d'amorce FW (amplification en 5'), 0,2 µM d'amorce RV (amplification en 3' sur le brin complémentaire), tampon de l'enzyme Phusion 1X (Phusion buffer HF, Thermo Scientific F-530), 1 µM de dNTP et 1 unité de l'enzyme Phusion (Phusion High Fidelity DNA polymerase, Thermo Scientific, F-530). La première étape de la réaction de PCR correspond à une dénaturation de 30 s à 98°C. Ensuite, 25 cycles sont réalisés. Chaque cycle se passe de la façon suivante : dénaturation 10 s à 98 °C, hybridation des amorces pendant 15 s à 58°C puis élongation à 72°C (1 min/kb). Une fois les cycles de PCR terminés, une étape finale d'élongation de 20 min à 72°C au cours de laquelle 1 µL de dATP 10 µM et 2,5 unités de Taq Polymérase (Clontech) sont rajoutés est réalisée. Ceci permet de rajouter des nucléotides dA aux amplicons. Après l'amplification par PCR du fragment d'intérêt, 1 µL de produit de PCR est ajouté au mélange suivant : tampon de ligation 1X, 25 ng de pGEM-T ou de pGEM-Teasy et 1,5 unité Weiss de T4DNA ligase (kit pGEM-T and pGEM-Teasy Vector Systems, Promega). La ligation se fait pendant 15 h à 16°C, puis 5 µL de milieu réactionnel sont utilisés pour la transformation de bactéries *E. coli* DH5α. Celles-ci sont ensuite étalées sur des boîtes de LB/Agar contenant les antibiotiques de sélection ainsi que 0,5 mg/mL d'isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) et 80 µg/mL de 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside (X-gal). Les vecteurs pGEM-T et pGEM-Teasy contiennent le gène codant pour la β-galactosidase, ce qui permet de discriminer les colonies contenant l'insert (colonies blanches, n'exprimant pas la β-galactosidase) de celles contenant le vecteur vide (colonies bleues, exprimant la β-galactosidase).

c) Ligation

La ligation est réalisée à partir d'un vecteur cible linéarisé et d'un insert. La réaction de ligation se fait dans un volume final de 15 µL dans les conditions suivantes : X ng d'insert, Y ng de vecteur, tampon de ligation 1X (Biolabs) et 400 unités de T4 DNA ligase (Biolabs). Les valeurs X et Y sont obtenues de la façon suivante :

$$ng_{insert} = \frac{ng_{vecteur} \times kb_{insert}}{kb_{vecteur}} \times 3$$

Le mélange de ligation est incubé pendant 15 h à 18 °C. Ensuite, 7,5 µL du produit de ligation sont utilisés pour réaliser une transformation dans *E. Coli* DH5α. Quatre colonies isolées sont ensemencées chacune dans 5 mL de milieu LB contenant l'antibiotique de sélection pendant 15 h à 37°C sous agitation orbitale (100 tr/min). Les plasmides de chacune des cultures sont extraits à l'aide du kit NucleoSpin Plasmid (Macherey-Nagel 740588.250). Une digestion puis une électrophorèse sur gel d'agarose 0,8 % sont réalisées afin de confirmer la ligation de l'insert dans le vecteur.

d) Vecteurs de bactéries pour la production de protéines recombinantes

Vecteur codant pour l'expression de GST-SBP1

La séquence codante pour SBP1 a été clonée (technique de clonage Gat-Way) dans le vecteur PGEX-3X(GW) (fourni par L. Gissot, INRA) qui permet l'expression de la protéine GST-SBP1 chez *E. coli*. La stratégie de clonage est détaillée dans Dutilleul *et al.* (2008).

Vecteurs codant pour l'expression de MAT-SBP1, GGS-SBP1 et GYA-SBP1

SBP1 (préalablement clonée dans le vecteur pFp101) est amplifiée à partir des amorces présentées dans le tableau 3. Les amorces FW permettent l'insertion d'un site NcoI avant le codon start et l'amorce RV permet l'insertion d'un site XhoI après le codon stop. La première étape correspond à l'amplification du fragment d'intérêt par PCR. Le produit de PCR est sous cloné dans le vecteur pGEM-T. Une colonie blanche est incubée 15 h dans 5 mL de milieu LB contenant l'antibiotique de sélection puis le plasmide est extrait à l'aide du kit NucleoSpin Plasmid (Macherey-Nagel 740588.250). Deux mutagenèses dirigées sont effectuées sur ces plasmides car la séquence de SBP1 contient deux sites NcoI. Les amorces sont présentées dans le Tableau 4. Après la mutation des deux sites NcoI, les plasmides pGEMT-MAT-SBP1, pGEMT-GGS-SBP1, pGEMT-GYA-SBP1 et pET-M11 (vecteur permettant l'expression de protéine avec une étiquette His₆ suivie d'un site de clivage à la TEV) sont digérés par les enzymes de restriction NcoI et XhoI. Les différents fragments sont séparés sur gel d'agarose 0,8 % puis purifiés à l'aide du kit NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel, 740609.250). Ensuite, une ligation permettant l'introduction de chacune des trois séquences (inserts) codant pour MAT-SBP1, GGS-SBP1 et GYA-SBP1 dans le vecteur pET-M11 (vecteur cible linéarisé) est réalisée.

Tableau 3 : Amorces utilisées pour l'amplification du cDNA de SBP1 préalablement clonée dans le vecteur pFp101. Les 3 amorces FW permettent l'insertion d'un site NcoI en amont de chacune des 3 formes de SBP1. L'amorce RV permet l'insertion d'un site XhoI après le codon stop.

Nom	Séquence
MAT-SBP1-NcoI-FW	5'-GCGCCATGGCAACGGAACGGAAGTTGTAGC-3'
GGs-SBP1-NcoI-FW	5'-GCGCCATGGGCGGAAGCAAAGGATGTTGC-3'
GYA-SBP1-NcoI-FW	5'-GCGCCATGGGTTACGCGACTCCTCTCGCCGCT-3'
SBP1-XhoI-RV	5'-GCGCTCGAGTCAAATCCAGATATCGGAAGTGC-3'

Tableau 4 : Amorces utilisées pour la mutation silencieuse des 2 sites NcoI présents dans la séquence codante de SBP1.

Nom	Séquence
SBP1-NcoI-1-FW	5'-TGGAACTCTTGTAGTTCTTGT CACGGT GATGCTTCTGTTGATAG-3'
SBP1-NcoI-1-RV	5'-CTATCAACAGAAGCATC ACCGTG ACAAGAACTACAAGAGTTCCA-3'
SBP1-NcoI-2-FW	5'-TTTATTTACTTTGTGAAGTGGCTT CACGG GAGACATTCGTCAGTACAAC-3'
SBP1-NcoI-2-RV	5'-GTTGTACTGACGAATGTCT CCGTGA AGCCAGTTCACAAAGTAAATAAA-3'

Vecteurs codant pour l'expression de GST-SBP1-H90.91A, GST-SBP1-H154A, GST-SBP1-H157A et GST-SBP1-H475A

Les mutagenèses dirigées des histidines 90, 91, 154, 157 et 475 en alanines sont réalisées sur la séquence codante de SBP1 préalablement clonée (technique de clonage GateWay) dans le vecteur PGEX-3X(GW) (Dutilleul *et al.*, 2008). Les différentes amorces utilisées sont référencées dans le tableau 5.

Tableau 5 : Amorces utilisées pour la mutagenèse dirigée de différentes histidines en alanines de la protéine GST-SBP1.

Nom	Séquence
SBP1-H90.91A-FW	5'-AATGCCTTTTGTGGTGATGAGCTT GCTG CTTCTGGTTGGAAGTCTTGTAGTTC-3'
SBP1-H90.91A-RV	5'-GAACTACAAGAGTTCCAACCAGA AGCAG CAAGCTCATCACCAACAAAAGGCATT-3'
SBP1-H154A-FW	5'-TGGATTGGCGTTTCCT GCC ACGGCTCATTGCCTC-3'
SBP1-H154A-RV	5'-GAGGCAATGAGCCGT GGC AGGAAACGCCAATCCA-3'
SBP1-H157A-FW	5'-TTCCTCACACGGCT GCTT GCCTCGCCACGG-3'
SBP1-H157A-RV	5'-CCGTGGCGAGGCA AGC AGCCGTGTGAGGAA-3'
SBP1-H475A-FW	5'-ACGGTCCTTCACTAGCC GCC GAGATGAGATATCCAG-3'
SBP1-H475A-RV	5'-CTGGATATCTCATCTC GGC GGCTAGTGAAGGACCGT-3'

e) Vecteurs de plantes pour la production de lignées transgéniques

Vecteurs codant pour l'expression du gène de la luciférase sous le contrôle du promoteur sauvage ou muté de SBP1

Les mutagénèses dirigées des motifs GAGAC présents dans le promoteur du gène *SBP1* (At4g14030) sont réalisées sur les séquences de chacun des promoteurs préalablement cloné dans le pGEMT-easy. Les différentes amorces utilisées sont référencées dans le tableau 6. Chacune des mutations est réalisée indépendamment puis différentes combinaisons possibles ont été réalisées. Le vecteur de plantes PLuc disponible au laboratoire permet de cloner la séquence sauvage ou mutée du promoteur de SBP1 *via* un site bidirectionnel BamHI, en amont du gène codant pour la luciférase. Ce vecteur a été généré à partir du vecteur pFp100 qui possède le gène codant pour le promoteur 2S3 (promoteur spécifique de la graine) en amont du gène codant pour la GFP, qui est le marqueur de sélection. La construction de ce plasmide est détaillée dans Hugouvieux *et al.* (2009). Le vecteur PLuc ainsi que les vecteur pGEMTe-PRO-SBP1, pGEMTe-PRO-SBP1-m1, pGEMTe-PRO-SBP1-m2, pGEMTe-PRO-SBP1-m3, pGEMTe-PRO-SBP1-m4, pGEMTe-PRO-SBP1-m1m2, pGEMTe-PRO-SBP1-m1m2m3 et pGEMTe-PRO-SBP1-m1m2m3m4 ont été digérés avec BamHI. Dans le cas du PLuc, la digestion est réalisée en présence de 10 unités de phosphatase alcaline (BioLabs) pour prévenir la recircularisation du vecteur. Les fragments sont séparés sur gel d'agarose 0,8 % puis purifiés à l'aide du kit NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel, 740609.250). Ensuite, une ligation permettant l'introduction de chacun des inserts dans le vecteur pLUC (linéarisé) est réalisée. Le clonage étant bidirectionnel, des PCR utilisant les amorces 5'-PRO (5'-GTTCCATCTTCCAGCGGATAGAATGG-3') située au début du promoteur et REV-SBP1 (5'-CGCGGATCCCTCTGATCTCTCTATGTGAAG-3') située en N terminal du cDNA de SBP1, permettant de vérifier le sens de l'insert dans le vecteur, ont été réalisées.

Tableau 6 : Amorces utilisées pour la mutagénèse dirigée des différents motifs GAGAC présents dans le promoteur de SBP1.

Nom	Séquence
PRO-SBP1-m1-FW	5'-GTCACGTGTGTTTGGCATATACTTTAAAGAGATTACGTGTAGCTTAACGACT-3'
PRO-SBP1-m1-RV	5'-AGTCGTAAAGCTACACGTAAATCTCTTTAAAGTATATCGCAAACACACAGTGAC-3'
PRO-SBP1-m2-FW	5'-CTGGTTAATTGTTTATGTTATCTATTTTGTGCATGTTTACGTATTTTAATTCGAAATACATCTCAATTAACCTT-3'
PRO-SBP1-m2-RV	5'-AAGTTAATTGAGATATTTGCAATTAAATACGTAACATGCACAAAATAGATAACATAAACAATTAACCGAG-3'
PRO-SBP1-m3-FW	5'-GATAATAAACTTTCTATTTATGTTGTGTGTAATATCTTTCGAGTAACCGAATTGAACCGATCA-3'
PRO-SBP1-m3-RV	5'-TGATCGGTTCAATTCGGTTACTCGAAAGATATTTACACACAACATAAATAGAAAGTTTATTATC-3'
PRO-SBP1-m4-FW	5'-CGAGATGAGATATCCCGCGTTTACTGCACTCCGATATCTGG-3'
PRO-SBP1-m4-RV	5'-CCAGATATCGGAAGTGCAGTAAACGCCGGGATATCTCATCTCG-3'

Vecteur codant pour la surexpression de SBP1

La séquence codante pour SBP1 a été clonée dans le vecteur pFp101 qui permet l'expression de SBP1 chez la plante sous le contrôle du promoteur 35S. La stratégie de clonage est détaillée dans Dutilleul *et al.* (2008).

Vecteur codant pour la sous-expression de la famille des SBPs

La séquence d'un micro ARN artificiel permettant de diminuer l'expression des trois isoformes de SBPs a été générée par le logiciel WMD (WebMicrona Designer) : amiRNA-FW : 5'-TTTGTACTGACGAATGTCCCC-3' et amiRNA-RV : 5'-GGGGACATTCGTCAGTACAAA-3'. Les séquences cibles sont les suivantes : SBP1 (1119-1139) : 5'-GGAGACATTCGTCAGTACAAC-3', SBP2 (1080-1100) : 5'-GGAGACATTCGTCAGTACAAC-3' et SBP3 (1119-1139) : 5'-GGAGATATTCGTCAGTACAAC-3'. Plusieurs PCR réalisées dans le plasmide pRS3000 (AddGene) ont permis de produire le micro ARN artificiel. Celui-ci est ensuite sous-cloné dans le vecteur pGEM-Teasy puis cloné dans le vecteur pFp101 après digestion par EcoRI puis traitement à l'enzyme de Klenow et insertion *via* un site XbaI pour donner le vecteur pFp101 -amiRNA.

Vecteur codant pour l'expression de SBP1 lors des expériences de complémentation

Afin de réaliser des expériences de complémentation, un vecteur, permettant l'expression de SBP1 avec un ARN messager non reconnu par le micro ARN artificiel, a été généré. La mutagenèse dirigée est une mutation silencieuse réalisée au niveau de la séquence de SBP1 reconnue par le micro ARN artificiel. Les amorces utilisées sont référencées dans le tableau 7. La mutation est réalisée dans le vecteur pGEM-Teasy-SBP1. Les vecteurs PNB96 (vecteur de plante cordialement fourni par J. Kwack, Maryland University) ainsi que le pGEM-Teasy-SBP1 sont digérés avec EcoRI. Dans le cas du PNB96, la digestion est réalisée en présence de 10 unités de phosphatase alcaline (BioLabs) pour prévenir la recircularisation du vecteur. Les fragments sont séparés sur gel d'agarose 0,8 % puis purifiés à l'aide du kit NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel, 740609.250). Ensuite, une ligation permettant l'introduction de l'insert SBP1-inhib-amiRNA dans le vecteur PNB96 (linéarisé) est réalisée. Le clonage étant bidirectionnel, des PCR utilisant les amorces 5'-35S (5'-GACCCCCACCCACGAGGAGCCA-3') située à la fin du promoteur et 6R-SBP1 (5'-CGCGGATCCCTCTGATCTCTCTATGTGAAG'3') située en N-terminal du cDNA de SBP1, permettant de vérifier le sens de l'insert dans le vecteur, sont réalisées.

Tableau 7 : Amorces utilisées pour la mutation silencieuse de la partie de la séquence codante de SBP1 reconnue par le micro ARN artificiel.

Nom	Séquence
SBP1-inhib-amiRNA-FW	5'-CGATTTATTTACTTTGTGAAGTGGCTCCATGGGGATATCCGCCAATATAATATAGAGGACCCTAAAAACCCTGTATTAACAGG-3'
SBP1-inhib-amiRNA-RV	5'-CCTGTTAATACAGGGTTTTAGGGTCTCTATATTATTTGGCGGATATCCCATGGAGCCAGTTCACAAAGTAAATAAATCG-3'

Vecteurs codant pour l'expression des protéines GFP-SBP1 et SBP1-GFP

La technique de clonage utilisée pour générer le vecteur codant pour la protéine GST-SBP1 est appelée « clonage Gateway ». Cette méthode permet une recombinaison entre les séquences nucléotidiques attR1 et attR2 contenues dans un clone entrée et les séquences attL1 et attL2 contenues dans un vecteur « destination ». Ceci permet un clonage directionnel de n'importe quel fragment nucléotidique, placé entre attR1 et attR2, dans n'importe quel vecteur « destination ». L'ADNc codant pour SBP1 (U15803, fourni par le National Arabidopsis Resource Center) présent dans un clone « entrée » a été cloné dans un vecteur « destination » (pK7WGF2 fourni par le Flandres Interuniversity Institute for Biotechnology) en aval du promoteur 35S et du gène codant pour le Green Fluorescent Protein (GFP). Concernant SBP1-GFP, le vecteur codant pour celle-ci a été obtenue par une technique de clonage classique qui utilise des enzymes de restriction. La séquence codante pour SBP1 a été amplifiée par PCR et les amorces utilisées ont permis l'ajout d'un site XhoI en amont du codon start en N terminal et un site SpeI en C terminal. L'amorce utilisée pour l'ajout du site SpeI supprime le codon stop et permet ainsi de réaliser une fusion traductionnelle en N terminal de SBP1. L'insert codant pour SBP1 est sous cloné dans le vecteur pGEM-Teasy, digéré par XhoI et SpeI, puis inséré dans le vecteur pGFP-Harper (cordialement fourni par J. Harper, The Scripps Research Institut). Ce vecteur permet, sous le contrôle du promoteur 35S, l'insertion de SBP1 qui ne possède pas de codon stop en amont du gène codant pour la GFP.

3. Visualisation et séparation de fragments d'ADN par électrophorèse

L'électrophorèse permet de vérifier la qualité d'une PCR et de séparer des fragments d'ADN après digestion par des enzymes de restriction. Le gel est préparé à partir d'agarose 0,8 % [p/v] dans un tampon TAE 0,5 X (Tris Acétate 20 mM pH 8,0 ; EDTA 0,5 mM) auquel est ajouté un intercalant d'ADN (sybresafe ou gelred dilué au 1/10000). Les échantillons sont dilués dans une solution de bleu de charge (glycérol 30 % [v/v], Bleu de Bromophénol 0,25 % [p/v], Xylène cyanol 0,25 % [p/v]). L'électrophorèse est réalisée dans une cuve « Run One » à 75 V dans du tampon TAE 0,5 X et le temps de migration varie entre 15 et 30 min en fonction de la taille des fragments attendus. Les fragments sont observés sous une source lumineuse à ultra-violet (UV) à l'aide de l'imageur « Molecular Imager Gel Doc XR » de Biorad.

C. Biochimie

1. Purification de protéines recombinantes

a) *Purification de protéines étiquetées GST et clivage de l'étiquette*

L'ADN codant pour la protéine SBP1 a été préalablement cloné dans le vecteur PGEX-3X(GW). Des bactéries *E. Coli* Rosetta 2 sont transformées avec le plasmide PGEX-3X(GW)-SBP1. Une colonie est placée dans 4 × 15 ml de milieu LB contenant les antibiotiques de sélection sous agitation orbitale (100 tr/min) à 37°C jusqu'à obtenir une densité optique à 600 nm (DO_{600}) de 1,2 (environ 5 h). Chaque culture bactérienne est transférée dans 800 mL de milieu LB contenant les antibiotiques de sélection puis placée sous agitation orbitale (100 tr/min) à 37°C jusqu'à obtenir une $DO_{600} = 0,8$ (environ 4 heures). Les cultures sont placées 1 h à 18°C puis la production de la protéine recombinante est induite par ajout de 400 μ M d'isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG). Les cultures bactériennes sont ensuite incubées pendant 15 h à 18°C. Celles-ci sont ensuite centrifugées à 4°C pendant 20 minutes à 5000 g puis rincées avec une solution HEPES 10 mM pH 7,4, NaCl 150 mM.

L'expression et la production de SBP1 chez *E. Coli* Rosetta 2 se fait dans un volume de culture bactérienne de 3,2 L (4 × 800 mL). Les bactéries sont lysées par sonication (6 × 1 min à l'aide du sonicateur « Branson Sonifier 250 ») dans 60 mL de tampon contenant HEPES 20 mM pH 7,4, NaCl 150 mM, 0,05 % Triton-X100 [v/v], 10 % glycérol [v/v] et DTT 1 mM. La fraction soluble est séparée de la fraction insoluble par centrifugation à 4°C pendant 40 min à 39000 g. La fraction soluble est incubée avec de la résine GSH-Sepharose (Glutathione Sepharose 4B, Ge Healthcare, 17-0851-01) pendant 2 h à température ambiante (un volume de résine pour 15 volumes de fraction soluble). La résine est rincée avec 20 volumes de tampon phosphate salin (PBS, Phosphate Buffer Saline) composé de NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na_2HPO_4 10 mM et KH_2PO_4 1,76 mM pH 7,0.

Elution de GST-SBP1

La protéine GST-SBP1 est éluée avec un tampon Tris 50 mM pH 8,0, GSH 10 mM (1,5 volume de tampon pour 1 volume de résine). La protéine est ensuite déposée sur une colonne PD10 (Ge Healthcare, 17-0851-01) et éluée avec un tampon HEPES 10 mM pH 7,4, NaCl 150 mM afin d'éliminer le GSH. Une colonne de chromatographie d'exclusion stérique S200 16/60 (HiLoad 16/60, Superdex 200, Amersham Biosciences) est utilisée grâce au système AKTA Purifier (Amersham Biosciences) avec les paramètres suivantes : 4°C, 1 mL/min, boucle de 2 mL et fractions de 1,5 mL. Cette étape permet de purifier à homogénéité GST-SBP1 (la concentration initiale ne doit pas dépasser 10 mg/mL) en éliminant les agrégats et les contaminants bactériens résiduels. La quantité moyenne de

protéine obtenue pour 3,2 L de culture est d'environ 10 mg dans le cas de la protéine sauvage. Dans le cas des protéines mutantes, cette quantité est inférieure.

Clivage de l'étiquette GST et purification de SBP1

La résine GSH-Sepharose (Glutathione Sepharose 4B, Ge Healthcare, 17-0851-01) est équilibrée dans un tampon Tris 50 mM pH 8,0, NaCl 150 mM et CaCl_2 1 mM (un volume de résine pour un volume de tampon) puis incubée pendant 15 h à 22°C sous agitation (roue) en présence de Facteur Xa (Sigma, SLBC 1547) sachant que 1,7 μg de Facteur Xa libère 1 mg de SBP1. Après centrifugation à 4°C pendant 5 min à 500 g, le surnageant est récupéré. La résine est incubée 5 min dans un volume de tampon Tris 50 mM, NaCl 150 mM et CaCl_2 1 mM puis centrifugée à 4°C pendant 5 min à 500 g, le surnageant est récupéré. La concentration en NaCl de la solution de protéine est ajustée à 0,5 M. La solution de protéine est déposée sur une colonne de benzamidine (p-amino benzamidine agarose, Sigma 031M5153) sachant que 100 μL de benzamidine fixe 1 μg de Facteur Xa puis concentrée dans un tampon HEPES 10 mM pH 7,4, NaCl 150 mM. Une colonne de chromatographie d'exclusion stérique S200 16/60 (HiLoad 16/60, Superdex 200, Amersham Biosciences) est utilisée grâce au système AKTA Purifier (Amersham Biosciences) avec les paramètres suivantes : 4°C, 1 mL/min, boucle de 2 mL et fractions de 1,5 mL. Cette étape permet de purifier à homogénéité SBP1 (la concentration initiale ne doit pas dépasser 10 mg/mL) en éliminant les agrégats et les contaminants bactériens résiduels. La quantité moyenne de protéine obtenue pour 3,2 L de culture est d'environ 5 mg de SBP1 purifiée.

b) Purification de protéines étiquetées poly-His et clivage de l'étiquette

L'ADN codant pour la protéine SBP1 a été préalablement cloné dans le vecteur pET-M11. Des bactéries *E. Coli* Rosetta 2 sont transformées avec le plasmide pET-M11-SBP1. Une colonie est placée dans 4 × 15 ml de milieu LB contenant les antibiotiques de sélection sous agitation orbitale (100 tr/min) à 37°C jusqu'à obtenir une $\text{DO}_{600} = 1,2$ (environ 5 h). Chaque culture bactérienne est transférée dans 800 ml de milieu LB contenant les antibiotiques de sélection puis placée sous agitation orbitale (100 tr/min) à 37°C jusqu'à obtenir une $\text{DO}_{600} = 0,8$ (environ 4 heures). Les cultures sont placées 1 h à 18°C puis la production de la protéine recombinante est induite par ajout de 400 μM d'IPTG. Les cultures bactériennes sont ensuite incubées pendant 15 h à 18°C. Celles-ci sont ensuite centrifugées à 4°C pendant 20 minutes à 5000 g puis rincées avec une solution HEPES pH 7,4, NaCl 150 mM.

L'expression et la production de His₆-SBP1 chez *E. Coli* se fait dans un volume de culture bactérienne de 3,2 L (4 × 800 mL). Les bactéries sont lysées par sonication (6 × 1 min à l'aide du

sonicateur Branson Sonifier 250) dans 60 mL de tampon HEPES 20 mM pH 7,4, NaCl 0,5 M, 0,05 % triton-X100 [v/v], 10 % glycérol [v/v], TCEP 1mM, imidazole 10 mM et une tablette de cocktail d'antiprotéases (Roche). La fraction soluble est séparée de la fraction insoluble par centrifugation à 4°C pendant 40 min à 39000 g. La fraction soluble est incubée avec de la résine Ni-Sepharose (Ge Healthcare, 17-52-68-02) pendant 2 h à 4°C (un volume de résine pour 20 volumes de fraction soluble). La résine est rincée avec 20 volumes de tampon HEPES 20 mM pH 7,4, NaCl 0,5 M, 0,05 % triton-X100 [v/v], 10 % glycérol [v/v], TCEP 1 mM et imidazole 50 mM. La protéine est éluée avec un tampon HEPES 20 mM pH 7,4, NaCl 0,5 M, 0,05 % triton-X100 [v/v], 5 % glycérol [v/v], TCEP 1mM, imidazole 250 mM puis dialysée pendant 15 h à 4°C dans un tampon HEPES 20 mM pH 7,4, NaCl 0,5 M, 0,05 % Triton-X100 [v/v], 5 % glycérol [v/v], EDTA 1 mM et TCEP 1 mM en présence de TEV (1,5 mg de TEV pour 20 mg de protéine). La protéine est concentrée dans un tampon HEPES 10 mM pH 7,4, NaCl 150 mM et TCEP 1 mM puis déposée sur colonne de chromatographie d'exclusion stérique S200 16/60 (HiLoad 16/60, Superdex 200, Amersham Biosciences) est utilisée grâce au système AKTA Purifier (Amersham Biosciences) avec les paramètres suivantes : 4°C, 1 mL/min, boucle de 2 mL et fractions de 1,5 mL. Cette étape permet de purifier à homogénéité SBP1 (la concentration initiale ne doit pas dépasser 10 mg/mL) en éliminant les agrégats et les contaminants bactériens résiduels. La quantité moyenne de protéine obtenue pour 3,2 L de culture est d'environ 80 mg.

2. Dosage des protéines

Les protéines purifiées ont été dosées au Nanodrop (NanoDrop 2000, ThermoScientific) qui mesure l'absorbance à 280 nm. Les paramètres suivants ont été utilisés pour le calcul des concentrations :

-GST-SBP1 : 82,85 kDa, $\epsilon = 132275 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$

-SBP1 clivée de l'étiquette GST : 56,54 kDa, $\epsilon = 92165 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$

-His₆-SBP1 : 54,86 kDa, $\epsilon = 92165 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$

-SBP1 clivée de l'étiquette His₆ : 54,04 kDa, $\epsilon = 90675 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$

Les mesures réalisées sur des extraits protéiques totaux ont été réalisées selon la méthode de Bradford (Bradford, 1976). Les mesures ont été réalisées à l'aide de la solution « Biorad Protein Assay » (500-0006, Biorad). Cette solution est diluée au 1/5 [v/v] dans de l'eau distillée. Dans 1 mL de celle-ci, 5 à 15 µL d'extrait protéique total sont ajoutés, l'ensemble est placé 30 min à l'obscurité puis l'absorbance à 595 nm est mesurée. Une courbe étalon est réalisée avec de l'albumine de sérum bovin (BSA).

3. Séparation des échantillons protéiques par électrophorèse

Les échantillons sont solubilisés par chauffage à 90°C pendant 2 min dans un milieu réducteur et dénaturant (Tris 80 mM pH 6,8, 10 % glycérol [v/v], 2 % SDS [v/v], 2,5 % β -mercaptoéthanol [v/v] et 0,004 % bleu de bromophénol [p/v]) puis centrifugés à 13000 g pendant 1 min. Les gels d'électrophorèse sont constitués d'une partie appelée gel de concentration constituée de 3 % d'acrylamide-bisacrylamide, Tris 125 mM pH 6,8, 0,1 % de persulfate d'ammonium (PSA) [v/v] et 0,1 % de tétraméthyléthylènediamine (TEMED) [v/v]. La seconde partie du gel appelée gel de séparation est constituée de 12 % d'acrylamide-bisacrylamide, Tris 375 mM pH 8,8, 0,1 % SDS [v/v], 0,1 % PSA [v/v] et 0,05 % TEMED [v/v]. Le tampon d'électrophorèse est constitué de Tris 50 mM pH 8,3, Glycine 0,2 M et 0,1 % SDS [v/v]. La migration est réalisée pendant 1 h 30 à 120 V. Les gels sont ensuite colorés dans une solution de bleu de coomassie (éthanol 50 % [v/v], acide acétique 10 % [v/v], bleu de coomassie R250 0,005 % [p/v]) pendant 1 h puis décolorés par des bains successifs dans une solution 50 % éthanol [v/v] et 7 % acide acétique [v/v].

4. Immunodétection de protéines par Western Blot

Après séparation des protéines par électrophorèse sur gel de polyacrylamide, celles-ci sont transférées sur une membrane de nitrocellulose pendant 2 h à 80 V dans un tampon contenant 80 % de TBS (50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7,6) [v/v] et 20 % d'éthanol [v/v]. Ce transfert est réalisé dans le module « Mini Protean III electro module » de Biorad. Après transfert, la membrane est rincée 3 × 5 min dans 10 mL de tampon TBS-T contenant du tampon TBS et 0,05 % triton-X100 [v/v]. Celle-ci est ensuite saturée par incubation dans du lait écrémé 5 % [p/v] (lait initialement en poudre dilué dans du tampon TBS-T) pendant 1 h à température ambiante. L'anticorps primaire (dilution 1/5000 [v/v]), dirigé contre la protéine d'intérêt (SBP1 ou la GFP), est ensuite ajouté et incubé pendant 3 h à température ambiante ou 15 h à 4°C. La membrane est à nouveau rincée 3 × 5 min dans 10 ml de tampon TBS-T. Elle est ensuite incubée dans du TBS-T en présence de l'anticorps secondaire (dilution 1/25000 [v/v]), capable de reconnaître l'anticorps primaire, pendant 1 h à température ambiante. Après de nouveaux rinçages (3 × 5 min dans 10 ml de tampon TBS-T), l'immunorévélation est réalisée grâce au kit Pierce ECL Western Blotting Substrate (Thermo Scientific).

5. Caractérisation biochimique et interactions protéines-ligands

a) *Analyse de la stabilité de la protéine via le « Thermal Shift Assay » (TSA)*

(1) Principe

Cette technique appelée plus communément le TSA (Thermal Shift Assay) repose sur le changement de la température de dénaturation d'une protéine en présence de ligand et permet donc de déterminer la capacité d'un ligand à stabiliser une protéine donnée. Une expérience de Thermal Shift Assay consiste à incuber la protéine et le ligand en présence d'un fluorophore (le sypro orange) capable de se lier aux acides aminés hydrophobes situés au cœur de la protéine et d'émettre alors un signal de fluorescence enregistré en fonction de la température. Ce fluorophore est excité à 492 nm et l'émission de fluorescence est enregistrée à 516 nm. Les données obtenues permettent de déterminer la température de dénaturation de la protéine en fonction du ligand présent (Figure 15 A). Si ce ligand stabilise la protéine, la fluorescence émise par le sypro orange apparaîtra à une température plus élevée que dans le cas de la protéine seule (absence de ligand). En présence des ligands qui entraînent la stabilisation de la protéine, il y aura donc une augmentation de la température de dénaturation de la protéine (Figure 15 B). Le TSA est couramment utilisé en cristallographie pour cribler les conditions qui permettent une augmentation de la stabilité de la protéine. Cette technique est également utilisée pour étudier les modifications de stabilité en fonction de la température lors de la production de protéines mutantes.

(2) Protocole

Les solutions de ligand (Cd^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} , SeO_3^{2-} , SeO_4^{2-} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+} et MoO_4^{2-}) ont été préparées à partir des poudres suivantes : $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ (20911, Sigma), ZnCl_2 (Z4875, Sigma), NiCl_2 (654507, Sigma), Na_2SeO_3 (S5261, Sigma), Na_2SeO_4 (S8295, Sigma), CuCl_2 (451665, Sigma), $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$ (239267, Sigma), Na_2MoO_4 (331058, Sigma), MnCl_2 (M3634, Sigma) et MgCl_2 (M9272). L'expérience est réalisée sur une plaque 96 puits et chaque puits contient 20 μL d'une solution contenant 5 μM SBP1, 5 ou 25 μM de solution de ligand et du sypro orange (dilué au 1/1000^{ème} à partir de la solution mère, S6650 Invitrogen) (Niesen *et al.*, 2007). Les échantillons sont dénaturés thermiquement de 25 à 75 °C (1°C / min) dans une machine de PCR en temps réel (Stratagène Mx3005P). La longueur d'onde d'excitation est de 492 nm et la longueur d'onde d'émission est de 516 nm. L'émission relative de fluorescence est enregistrée en fonction de la température.

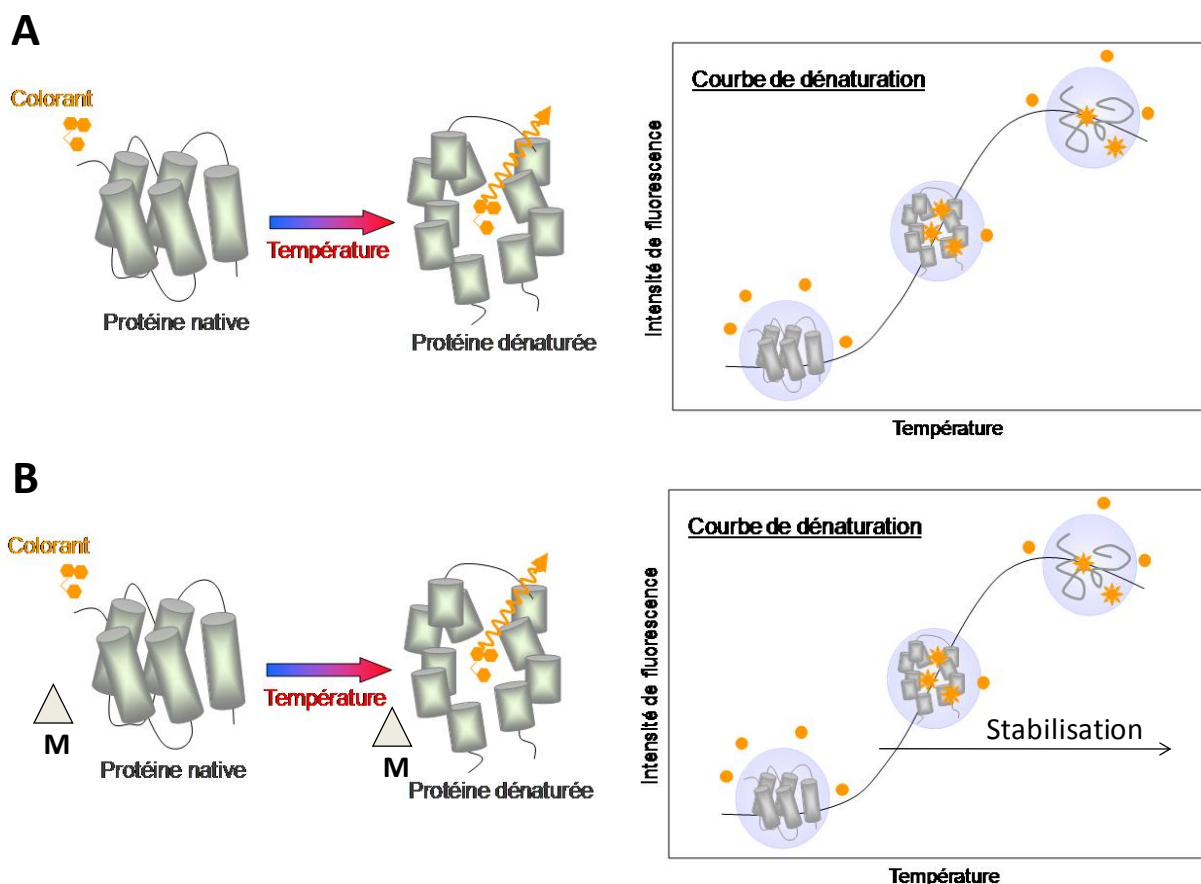


Figure 15 : Principe de la thermostabilité par fluorescence. A : Evolution de l'intensité émise par le sypro orange lorsque celui est incubé en présence d'une protéine soumise à une température croissante. L'augmentation de température entraîne la dénaturation de la protéine et le sypro orange peut ainsi se lier aux acides aminés hydrophobes et émettre un signal de fluorescence. Cette intensité de fluorescence est enregistrée en fonction de la température et permet d'obtenir la courbe de dénaturation de la protéine. B : Evolution de l'intensité émise par le sypro orange lorsque celui est incubé en présence d'un mélange protéine-ligand soumis à une température croissante. Si le ligand stabilise la protéine, la courbe de dénaturation est décalée vers la droite.

b) Test de capacité de liaison

Les différents ligands testés ont été mis en solution : Cd^{2+} (à partir de $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$), Zn^{2+} (à partir de ZnCl_2), Ni^{2+} (à partir de NiCl_2), SeO_3^{2-} (à partir de Na_2SeO_3) et SeO_4^{2-} (à partir de Na_2SeO_4). SBP1 (80 μM) est incubée avec un ligand (1 mM) dans une solution tampon HEPES 10 mM pH 7,4, NaCl 150 mM. L'incubation est réalisée dans 25 μL à 25°C pendant 15 min sous une agitation orbitale de 300 tr/min. Cette solution est ensuite passée sur une colonne de chromatographie d'exclusion stérique (G25 Fine, hauteur 9 cm, diamètre 5 mm) afin de séparer les complexes SBP1-ligand du ligand libre. Des fractions de 200 μL sont collectées en sortie. L'absorbance à 280 nm est mesurée dans chacune

des fractions (NanoDrop 2000, ThermoScientific) afin d'obtenir la concentration de SBP1 et les différents ligands sont quantifiés par ICP-MS (Inductive Coupled Plasma Mass Spectrometry, Spectrométrie de masse couplée à une torche à plasma induit)

c) Quantification des différents ligands (ICP-MS)

(1) Principe

L'ICP-MS est une technique qui couple l'ionisation par une torche à plasma d'argon et l'identification par spectrométrie de masse de différents composés en fonction de leur rapport masse/charge. L'ensemble des éléments de la chaîne ICP-MS sont présentés dans la figure 16. Dans un premier temps, l'échantillon est amené dans une chambre de nébulisation (chambre de Scott) maintenue à basse température (5°C) par un refroidisseur à effet Peltier. De l'argon gazeux (ce gaz est considéré comme plasmagène car il a un potentiel d'ionisation élevé) ainsi qu'un nébuliseur de type Babington sont ensuite utilisés pour nébuliser l'échantillon sous forme de fines gouttelettes alors dirigées vers la torche à plasma *via* la chambre de Scott. La torche à plasma est constituée d'un plasma d'argon dont la température peut atteindre 10000°C. Les échantillons nébulisés y sont ionisés sous forme de cations monovalents. Le faisceau d'ions est ensuite affiné grâce à une interface constituée de deux cônes de nickel puis les cations sont extraits par un système de lentilles électrostatiques qui va ensuite permettre de focaliser ce faisceau de cations. Ce même système permet de débarrasser le faisceau des photons et autres éléments neutres. La séparation se fait au niveau d'un quadripôle (spectromètre de masse) en fonction du rapport masse/charge qui est dépendant de la fréquence appliquée au quadripôle. Chaque élément possédant son propre rapport masse/charge est envoyé vers un détecteur de type multiplicateur d'électrons.

(2) Protocole

Les ligands sont quantifiés grâce à un spectromètre de masse couplé à une torche à plasma (ICP-MS) (HP4500 ChemStation, Yokogaya analytical systems). Les isotopes ^{112}Cd , ^{114}Cd et ^{116}Cd ont été mesurés pour le Cd, ^{77}Se et ^{82}Se pour le Se, ^{64}Zn et ^{66}Zn pour le Zn et ^{60}Ni pour le Ni. Dans le cas des échantillons provenant des tests de capacité de liaison, les échantillons sont dilués dans 5 mL de HNO_3 0,1 % [v/v] (Suprapur, Merck). Les concentrations en ligand doivent être de l'ordre de 2,5 à 6 ppm. Dans le cas des échantillons de plantes, les racines et les feuilles sont collectées indépendamment puis séchées pendant 3 jours à 50 °C. Chaque échantillon est minéralisé dans 3 mL de HNO_3 65 % [v/v] (Suprapur, Merck) et 1 mL de HCl 30 % [v/v] (Suprapur, Merck) pendant 3 h à 85

°C. Après évaporation totale, le résidu de matériel végétal est dissout dans du HNO_3 1 % [v/v] (Suprapur, Merck) puis les expériences de quantification sont réalisées par ICP-MS.

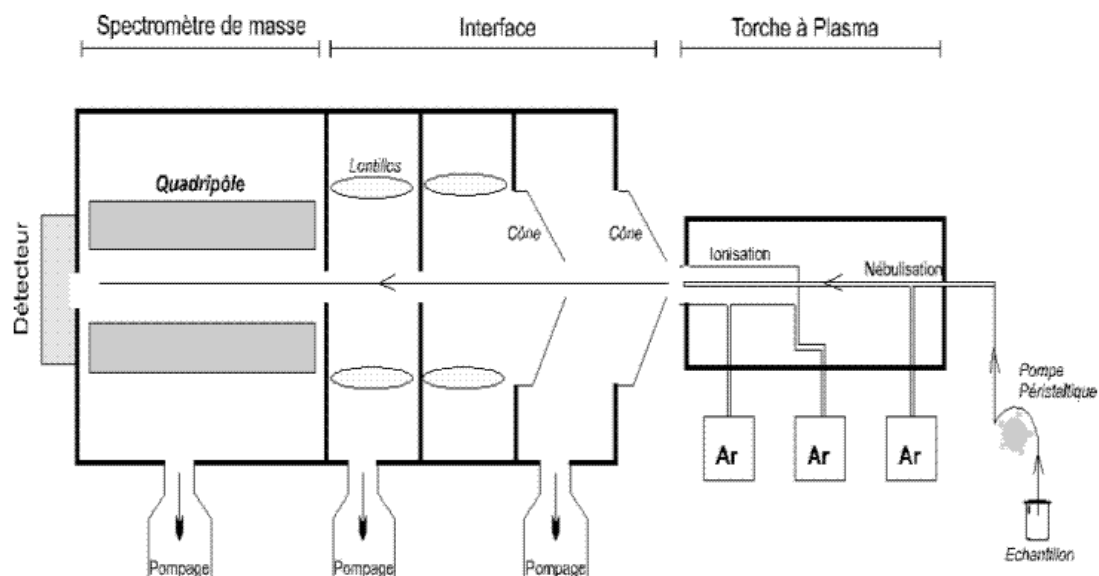


Figure 16 : Schéma d'une installation de spectrométrie de masse couplée à un plasma induit. L'ensemble des éléments présents sur cette figure sont détaillés ci-dessus.

d) Dosage des cystéines réduites accessibles avec le réactif d'Ellman

(1) Principe

La réaction d'une molécule du réactif d'Ellmann (acide 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoïque) ou DTNB) avec une cystéine réduite accessible entraîne la libération d'une molécule de 2-nitro-5-thiobenzoate (NTB) quantifiable par spectrométrie (Figure 17). Ce composé absorbe à 412 nm et son coefficient d'extinction molaire est de $13600 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, ce qui permet une détermination simple de sa concentration par l'utilisation de la loi de Beer-Lambert ($A = \epsilon l C$). Cette technique de dosage permet donc de mesurer la concentration molaire des cystéines libres accessibles qui est égale à la concentration molaire du NTB formé.

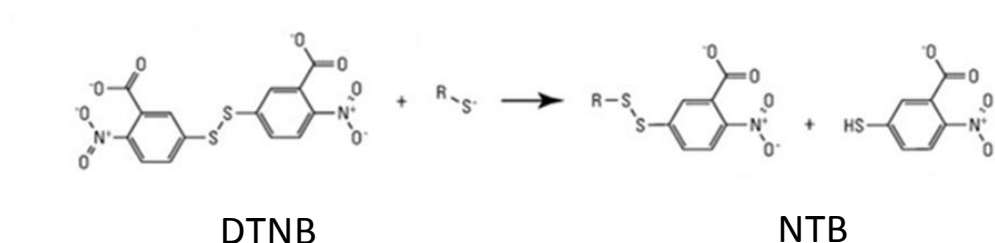


Figure 17 : Réaction de liaison du réactif d'Ellmann avec un composé soufré (R-S-). Cette réaction donne lieu à la production d'une molécule de NTB quantifiable par la mesure de l'absorbance du mélange à 412 nm.

(2) Protocole

Un volume de 60 μL de SBP1 à 8 μM est incubé en présence de 2 μL de DTNB à 20 mM pendant 30 min à l'obscurité. La mesure de l'absorbance à 412 nm du mélange est réalisée au nanodrop (Nanodrop 2000, thermoscientific). La valeur de l'absorbance permet de calculer le nombre de cystéines réduites ($\epsilon = 13600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Pour le dosage des cystéines réduites non accessibles, la protéine est, dans un premier temps, dénaturée avec de l'urée 8M. Lorsque la protéine est préalablement incubée en présence de différents ligands (15 min à 25°C sous une agitation orbitale de 300 tr/min), la concentration de ceux-ci est de 100 μM .

e) Détermination des paramètres thermodynamiques par microcalorimétrie (ITC)

(1) Principe

Lors d'une expérience de microcalorimétrie (appareillage représenté figure 18 A), la protéine est déposée dans une cellule située dans une enceinte adiabatique contenant également une cellule de référence. La température est mesurée simultanément dans les deux cellules. Des injections successives de ligand sont réalisées dans la cellule contenant la protéine. L'interaction protéine/ligand entraîne un dégagement ou une absorption de chaleur mesurée au niveau de la cellule contenant la protéine. Cette variation d'énergie est compensée par chauffage ou refroidissement de la cellule jusqu'à atteindre la température de la cellule de référence. Ce phénomène est traduit graphiquement (figure 18 B) par la représentation de cette variation d'énergie (dQ / dt) en fonction du temps. Cette énergie est ensuite intégrée (Q) puis représentée en fonction du ratio ligand/ protéine (figure 18 B). D'après ce graphe et les formules décrivant l'énergie de Gibbs ΔG : $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$ et $\Delta G = -RT \ln K_a$, il est possible d'obtenir la valeur de la constante d'affinité K_a , de la stoechiométrie de liaison, de l'enthalpie ΔH et de l'entropie ΔS .

(2) Protocole

Les expériences ont été réalisées sur l'appareil Microcal ITC200 System (Ge Healthcare). Trois cent cinquante microlitres de protéine (SBP1 clivée de l'étiquette GST ou GST seule) à 50 mM sont placés dans la cuve de mesure et l'injecteur (55 μL) est rempli d'une solution de Cd^{2+} à 2 mM. Des ajouts successifs de 1,5 μL de Cd sont réalisés toutes les 3 min dans la cuve de mesure sous une agitation de 800 tr/min. Les données ont été analysées à l'aide du logiciel Origin ITC200.

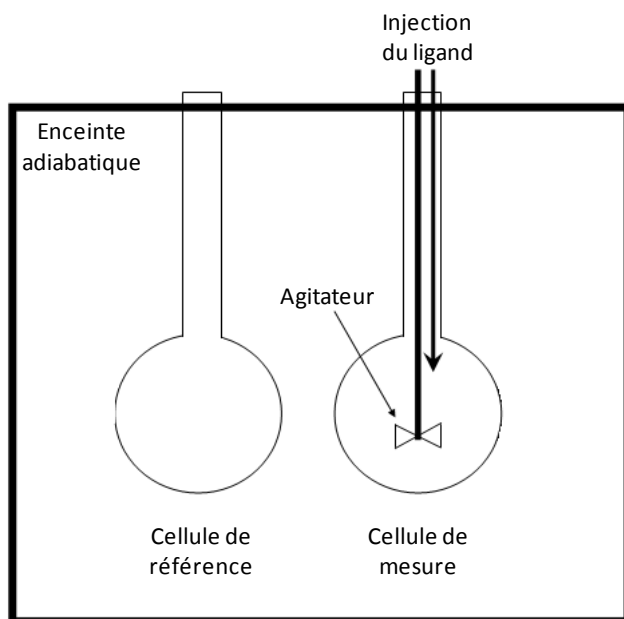
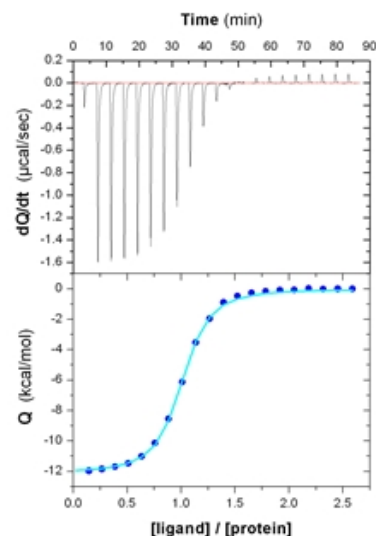
A**B**

Figure 18 : Microcalorimétrie isotherme différentielle. A : Schéma d'un appareil de microcalorimétrie isotherme différentielle. B : Exemple de résultat obtenu lors d'une expérience de microcalorimétrie isotherme différentielle. dQ / dt représente l'énergie dégagée par l'interaction protéine/ligand par unité de temps. Q représente l'intégration dans le temps de l'énergie dégagée.

f) Analyse de la liaison Se-SBP1 par spectrométrie de masse

(1) Protocole sur protéine entière

Après avoir réalisé un test de capacité de liaison de SBP1 avec le SeO_3^{2-} , la fraction contenant la plus forte concentration de protéines est conservée. La protéine purifiée par des systèmes VIVASPIN 500 (Sartorius) en échange contre de l'eau pure est analysée par introduction directe dans la source électrospray *via* un pousse-seringue. La concentration en protéine utilisée est de 1 pmole/µl. L'analyse est réalisée en LTQ-MS (Linear Trap Quadrupole) basse résolution sur un instrument LTQ-Orbitrap-XL. La résolution de l'orbitrap étant insuffisante pour pouvoir obtenir une résolution isotopique à cette masse, nous avons opté pour la mesure d'une masse moyenne. La gamme de masse sélectionnée est de 500-1600 (m/z). La déconvolution des spectres a été réalisée avec ICR-2LS (PNNL) utilisant l'algorithme Horn Mass Transform.

(2) Protocole sur protéine digérée

Après avoir réalisé un test de capacité de liaison de SBP1 avec le SeO_3^{2-} , la fraction contenant la plus forte concentration de protéines est conservée. La digestion est réalisée en milieu liquide avec de la chymotrypsine (dilution $1/20^{\text{ème}}$ [p/p]) pendant 15 h à 37 °C puis les peptides digérés sont

séchés sous vide puis repris dans une solution d'acétonitrile 5 % [v/v] et d'acide formique 0,1 % [v/v]. L'analyse est réalisée sur une chaîne nano LC/MS (Ultimate 3000, Dionex et LTQ orbitrap Velos pro, Thermo Fisher Scientific). Les échantillons sont injectés sur une colonne de dessalage Pepmap C18 (300 μm $\times$ 5 mm) puis séparés sur une colonne Pepmap C18 (75 μm $\times$ 250 mm). L'élution est réalisée grâce à un gradient linéaire d'acétonitrile (5 à 45 % [v/v]) dans 0,1 % d'acide formique [v/v] pendant 30 min avec un débit de 300 nL/s. L'analyse MS est suivie d'une analyse MS/MS, les résultats ont été acquis avec le logiciel XCalibur (Thermo Fisher Scientific). Les fichiers bruts obtenus ont été soumis à Mascot distiller puis Mascot 2.4.

L'identification des protéines a été réalisée en utilisant le moteur de recherche Mascot et une banque de protéines contenant la séquence de la protéine SBP1 entre autres protéines d'intérêt. L'instrument sélectionné pour les recherches est un ESI-TRAP. L'enzyme sélectionnée est la chymotrypsine et 2 erreurs de coupures sont autorisées. La tolérance sur la masse des peptides est de 10 ppm et de 0,6 Da sur les fragments générés. Les modifications variables autorisées étaient : carbamidométhyl, oxydation, sélénium, sélénium-oxyde et déamidation. Le logiciel IrMa a été utilisé pour filtrer les résultats (Dupierris *et al.*, 2009).

g) Etude des structures secondaires par dichroïsme circulaire

(1) Principe

Les acides aminés sont des composés possédant un carbone asymétrique. Les formes lévogyres et dextrogyres ne sont donc pas superposables, on parle alors de composés chiraux. Ces molécules ont la particularité de ne pas absorber de la même façon les ondes polarisées circulairement à droite et à gauche (Figure 19 A). Ce phénomène est appelé dichroïsme circulaire. Dans le cas des protéines, il existe un signal de dichroïsme circulaire dans l'UV lointain (200-260 nm) spécifique aux hélices alpha, aux feuillets bêta et au repliement aléatoire (Figure 19 B). Ainsi, il est possible de déterminer la proportion de chacune de ces structures secondaires au sein de la protéine. Afin de réaliser des mesures de dichroïsme circulaire, un spectropolarimètre est utilisé. Celui-ci émet un faisceau de photons polarisés circulairement à droite et à gauche et le spectre de dichroïsme circulaire correspond à la différence d'absorbance en mdeg de chacune des ondes pour chaque longueur d'onde.

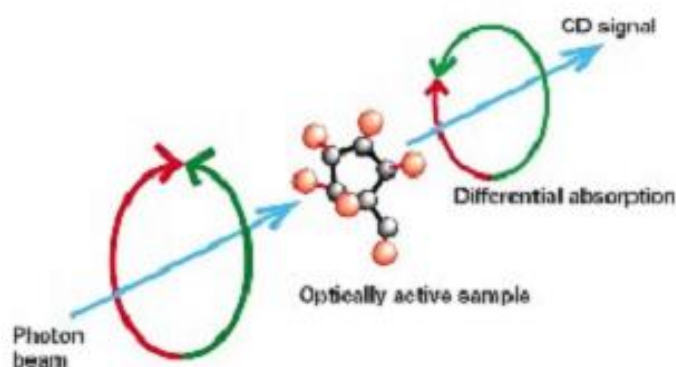
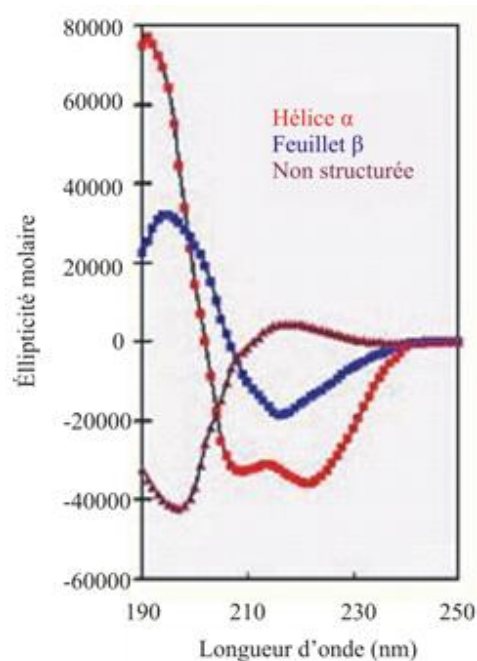
A

Figure 19 : Principe du dichroïsme circulaire dans le cas des protéines. A : Emission du signal de dichroïsme circulaire dans le cas d'une molécule chiral. **B :** Courbe de spectres standards de dichroïsme circulaire pour des peptides se retrouvant dans une structure secondaire définie.

B

(2) Protocole

L'acquisition des spectres a été réalisée à 25°C dans l'UV lointain (200-260nm) sur un spectropolarimètre J-815 (Jasco). Les paramètres d'acquisition sont les suivants : pas de 1 nm, bande passante de 2 nm et une vitesse de scan de 200 nm/min. Chaque spectre correspond à la moyenne de 10 acquisitions. La concentration de SBP1 est de 2,7 μM et la concentration de Cd^{2+} ou de SeO_3^{2-} est de 33,5 μM . Le mélange SBP1-ligand est préalablement incubé 15 min à 25°C sous une agitation orbitale de 300 tr/min.

h) Détermination de l'affinité du Cd^{2+} à SBP1 par fluorimétrie

(1) Principe

Les molécules fluorescentes (appelées fluorophores) sont des molécules qui possèdent la propriété d'absorber de l'énergie lumineuse et de la restituer sous forme de lumière fluorescente. Une fois l'énergie du photon absorbée, le fluorophore est à un état excité, puis le retour à l'état fondamental se traduit par une émission de fluorescence. Le tryptophane est une sonde naturelle de fluorescence, ce qui donne une propriété intrinsèque de fluorophore à toutes les protéines possédant un ou plusieurs tryptophanes. La longueur d'onde d'excitation de cet acide aminé se situe à 295 nm tandis que sa longueur d'onde d'émission se situe à 350 nm. L'ajout d'un ligand peut modifier l'intensité de fluorescence émise par la protéine et cette variation de fluorescence permet de déterminer la proportion de complexe protéine-ligand par rapport à la quantité de protéine

initiale ($I_{(t)}/I_{(t=0)} = \text{complexe}_{(t)} / \text{protéine}_{(t=0)}$). Ainsi, cette technique permet de déterminer la stœchiométrie de liaison et la constante d'affinité d'un ligand pour une protéine. L'appareillage utilisé est un fluorimètre qui émet une lumière à une longueur d'onde donnée et qui détecte la fluorescence émise par l'échantillon pour une gamme de longueur d'onde donnée.

(2) Protocole

L'acquisition des spectres est réalisée à 25°C sur un fluorimètre FP-8500 (Jasco). L'acquisition des spectres a lieu entre 300 et 400 nm après excitation de l'échantillon à 280 nm. Les paramètres d'acquisition sont les suivants : pas de 1nm, bande passante de 2 nm et une vitesse de scan de 10 nm/s. La concentration de SBP1 est de 2,7 μM . Des ajouts successifs de Cd^{2+} sont réalisés sous agitation (200 tr/min) jusqu'à obtenir une concentration finale en Cd^{2+} de 33,7 μM . Le calcul du K_d et du K_a sont réalisés à partir des valeurs de fluorescence émise à 330 nm.

i) Caractérisation de l'environnement atomique et de la spéciation du Cd et du Se par spectroscopie d'absorption des rayons X (XAFS)

(1) Généralités

Actuellement, la spectroscopie XAFS (X-ray Absorption Fine Structure) est une des techniques les plus performantes pour caractériser le degré d'oxydation ainsi que l'environnement (nature et nombre d'atomes, distance interatomique, type de coordinence) d'un atome donné. Cette technique permet de mesurer le signal XANES (absorption des rayons X au voisinage du seuil d'absorption) et le signal EXAFS (absorption des rayons X au-delà du seuil d'absorption) au niveau du seuil d'absorption de l'élément choisi. Ces techniques utilisant le rayonnement synchrotron ont été utilisées en biologie végétale à plusieurs reprises et ont fait l'objet de plusieurs revues (Salt *et al.*, 2002; Gardea-Torresdey *et al.*, 2005; Lombi *et al.*, 2009; Sarret *et al.*, 2013). Le XANES donne des informations sur la symétrie locale et le degré d'oxydation, c'est-à-dire sur la structure tridimensionnelle et électronique d'un élément, tandis que l'EXAFS, utilisé pour l'analyse de la structure radiale, permet de déterminer le nombre, la nature et la distance des atomes de la première couronne.

(2) Principe

Chaque élément possède un ou plusieurs seuils d'absorption pour lesquels l'absorption d'un photon X entraîne l'éjection d'un électron d'une couche profonde (K, L_(II), L_(III) ...) au niveau du continuum. Ceci provoque l'émission de photons de fluorescence et également l'émission d'électrons Auger ainsi que de photons diffusés élastiquement ou inélastiquement (Figure 20 A). L'acquisition d'un spectre d'absorption X représente la variation du coefficient d'absorption linéaire μ en fonction

de l'énergie E du faisceau de photons. Le spectre obtenu se sépare en deux parties : le XANES et l'EXAFS (Figure 20 B). Le coefficient μ peut être déterminé en fluorescence ou en transmission en fonction de la concentration de l'élément et de la nature de l'échantillon. Les différents appareillages impliqués dans les mesures en mode fluorescence et en mode transmission sont représentés dans la figure 21. Les mesures en mode fluorescence sont réalisées à l'aide d'un détecteur situé à 45° du faisceau de photons capable de détecter les photons de fluorescence et le coefficient μ est proportionnel à I_{flu}/I . Les mesures en mode transmission sont réalisées par un détecteur de rayons X situé derrière l'échantillon, il permet de mesurer l'intensité I transmise et le coefficient μ est proportionnel à $\ln(I_0/I)$.

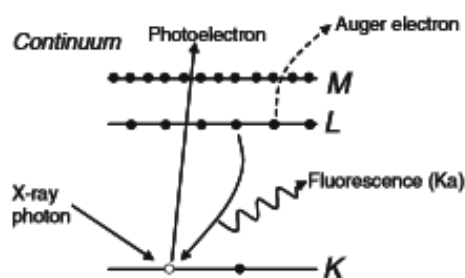
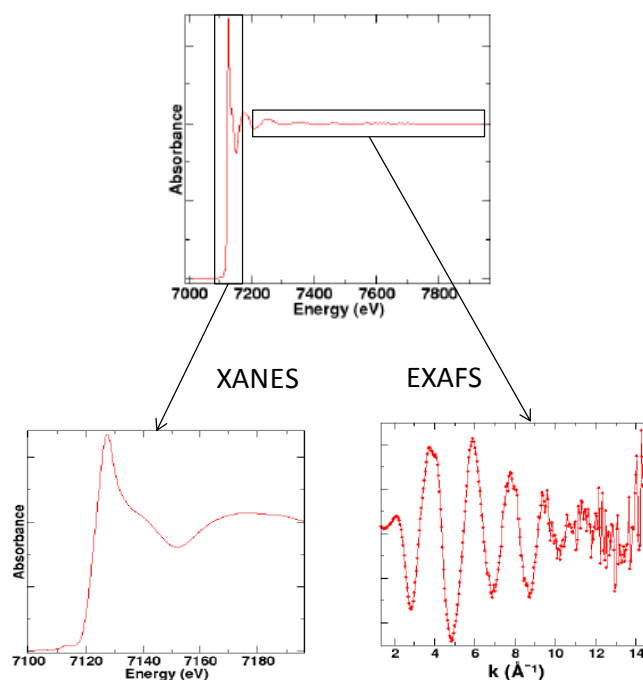
A**B**

Figure 20 : Spectroscopie d'absorption X. A : Excitation d'un atome par un photon issu d'un rayon X puis relaxation de l'état excité via l'émission d'un photon de fluorescence ou d'un électron Auger (D'après Lombi et al. 2009). **B : Représentation d'un spectre d'absorption X.** Le spectre XANES correspond à la partie gauche du spectre d'absorption X. Le spectre EXAFS correspond à la partie droite du spectre d'absorption X auquel la formule mathématique de l'EXAFS (Règle d'Or de Fermi) a été appliquée.

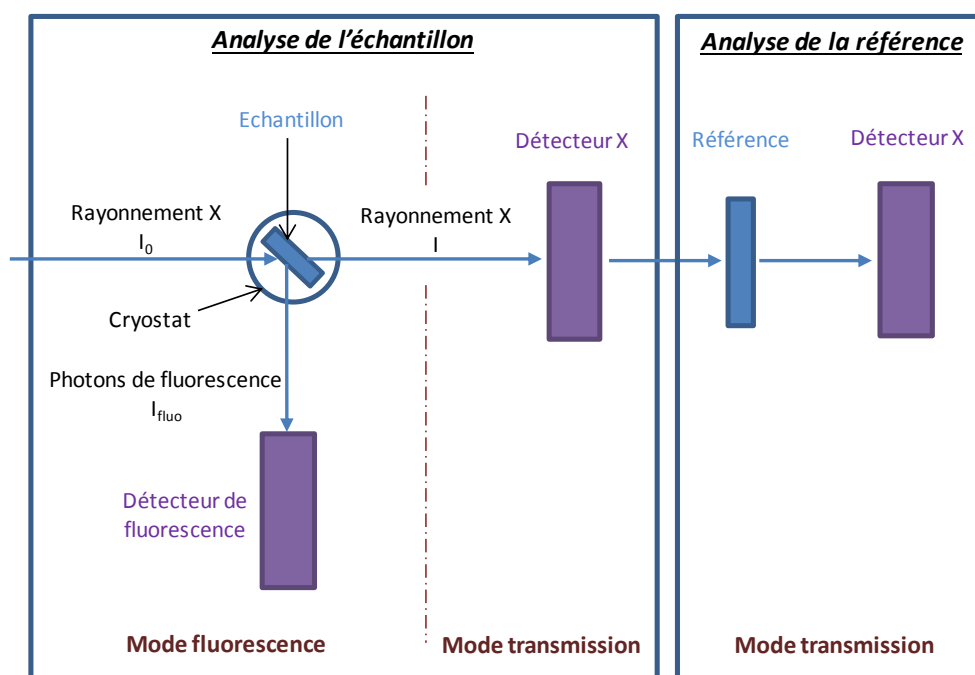


Figure 21 : Représentation simplifiée de la ligne de mesures CRG/FAME (BM30B). Les différents équipements présentés sur cette figure ainsi que les principes de mesure en transmission et en fluorescence sont décrits dans le paragraphe ci-dessus.

(3) Préparation des échantillons

Complexe protéine-métal

Le test de capacité de liaison du Cd^{2+} et du SeO_3^{2-} à SBP1 est réalisé de façon à obtenir une solution de complexe SBP1-ligand avec une concentration de ligand de 100 ppm. Quarante microlitres de chaque solution SBP1-ligand sont disposés sur un portoir à fenêtre de kapton et immédiatement congelés dans l'azote liquide.

Plantes

Des plantules de 7 jours ont été transférées pendant 3 jours sur un milieu $\frac{1}{2}$ MS contenant 100 μM SeO_4^{2-} ou 100 μM SeO_3^{2-} . Les parties aériennes de chaque lignée ont été collectées indépendamment puis broyées dans l'azote liquide. Chaque échantillon contient entre 50 et 100 μM de Se (d'après les résultats obtenus lors de l'analyse d'accumulation du Se dont la quantification a été réalisée par ICP-MS). A l'aide d'une presse, chaque échantillon est mis sous la forme d'une pastille (diamètre 5 mm, hauteur 2 mm) puis conservée à -80°C . Lors de l'acquisition des spectres, les pastilles sont placées sur un portoir à fenêtre de kapton.

Standards

Les composés standards utilisés dans le cas des mesures réalisées au seuil K du Cd sont les suivants : Cd-Cys (Cd 10 mM et cystéine 100 mM dans un tampon HEPES 10 mM, NaCl 150 mM et 20 % glycérol [v/v], pH 3,5), Cd-His (Cd 10 mM et histidine 100 mM dans un tampon HEPES 10 mM, NaCl 150 mM et 20 % glycérol [v/v], pH 5,5), Cd-malate (Cd 10 mM et acide malique 100 mM dans un tampon HEPES 10 mM, NaCl 150 mM et 20 % glycérol [v/v], pH 5,5) et Cd-MT (liaison du Cd dans le cas des métallothionéines extraites à partir de moules exposées au Cd, le spectre de référence a été fourni par Serge Pin, DSM/IRAMIS/SIS2M/LRad, CEA, Saclay). Les composés standards utilisés dans le cas des mesures réalisées au seuil K du Se sont les suivants : Na Selenite (5000 ppm de $\text{Na}_2\text{SeO}_3^{2-}$ dans du Nitrure de Bore (NB)), Na Selenate (5000 ppm de $\text{Na}_2\text{SeO}_4^{2-}$ dans du NB), Selenométhylcystéine (SeMetCys, R-Se-R) (5000 ppm de SeMetCys dans du NB), SeS_2 (5000 ppm de SeS_2 dans du NB), Se gris (Se^0) (5000 ppm de Se Gris dans du NB), Sélénométhionine (SeMet, R-Se-R) (5000 ppm de SeMet dans du NB), Sélénocystine (SeCystine, R-Se-Se-R) (5000 ppm de SeCystine dans du NB) et sélénodiglutathion (SediGSH, R-S-Se-S-R) préparé par Laure Avoscan (DSM/IRAMIS/SIS2M/LPS, CEA, Saclay) (Ganther, 1968; Sarret *et al.*, 2005).

(4) Réglages de la ligne et mesures

Les mesures d'absorption par rayons X sont réalisées en collaboration avec D. Testemale (CNRS, Institut Néel, Grenoble) à l'ESRF (European Synchrotron Radiation Facility, Grenoble) dont l'anneau fonctionne avec un courant de 150-200 mA. Les spectres ont été collectés sur la ligne BM30B (CRG/FAME) (Proux *et al.*, 2005; Proux *et al.*, 2006; Hazemann *et al.*, 2009) qui utilise un monochromateur deux-cristaux Si (220) et une stabilisation dynamique sagittale. Le flux de photons à l'énergie de travail est de l'ordre de 5×10^{11} photons/s et la taille du faisceau est de 300 μm (horizontal) sur 100 μm (vertical) FWHM. Le portoir contenant les échantillons est déposé dans un cryostat d'hélium où la température est stabilisée autour de 10 K pour l'ensemble des acquisitions. Cette basse température permet de limiter fortement la destruction d'échantillons et les cinétiques d'oxydo-réduction sous faisceau. Les spectres ont été collectés en mesurant la fluorescence ou la transmission au seuil K du Cd et du Se avec un détecteur solide au Germanium 30-éléments (fluorescence) et des diodes silicium (transmission). Pour chaque échantillon, 4 à 6 scans de 40 min ont été moyennés. La position du faisceau est modifiée entre chaque acquisition de spectre afin d'éviter les dommages dues aux radiations. La calibration en énergie de la ligne a été réalisée en effectuant le spectre d'une feuille métallique de l'élément étudié et en choisissant le premier point d'inflexion du spectre comme référence (26715 eV dans le cas du Cd et 12658 eV dans le cas du Se). L'analyse des données a été réalisée avec l'ensemble de logiciels Horae qui comprend Athena pour

l'extraction des données et les combinaisons linéaires des spectres XANES et Artemis pour l'analyse des spectres EXAFS (Ravel *et al.*, 2005). Les spectres XANES (absorption des rayons X au voisinage du seuil d'absorption) ont été normalisés en utilisant une fonction polynomiale de degré 3 pour la partie pré-seuil et la partie post-seuil. Pour les spectres correspondant aux échantillons de plantes exposés au SeO_4^{2-} et au SeO_3^{2-} , une analyse par combinaison linéaire avec différents standards, dans une gamme d'énergie (E) allant de -10,153 à 7,410 eV, a été réalisée avec le logiciel Athéna. Dans le cas des mesures EXAFS (absorption des rayons X au-delà du seuil d'absorption) réalisées à partir des échantillons de complexe SBP1-Cd, les spectres ont été pondérés en k^3 puis la transformée de Fourier a été obtenue pour une gamme d'énergie (E) allant de 3,37 à 11,36 eV en utilisant une fenêtre de Hanning. Les combinaisons de spectres EXAFS ont été réalisées à partir de la transformée de Fourier filtrée dans l'espace R pour une gamme allant de 1 à 2,77 Å. Les fonctions d'amplitude théorique et de phase ont été calculées *ab initio* avec le code FEFF 6.0 en utilisant la structure du sulfite de Cd (liaison Cd-S), du catena-(dodecakis(μ -2,2-methylimidazolato)-hexa-cadmium) (liaison Cd-N) et du catena-($\text{C}\mu$ -3-DL-malato)-diaqua-cadmium monohydrate (liaison Cd-O). Ces structures ont été obtenues à partir de la Cambridge Structural Database (CSDb).

6. Analyse structurale

(1) Principe

Le principe de la technique utilisée repose sur la diffusion de vapeur. L'ensemble du dispositif est représenté dans la figure 22. Dans une enceinte close (puits recouvert d'une lame de verre), un puits est rempli de solution de cristallisation. Ces solutions sont caractérisées par la nature et la concentration en agent précipitant, en sel et en tampon. Un volume de protéine est déposé sur un portoir dont les pieds sont immergés dans la solution de cristallisation. Dans l'enceinte close, un équilibre va s'établir entre la goutte et le puits par diffusion des espèces volatiles jusqu'à ce que la tension de vapeur soit la même dans la goutte et dans le puits. Ceci va diminuer la solubilité de la protéine qui va alors potentiellement pouvoir cristalliser. La première étape du processus de cristallisation est la nucléation qui correspond à la formation d'un amas de protéines qui à partir d'une taille critique peut former un cristal. La deuxième étape est la croissance cristalline qui est caractérisée par l'augmentation de la taille des cristaux. Ceux-ci sont ensuite analysés par diffraction des rayons X.

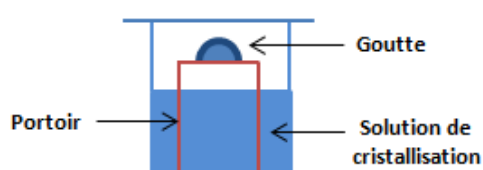


Figure 22 : Représentation de la technique de la goutte assise.

(2) Protocole

Les essais de cristallogénèse de la protéine SBP1 sous différentes formes ont été réalisés à 4°C pour une concentration de protéine de 5 mg/mL dans du tampon HEPES 10 mM pH 7,4, NaCl 150 mM. Les différentes conditions testées sont présentées tableau 11 (page 128). Lorsqu'il y a eu ajout de ligand, celui-ci a été incubé avec la protéine pendant 15 min à 25°C sous une agitation orbitale de 300 tr/min. Pour chaque conditions ? les différents kits testés sont les suivants : Wizard I & II de Emerald Biosystem, the classics de Quiagen, JCSG de Quiagen, Crystal Screen Lite and Peg Ion de Hampton et Index Screen de Hampton. Ces cribles ont été réalisés avec le robot de cristallisation de l'EMBL (European Molecular Biology Laboratory, Grenoble).

La modélisation de la structure de SBP1 a été réalisée à l'aide du logiciel MODELLER et la prédiction des structures secondaires grâce aux logiciels DSC, DPM, GOR I, GOR III, GOR IV, HNV, SIMPA96, PHD, PREDATOR et SOMP.

D. Techniques relatives aux analyses *in planta*

1. Transformation et sélection de lignées transgéniques à une insertion

Des bactéries *Agrobacterium tumefaciens* C58 sont transformées avec le plasmide sélectionné. Une colonie isolée est déposée dans 10 mL de milieu LB contenant les antibiotiques de sélection (préculture) puis le mélange est placé à 28°C sous agitation orbitale (100 tr/min). Lorsque la $DO_{600} = 1$, 500 µL de préculture sont déposés dans 500 mL de milieu LB contenant les antibiotiques de sélection. La culture bactérienne est placée à 28°C pendant 12h sous agitation orbitale (100 tr/min). Celle-ci est ensuite centrifugée 20 min à 60 g puis reprise dans du saccharose 5 % (le volume de saccharose est calculé de façon à avoir une $DO_{600} = 0,8$). Le surfactant Silwett est ajouté afin que sa concentration volumique finale soit de 0,02 %.

La transformation se fait par trempage des inflorescences d'*Arabidopsis thaliana* (1 à 2 semaines après montaison) dans la solution d'*Agrobacterium tumefaciens* préparée précédemment (Clough *et al.*, 1998). Les tiges sont trempées pendant 30 s puis sont placées pendant 2 jours sous cloche dans la chambre de culture. Les plantes sont ensuite placées dans des conditions normales d'humidité (80 %).

Les lignées transgéniques peuvent posséder différents marqueurs de sélection. Dans le cas des plantes transformées avec les vecteurs pFP100, pFP101 et pLUC, l'insertion du plasmide entraîne l'expression de la Green Fluorescent Protein (observable à la loupe binoculaire à l'aide d'une lampe UV et d'un filtre spécifique de la GFP). L'analyse se fait au stade graine. Pour ce qui est du vecteur

PNB96, son insertion est caractérisée par une résistance à l'herbicide BASTA. L'analyse de ségrégation se fait au stade jeune plantule, en sol, après 3 vaporisations successives espacées de 2 jours, de Basta dilué au 1/1000 dans de l'eau distillée. Huit semaines après transformation, les graines sont collectées puis sélectionnées en fonction du marqueur choisi. Les graines sélectionnées sont semées puis collectées huit semaines plus tard. Grâce au marqueur de sélection, la proportion de graines transformées ou non par plante est déterminée. Les lignées pour lesquelles 75 % des graines sont transformées et 25 % non transformées ont une seule insertion dans leur génome et sont donc sélectionnées. Celles-ci sont à nouveau semées et collectées huit semaines plus tard. Les lignées possédant 100 % de graines transformées sont des plantes homozygotes et sont alors sélectionnées.

2. Analyse de du niveau d'expression de SBP1 par enregistrement de l'activité luciférase

Les expériences ont été réalisées en utilisant une caméra CCD (Princeton Instrument) reliée à une chambre noire (Welsh *et al.*, 2005; Hugouvieux *et al.*, 2009). Les données ont été analysées avec le logiciel Metavue (Biorad). Les plantes ayant été transformées avec les vecteurs contenant le gène de la luciférase sous le contrôle de différentes formes du promoteur de SBP1 sont vaporisées avec une solution de luciférine 1 mM (Promega) et de triton X-100 0,02 % [v/v], puis conservées 5 min en chambre noire. Un enregistrement de l'activité luciférase est ensuite réalisé pendant 5 min. Pour chaque expérience, un minimum de 8 plantules par lignée a été analysé par condition.

3. Etude de la localisation sub-cellulaire de GFP-SBP1 et SBP1-GFP par microscopie confocale

Des bactéries *Agrobacterium tumefaciens* préalablement transformées avec les plasmides codant pour les protéines GFP-SBP1 et SBP1-GFP sont étalées sur une boîte de Pétri contenant du LB/Agar, de l'agarose (1,1 % [p/v]) et les antibiotiques de sélection. Après 72 h, une colonie isolée est transférée en milieu liquide LB contenant les antibiotiques de sélection pendant 24 h. La culture bactérienne est ensuite diluée 5 fois dans le milieu d'induction (78 mM MES; 1,734 mM Na₂HPO₄; 18,7 mM NH₄Cl; 1,2 mM MgSO₄; 2 mM KCl; 0,06 mM CaCl₂; 9 µM FeSO₄; 0,5 % glucose [p/v]; 0,2 mM acétosyringone) (Lavy *et al.*, 2002). Après 6 h d'induction, la DO₆₀₀ est mesurée et la solution bactérienne est diluée dans l'eau afin d'obtenir une DO₆₀₀ = 0,5. Les bactéries sont ensuite infiltrées sous pression à l'aide d'une seringue sans aiguille au niveau de la face inférieure des feuilles de tabac (*Nicotiana benthamiana*) âgées de 8 à 10 semaines. L'expression des protéines de fusion GFP-SBP1 et

SBP1-GFP est observable en microscopie confocale entre le 2^{ème} et le 4^{ème} jour avec un maximum d'intensité au 3^{ème} jour.

La localisation sub-cellulaire de SBP1 a également été réalisée à partir de lignées d'*Arabidopsis thaliana* exprimant de façon stable GFP-SBP1.

Les analyses de localisation cellulaire ont été réalisées par microscopie confocal avec le microscope TCS SP2 SE Leica DMRE. La longueur d'onde d'excitation est de 488 nm et 550 nm pour la GFP et la chlorophylle respectivement. La longueur d'onde d'émission est de 650 nm pour la GFP et 720 nm pour la chlorophylle. Les images ont été observées grâce au logiciel Leica Confocal Software.

4. Analyse d'expression des gènes par PCR quantitative

L'ARN total est extrait indépendamment des feuilles et des racines à partir de 100 mg de tissus. Cette étape est réalisée à l'aide du kit RNeasy plant mini kit (Qiagen). Un traitement à la DNase sur colonne est réalisé. Un microgramme d'ARN total est utilisé pour la synthèse des ADNc (Reverse-it first strand synthesis kit, ABgene) dans un volume total de 20 µL. A la fin de la réaction, 180 µL d'eau sont ajoutés. Des amorces spécifiques des 3 isoformes de SBPs ont été générées et sont présentées dans le tableau 8. Les réactions de PCR ont été réalisées à partir de 5 µL de solution de d'ADNc, en triplicat, sur le thermocycler « Rotor Gene 3000 » (Cobbett Research) en utilisant du SYBR Green JumpStart ReadyMix (Sigma-Aldrich). La quantification de l'expression des gènes a été réalisée avec la méthode comparative Ct à l'aide du logiciel « Rotor-Gene 3000 Software ». Le gène *ACTIN2/7* (At5g09810) a été utilisé pour normaliser les données obtenues.

Tableau 8 : Amorces utilisées pour l'analyse de l'expression des gènes SBP1 (At4g14030), SBP2 (At4g14040) et SBP3 (At3g23800).

Nom	Séquence
At4g14030-FW	5'-TGGCGACGGAAACGGAAGTTGTAG-3'
At4g14030-RV	5'-CGAGCTTGGATCTACATCCACCG-3'
At4g14040-FW	5'-GCAACCGAAACCGTATTAGCCACGG-3'
At4g14040-RV	5'-GCATTTTGTAGTCTGTGAATGACGC-3'
At3g23800-FW	5'-ATGGAAGCGGCGATGAACAACCACG-3'
At3g23800-RV	5'-GGTAAGGCATTGGTAATCTGTGG-3'

5. Quantification des ligands et analyse de leur spéciation

La quantification est réalisée après minéralisation par ICP-MS (protocole page 69) et la spéciation de ces différents ligands est réalisée par spectroscopie d'absorption des rayons X (protocole pages 77 à 79).

IV. CHAPITRE 1 : Caractérisation
biochimique de la protéine « Selenium
Binding Protein 1 » (SBP1)
d'*Arabidopsis thaliana* – Etude des
propriétés de liaison aux métaux et
autres ligands

A. Analyse de la capacité de liaison de différents ligands à la protéine SBP1 d'*Arabidopsis thaliana*

1. Purification de la protéine SBP1 d'*Arabidopsis thaliana*

La protéine chimérique GST-SBP1 (SBP1 couplée à la Glutathione-S-Transférase, GST) a été surexprimée chez la souche Rosetta 2 thermocompétente d'*E. coli* par transformation avec le vecteur PGEX-3X-SBP1 (Gate-Way). La séquence de cette protéine est présentée dans l'annexe 1. La protéine GST-SBP1, présente dans la fraction soluble, a été purifiée par affinité sur colonne de glutathion (GSH)-sépharose. Par la suite, l'étiquette GST, pouvant interférer avec différents ligands, a été clivée. L'optimisation des conditions de clivage de la GST a montré que l'utilisation de 1,7 µg de Facteur Xa (endopeptidase appelée facteur de Stuart ou prothrombinase) pendant 15 heures à 22°C permettait de cliver 1 mg de GST-SBP1 avec un rendement de clivage proche de 100% (Figure 23 A). Des analyses protéomiques en collaboration avec Y. Couté du laboratoire EDyP (Etude de la Dynamique des Protéomes, CEA-Grenoble) ont été réalisées sur SBP1 après clivage (Annexe 2) et les résultats ont montré une contamination significative de SBP1 par les protéines GroL (protéine chaperon de 60 kDa) et DNAK (protéine chaperon de choc thermique de 70 kDa). En effet, pour 23 peptides de SBP1 identifiés, 21 peptides de GroL ont également été identifiés lors des analyses protéomiques par spectrométrie de masse. Ainsi, une étape de chromatographie d'exclusion stérique (passage de SBP1 sur Superdex S200 16/60) (Figure 23 B) a été réalisée et des analyses protéomiques ont montré que cette étape supplémentaire permettait de séparer SBP1 des deux contaminants majeurs (GroL et DNAK) (Annexe 3). En effet, le volume d'élution de GroL et DNAK est de 70 mL tandis que celui de SBP1 est de 78,5 mL (Figure 23 B). Les fractions les plus riches en SBP1 (volume d'élution allant de 76 à 82 mL) ont été réunies afin de réaliser des analyses biochimiques ultérieures. Lors de cette purification, 5 mg de protéines ont été obtenus à partir de 3,2 L de culture d'*E. Coli*. Pour déterminer la structure quaternaire de SBP1, un mélange de protéines étalons a été injecté sur la colonne de chromatographie d'exclusion stérique ce qui a permis de déterminer la courbe d'étalonnage de cette colonne (Figure 23 C). La masse moléculaire apparente de SBP1 a donc pu être calculée (Figure 23 C), celle-ci est de 56,6 kDa montrant que la protéine est sous la forme monomérique (masse moléculaire théorique : 56,59 kDa).

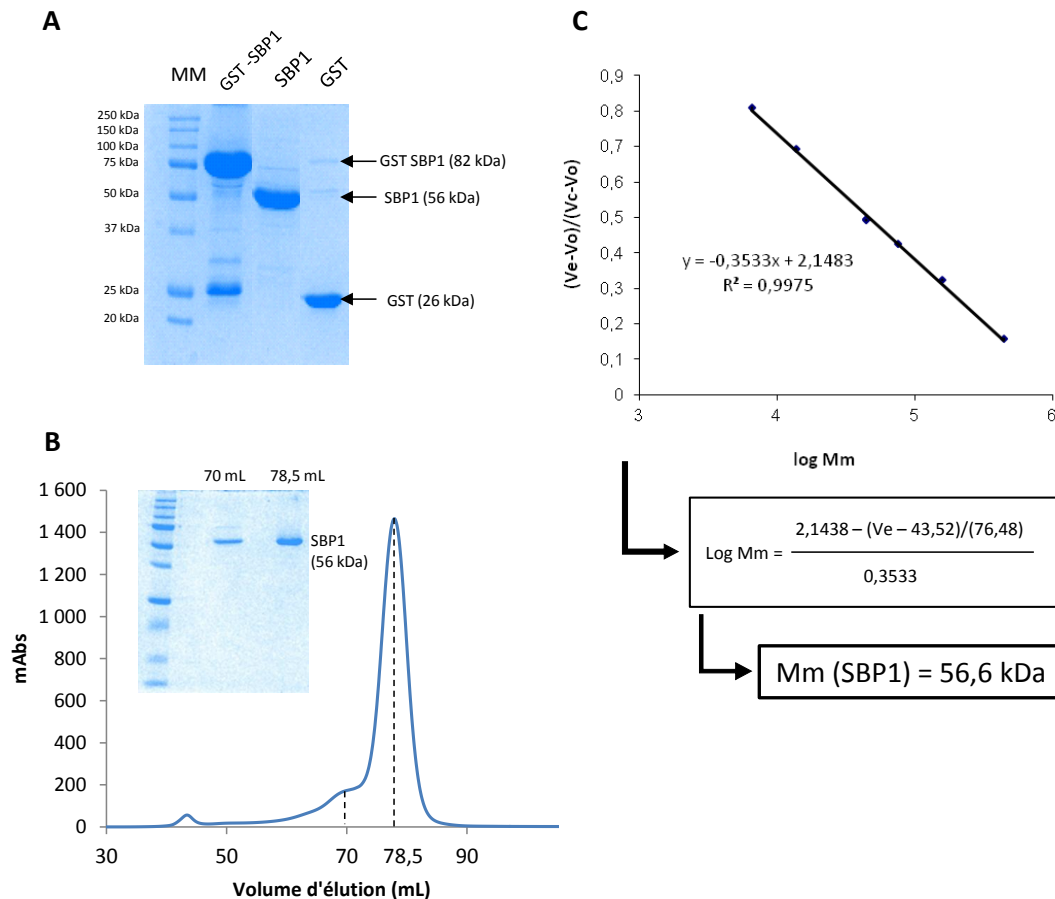


Figure 23 : Purification de la protéine SBP1. A : Optimisation des conditions de clivage de l'étiquette GST. Analyse par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (PAGE) 12% en présence de sodium dodécylsulfate (SDS) montrant la GST-SBP1 (15 µg) après élution de la colonne GSH-sépharose par une solution de GSH 20 mM Tris 50 mM pH 8, SBP1 (10 µg) après clivage au facteur Xa sur résine (1,7 µg de facteur Xa pour 1 mg de SBP1, 15h, 22°C) avec une solution Tris 50 mM NaCl 150 mM CaCl₂ 2 mM pH 7,4 et l'étiquette GST (10 µg) après clivage de SBP1 et élution de l'étiquette avec une solution GSH 20 mM Tris 50 mM pH 8,0. **B : Profil d'élution par passage sur colonne de chromatographie d'exclusion stérique (S200 16/60).** Le volume des fractions collectées est de 1,5 mL, les fractions correspondant aux volumes d'élution 70 mL et 78,5 mL ont été analysées par gel SDS-PAGE 12 % (1 µg et 1,5 µg pour les fractions correspondant aux volumes d'élutions 70 et 78,5 mL respectivement), puis découpées et analysées en protéomique (Annexe 3). **C : Etalonnage de la colonne de chromatographie d'exclusion stérique Superdex 200 (S200) 16/60 (utilisation du kit GE Healthcare Gel Filtration Calibration).** Les étalons utilisés sont l'aprotinine (6,5 kDa), la ribonucléase (13,7 kDa), l'ovalbumine (44 kDa), la conalbumine (75 kDa), l'aldolase (158 kDa) et la ferritine (440 kDa). Le volume d'élution V_0 correspond au volume d'élution du bleu dextran ($V_0 = 43,5$ mL). V_c correspond au volume mort de la colonne (120 mL), V_e correspond au volume d'élution (mL) de chaque étalon et M_m correspond à la masse moléculaire (Da). L'équation obtenue permet d'obtenir la masse moléculaire théorique (Da) en fonction du volume d'élution (mL). Cette formule permet de calculer la masse moléculaire apparente de SBP1 = 56,6 kDa.

2. Mise en évidence de la capacité de différents ligands à se lier à SBP1

a) Identification des ligands capables de stabiliser SBP1

SBP1 est capable de lier du cadmium (Cd) sous la forme Cd^{2+} avec un ratio molaire Cd^{2+} /protéine de 3 (Dutilleul *et al.*, 2008) et ce phénomène pourrait jouer un rôle potentiel dans la détoxification du Cd^{2+} . La présence de nombreux sites conservés de liaison aux métaux ainsi qu'à d'autres ligands pourrait avoir de l'importance dans la fonction de SBP1 dans le cas d'une liaison à des métaux ou ligands essentiels. Ainsi, pour identifier des ligands potentiels à SBP1, nous avons d'abord cherché si certains d'entre eux étaient capables ou non de stabiliser cette protéine en mesurant l'émission de fluorescence du sypro orange lorsque celui-ci est lié aux acides aminés hydrophobes localisés au cœur de la protéine en fonction de la température (Niesen *et al.*, 2007). Cette technique est appelée plus communément le « Thermal Shift Assay ». En effet, l'augmentation de la température de dénaturation de la protéine en présence de ligand signifie que celui-ci stabilise la protéine (technique décrite page 67-68). Ces expériences ont été réalisées en collaboration avec C. Zubieta de l'EMBL (European Molecular Biology Laboratory, Grenoble). Les différents ligands métalliques testés ont été le Zn^{2+} , le Ni^{2+} , le Co^{2+} , le Cu^{2+} , le MoO_4^{2-} , le Mn^{2+} et le Mg^{2+} , ainsi que le Cd^{2+} (en tant que contrôle positif). Le sélénium (Se) sous sa forme séléniate (SeO_4^{2-}) et sélénite (SeO_3^{2-}), qui sont les deux formes prédominantes dans les sols, a également été testé car chez l'homme et la souris, SBP1 a été caractérisée en tant que protéine capable de lier le Se lorsque celui-ci est initialement sous la forme SeO_3^{2-} .

La figure 24 montre que SBP1 a une température de dénaturation de 45°C. En présence de concentrations croissantes de Cd^{2+} , une augmentation de la température de dénaturation de 4°C est observée, ce qui montre bien que le Cd^{2+} , en se liant à SBP1, stabilise la protéine. Le Zn^{2+} , le Ni^{2+} , le Co^{2+} et le Cu^{2+} sont également des ligands métalliques capables de stabiliser SBP1. Ces métaux essentiels entraînent une augmentation de 4 à 5°C de la température de dénaturation, excepté le Zn^{2+} qui entraîne une augmentation de cette température de 8°C. Pour ce qui est du Mn^{2+} , du Mg^{2+} et du MoO_4^{2-} , ils n'entraînent pas de modification de la température de dénaturation et ne stabilisent donc pas SBP1. Dans le cas du Se, seule la forme SeO_3^{2-} et non la forme SeO_4^{2-} permet d'augmenter la température de dénaturation de 1°C de façon très reproductible et donc de stabiliser SBP1.

L'ensemble des ligands capables de stabiliser SBP1, c'est-à-dire le Cd^{2+} , le Zn^{2+} , le Ni^{2+} , le Cu^{2+} , le Co^{2+} et le SeO_3^{2-} , apparaissent comme des candidats potentiels pour se lier à cette protéine. Le Zn^{2+} est le ligand qui entraîne la plus forte stabilisation de SBP1.

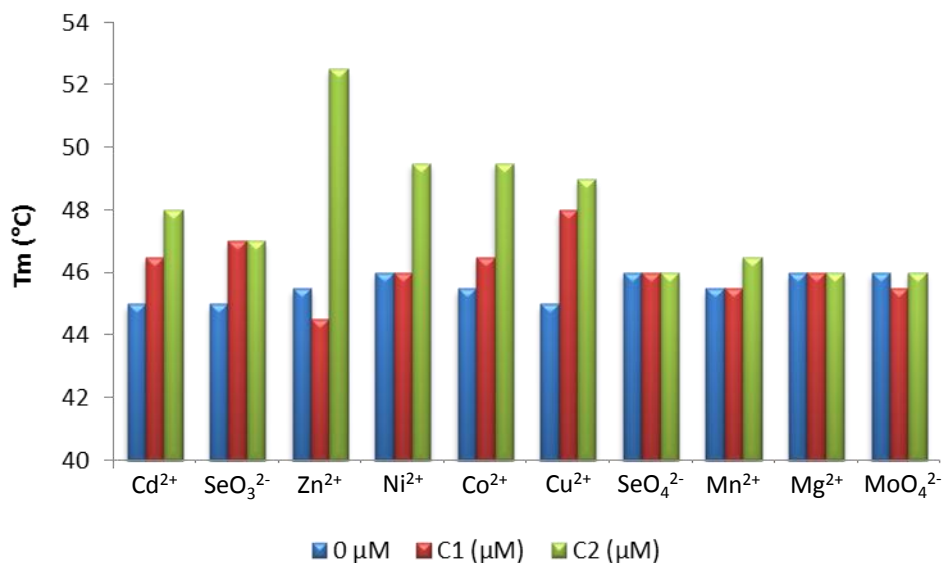
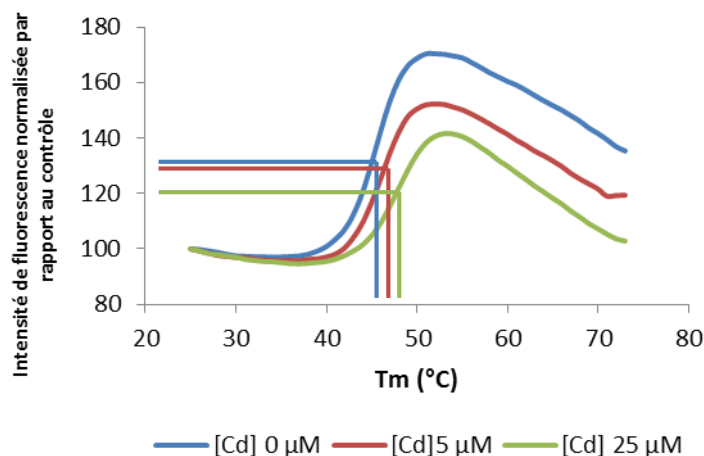
A**B**

Figure 24 : Capacité de différents ligands à stabiliser SBP1. A : Température de dénaturation T_m (°C) de SBP1 en fonction de la concentration de ligand déterminée par Thermal Shift Assay. SBP1 (5 μ M) est incubée avec différentes concentrations de ligand (C1= 5 μ M et C2 = 25 μ M) en présence de sypro orange ©. Les ligands ont été testés sous les formes : Cd^{2+} , SeO_3^{2-} , Zn^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , SeO_4^{2-} , Mn^{2+} , Mg^{2+} et Mo^{2+} (préparées à partir des poudres suivantes : $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$, ZnCl_2 , NiCl_2 , Na_2SeO_3 , Na_2SeO_4 , $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$, CuCl_2 , MnCl_2 , MgCl_2 et Na_2MoO_4). **B : Exemple de l'évolution de l'intensité de fluorescence émise par le sypro orange © en fonction de la température.** SBP1 (5 μ M) est incubée avec du Cd^{2+} (0 μ M, 5 μ M et 25 μ M). La température de dénaturation T_m correspond à la température pour laquelle l'intensité de fluorescence est $I = (I_{\text{maximale}} - I_{\text{initiale}})/2$. Les courbes ont été normalisées par rapport à la fluorescence initiale.

b) Validation de la capacité de liaison à SBP1 de différents ligands

Afin d'étudier si les éléments chimiques capables de stabiliser SBP1 sont effectivement capables de se lier à SBP1, des expériences permettant de quantifier le ratio molaire de liaison ligand/protéine ont été réalisées. Celles-ci consistent à incuber le ligand et SBP1 (15 min à 25°C et sous une agitation orbitale de 300 tr/min) puis à séparer le complexe SBP1-ligand du ligand seul sur une colonne d'exclusion stérique. Ensuite, dans chaque fraction, l'absorbance à 280 nm est mesurée afin de quantifier SBP1 et la technique de l'ICP-MS (spectrométrie de masse couplée à un plasma induit) est utilisée pour quantifier le ligand.

Pour l'ensemble des ligands qui stabilisent SBP1, des expériences indépendantes ont été menées et ont permis de déterminer le ratio de liaison ligand/protéine dans le cas du Cd^{2+} , du SeO_3^{2-} , du Zn^{2+} et du Ni^{2+} . La figure 25 A montre le profil d'élution du mélange ligand/SBP1 pour ces 4 ligands et met en évidence que le passage sur la colonne d'exclusion stérique permet de séparer le complexe ligand/protéine du ligand libre. Le volume d'élution du complexe est compris entre 1,2 et 1,6 mL tandis que le volume d'élution du ligand libre est compris entre 2,4 et 4 mL suivant le ligand. Ces expériences de capacité de liaison montrent que le Se sous sa forme SeO_3^{2-} est capable de se lier à SBP1 avec un ratio molaire Se/SBP1 de 1 (Figure 25 B), tandis que le Cd^{2+} , le Zn^{2+} et le Ni^{2+} se lient à SBP1 avec un ratio molaire métal/SBP1 de 3. Ce résultat suggère l'existence de deux types de ligands : un chargé négativement qui se lie à SBP1 avec un ratio molaire ligand/SBP1 de 1 et ceux chargés positivement qui se lient avec un ratio molaire de 3. Cette expérience d'analyse des capacités de liaison a également été réalisée avec du SeO_4^{2-} qui, d'après les résultats de TSA, ne stabilise pas SBP1. Il a effectivement été montré que ce ligand ne se liait pas à SBP1.

D'après l'analyse de la structure primaire de SBP1 et la comparaison avec les séquences des SBPs de plusieurs organismes photosynthétiques, de mammifères et d'un procaryote de la famille des archées, il a été mis en évidence que différents sites de liaisons à plusieurs ligands métalliques ou non métalliques étaient conservés parmi les SBPs (Figure 14, page 50-51). En déterminant la température de dénaturation de SBP1 en présence de différents ligands, il a été montré que SBP1 était stabilisée par un certain nombre de ligands (Cd^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} et SeO_3^{2-}) et que certains d'entre eux étaient capables de se lier à SBP1 (Cd^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} et SeO_3^{2-}). L'ensemble de ces résultats suggère que la capacité de liaison de SBP1 à différents ligands métalliques (Cd^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+}) ou non métallique (SeO_3^{2-}) pourrait jouer un rôle fondamental dans sa fonction. Ainsi, la suite de l'étude biochimique a porté sur la caractérisation des liaisons SBP1/ligands, particulièrement dans le cas du Cd^{2+} et du SeO_3^{2-} .

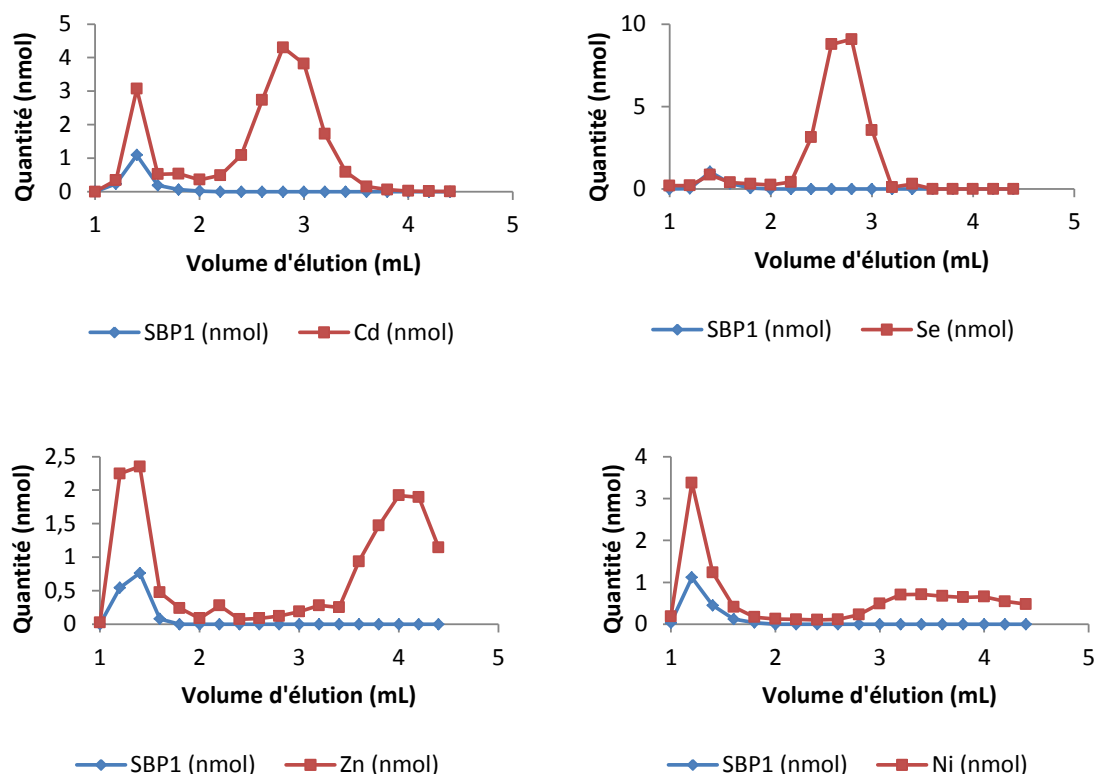
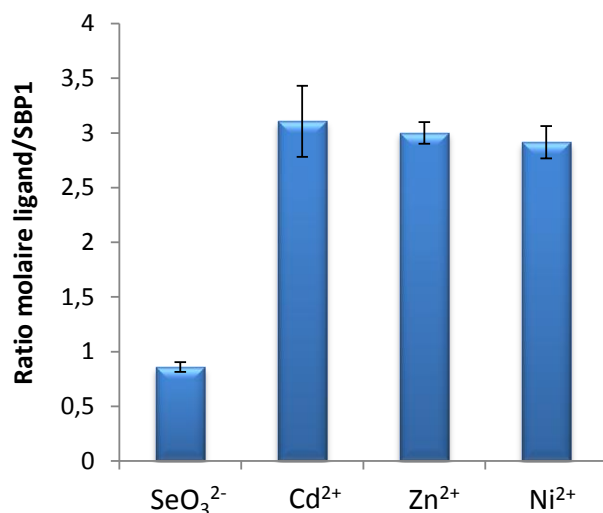
A**B**

Figure 25 : Capacité de liaison in vitro de différents métaux à se lier à SBP1. A : Profil d'élution du mélange SBP1/ligand après passage sur colonne de chromatographie d'exclusion stérique G25. Deux nmoles de SBP1 (80 μM) ont été incubées avec 25 nmoles de ligand (1 mM) dans un volume total de 25 μL (ratio molaire ligand/SBP1=12,5). Le complexe protéine/ligand a été séparé du ligand libre par passage sur colonne d'exclusion stérique G25. En sortie de colonne, la quantité de SBP1 est suivie par l'absorbance à 280 nm et le ligand est quantifié par ICP-MS (isotope 112 pour le Cd, isotope 64 pour le Zn, isotope 60 pour le Ni et isotope 77 pour le Se). **B : Détermination du ratio SBP1/ligand.** Ce ratio a été calculé pour la fraction la plus riche en SBP1. Pour chaque ligand, la valeur obtenue correspond au ratio moyen calculé pour 3 expériences indépendantes.

B. Caractérisation biochimique des liaisons SBP1/ligands et identification des sites de liaison au Cd et au Se

Afin d'obtenir des informations concernant la caractérisation biochimique des liaisons SBP1/ligands et d'identifier les sites de liaison, les deux modèles de ligands choisis ont été le Cd^{2+} et le SeO_3^{2-} car ils présentent des ratios de liaison à SBP1 différents, n'ont pas la même nature chimique, et occupent donc potentiellement des sites de liaison différents.

1. Caractérisation préliminaire des liaisons SBP1/Cd et SBP1/Se

a) *Recherche de l'implication des cystéines de SBP1 dans la liaison au Cd^{2+} et au SeO_3^{2-}*

Afin d'étudier l'implication potentielle des cystéines ainsi que la nature des liaisons protéine/ligand, les cystéines réduites accessibles ont été dosées en absence de ligand (forme apoprotéique) puis en présence de ligand. Ce dosage a été réalisé avec le réactif d'Ellmann (ou acide 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoïque), DTNB). Celui-ci, en se liant aux cystéines libres et accessibles, libère une molécule de NTB (2-nitro-5-thiobenzoate) quantifiable par spectrophotométrie à 412 nm (technique décrite page 70). Les expériences ont été réalisées dans les mêmes conditions que les expériences de capacité de liaison, c'est-à-dire un ratio molaire ligand/SBP1 = 12,5 et 15 minutes d'incubation à 25°C sous une agitation orbitale de 300 tr/min.

(1) **La liaison au Cd^{2+} n'est pas une liaison de forte affinité impliquant des cystéines réduites accessibles**

SBP1 possède sept cystéines et le dosage de cet acide aminé en conditions natives montre que quatre cystéines sont réduites et accessibles (Figure 26). La présence du Cd^{2+} ne modifie pas le nombre de cystéines réduites accessibles dosées. Ce résultat permet de proposer deux hypothèses concernant la liaison du Cd^{2+} à SBP1. La première serait que la liaison du Cd^{2+} à la protéine n'implique pas de cystéines qui restent donc libres et accessibles pour le dosage au réactif d'Ellmann. La deuxième hypothèse serait que la liaison du Cd^{2+} à SBP1 puisse être rompue lors de l'ajout du réactif d'Ellmann qui se lie de façon covalente aux cystéines. Il pourrait donc apparaître comme un compétiteur face au Cd^{2+} . Dans le cas de SBP1, il se pourrait donc que la liaison du Cd^{2+} à la protéine soit une liaison impliquant des cystéines, non covalente, et que cette liaison soit rompue lors de l'ajout du réactif d'Ellmann.

(2) La liaison au SeO_3^{2-} est une liaison covalente ou de forte affinité qui pourrait impliquer deux cystéines réduites accessibles

Le dosage réalisé en présence de SeO_3^{2-} montre que la liaison SBP1-Se entraîne la non-accessibilité de deux cystéines (Figure 26). Cela permet d'émettre deux hypothèses : soit ces deux cystéines sont impliquées dans la liaison SBP1-Se ou bien une seule des cystéines est impliquée dans cette liaison et dans ce cas, un changement de conformation de la protéine entraîne la non-accessibilité de l'autre cystéine. D'après la littérature, il semblerait que les liaisons impliquant des cystéines et du SeO_3^{2-} soient de préférence des liaisons de type S-Se-S (Zakharyan *et al.*, 2005). L'hypothèse d'une liaison impliquant deux cystéines semble donc plus favorable.

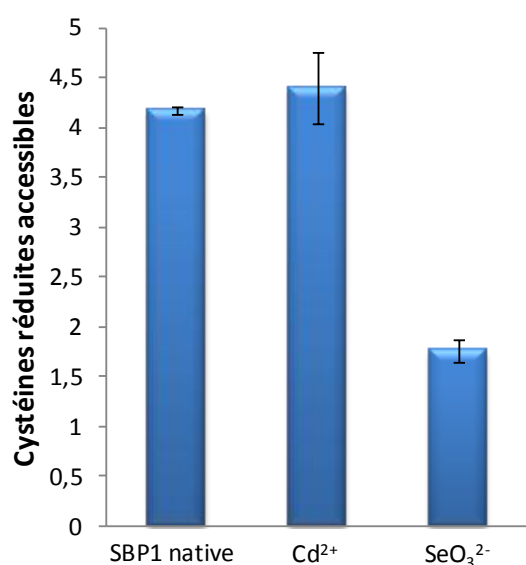


Figure 26 : Influence de la liaison au Cd^{2+} et au SeO_3^{2-} sur le nombre de cystéines réduites accessibles. La concentration de cystéines réduites est dosée avec le réactif d'Ellmann en condition native et en présence de SeO_3^{2-} ou de Cd^{2+} . La concentration de SBP1 est de 8 μM et la concentration de SeO_3^{2-} et de Cd^{2+} est de 100 μM (ratio molaire ligand/SBP1 = 12,5). La valeur obtenue correspond au nombre moyen de cystéines libres accessibles dosées au cours 6 expériences indépendantes.

b) La liaison au Cd^{2+} et au SeO_3^{2-} ne modifie pas les structures secondaires

La liaison à un ligand peut modifier les structures secondaires d'une protéine et donc potentiellement affecter sa structure tertiaire. Concernant l'étude des structures secondaires de SBP1 sous sa forme apoprotéique ou en présence de différents ligands, des analyses de dichroïsme circulaire dans l'UV lointain ont été réalisées en collaboration avec V. Forge du LCBM (Laboratoire de Chimie et Biologie des Métaux, Grenoble). Cette technique spectroscopique permet d'obtenir des informations sur la présence d'hélices alpha, de feuillets bêta et de zones désordonnées au niveau de la protéine (technique décrite page 73-74). Le signal de dichroïsme circulaire a été enregistré pour SBP1 sous sa forme apoprotéique, puis pour SBP1 en présence de SeO_3^{2-} et de Cd^{2+} (Figure 27). Les conditions d'incubation (15 min à 25°C sous une agitation orbitale de 300 tr/min) ainsi que le ratio

molaire ligand/SBP1 de 12,5 sont identiques à ceux utilisés lors des expériences de capacités de liaison. Les spectres obtenus montrent quelques différences vers 210-220 nm pouvant être caractéristiques de modifications au niveau des hélices alpha ou des feuilletts bêta mais celles-ci ne sont pas significatives. Par contre, un décalage des spectres vers 230-240 nm est observé (encadré figure 27) et ce phénomène est caractéristique de modifications au niveau des cystéines. Ceci semble plus marqué dans le cas du Cd^{2+} que dans le cas du SeO_3^{2-} .

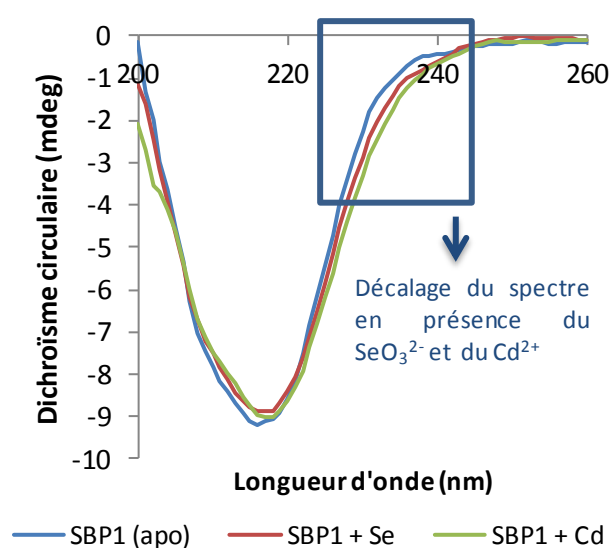


Figure 27 : Influence de la liaison au Cd^{2+} et au SeO_3^{2-} sur les structures secondaires de SBP1. Dichroïsme circulaire en millidegré (mdeg) dans l'UV lointain (200-260 nm) de SBP1, SBP1 + SeO_3^{2-} et SBP1 + Cd^{2+} . La concentration de SBP1 est de 2,7 μM et celle de SeO_3^{2-} et Cd^{2+} de 33,5 μM (ratio molaire ligand/SBP1 = 12,5).

2. Caractérisation biochimique et identification des sites de liaison du Cd^{2+} et du SeO_3^{2-} à SBP1

a) Caractérisation biochimique et identification des sites de liaison du Cd^{2+} à SBP1

(1) Etude de l'affinité du Cd^{2+} pour SBP1

La liaison du Cd^{2+} à SBP1 est une liaison non covalente. Afin de déterminer l'affinité du Cd^{2+} pour SBP1, des analyses de fluorescence ont été effectuées (technique décrite page 74-75). Des mesures de fluorescence des tryptophanes (excitation à 280 nm et émission de 300 à 400 nm) en présence de SBP1 (2,7 μM) après ajouts successifs de Cd^{2+} ont été réalisées jusqu'à atteindre le ratio molaire Cd^{2+} /SBP1 = 12,5. Après normalisation des données de fluorescence obtenues, la représentation graphique de $[\text{SBP1-Cd}]/[\text{SBP1}]_{\text{tot}}$ en fonction de $[\text{Cd}]_{\text{tot}}/[\text{SBP1}]_{\text{tot}}$ (Figure 28 A) a permis de confirmer que le ratio de liaison Cd^{2+} /SBP1 était de 3. En considérant donc qu'il y a trois

sites de liaison (c'est-à-dire que $3 \times [\text{SBP1-Cd}] = [\text{Sites occupés}]$ et que $3 \times [\text{SBP1}] = [\text{Sites}]_{\text{tot}}$), les données expérimentales $[\text{Sites occupés}]/[\text{Sites}]_{\text{tot}}$ ont été représentées en fonction de $[\text{Cd}]_{\text{tot}}$ (Figure 28 B). L'équation reliant ces deux paramètres a été déterminée (Figure 28 C), ce qui a permis, à partir des données expérimentales de fluorescence, d'obtenir la courbe représentée dans la figure 28 B. La constante de dissociation K_D alors estimée est de $2,2 \times 10^{-7} \text{ M} \pm 0,7 \times 10^{-7} \text{ M}$ et la constante d'affinité K_A est de $4,5 \times 10^6 \text{ M}$.

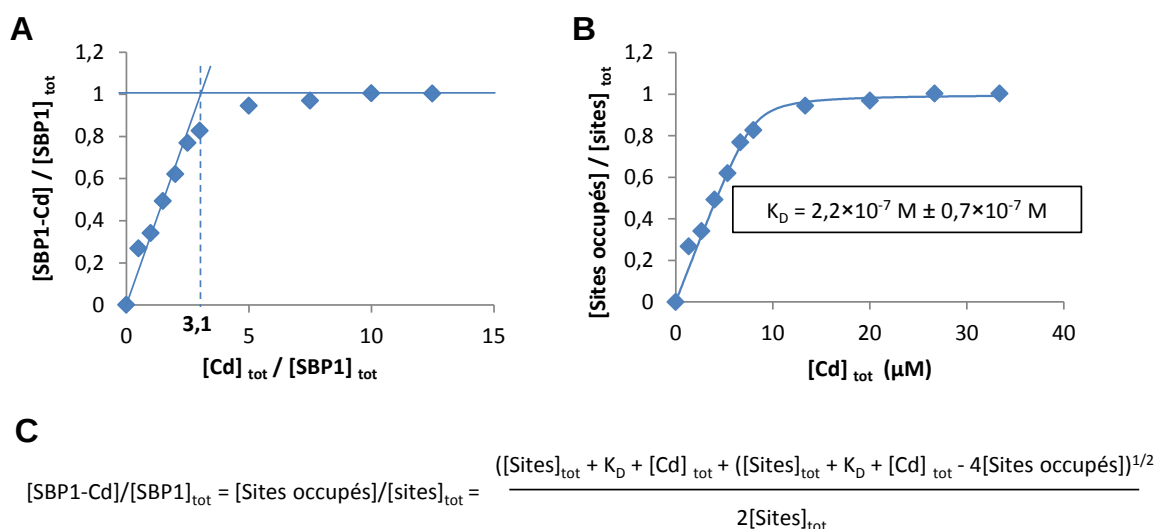


Figure 28 : Analyse de la liaison Cd^{2+} -SBP1 par fluorescence. A : Détermination graphique du nombre de sites de liaison du Cd^{2+} à SBP1. Les mesures ont été réalisées à partir d'une solution de SBP1 à $2,7 \mu\text{M}$. Des ajouts successifs de Cd^{2+} ont été réalisés jusqu'à atteindre un ratio $\text{Cd}^{2+}/\text{SBP1} = 12,5$. Le ratio $[\text{SBP1-Cd}]/[\text{SBP1}]_{\text{tot}}$ est calculé selon la formule: $(I_{\text{fluo}} - I_{\text{fluo(initial)}})/(I_{\text{fluo(final)}} - I_{\text{fluo(initial)}})$. Ce ratio est ensuite représenté en fonction du ratio $[\text{Cd}]_{\text{tot}} / [\text{SBP1}]_{\text{tot}}$, ce qui permet de déterminer graphiquement le ratio de liaison $\text{Cd}^{2+}/\text{SBP1}$. **B : Détermination de l'affinité du Cd^{2+} pour SBP1.** Les mesures ont été réalisées à partir d'une solution de SBP1 à $2,7 \mu\text{M}$. Des ajouts successifs de Cd^{2+} ont été réalisés jusqu'à atteindre un ratio $\text{Cd}^{2+}/\text{SBP1} = 12,5$. Le ratio $[\text{SBP1-Cd}]/[\text{SBP1}]_{\text{tot}}$ est calculé selon la formule : $(I_{\text{fluo}} - I_{\text{fluo(initial)}})/(I_{\text{fluo(final)}} - I_{\text{fluo(initial)}})$. $I_{\text{fluo(initial)}}$ et $I_{\text{fluo(final)}}$ correspondent aux valeurs de fluorescence enregistrées avant le premier ajout de métal et après le dernier ajout de métal respectivement. I_{fluo} correspond à la valeur de la fluorescence enregistrée pour une concentration de métal donnée. Le ratio est ensuite représenté en fonction de $[\text{Cd}]_{\text{tot}}$ en μM d'après la formule C. **C : Formule permettant d'estimer la constante de dissociation K_D grâce aux données obtenues en A.** $3 \times [\text{SBP1-Cd}] = [\text{Sites occupés}]$, $3 \times [\text{SBP1}] = [\text{Sites}]_{\text{tot}}$, $[\text{Cd}]_{\text{tot}} = 0 - 34 \mu\text{M}$.

(2) La liaison Cd^{2+} /SBP1 est une liaison polaire, thermodynamiquement favorable, et qui ne semble pas faire intervenir de molécules d'eau

Afin de compléter les résultats obtenus lors du calcul de l'affinité du Cd^{2+} pour SBP1 et d'avoir des informations sur la nature de la liaison Cd^{2+} -SBP1, des analyses de microcalorimétrie (ou Isothermal Titration Calorimetry, ITC) ont été réalisées (technique décrite page 71-72). Cette technique permet de caractériser plusieurs paramètres thermodynamiques (enthalpie H et entropie S) et ainsi, d'obtenir des informations supplémentaires sur la liaison. En effet, ces deux paramètres thermodynamiques permettent de mieux caractériser une liaison protéine-ligands (nature de l'interaction, nature des acides aminés, présence ou non de molécules d'eau). Pour cela, SBP1 (350 μL à 50 μM) est placée dans une cuve à 25°C et des ajouts successifs d'une solution de Cd^{2+} (ajouts de 1,5 μL à 2 mM) sont effectués. La liaison ligand-SBP1 va modifier la température dans la cuve et l'énergie nécessaire pour replacer la cuve à 25°C va permettre de déterminer les paramètres thermodynamiques. Les expériences ont été réalisées en collaboration avec A. Palencia de l'EMBL (European Molecular Biology Laboratory, Grenoble). Afin d'obtenir un résultat global pour l'ensemble des trois sites de liaison au Cd^{2+} , le nombre de sites de liaisons a été fixé à 1 pour le calcul des paramètres thermodynamiques. La représentation graphique de la titration calorimétrique de SBP1 avec du Cd^{2+} (Figure 29 A) montre que lors de chaque injection de ligand, une émission de chaleur est détectée, ce qui signifie que la réaction provoquée lors de la liaison du Cd^{2+} à SBP1 est exothermique. Les réactions exothermiques sont caractéristiques des liaisons qui font intervenir des acides aminés polaires. Les différents acides aminés pouvant être impliqués dans la liaison au Cd^{2+} sont donc les suivants : cystéine (Cys), aspartate (Asn), glutamine (Gln), sérine (Ser), thréonine (Thr) et tyrosine (Tyr). Les valeurs de ΔH (différence d'enthalpie) et ΔS (différence d'entropie) présentées dans le tableau 9 proviennent de quatre expériences indépendantes. La valeur moyenne de l'énergie de Gibbs ΔG (-14041,3 cal/mol) calculée ($\Delta G = \Delta H - T\Delta S$) d'après les valeurs moyennes de ΔH (-14460 cal/mol) et de $-T\Delta S$ (418,7 cal/mol) est négative, ceci signifie que la réaction est spontanée. Concernant l'enthalpie de liaison, celle-ci est négative (-14460 cal/mol) donc thermodynamiquement favorable et également caractéristique des liaisons polaires. L'entropie est défavorable ($-T\Delta S = 418,7$ cal/mol) car $-T\Delta S$ est positif. En comparant la variation de l'enthalpie ($\Delta H = -14460$ cal/mol) et de l'entropie ($\Delta S = 418,7$ cal/mol), on constate que le facteur enthalpique est beaucoup plus important. La contribution entropique, caractéristique des liaisons hydrophobes et de la désolvatation des sites de liaison est donc négligeable.

Le logiciel (Origin ITC 200) permettant d'analyser les données de microcalorimétrie offre la possibilité de fixer le nombre de sites de liaison à trois pour le calcul des paramètres thermodynamiques (Figure 29 B). Pour chacune des expériences (Tableau 9 B), deux sites ont une

variation d'enthalpie négative (ΔH compris entre -22990 cal/mol et -6837 cal/mol) donc favorable et une variation d'entropie défavorable ou très peu favorable ($-T\Delta S$ compris entre 1550 et -110,5 cal/mol). Le troisième site a une enthalpie défavorable (ΔH compris entre 9127 et 20370 cal/mol) et une entropie favorable ($-T\Delta S$ compris entre -2207,5 et -1162,3 cal/mol). Il se pourrait donc que deux sites de liaison fassent intervenir des interactions polaires tandis que le troisième site pourrait faire intervenir des interactions hydrophobes et/ou un phénomène de désolvatation du site de liaison. L'ensemble de ces données de microcalorimétrie obtenues en fixant le nombre de sites à 3 confirme donc une forte contribution enthalpique lors de la liaison du Cd^{2+} à SBP1.

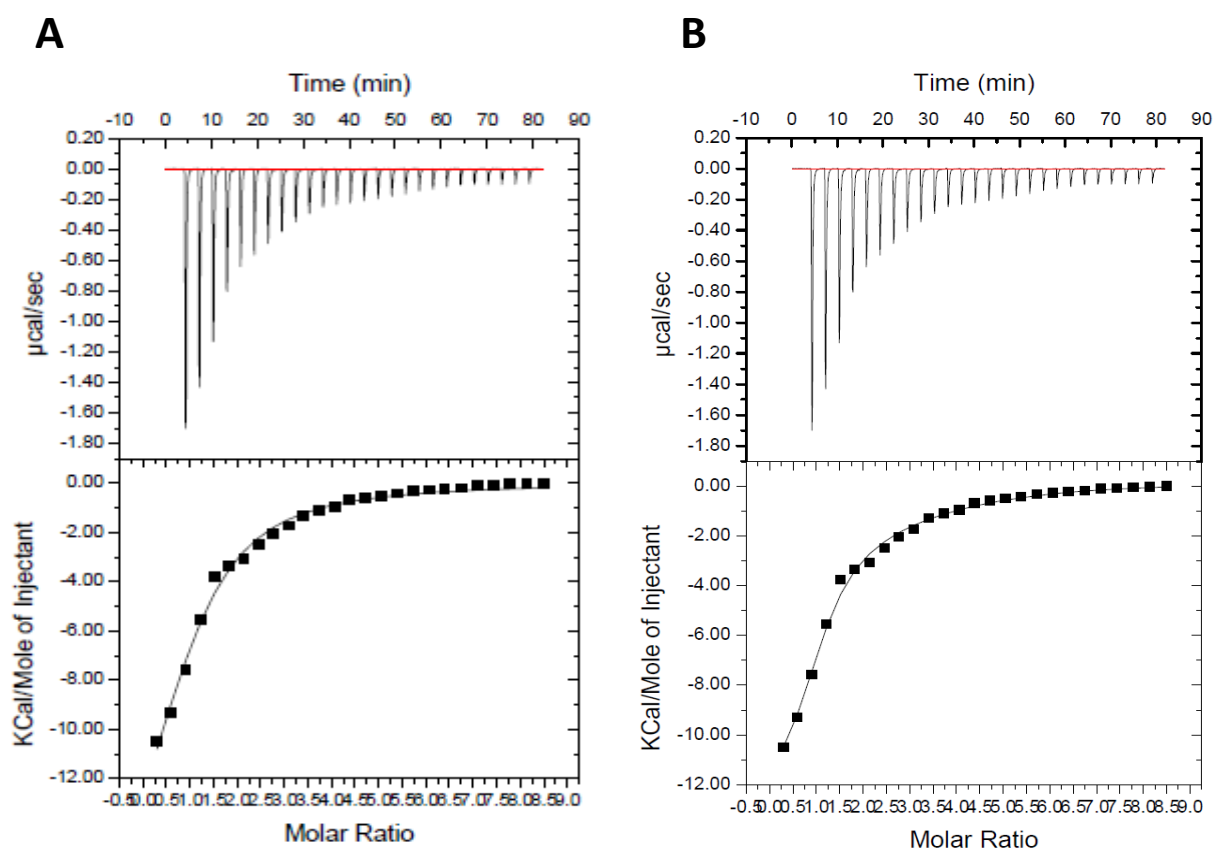


Figure 29 : Titration calorimétrique de SBP1 (50 μM) avec du Cd^{2+} (2mM) à 25°C dans le tampon HEPES 10 mM pH 7,4 et NaCl 150 mM. La partie haute de chaque graphe correspond au dégagement d'énergie associé à chaque injection de Cd^{2+} (1,5 μL) en fonction du temps (minutes). La partie basse du graphe correspond à l'intégration de la chaleur dégagée pour chaque injection en fonction de la concentration de Cd^{2+} . **A :** La courbe de modélisation a été calculée en fixant le nombre de sites de liaison à 1 (logiciel Origin ITC 200). Quatre expériences indépendantes ont été réalisées et une des expériences est représentée. **B :** La courbe de modélisation a été calculée en fixant le nombre de sites de liaison à 3 (logiciel Origin ITC 200). Quatre expériences indépendantes ont été réalisées et une des expériences est représentée.

Tableau 9 : Paramètres thermodynamiques de la liaison Cd^{2+} -SBP1 calculés à partir d'expériences de microcalorimétrie. Les paramètres (ΔH et ΔS) ont été calculés par le logiciel Origin ITC 200. La concentration de SBP1 est de 50 μM et la concentration de Cd^{2+} est de 2 mM. Les expériences ont été réalisées à 25°C. **A : Paramètres calculés dans le cas d'un site de liaison au Cd^{2+} .** Ces paramètres ont été calculés pour quatre répétitions notées ITC 1-4 (l'expérience ITC 1 est présentée Figure 29 A). **B : Paramètres calculés dans le cas de trois sites de liaison au Cd^{2+} .** Ces paramètres ont été calculés pour quatre répétitions notées ITC 1-4_site 1-3 (L'expérience ITC 1 est présentée Figure 29 B).

A

	ΔH (cal/mol)	ΔS (cal/mol/deg)	$-T\Delta S$ (cal/mol)
ITC 1	-19620 $\pm$ 492	-45,3	1132,5
ITC 2	-17750 $\pm$ 480	-40,1	1002,5
ITC 3	-10610 $\pm$ 682	-14,8	370
ITC 4	-9862 $\pm$ 768	-13,1	327,5
ITC moyen	-14460 $\pm$ 4947	-28,3 $\pm$ 16,7	708,1 $\pm$ 418,7

B

	ΔH (cal/mol)	ΔS (cal/mol/deg)	$-T\Delta S$ (cal/mol)
ITC 1 _ site 1	-13350 $\pm$ 822	-22	550
ITC 1 _ site 2	-22990 $\pm$ 8310	-62	1550
ITC 1 _ site 3	20370 $\pm$ 8380	88,3	-2207,5
ITC 2 _ site 1	-6479 $\pm$ 115	4,42	-110,5
ITC 2 _ site 2	-13550 $\pm$ 1100	-27,4	685
ITC 2 _ site 3	9127 $\pm$ 1980	46,5	-1162,5
ITC 3 _ site 1	-13330 $\pm$ 3670	-24,4	610
ITC 3 _ site 2	9899 $\pm$ 7060	51,4	-1285
ITC 3 _ site 3	-6837 $\pm$ 4190	-1,84	46
ITC 4 _ site 1	-11450 $\pm$ 2770	-17,9	447,5
ITC 4 _ site 2	9854 $\pm$ 4560	52,9	-1322,5
ITC 4 _ site 3	-7532 $\pm$ 2600	3,44	-86

(3) La liaison Cd^{2+} /SBP1 implique une forte majorité de résidus soufrés

Afin de caractériser plus précisément les acides aminés impliqués dans la liaison au Cd^{2+} , des expériences de rayonnement synchrotron (XANES : absorption des rayons X au voisinage du seuil d'absorption; et EXAFS : absorption des rayons X au-delà du seuil d'absorption) ont été réalisées en collaboration avec D. Testemale de l'ESRF (European Radiation Synchrotron Facility, Grenoble). Cette technique spectroscopique d'absorption des rayons X (technique décrite page 75 à 77) permet de caractériser le degré d'oxydation et l'environnement (type et nombre de voisins, distances interatomiques) d'un atome donné. Le spectre du Cd^{2+} lorsque celui-ci est lié à SBP1 a été enregistré ainsi que les spectres de différents composés de référence du Cd^{2+} . Ensuite, en comparant le spectre de l'élément lié à la protéine avec les spectres de référence, il est possible de déterminer l'environnement du Cd^{2+} dans la protéine. SBP1 a été incubée en présence de métal dans les mêmes conditions que lors des expériences de capacité de liaison (ratio Cd^{2+} /SBP1 = 12,5, incubation pendant 15 min à 25°C sous une agitation orbitale de 300 tr/min). Les différents étalons choisis ont été les suivants : Cd-histidine (liaison du Cd avec des groupements imidazole), Cd-cystéine (liaison du Cd avec 4 groupements thiol), Cd-malate (liaison du Cd avec des groupements carboxyles) et Cd-MT (liaison du Cd aux cystéines des métallothionéines). Dans ce dernier cas, le Cd est présent sous forme de clusters Cd_3S_9 (domaine β) et Cd_4S_{11} (domaine α), chaque atome de Cd étant lié à 4 S (Chan *et al.*, 2005).

L'analyse des résultats a été réalisée en collaboration avec G. Sarret d'ISTerre (Institut des Sciences de la Terre, Grenoble). Le spectre XANES (Figure 30 A) de SBP1 ayant lié du Cd^{2+} dans des conditions similaires à celles des expériences de capacité de liaison est identique au spectre XANES des références Cd-MT et Cd-cystéine. La géométrie autour du Cd^{2+} lié à SBP1 est donc très proche de celle du Cd^{2+} dans les métallothionéines ou en présence de cystéines. De même, la comparaison des spectres EXAFS (Figure 30 B) et de sa transformée de Fourier (Figure 30 C) montre que les spectres les plus proches de Cd_SBP1 sont ceux de Cd-MT et Cd-Cystéine, ce qui indique que les distances interatomiques et le nombre de voisins sont très proches. L'environnement atomique direct de chacun des trois atomes de Cd^{2+} liés à SBP1 semble donc être très majoritairement composé de quatre résidus soufrés et les distances interatomiques entre le Cd^{2+} et les atomes de soufre sont très proches de celles observées dans le cas des métallothionéines.

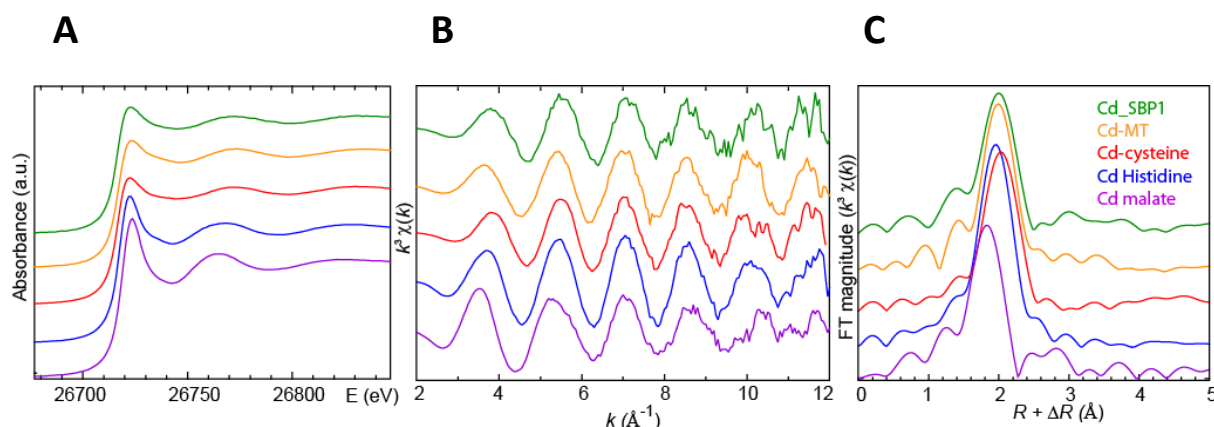


Figure 30 : Spectres XANES (A), EXAFS (B) et transformée de Fourier (C) au seuil K du Cd de quatre références et du Cd²⁺ lié à SBP1. Les différents standards utilisés sont les suivants : Cd-MT (Cd lié aux métallothionéines); Cd-cystéine : 10 mM Cd(NO₃)₂, 100 mM cystéine, pH = 3,5; Cd-histidine : 10 mM Cd(NO₃)₂, 100 mM histidine, pH = 5,5; Cd-malate : 10 mM Cd(NO₃)₂, 100 mM malate, pH = 5,5. L'échantillon Cd_SBP1 a été préparé de la façon suivante : 26,8 nmoles de SBP1 (80 μM) ont été incubées avec 335 nmoles de ligand (1 mM) dans un volume total de 335 μL (ratio molaire SBP1/ligand = 12,5). Le complexe protéine/ligand été séparé du ligand libre par passage sur colonne d'exclusion stérique G25. En sortie de colonne, la quantité de SBP1 est suivie par l'absorbance à 280 nm et le Cd²⁺ est quantifié par ICP-MS (isotope 112 pour le Cd). Le ratio de liaison Cd²⁺/SBP1 est de 3. L'échantillon analysé contient 100 ppm de Cd²⁺.

Afin d'obtenir des informations supplémentaires sur les paramètres de liaison entre le Cd²⁺ et SBP1, la première couche de coordination a été simulée par une couche de soufre (S) seule, un mélange soufre + oxygène (S + O) et un mélange soufre + azote (S + N) (Figure 31, Tableau 10). Les résultats confirment que l'environnement direct des atomes de Cd²⁺ est composé majoritairement d'atomes de S, mais ils suggèrent que l'existence d'une contribution provenant d'atomes d'azote (N) ou d'oxygène (O) pourrait exister. En effet, les spectres obtenus pour les mélanges Cd-S + Cd-O et Cd-S + Cd-N sont plus proches du spectre expérimental que le spectre Cd-S. Les résultats obtenus pour Cd-S + Cd-O et Cd-S + Cd-N sont très proches, il n'est donc pas possible de distinguer la contribution O de la contribution N. En moyennant le nombre d'atome n de S et de O ou de N présents dans la première couronne, il y aurait 3,1 atomes de S et 0,75 atome de O ou de N. Ceci représente donc 80 % d'atomes de S ($3,1/(3,1+0,75)=0,8$) et 20 % d'atomes de O ou de N ($0,75/(3,1+0,75)=0,2$). Si les 3 sites de liaison au Cd²⁺ sont isolés et que chacun de ces sites a 4 atomes dans sa sphère de coordination, cela fait 12 atomes impliqués dans la coordination du Cd²⁺. Dans ce cas, il y aurait entre 9 et 10 ligands soufrés et entre 2 et 3 ligands O ou N impliqués dans la liaison au Cd²⁺. Les distances interatomiques ont pu être calculées et les atomes de S sont situés à 2,51 Å du Cd²⁺ tandis que les atomes de O ou de N sont situés à 2,18 Å. Concernant la nature des acides aminés impliqués dans la liaison au Cd²⁺, les ligands S peuvent correspondre à des cystéines mais aussi à des méthionines (Berreau *et al.*, 2000). Les ligands N pourraient être des histidines (groupement imidazole) souvent

décrites dans la littérature comme un acide aminé impliqué dans les liaisons métalliques. Les ligands O pourraient correspondre à des molécules d'H₂O.

Il est intéressant de noter que dans le cas du Cd²⁺ lié aux métallothionéines, en observant la transformée de Fourier, il semblerait qu'il y ait également une contribution de O ou de N. En théorie, cette contribution ne devrait pas exister car la liaison au Cd²⁺ se fait *via* quatre cystéines. Ceci peut être dû à une très faible quantité de Cd²⁺ non lié aux métallothionéines.

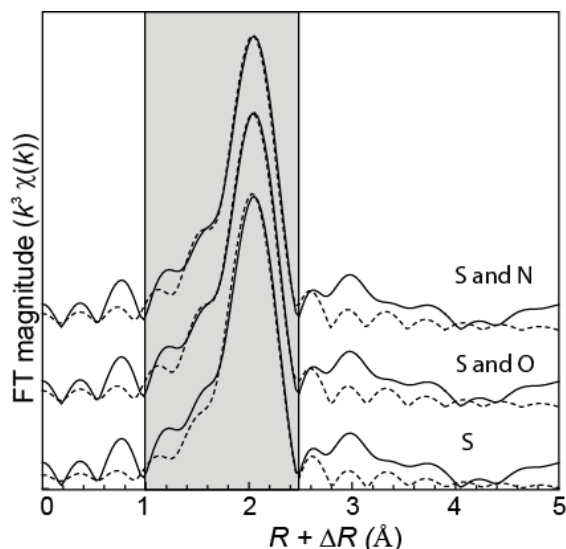


Figure 31 : Transformées de Fourier obtenue à partir du spectre EXAFS du Cd²⁺ lié à SBP1 (trait plein). Les simulations ont été réalisées pour des valeurs de k allant de 3,37 à 11,86 Å⁻¹ et des valeurs de R allant de 1 à 2,77 Å. Les paramètres des différentes simulations de la première couche de coordination (traits pointillés) sont présentés dans le tableau 10.

Tableau 10 : Paramètres structuraux de la première couche d'atomes liée au Cd²⁺ lorsque le Cd²⁺ est lié à SBP1. Les différentes couches testées sont les suivantes : uniquement des atomes de S, mélange d'atomes de S et de N, mélange d'atomes de S et de O. n : nombre d'atomes, R : distance interatomique en Å, σ^2 : facteur de Debye-Waller en Å², R -factor : valeur résiduelle entre la modélisation et le spectre expérimental.

	atome	n	R (Å)	σ^2 (Å ²)	R factor
Cd-S	S	3,7	2,5	0,0071	0,022
Cd-S + Cd-N	S	3,2	2,5	0,0056	0,0158
	N	0,9	2,2	0,0056	
Cd-S + Cd-O	S	3,0	2,5	0,0053	0,0154
	O	0,7	2,2	0,0053	

b) Identification du site de liaison du Se à SBP1

(1) Le SeO_3^{2-} se lie à SBP1 de façon covalente sous sa forme Se

Afin de confirmer une potentielle liaison covalente entre SBP1 et le Se et d'identifier les acides aminés impliqués dans cette liaison, des expériences utilisant la spectrométrie de masse ont été menées en collaboration avec S. Kieffer-Jaquinod et A. Kraut de la plateforme EDyP (Etude de la Dynamique des Protéomes, Grenoble).

Afin de confirmer la liaison du Se à SBP1 ainsi que le ratio de liaison, une analyse ES-MS (Spectrométrie de Masse ElectroSpray) sur protéine entière a été réalisée sur l'apoprotéine SBP1 (Figure 32 I) et sur la protéine SBP1 ayant été incubée en présence SeO_3^{2-} pendant 15 min à 25°C sous une agitation orbitale de 300 tr/min (le complexe SBP1-Se a été séparé du métal libre sur une colonne d'exclusion stérique) (Figure 32 II). Le spectre obtenu montre que pour les différents rapports m/z de la protéine ayant été incubée en présence de SeO_3^{2-} , un adduit est observé (Figure 32 A et B). La déconvolution des spectres (Figure 32 A' et B') montre que la masse moyenne de cet adduit est de 77 Da, pouvant correspondre à un adduit de Se de masse moyenne 79 Da moins la masse de deux atomes d'hydrogène. L'analyse sur protéine entière suggère qu'il y a un gain de masse d'un atome de Se par protéine SBP1 et que la liaison SBP1-Se entraîne la réduction du SeO_3^{2-} . Le spectre déconvolué de la protéine SBP1 incubée en présence de SeO_3^{2-} met en évidence l'existence de deux espèces en solution : SBP1 sous sa forme apoprotéique et SBP1 ayant lié du Se. La deuxième forme de SBP1 est très largement majoritaire, ce qui confirme les résultats obtenus lors de l'analyse de la capacité de liaison de SBP1 à lier de façon covalente du Se avec un ratio Se/SBP1 proche de 1.

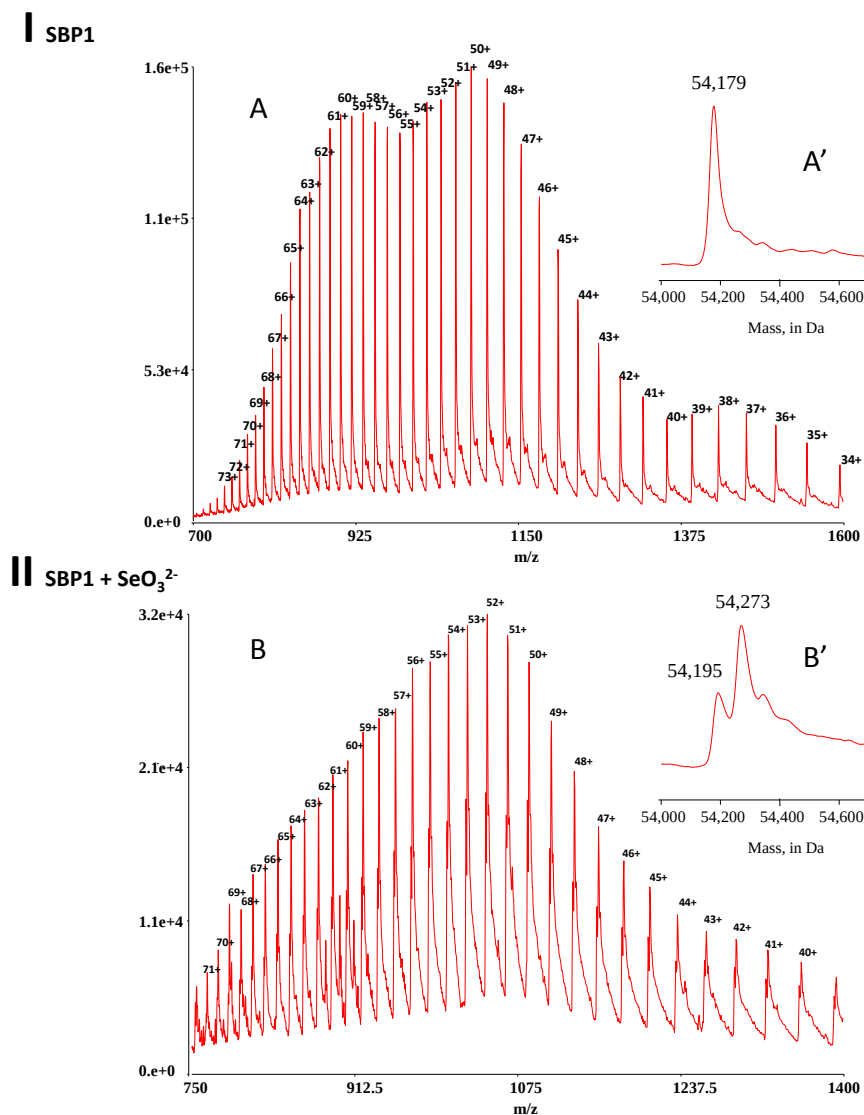


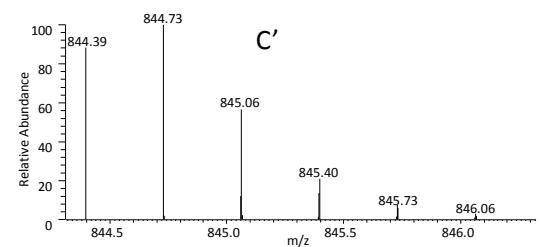
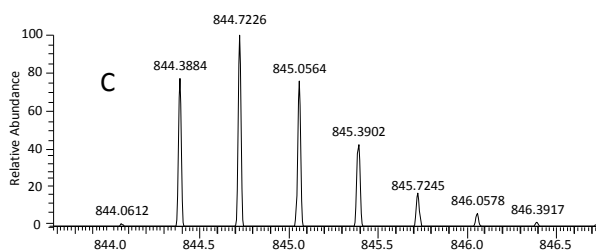
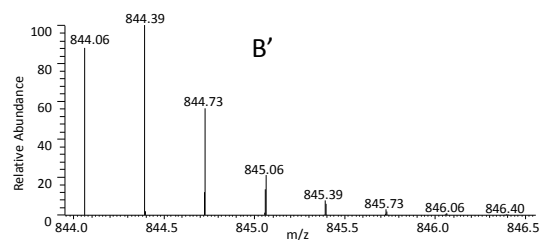
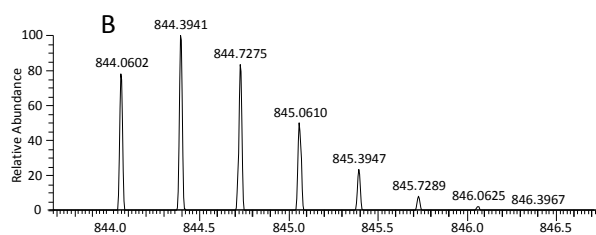
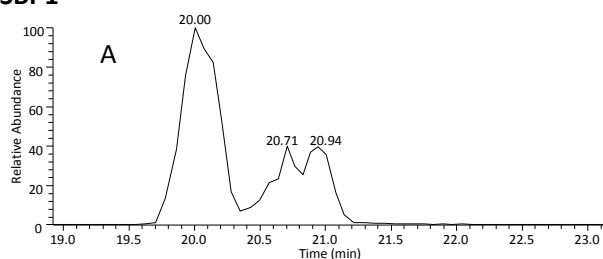
Figure 32 : Identification d'un adduit de 77 Da sur SBP1 lorsque celle-ci est incubée en présence de SeO₃²⁻. Profil d'élution lorsque SBP1 n'a pas lié (I) ou a lié du SeO₃²⁻ (II). Le complexe SBP1-Se a été préparé de la façon suivante : deux nmoles de SBP1 (80 μM) ont été incubées avec 25 nmoles de SeO₃²⁻ (1 mM) dans un volume total de 25 μL (ratio molaire SeO₃²⁻/SBP1 = 12,5), le complexe protéine/SeO₃²⁻ été séparé du SeO₃²⁻ libre par passage sur colonne d'exclusion stérique G25, puis, en sortie de colonne, la quantité de SBP1 est suivie par l'absorbance à 280 nm. La fraction la plus riche en SBP1 est analysée par spectrométrie de masse ES/MS. **A et B : profils de distributions de charges. **A' et B'** : Spectres déconvolués de A et B. **A'** : La masse moyenne attendue est de 54,185 kDa, la masse obtenue est de 54,179 kDa, le pic déconvolué correspond donc à SBP1. **B'** : Deux pics sont observés. Le pic à 54,195 kDa correspond à SBP1 et le pic fortement majoritaire à 54,273 kDa correspond à SBP1 + Se.**

(2) Le peptide impliqué dans la liaison au Se contient le motif C²¹-C²²

Ensuite, afin de cibler au mieux la zone de la séquence au niveau de laquelle se fait la liaison au Se, une analyse par spectrométrie de masse en tandem (MS/MS) a été menée. Cette technique a permis d'identifier, après digestion de la protéine à la chymotrypsine, un peptide qui, en présence de SeO_3^{2-} , présentait différents gains de masse correspondant aux différentes masses mono-isotopiques du Se (Figure 33). Ce peptide va du premier au vingt-quatrième acide aminé de la protéine (M¹-Y²⁴) et contient deux cystéines : la cystéine 21 et la cystéine 22 pouvant potentiellement être impliquées dans une liaison covalente avec le Se. Le profil d'élution en LC/MS (Chromatographie Liquide / Spectrométrie de Masse) de ce peptide montre que celui-ci est présent sous deux formes différentes : une forme normale et une forme déamidée. En effet, il est courant d'observer une déamidation partielle des résidus asparagine lorsqu'ils se trouvent situés directement avant une glycine (Hao *et al.*, 2011), ce qui est le cas pour SBP1 (N¹⁵-G¹⁶). Cette modification entraîne un incrément de masse de +0,98 Da (correspondant à la substitution $\text{NH}_3/\text{H}_2\text{O}$). Les massifs isotopiques expérimentaux (Figure 33 B et C) et théoriques (Figure 33 B' et C') de ce peptide déamidé ou non sont identiques. Dans le cas de la protéine incubée en présence de SeO_3^{2-} et pour une masse monoisotopique de 79,9 Da qui est l'espèce majoritaire, deux gains de masse différents sont observés (77,9 Da et 78,9 Da). Le gain de masse de 77,9 Da correspond au cas du peptide non déamidé pour lequel il y a un atome de Se lié et une perte de 2 hydrogènes (77,9 Da = 79,9 Da (+Se) - 2 Da (-2H)). Dans le cas du peptide déamidé, l'incrément de masse est de 0,98 Da par rapport au peptide non déamidé, le gain de 77,9 Da correspond donc également au gain d'un atome de Se et à une perte de 2 hydrogènes (78,9 Da = 79,9 Da (+Se) - 2 Da (-2H) + 0,98 Da (-N/+O,-H dû à la déamidation). Ceci est confirmé par la comparaison entre les massifs isotopiques expérimentaux (Figure 33 C et D) et théoriques (Figure 33 C' et D') du peptide M¹-Y²⁴ déamidé ou non.

Le spectre de masse MS/MS réalisé en basse résolution ne permet pas d'identifier formellement les acides aminés impliqués dans la liaison avec l'atome de Se. Par contre la masse exacte du peptide, le profil isotopique ainsi que la perte de 2H sont assez d'arguments pour laisser penser que la liaison du Se sur la protéine se fait bien sur les deux cystéines 21 et 22.

SBP1



SBP1 + SeO₃²⁻

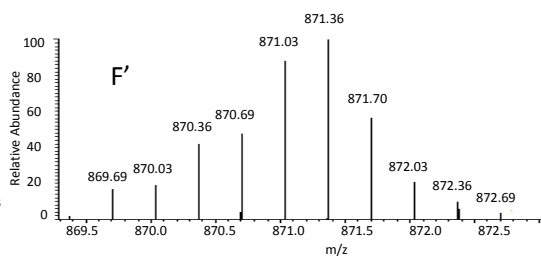
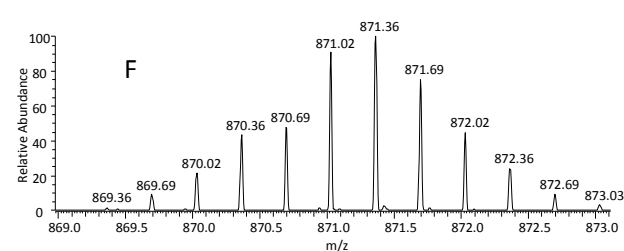
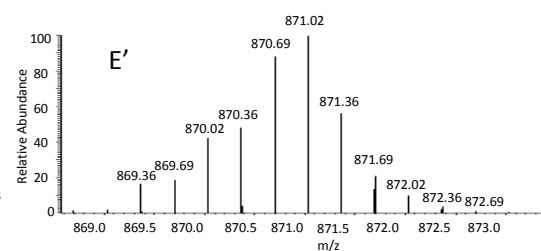
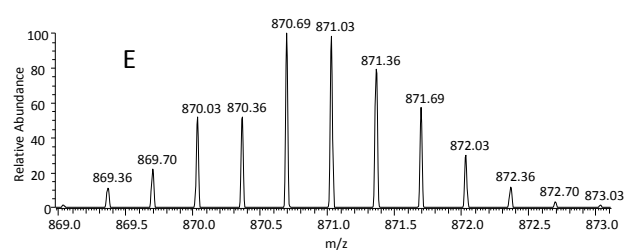
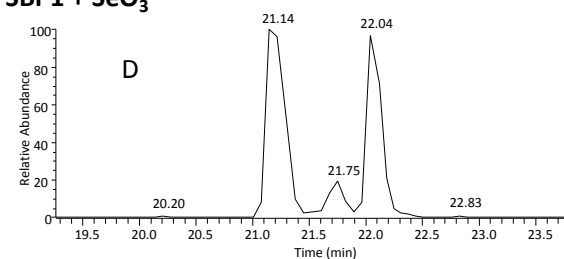


Figure 33 : Identification d'un adduit de la masse du Se sur le peptide M^1-Y^{24} de SBP1 lorsque celle-ci est incubée en présence de SeO_3^{2-} . A et D : Profil d'élution du peptide M^1-Y^{24} lorsque SBP1 n'a pas lié (I) ou a lié (II) du SeO_3^{2-} . Le complexe SBP1-Se a été préparé de la façon suivante : deux nmoles de SBP1 (80 μM) ont été incubées avec 25 nmoles de SeO_3^{2-} (1 mM) dans un volume total de 25 μL (ratio molaire $SeO_3^{2-}/SBP1 = 12,5$), le complexe protéine/ SeO_3^{2-} a été séparé du SeO_3^{2-} libre par passage sur colonne d'exclusion stérique G25, puis, en sortie de colonne, la quantité de SBP1 est suivie par l'absorbance à 280 nm. La fraction la plus riche en SBP1 est analysée par spectrométrie de masse MS/MS. **A :** Le pic à 20 min correspond au peptide M^1-Y^{24} et les 2 pics à 20,71 min et 20,94 min correspondent au peptide déamidé. La déamidation de l'asparagine N^{15} est un phénomène courant lorsque celle-ci est suivie d'une glycine. **D :** Le pic à 21,14 min correspond au chromatogramme d'ion du peptide M^1-Y^{24} et le pic à 22,04 min correspond à celui du peptide déamidé. **Massif isotopique du spectre m/z du peptide M^1-Y^{24} de SBP1 n'ayant pas lié (I) et ayant lié (II) SeO_3^{2-} . B et E : SBP1 non déamidée. B' et E' : massifs isotopiques théoriques (pour $z=3$). C et F : SBP1 déamidée C' et F' : massifs théoriques (pour $z=3$).**

(3) La liaison SBP1/Se est de type R-S-Se-S-R

Afin de valider l'hypothèse d'une liaison de type R-S-Se-S-R, des analyses spectroscopiques d'absorption par rayon X utilisant le rayonnement synchrotron ont été réalisées. Dans le cas de SBP1 ayant été incubée en présence de SeO_3^{2-} , différents standards ont été utilisés afin de caractériser la liaison SBP1-Se. Ces standards sont le sélénodiglutathion SediGSH (liaison de type R-S-Se-S-R, les soufres proviennent de cystéines), le sulfure de sélénium SeS_2 (liaison de type S-Se-S dans une structure minérale), le sélénite de sodium SeO_3^{2-} (forme chimique initiale du Se lorsqu'il est mis en contact avec SBP1 lors des expériences de capacité de liaison), la séléno-méthylcystéine (liaison de type C-Se-C, le Se est incorporé dans une chaîne aliphatique) et le sélénium élémentaire $Se^{(0)}$ (le Se ne possède aucun atome coordonné).

Le spectre XANES de SBP1 ayant été incubée en présence de SeO_3^{2-} dans des conditions similaires à celles des expériences de capacité de liaison (incubation pendant 15min à 25°C sous une agitation orbitale de 300 tr/min, le ratio de liaison $Se/SBP1 = 1$ a été vérifié après séparation du complexe $SBP1/SeO_3^{2-}$ du SeO_3^{2-} non lié) ne correspond pas au spectre du SeO_3^{2-} . Ceci confirme le résultat obtenu en spectrométrie de masse, c'est-à-dire que le degré d'oxydation du Se a été modifié. Le maximum d'absorbance du spectre XANES, appelé raie blanche, s'est décalé vers une plus basse énergie. Ce phénomène est caractéristique d'une réduction du SeO_3^{2-} . Le spectre de la protéine ayant été incubée en présence de SeO_3^{2-} (spectre Se_SBP1) correspond au spectre XANES du sélénodiglutathion (Figure 34). Les spectres du sulfure de sélénium et de la sélénométhylcystéine ne sont pas similaires à ceux de SBP1. En effet, en réalisant une combinaison linéaire à une seule composante avec le sélénodiglutathion, le facteur R (valeur résiduelle entre la simulation et le spectre expérimental) est de 0,000676. En réalisant des combinaisons linéaires permettant d'apporter la contribution du SeO_3^{2-} , du SeS_2 , de la séléno-méthylcystéine ou du Se^0 , le facteur R

n'est pas significativement amélioré, la simulation n'est donc pas meilleure en présence de ces autres composés. La liaison au Se se fait vraisemblablement de la même façon que dans le cas du SediGSH, c'est-à-dire *via* deux soufres provenant de cystéines (liaison de type R-S-Se-S-R). Le peptide identifié en spectrométrie de masse (Figure 33) impliqué dans la liaison d'un atome de Se possède deux cystéines (cystéines 21 et 22). Cette liaison entraîne également la perte de deux hydrogènes au niveau de ce peptide, ce qui confirme l'implication de deux cystéines. La liaison du Se à SBP1 est donc une liaison covalente impliquant l'atome de S de chacune des cystéines 21 et 22 pour former une liaison R-S-Se-S-R.

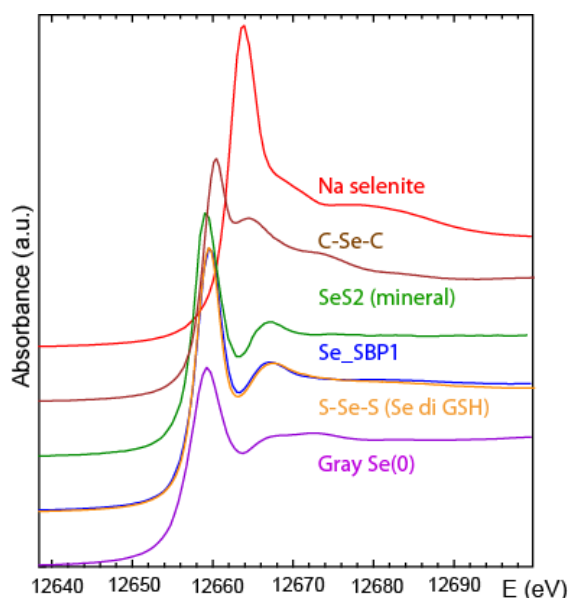


Figure 34 : Spectres XANES au seuil K du Se de 5 standards et du Se lié à SBP1. Les différents standards utilisés sont les suivants : Na selenite : 29 mM SeO_3^{2-} ; C-Se-C : 27 mM Sélénio-méthylcystéine; SeS_2 (minéral) : 35 mM SeS_2 ; S-Se-S : 10 mM selenodiglutathion (Se di GSH); Gray Se (0) : 79 mM Se Gris. Se_SBP1 : 107 nmoles de SBP1 (80 μM) ont été incubées avec 1338 nmoles de ligand (1 mM) dans un volume total de 1338 μL (ratio molaire SBP1/ligand = 12,5). Le complexe protéine/ligand été séparé du ligand libre par passage sur colonne d'exclusion stérique G25. En sortie de colonne, la quantité de SBP1 est suivie par l'absorbance à 280 nm et le sélénium est quantifié par ICP-MS (isotope 77 pour le Se). Le ratio de liaison Se/SBP1 est de 1. L'échantillon analysé contient 1,16 mM SBP1 et 1,16 mM Se. La quantité finale de Se est de 100 ppm.

C. Discussion

Chez *Arabidopsis thaliana*, la surexpression de SBP1 augmente la tolérance au Cd^{2+} et SBP1 est capable de lier du Cd^{2+} avec un ratio $\text{Cd}^{2+}/\text{SBP1}$ de 3 (Dutilleul *et al.*, 2008). Cette protéine apparait donc comme un acteur potentiel dans la détoxification du Cd^{2+} *via* ses propriétés de chélation à ce métal. De plus, l'analyse de la séquence primaire de SBP1 et sa comparaison avec la séquence des SBPs d'autres organismes, particulièrement les organismes photosynthétiques, met en évidence la conservation d'acides aminés (cystéines et histidines) impliqués dans des sites de liaison potentiels aux métaux. Chez les mammifères, SBP1 a été caractérisée en tant que protéine capable de lier le Se sans que celui-ci soit incorporé au niveau acides aminés tels que la sélénocystéine et la sélénométhionine. Cette liaison au Se est donc un évènement post-traductionnel. L'ensemble de ces données bibliographiques suggère que SBP1 est impliquée dans la liaison à différents ligands.

Analyse globale des capacités de liaison de différents ligands à SBP1

Afin de déterminer si SBP1 est capable de lier ou non d'autres ligands, en particulier des métaux et le Se, un criblage permettant de déterminer si les ligands stabilisent SBP1 a été réalisé. Le principe physique de ce criblage, c'est-à-dire l'analyse de la thermostabilité par fluorescence, a été utilisé par l'équipe de S. Giuliani (Giuliani *et al.*, 2011) pour cribler différents ligands (métaux, composés aromatiques, lipides, acides aminés, phosphate, urée et polyamide) capables ou non de se lier à différents transporteurs ABC chez *Rhodopseudomonas palustris*. Dans le cas de SBP1, les ligands capables de stabiliser la protéine sont le Cd^{2+} , le Zn^{2+} , le Ni^{2+} , le Cu^{2+} , le Co^{2+} et le SeO_3^{2-} . Il est intéressant de noter que le Zn^{2+} est le ligand qui entraîne la plus forte augmentation de T_m , ceci pourra être utilisé ultérieurement lors du choix des conditions de cristallisation de la protéine SBP1. Des expériences de capacité de liaison ont montré que le Se se lie à SBP1 avec un ratio molaire Se/SBP1 de 1 et que le Cd^{2+} , le Zn^{2+} et le Ni^{2+} se lient à SBP1 avec un ratio molaire de liaison métal/SBP1 de 3. Chez *Arabidopsis thaliana*, SBP1 possède donc la même propriété que chez les mammifères, c'est-à-dire la capacité à lier du Se lorsque celui-ci est initialement sous la forme chimique SeO_3^{2-} (Bansal *et al.*, 1990). Il est intéressant de noter que chez les mammifères, le ratio de liaison Se/SBP1 n'est pas décrit dans la littérature. Le Cd^{2+} , le Zn^{2+} et le Ni^{2+} se lient à SBP1 avec un ratio métal/SBP1 identique. Ces trois métaux étant divalents, on peut se demander si les sites de liaisons sont identiques. Concernant leur géométrie de coordination, une étude a été réalisée en 1998 (Rulisek *et al.*, 1998) sur 100 métalloprotéines et 3000 petites molécules contenant des métaux de transition issus de la Protein Data Bank et du Cambridge Structural Database. Les résultats ont montré que le Zn^{2+} se coordonnait préférentiellement de façon tétraédrale tandis que le Ni^{2+} se coordonnait plutôt de façon octaédrale. Le Cd^{2+} peut se coordonner aussi bien de manière tétraédrale qu'octaédrale. Un des phénomènes connu de la toxicité du Cd^{2+} vient du fait qu'il puisse se substituer à la place de Zn^{2+} (Moulis, 2010) et rentrer *via* les transporteurs de métaux divalents notamment ceux du Zn^{2+} (Oomen *et al.*, 2009). Ceci renforce l'hypothèse de sites de liaison identiques pour le Cd^{2+} et le Zn^{2+} tous deux capables de se coordonner tétraédralement. Concernant le Ni^{2+} , la différence observée au niveau de la symétrie de coordination laisse penser que les sites de liaison ne seraient pas les mêmes.

Afin de caractériser plus précisément la liaison de SBP1 aux différents ligands étudiés précédemment, nous nous sommes focalisés sur le Cd^{2+} et le SeO_3^{2-} , éléments toxiques chez la plante.

La liaison Cd-SBP1 est une réaction spontanée qui fait intervenir une forte majorité de résidus soufrés

Le ratio molaire de liaison Cd^{2+} /SBP1 de 3 a été publié (Dutilleul *et al.*, 2008) et confirmé dans cette étude par des analyses de fluorescence. Les expériences de microcalorimétrie ont montré que la liaison SBP1-Cd était spontanée et thermodynamiquement favorable. L'utilisation de la fluorescence a permis de déterminer que le Cd^{2+} a un K_D de $2,2 \times 10^{-7} \text{ M} \pm 0,7 \times 10^{-7} \text{ M}$ pour SBP1. Un K_D supérieur ou de l'ordre du micromolaire correspond à une interaction « accidentelle » (Xiao *et al.*, 2010). En effet, en règle générale, les interactions métal/protéines dans le cas des métalloprotéines et métalloenzymes spécifiques ont une affinité de l'ordre ou inférieure à 10^{-7} M . Parmi les métalloprotéines spécifiques chez *Arabidopsis thaliana* figurent les transporteurs métalliques de la famille HMA (Heavy Metal ATPase) qui possèdent un domaine de liaison métallique en N terminal. Par exemple, les transporteurs HMA2 et HMA4 situés dans les cellules péricycliques racinaires et impliqués dans le transport du Zn^{2+} vers les parties aériennes de la plante (Hussain *et al.*, 2004; Sinclair *et al.*, 2007) ont un motif CC-X₂-E en N terminal impliqué dans la liaison au Zn^{2+} (Eren *et al.*, 2007). L'affinité de ces sites de liaison pour le Zn^{2+} est de l'ordre du nanomolaire dans le cas des deux transporteurs (Zimmermann *et al.*, 2009). Dans le cas de HMA4, il est intéressant de noter que l'affinité pour le Cd^{2+} a été caractérisée et celle-ci est de $3,5 \times 10^{-11} \text{ M}$, ce qui est plus élevé que pour le Zn^{2+} (Zimmermann *et al.*, 2009). Il existe des cas de métalloprotéines où l'affinité pour un ligand peut être plus faible, c'est-à-dire de l'ordre de 1×10^{-6} à $100 \times 10^{-6} \text{ M}$. Par exemple, la protéine CopK impliquée dans la résistance au Cu chez *Cupriavidus metallidurans*, est capable de lier le Cu^{2+} avec un K_D supérieur ou égal au micromolaire lorsque elle sous forme dimérique. L'affinité du site de liaison peut être augmentée (de l'ordre du picomolaire) si CopK lie dans un premier temps le Cu^+ . En effet, cette liaison entraîne la dissociation du monomère et le site de liaison au Cu^{2+} a alors une meilleure affinité pour son ligand (Chong *et al.*, 2009). Dans le cas de SBP1, l'affinité de la liaison du Cd^{2+} étant de $2,2 \times 10^{-7} \text{ M}$, la liaison semble « non accidentelle ». Malgré cela, l'affinité de la liaison ne semble pas très élevée car supérieure à 100 nM. Il se pourrait que cette affinité soit meilleure si SBP1 est sous une autre conformation (liaison d'un autre ligand, liaison d'un partenaire protéique, modification du degré d'oligomérisation), ce qui pourrait très bien être le cas dans la cellule.

L'utilisation de différentes techniques complémentaires a mis en évidence que la liaison SBP1- Cd^{2+} faisait intervenir une forte majorité de résidus soufrés. En effet, les expériences de microcalorimétrie ont montré que la liaison faisait intervenir des résidus polaires tels que les cystéines. Les spectres XANES et EXAFS ainsi que la transformée de Fourier obtenus dans le cas du Cd^{2+} lié à SBP1 montrent que l'environnement proche des trois atomes de Cd^{2+} est composé à 80 % d'atomes de S et 20 % d'atomes de O/N. La majorité des acides aminés les plus proches de SBP1

semblent donc être des cystéines et/ou des méthionines. Les liaisons Cd^{2+} -Cystéines ont déjà été décrites à plusieurs reprises dans la littérature. Tout d'abord, dans le cas des protéines impliquées dans la détoxification du Cd^{2+} , c'est-à-dire les métallothionéines (Sutherland *et al.*, 2011) et les phytochélatines (Pal *et al.*, 2010), les acides aminés impliqués dans la liaison sont des cystéines. Une analyse des différents sites de liaison impliqués dans la liaison au Cd^{2+} a été menée en 2012 (Jesu Jaya Sudan *et al.*, 2012). Pour cela, 195 structures de protéines auxquelles du Cd^{2+} est lié ont été sélectionnées. Ces protéines proviennent de la Protein Data Bank et leur structure a été obtenue par diffraction des rayons X. Les analyses bioinformatiques réalisées montrent que les acides aminés dominant dans les sites de liaison au Cd^{2+} sont effectivement des cystéines.

L'utilisation de la microcalorimétrie a permis de montrer que la liaison est contrôlée par le facteur enthalpique (formation de liaisons hydrogènes et d'interactions de Van Der Waals). La contribution du facteur entropique est faible donc négligeable. Une entropie favorable est caractérisée par des interactions hydrophobiques et une désolvatation du site de liaison. Cette entropie peut être négligeable mais peut également compenser une enthalpie favorable (Palencia *et al.*, 2004). Ce phénomène est décrit dans le cas de l'interaction entre le domaine SH3 (Src Homology 3 region) de la tyrosine kinase Abl et le peptide p41 riche en prolines (Palencia *et al.*, 2010). Dans notre cas, l'enthalpie favorable n'étant pas compensée par l'entropie défavorable, il semblerait qu'il n'y ait pas de molécule d'eau à l'interface ligand/protéine.

La liaison Cd^{2+} -SBP1 ne fait pas varier le nombre de cystéines réduites accessibles de SBP1. Il a été montré dans la littérature que les liaisons au Cd^{2+} faisant intervenir des cystéines pouvaient, en fonction des acides aminés impliqués dans la liaison, être plus ou moins fortes (Satofuka *et al.*, 2001). En effet, une étude réalisée sur des peptides proches des phytochélatines (peptides $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}$ pour lesquelles le glutamate a été muté en aspartate, lysine, sérine, glycine ou glutamine) a montré que dans le cas où la coordination du Cd^{2+} impliquait des groupements carboxyliques COOH (glutamate et aspartate) en plus des cystéines, la liaison au Cd^{2+} était plus forte (les groupements SH ne peuvent être dosés par le réactif d'Ellmann en présence de Cd^{2+}) que dans le cas de liaisons impliquant d'autres résidus comme la lysine, la sérine, la glycine ou la glutamine (les groupements SH sont dosés en présence de Cd^{2+} par le réactif d'Ellmann car celui-ci déplace le Cd^{2+} des sites de liaison). Les analyses de dichroïsme circulaire ont mis en évidence une implication des cystéines dans la liaison du Cd^{2+} à SBP1 et les analyses de microcalorimétrie ont montré que la liaison Cd^{2+} -SBP1 faisait intervenir des résidus polaires tels que les cystéines. Il semblerait donc que la liaison avec les trois atomes de Cd^{2+} fasse intervenir des cystéines et qu'il n'y ait pas de groupements carboxyles au niveau des sites de liaison.

Les acides aminés qui se retrouvent le plus souvent au niveau des sites de liaison avec les cystéines sont les histidines, les aspartates et les glutamates. Les dosages avec le réactif d'Ellmann suggèrent que l'aspartate et le glutamate ne peuvent être impliqués dans la liaison au Cd^{2+} , il semblerait donc que la contribution des atomes d'oxygène ou d'azote dans le cas de SBP1 soit due à des histidines. Ce profil de liaison a déjà été décrit dans le cas de l'anhydrase carbonique chez *Thalassiosira weissflogii*. Il a été montré par des analyses XANES que la liaison au Cd^{2+} était probablement une structure tétraédrale impliquant au moins deux résidus soufrés et une histidine (Lane *et al.*, 2005).

La Liaison SBP1-Se est une liaison de type R-S-Se-S-R faisant intervenir les cystéines 21 et 22

Afin de caractériser la liaison Se-SBP1, différentes techniques complémentaires ont été utilisées. Le dosage des cystéines réduites et accessibles ainsi que l'obtention du spectre de dichroïsme circulaire dans l'UV lointain de SBP1 ayant été incubée ou non en présence de SeO_3^{2-} met en évidence l'implication de deux cystéines dans la liaison Se-SBP1. Afin d'identifier plus précisément les cystéines impliquées dans cette liaison, des analyses de spectrométrie de masse sur protéine entière et digérée ainsi que des expériences de spectroscopie d'absorption des rayons X (XANES) ont été utilisées. La spectroscopie d'absorption des rayons X a déjà été utilisée par plusieurs équipes afin de caractériser l'environnement d'un atome donné dans une protéine. Ainsi, les sites de liaison au cobalt du domaine périplasmique de la protéine CnrX (senseur de métaux) de *Cupriavidus metallidurans* CH34 (Trepreau *et al.*, 2011) ont été caractérisés par EXAFS. Cette même technique, complémentée par des analyses XANES, a été utilisée pour étudier le site de liaison du Cu(I) et du Cu(II) chez la protéine du prion chez l'homme (Hao *et al.*, 2011). Dans le cas de la protéine sauvage du prion, le degré d'oxydation du Cu (I ou II) ne modifie pas la structure du site de liaison tandis que dans le cas du mutant pathologique, la coordination du Cu est modifiée en fonction de son degré d'oxydation. Dans le cas de SBP1, une liaison covalente de type R-S-Se-S-R impliquant les cystéines 21 et 22 a été mise en évidence. Chez l'homme, il a été suggéré que la liaison au Se se faisait *via* la cystéine 59 uniquement (Raucci *et al.*, 2011). Cette identification a été réalisée d'après la modélisation de la structure et un dosage des cystéines réduites accessibles. La cystéine 59 n'est pas conservée chez la souris et chez les trois isoformes de SBPs chez *Arabidopsis thaliana*, or la liaison du Se à SBP1 a été identifiée chez la souris et cette liaison existe chez *Arabidopsis thaliana*. Les cystéines 21 et 22 ne sont pas présentes chez l'homme et la souris sous la forme du motif CC mais sous la forme d'un motif C-X₂-C (Figure 15 page 50-51), connu pour son implication potentielle dans la liaison à différents ligands. L'hypothèse d'une liaison au Se impliquant les cystéines du motif C-X₂-C dans le cas de la protéine SBP1 chez l'homme (et la souris) apparaît donc plus probable qu'une liaison faisant intervenir seulement la cystéine 59. Les analyses de spectrométrie de masse ainsi que le XANES

montrent que lors de l'incubation de SBP1 en présence de SeO_3^{2-} , le Se est réduit et se retrouve sous la forme R-S-Se-S-R. Ceci suggère que SBP1 est capable de réduire le SeO_3^{2-} et pourrait donc avoir une activité catalytique.

Conclusion

Chez *Arabidopsis thaliana*, SBP1 est capable de lier le Cd^{2+} , mais également le Zn^{2+} , le Ni^{2+} et le SeO_3^{2-} . Le Cd^{2+} et le SeO_3^{2-} ont été choisis comme modèles pour caractériser les capacités de liaison de SBP1 ainsi que pour identifier les sites de liaison. Concernant le Cd^{2+} , la liaison est spontanée et le K_D est inférieur au micromolaire, ce qui suggère que cette liaison pourrait être physiologique lorsque le Cd^{2+} est présent dans la cellule. Les acides aminés principalement impliqués dans la liaison au Cd^{2+} sont les acides aminés soufrés (cystéines et méthionines) avec une contribution provenant très probablement d'histidines. La liaison Cd^{2+} -SBP1 est donc assez proche de la liaison du Cd^{2+} aux phytochélatines et aux métallothionéines. Ceci confirme donc un rôle potentiel de SBP1 dans la détoxification des composés toxiques *via* ses propriétés de chélation. La liaison au SeO_3^{2-} est covalente et se fait au niveau des cystéines 21 et 22 *via* une liaison R-S-Se-S-R. SBP1 apparaît comme une protéine capable de réduire le SeO_3^{2-} . Des expériences complémentaires devront être menées afin de caractériser cette activité catalytique potentielle. SBP1 semble donc être une protéine impliquée dans la détoxification du SeO_3^{2-} .

**V. CHAPITRE 2 : Etude de la structure
tridimensionnelle de la protéine
« Selenium Binding Protein 1 » (SBP1)
d'*Arabidopsis thaliana***

A. Etude structurale de la protéine SBP1 chez *Arabidopsis thaliana*

1. SBP1 : une protéine de la famille des bêta-propeller

a) Structure de SBP1 chez l'organisme *Sulfolobus tokodaii*

Actuellement, la structure tridimensionnelle de SBP1 chez *Arabidopsis thaliana* ainsi que chez les autres organismes photosynthétiques et les mammifères n'a pas été résolue. Des analyses de génomique structurale (Yamada *et al.*, 2007, non publié) ont permis d'obtenir la structure par rayons X de SBP1 sous sa forme apoprotéique chez l'archée *Sulfolobus tokodaii*. Cette structure est disponible sur la Protein Data Bank (PDB) sous la référence « 2ece ». La totalité de la structure de la protéine n'a pas été résolue par rayons X, il manque les sept premiers acides aminés. Le pourcentage d'identité entre SBP1 chez *Arabidopsis thaliana* (At_SBP1) et *Sulfolobus tokodaii* (St_SBP1) est de 41 %. St_SBP1 est une protéine globulaire de type bêta-propeller (ou hélices d'avion), ce qui signifie qu'elle est constituée de feuillets de brins bêta antiparallèles reliés par des hélices alpha autour d'un tunnel central (ou cœur) (Figure 35). Chez beaucoup de protéines ayant une structure de type bêta-propeller, le cœur joue un rôle essentiel dans la fonction de la protéine (Pons *et al.*, 2003).

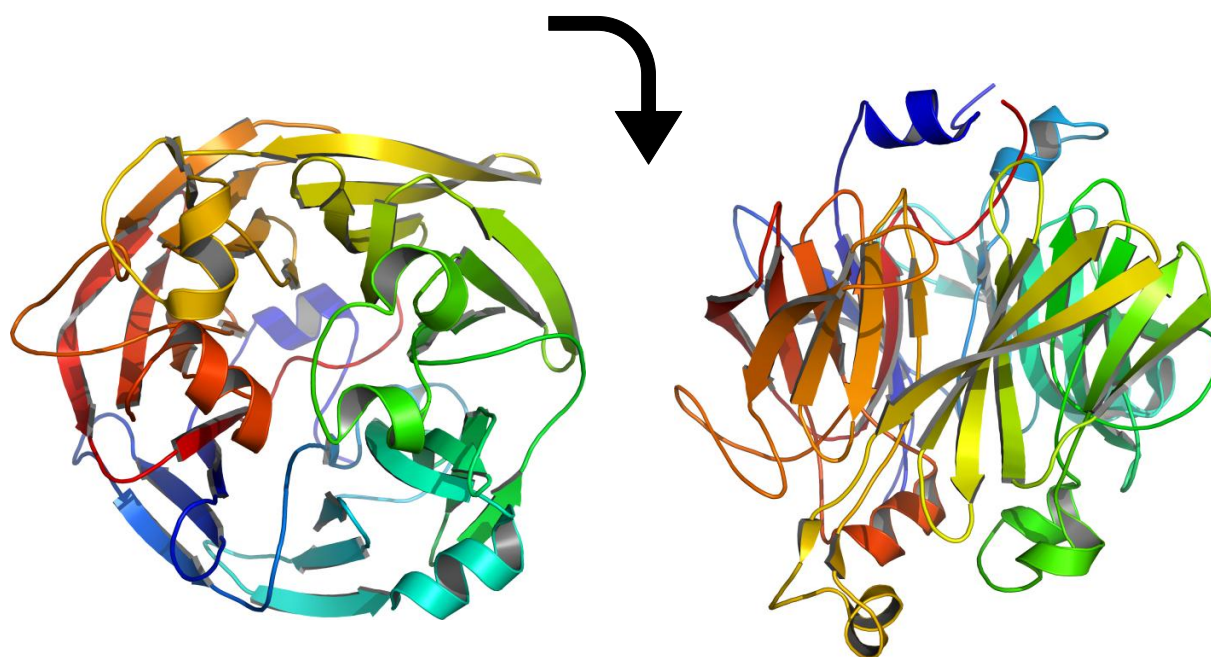


Figure 35 : Structure tridimensionnelle obtenue par rayons X de SBP1 chez *Sulfolobus tokodaii*. Cette structure a été obtenue par génomique structurale (PDB : 2ece). La flèche représente une rotation de 90°.

Dans le cas de SBP1 chez *Sulfolobus tokodaii*, l'observation du tunnel central (Figure 36 A) met en évidence l'existence d'un potentiel site actif contenant quatre histidines (H⁸¹, H⁸², H¹⁴⁸ et H⁴⁵²)

ainsi qu'une tyrosine (Y¹⁹¹) (Figure 36 B). L'histidine 148 fait partie du motif H¹⁴⁸-X₂-H¹⁵¹, connu pour son implication dans la liaison aux métaux.

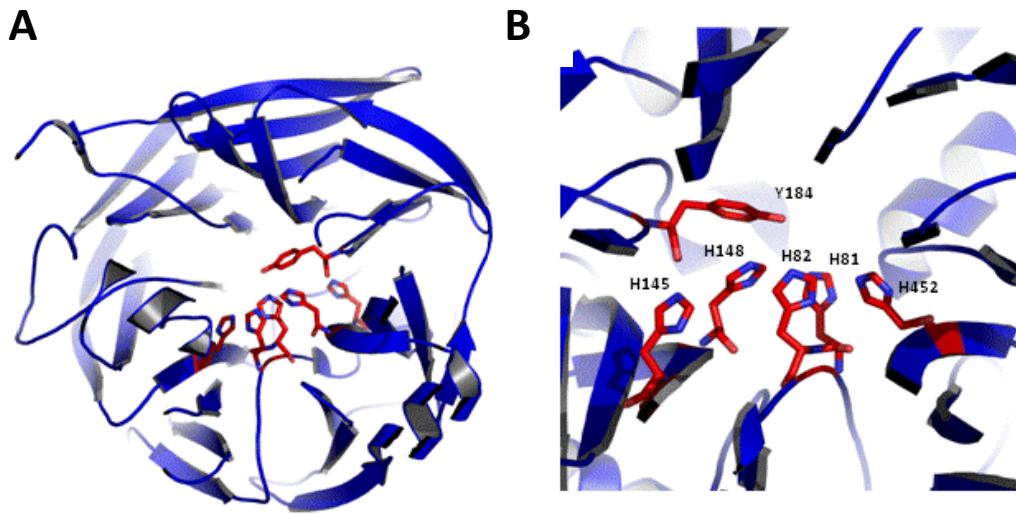


Figure 36 : Identification d'un potentiel site actif de SBP1 chez *Sulfolobus tokodaii* (St_SBP1). **A:** Représentation de St_SBP1 et des acides aminés présents au niveau du tunnel central. **B :** Agrandissement du tunnel central de St_SBP1 permettant d'identifier les acides aminés situés au centre de St_SBP1.

b) Modélisation de la structure tridimensionnelle de SBP1 chez *Arabidopsis thaliana*

La structure tridimensionnelle de St_SBP1 a été modélisée grâce au logiciel MODELLER d'après la structure obtenue par rayons X de At_SBP1. La modélisation de At_SBP1 commence à Y²⁹ (début de la structure de la PDB : 2ece) et montre que chez *Arabidopsis thaliana*, SBP1 est également un beta-propeller (Figure 37). Les logiciels (DSC, DPM, GOR I, GOR III, GOR IV, HNV, SIMPA96, PHD, PREDATOR et SOMP) de prédictions de structures secondaires prédisent que la partie N-terminale allant de M¹ à Y²⁹ de At_SBP1 n'est pas repliée sous forme d'hélice alpha, de feuillet bêta ou de boucle. Elle apparaît donc comme désordonnée, ce qui rend impossible la prédiction de sa position au niveau tridimensionnel.

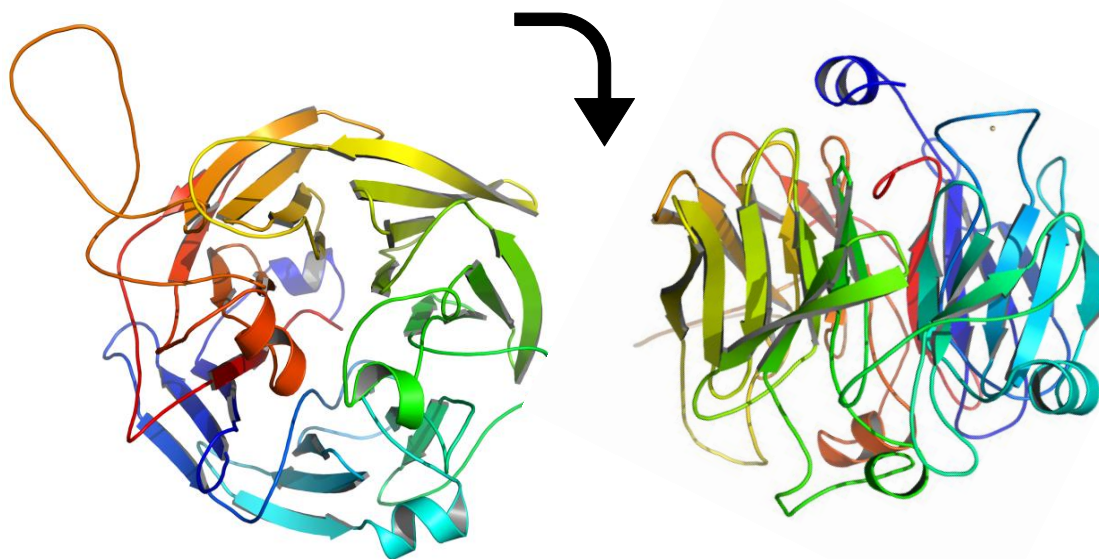


Figure 37 : Modélisation de At_SBP1. La structure de At_SBP1 a été modélisée grâce au logiciel MODELLER à partir de la structure tridimensionnelle (obtenue par génomique structurale) de l'hypothétique SBP1 (St_SBP1) de *Sulfolobus tokodaii* (41 % d'identité). La flèche représente une rotation à 90°.

Le tunnel (ou cavité centrale) apparaît également comme un potentiel site actif et la nature des acides aminés présents au niveau de ce site est identique à celle des acides aminés observés dans le cas de SBP1 chez *Sulfolobus tokodaii* (Figure 38 A). D'après la modélisation, le cœur de SBP1 chez *Arabidopsis thaliana* possède également quatre histidines (H^{90} , H^{91} , H^{154} et H^{475}) qui pourraient former un site actif potentiel (Figure 38 B). Ce site pourrait impliquer la tyrosine 205 (Y^{205}). Il est intéressant de noter que H^{154} forme avec une autre histidine (H^{157}) le motif HTAH, motif du type H-X₂-H, connu pour son implication dans la liaison aux métaux. L'homologie entre le cœur de SBP1 dans le cas de la protéine résolue par rayons X chez *Sulfolobus tokodaii* et la modélisation de SBP1 chez *Arabidopsis thaliana* suggère que le cœur de la protéine pourrait avoir un rôle essentiel dans la fonction de SBP1.

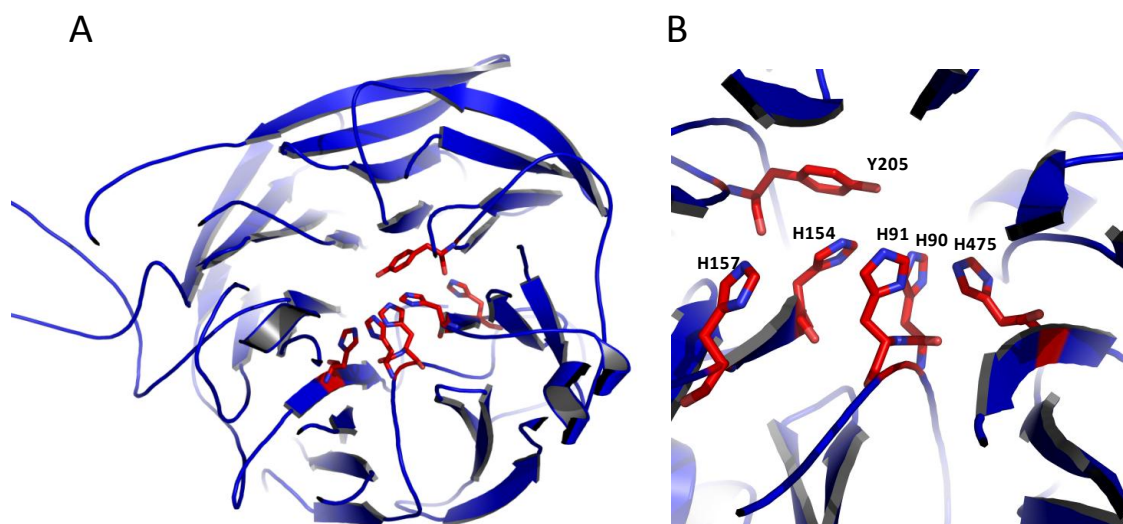


Figure 38 : Identification d'un potentiel site actif de SBP1 chez *Arabidopsis thaliana* (At_SBP1). A : Représentation de At_SBP1 et des acides aminés présents au niveau du tunnel central observé lors de la modélisation de la structure de At_SBP1. B : Agrandissement du tunnel central de SBP1 permettant d'identifier les acides aminés situés au centre de At_SBP1.

2. Dosage des cystéines réduites et identification d'un potentiel pont disulfure

Les cystéines sont des résidus qui apparaissent important dans la capacité du Cd^{2+} et du Se à se lier à SBP1. De plus, les cystéines peuvent être impliquées dans la formation de ponts disulfures connus en tant qu'acteurs dans le contrôle des réactions d'oxydo-réduction ainsi que pour leur rôle structural. Afin d'obtenir des informations sur le nombre de cystéines potentiellement réactives ainsi que sur la structure tridimensionnelle de SBP1 chez *Arabidopsis thaliana*, les cystéines réduites accessibles ont été dosées en conditions natives et non natives (urée 8M) avec le réactif d'Ellmann (technique décrite page 70). SBP1 possède 7 cystéines. La quantification (Figure 39) montre que la protéine native a quatre cystéines réduites accessibles. Si SBP1 est dénaturée avec de l'urée (8M), cinq cystéines réduites accessibles sont dosées ($p < 0,001$), il y a donc une cystéine réduite non accessible enfouie dans la structure. Ces résultats suggèrent que deux cystéines sont sous forme oxydée, il y a donc potentiellement un pont disulfure.

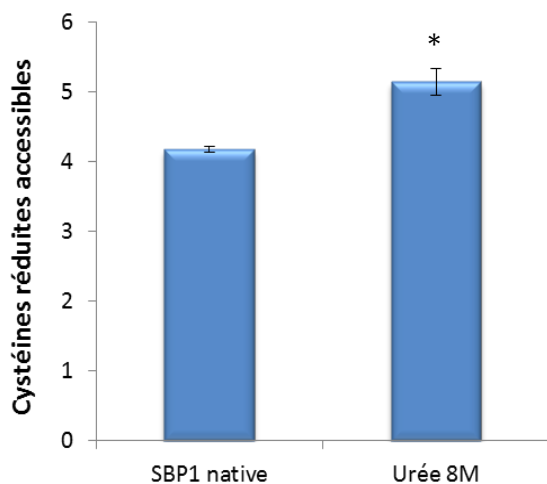


Figure 39 : Quantification du nombre de cystéines réduites accessibles sur la protéine SBP1. La concentration de cystéines réduites est dosée avec le réactif d'Ellmann en conditions native et non natives (urée 8M). La concentration de SBP1 est de 8 μ M. Le nombre de cystéines réduites obtenu correspond à la moyenne obtenue pour 6 expériences indépendantes. L'étoile montre une différence significative évaluée par un test de student ($p < 0,001$) entre le dosage effectué sur la protéine native et en présence d'urée 8M.

D'après l'observation de la simulation de la structure de At_SBP1, les cystéines impliquées dans un pont disulfure seraient les cystéines 97 et 158 (le même pont disulfure est retrouvé dans la structure de St_SBP1) et la cystéine réduite non accessible serait la cystéine 168. Les cystéines 21 et 22 ne sont pas sur le modèle mais elles sont présentes sur la partie N terminale prédite comme non repliée, ce qui suggère qu'elles sont accessibles. Les cystéines réduites accessibles seraient donc les cystéines 21, 22, 100 et 485. Il a été montré dans le chapitre 1 que la liaison du Cd^{2+} à SBP1 impliquait une majorité de résidus soufrés tels que les cystéines. Les cystéines 21, 22, 100 et 485 apparaissant donc comme des candidates potentielles impliquées dans la liaison des 3 atomes de Cd^{2+} . Les vecteurs permettant la production des protéines GST-SBP1-C21S, GST-SBP1-C22S, GST-SBP1-C100S et GST-SBP1-C485S, c'est-à-dire des protéines pour lesquelles les cystéines ont été remplacées par des sérines, ont donc été générés. L'objectif est maintenant de produire ces protéines, de vérifier, à l'aide de la thermostabilité par fluorescence, que les mutations n'affectent pas leur stabilité, puis des réaliser des analyses de capacité de liaison au Cd^{2+} .

3. Importance du tunnel central de SBP1

Le tunnel central de SBP1 est constitué de 4 histidines et des analyses par spectroscopie d'absorption des rayons X ont montré que 2 ou 3 histidines pouvaient potentiellement être impliquées dans la liaison au Cd^{2+} (Chapitre 1). Il a donc été décidé de produire les protéines mutantes GST-SBP1 pour lesquelles les histidines H^{90} , H^{91} , H^{154} , H^{157} et H^{475} ont été mutées en alanine afin de réaliser des tests de capacité de liaison du Cd^{2+} . Des expériences de mutagenèse dirigée ont permis de produire les vecteurs codant pour les protéines mutantes suivantes : GST-SBP1-H90.91A,

GST-SBP1-H154A, GST-SBP1-H157A et GST-SBP1-H475A. Les différentes protéines chimériques GST-SBP1, GST-SBP1-H90.91A, GST-SBP1-H154A, GST-SBP1-H157A et GST-SBP1-H475A (SBP1 sauvage ou mutée couplée à la Glutathione-S-Transférase, GST) ont été surexprimées chez la souche Rosetta 2 thermocompétente d'*E. coli* par transformation avec les vecteurs PGEX-3X-SBP1, PGEX-3X-SBP1-H90.91A, PGEX-3X-SBP1-H154A, PGEX-3X-SBP1-H157A et PGEX-3X-SBP1-H475A. Les différentes protéines, présentes dans la fraction soluble, ont été purifiées par affinité sur colonne de glutathion (GSH)-sépharose. Ces protéines ont ensuite été éluées par compétition avec une solution de Tris 50 mM GSH 10 mM pH 8,0 puis déposées sur une colonne de chromatographie d'exclusion stérique PD10 afin de se séparer du GSH. L'étiquette GST a été conservée en raison du caractère onéreux de son clivage. Les différentes protéines obtenues ont été analysées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide afin d'observer leur pureté (Figure 40 A). Chez les protéines mutantes, un contaminant dont la masse moléculaire est proche de 25 kDa apparaît alors qu'il n'est pas présent dans le cas de la protéine sauvage. De plus, les bandes correspondant aux protéines mutées sont moins intenses que la bande correspondant à la protéine GST-SBP1. Des quantités identiques de protéine ont été déposées sur le gel, ceci montre donc que les protéines mutantes sont moins pures que la protéine sauvage malgré un protocole de purification identique. Concernant les quantités obtenues après élution, celle-ci sont très variables (Figure 40 B). Dans le cas de la protéine sauvage, la quantité obtenue est de 20 mg. Cette quantité est inférieure dans le cas des protéines mutantes. Cette diminution de production est de 15 % dans le cas de GST-SBP1-H90.91A, 52,5 % dans le cas de GST-SBP1-H154A, 65 % dans le cas de GST-H157A et de 67,5 % dans le cas de GST-SBP1-H475A. L'ensemble de ces résultats suggère que les mutations réalisées ont un impact sur la quantité et la pureté des protéines purifiées.

Des analyses de thermostabilité par fluorescence ont été réalisées afin d'étudier l'impact potentiel des différentes mutations sur la stabilité des protéines. Les résultats ont montré que l'émission de fluorescence émise par le sypro orange en fonction de la température était différente en fonction des protéines (Figure 41). Pour chacune des courbes, 2 pics sont visibles. Le premier pic (situé entre 42 et 45 °C) correspond à SBP1 et le deuxième pic (situé à 56°C) à l'étiquette GST. Les protéines GST-SBP1-H90.91A, GST-SBP1-H157A et GST-SBP1-H475A n'ont pas le même niveau de fluorescence dès le début des mesures, c'est-à-dire à 28°C. Ceci signifie donc que ces protéines ne sont pas initialement repliées de la même façon que la protéine GST-SBP1. Concernant les protéines GST-SBP1 et GST-SBP1-H154A qui ont initialement un niveau de fluorescence très proche, leur profil d'évolution de la fluorescence au cours de l'augmentation de température est différent. En effet, l'amplitude d'augmentation de fluorescence de la protéine GST-SBP1-H154A est plus faible que pour la protéine GST-SBP1. Au cours de l'augmentation de température, le repliement de ces deux

protéines n'évolue donc pas de façon similaire. La mutation de l'histidine 154 modifie donc le repliement de la protéine, et ce dès 35°C.

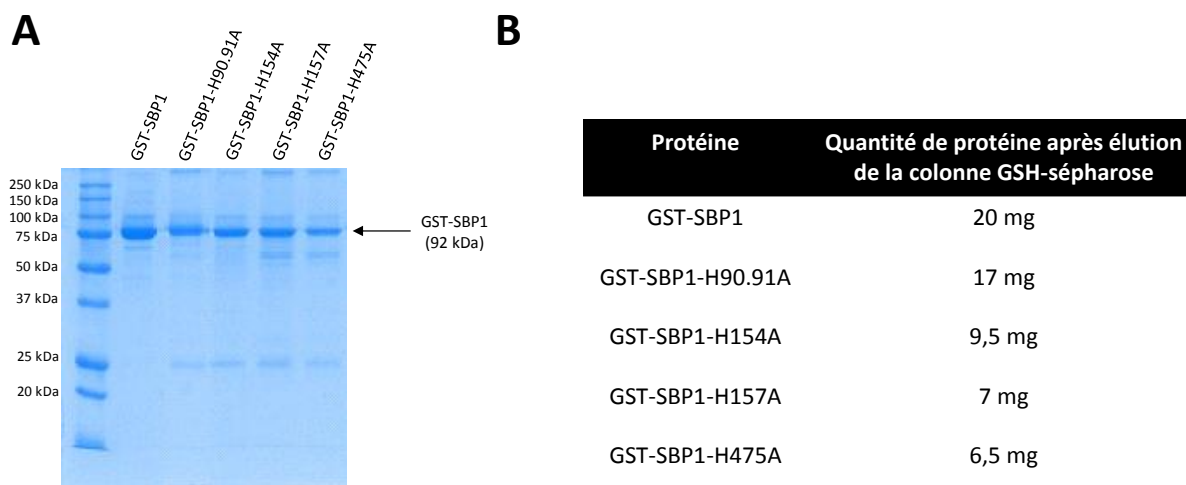


Figure 40 : Purification des protéines GST-SBP1, GST-SBP1-H90.91A, GST-SBP1-H154A, GST-SBP1-H157A et GST-SBP1-H475A à partir de 3,2 L de culture bactérienne. A : Gel SDS-PAGE 12% des différentes protéines (10 μ g) après élution de la colonne GSH-Sépharose avec une solution Tris 50 mM, GSH 20 mM, pH 8,0 et passage sur une colonne de chromatographie d'exclusion stérique PD10. B : Quantités de protéines obtenues après élution de la colonne GSH-Sépharose avec une solution Tris 50 mM, GSH 20 mM, pH 8,0.

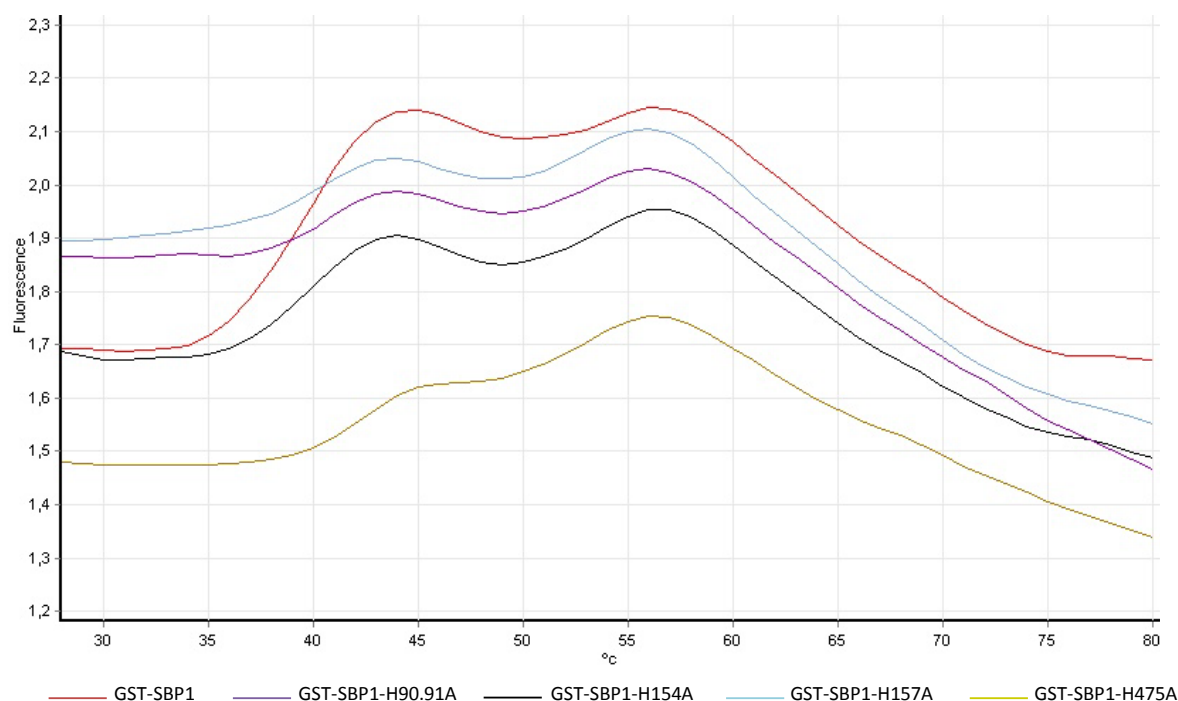


Figure 41 : Analyse par « Thermal Shift Assay » (TSA) de la thermostabilité par fluorescence des protéines GST-SBP1, GST-SBP1-H90.91A, GST-SBP1-H154A, GST-SBP1-H157A et GST-SBP1-H475A. 5 μ M de protéine dans un tampon HEPES 10 mM pH 7,4, NaCl 150 mM ont été placés en présence de Sypro Orange.

La mutation des histidines 90, 91, 154 et 475 situées au cœur de SBP1 ainsi que la mutation de l'histidine 157 semblent modifier la stabilité de la protéine. De plus, ces mutations entraînent une diminution de la quantité de protéine purifiée et de la pureté de la protéine, ce qui pourrait être corrélé avec une moins bonne stabilité initiale due à un repliement différent. L'ensemble des histidines mutées, et plus particulièrement celles du tunnel central de SBP1, apparaît donc comme important pour la stabilité de la protéine. Suite à ce résultat, les analyses de capacité de liaison du Cd^{2+} à SBP1 n'ont pas été menées car il ne semblait pas pertinent de les réaliser sur des protéines affectées dans leur repliement. La production de protéines mutantes afin d'étudier l'importance du tunnel central dans la liaison au Cd^{2+} ne semble donc pas adaptée, c'est pourquoi des essais de cristallogenèse en présence de Cd^{2+} devront être réalisés afin d'identifier les acides aminés impliqués.

B. Choix de différentes formes de SBP1 afin d'optimiser les conditions de cristallogenèse

Afin de connaître la structure tridimensionnelle de SBP1 chez *Arabidopsis thaliana*, d'identifier clairement les sites de liaison au Cd^{2+} et de connaître la structure tridimensionnelle de SBP1 lorsque celle-ci est sous la forme Cd^{2+} -SBP1 et Se-SBP1, des expériences de cristallogenèse ont été menées. La forme de SBP1 (Annexe 1) utilisée lors des expériences de biochimie présentées dans le chapitre 1 contient 20 acides aminés supplémentaires situés entre le site de clivage de l'étiquette GST au facteur Xa et le début de la protéine. Cette suite de 20 acides aminés ainsi que la partie N terminale de SBP1 sont prédites comme non repliées car riche en glycine, sérine, alanine et valine. Ces acides aminés pourraient être défavorables à la cristallogenèse de SBP1. La protéine SBP1 sans les 20 acides aminés supplémentaires de la partie N terminale a donc été produite en utilisant le vecteur pET-M11. Ce vecteur permet de produire la protéine His₆-SBP1 avec un site de clivage à la TEV (protéase provenant du virus de la gravure du tabac ou Tobacco Etch Virus) puis d'obtenir une protéine clivée avec seulement 2 acides aminés (glycine et alanine) supplémentaires du côté N terminal. Cette protéine est appelée MAT-SBP1. La partie N terminale de SBP1 contenant les quinze premiers acides aminés étant prédite comme non repliée, une forme tronquée commençant au 16^{ème} acide aminé (G^{16}) a aussi été produite (Figure 42). Cette protéine est appelée GGS-SBP1. La structure de SBP1 chez *Sulfolobus tokodaii* résolue par rayons X commence à R⁸ (St_SBP1), ce qui correspond d'après l'alignement de séquences à Y²⁴ dans le cas de SBP1 chez *Arabidopsis thaliana*. Une troisième construction de SBP1 a donc été réalisée à partir de G²⁸. Cette construction ne commence pas à Y²⁴ car cet acide aminé est suivi de deux glycines connues pour apporter de la flexibilité à la structure. Cette troisième forme de SBP1 est appelée GYA-SBP1.

Sur la figure 42, la structure secondaire de St_SBP1 montre que celle-ci est ordonnée à partir de la proline P¹⁶, ce qui correspond à la proline P³² chez At_SBP1. Les coupures au niveau de G¹⁶ et G²⁸ chez At_SBP1 n'entraîneront donc potentiellement pas de rupture d'hélice alpha et de brin bêta.

1. Purification des protéines MAT-SBP1, GGS-SBP1 et GYA-SBP1

a) Optimisation des conditions de purification de MAT-SBP1

Tout d'abord, les conditions de purification de la forme la plus longue de SBP1 appelée MAT-SBP1 (M¹⁻⁴⁹⁰) ont été mises au point. Pour chaque paramètre de purification modifié, la liaison au Cd²⁺ et au Se a été vérifiée. En effet, il a été montré que trois nmoles de Cd²⁺ et une nmole de Se lorsque celui-ci est initialement sous la forme sélénite (SeO₃²⁻) étaient capables de se lier à une nmole de SBP1. Ainsi, la liaison du Cd²⁺ et du Se à SBP1 a été testée afin de vérifier que les modifications des conditions de purification n'affectaient pas les capacités de liaison de SBP1.

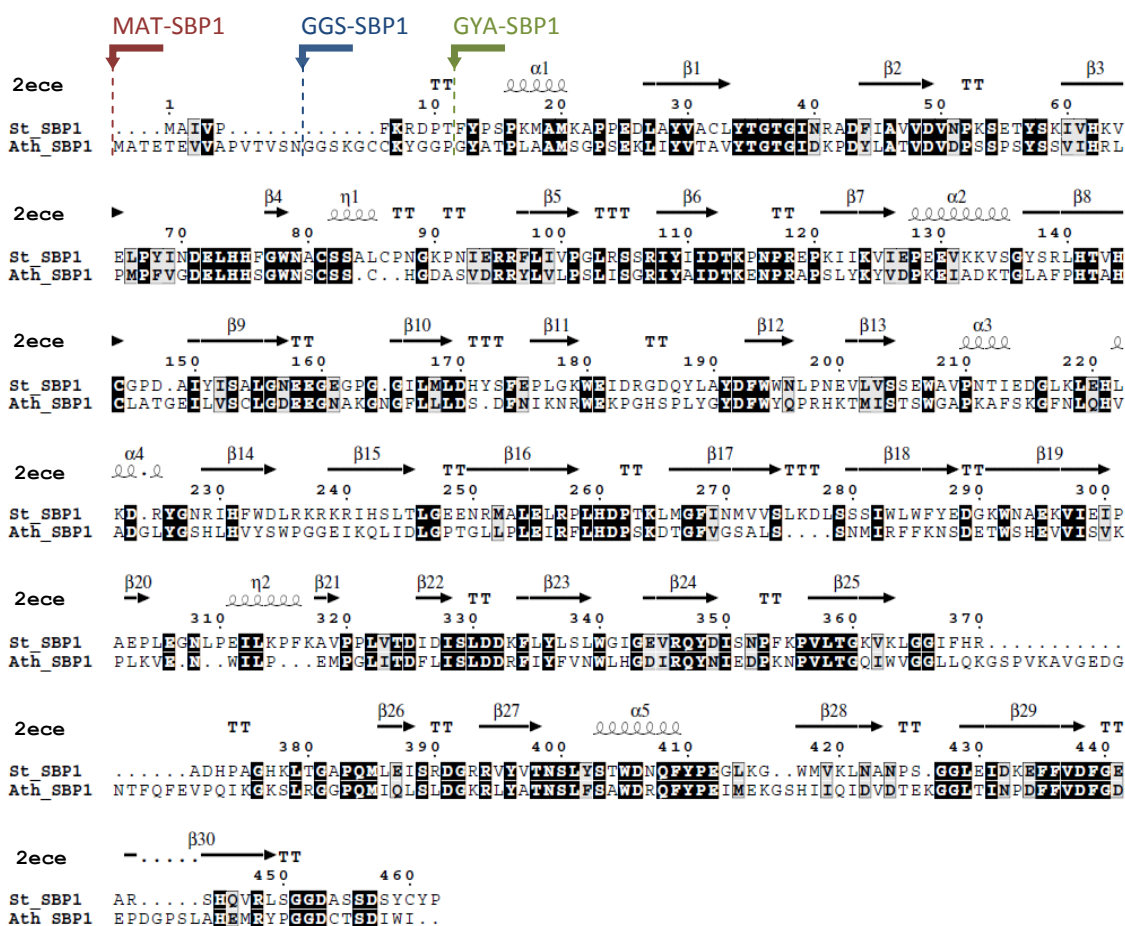


Figure 42 : Alignement de At_SBP1 et St_SBP1 et structure secondaire de St-SBP1. L'alignement a été réalisé par la méthode ClustalW et la structure secondaire a été obtenue d'après la structure connue de St_SBP1 (PDB : 2ece). Les flèches de couleur indiquent le début de la séquence des trois formes de SBP1 choisies pour les essais de cristallogénèse. La flèche rouge représente MAT-SBP1, la flèche bleue GGS-SBP1 et la flèche verte GYA-SBP1. Les spirales représentent les hélices alpha, les flèches les brins bêta et les T les boucles.

Afin de purifier la protéine MAT-SBP1 destinée aux essais de cristallogénèse, la protéine His₆-MAT-SBP1 a été surexprimée chez la souche Rosetta 2 thermocompétente d'*E. coli* par transformation avec le vecteur pET-M11. La séquence de la protéine est présentée en annexe 1. La protéine, présente dans la fraction soluble, a été purifiée par affinité sur colonne de Ni-sépharose (Ge Healthcare). L'étiquette His₆ pouvant interférer avec différents ligands métalliques, celle-ci a été clivée. L'optimisation des conditions de clivage de l'étiquette His₆ a montré que l'utilisation de 1,5 mg de TEV pendant 15 heures à 4°C permettait de cliver 20 mg de His₆-MAT-SBP1 avec un rendement de clivage très proche de 100 % (Figure 43).

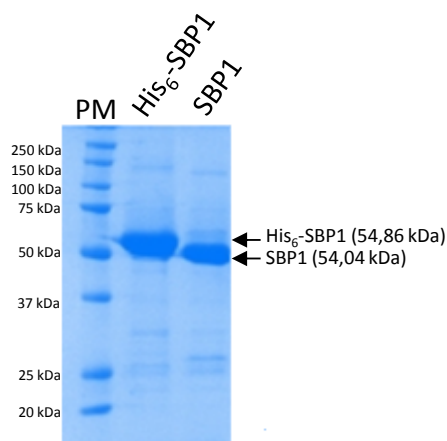


Figure 43 : Optimisation des conditions de clivage de l'étiquette His₆. Analyse par gel SDS-PAGE 12% montrant la protéine His₆-SBP1 (10 µg) après élution de la colonne Ni-sépharose avec une solution d'imidazole 250 mM HEPES 10 mM NaCl 150 mM pH 7,4 et SBP1 (10 µg) après clivage à la TEV (1,5 mg de TEV pour 20 mg de SBP1).

La deuxième condition qui a nécessité une phase d'optimisation est la nature du réducteur (dithiothréitol, DTT ou tris(2-carboxyethyl)phosphine, TCEP) (Figure 44). En effet, il a été montré dans le chapitre 1 que les cystéines sont les principaux acides aminés impliqués dans la liaison au Cd²⁺ et au Se. Les essais de cristallogénèse seront réalisés en présence de ces 2 ligands, il est donc important que les cystéines ne soient pas oxydées. L'utilisation de DTT (1 mM) et du TCEP (1 mM) permettent de retrouver les ratios Cd²⁺/SBP1 et Se/SBP1 attendus mais le DTT peut provoquer une réduction du Ni²⁺ lié à la colonne d'affinité utilisée (Figure 44). Un essai de purification sans réducteur a été testé mais les ratios ligands/SBP1 obtenus n'étaient pas satisfaisants. Les étapes de purification ont donc été réalisées en présence de TCEP 1mM.

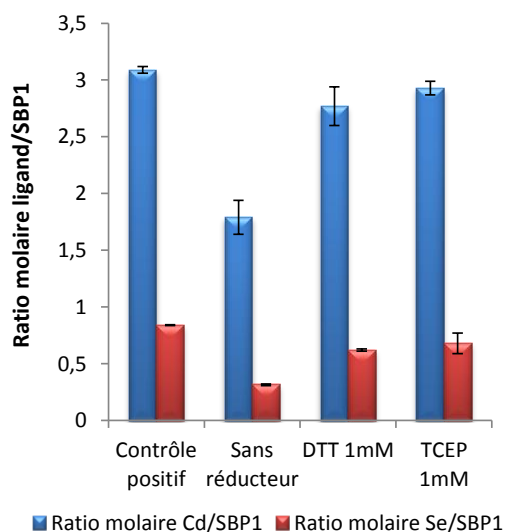


Figure 44 : Capacité de liaison in vitro du Cd^{2+} et du Se à SBP1 en fonction des conditions réductrices durant la purification. Deux nmoles de SBP1 (80 μM) ont été incubées avec 25 nmoles de ligand (1 mM) dans un volume total de 25 μL . Le complexe protéine/ligand a été séparé du ligand libre par passage sur colonne d'exclusion stérique G25. En sortie de colonne, la quantité de SBP1 est suivie par l'absorbance à 280 nm et le métal est quantifié par ICP-MS (isotope 112 pour le Cd et isotope 77 pour le Se). Les différentes conditions réductrices testées pendant la purification sont les suivantes : sans réducteur, DTT 1 mM et TCEP 1mM. Le contrôle positif correspond à la protéine SBP1 séparée de son étiquette GST avec utilisation de DTT 1mM dans le tampon de lyse.

La colonne d'affinité utilisée contient du Ni^{2+} et SBP1 est une protéine capable de lier les métaux comme le Ni^{2+} donc la purification nécessite une étape de dialyse en présence d'acide éthylène diamine tétraacétique (EDTA) afin d'éliminer les traces de Ni^{2+} potentiellement lié à SBP1. En effet, des analyses de dosage de Ni^{2+} réalisées sur la protéine MAT-SBP1 sans traitement à l'EDTA ont montré que 0,35 nmole de Ni^{2+} se liait à une nmole de SBP1 (Figure 45), tandis que la protéine SBP1 purifiée sur colonne d'affinité au GSH puis clivée de son étiquette GST ne contenait pas de Ni^{2+} . Une étape de dialyse avec 1 mM d'EDTA a donc été testée pour la protéine MAT-SBP1 et le dosage du Ni^{2+} après dialyse a montré que cette étape supplémentaire permettait de s'affranchir significativement du Ni^{2+} lié à MAT-SBP1 (Figure 45).

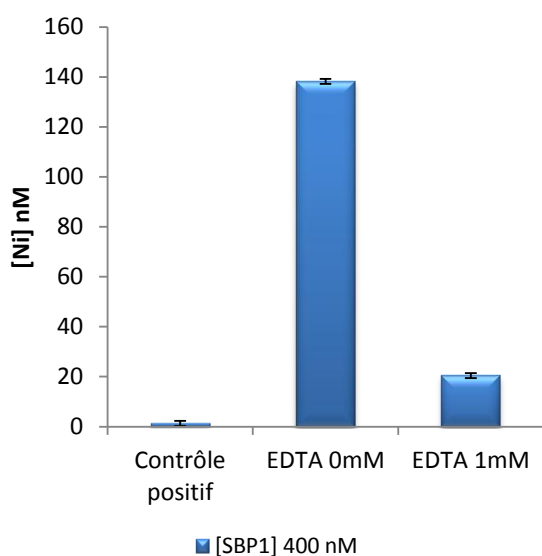


Figure 45 : Quantification du Ni^{2+} lié à SBP1 en fonction de la concentration d'EDTA pendant l'étape de dialyse précédant l'étape finale de la purification (passage sur colonne d'exclusion stérique S200 16/60). La concentration en Ni^{2+} a été mesurée par ICP-MS (isotope 60) pour une concentration de protéine de 400 nM. Le contrôle positif correspond à la protéine SBP1 séparée de son étiquette GST n'ayant pas subi de passage sur colonne de Ni^{2+} et donc pas de dialyse dans l'EDTA.

Afin de se débarrasser des potentiels contaminants ainsi que du TCEP et de l'EDTA résiduel, la protéine MAT-SBP1 a été déposée sur une colonne de chromatographie d'exclusion stérique S200 16/60 (Figure 46).

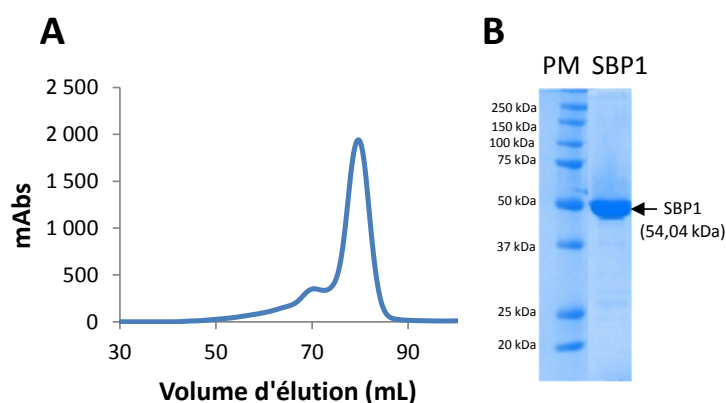


Figure 46 : Passage de SBP1 sur colonne de chromatographie d'exclusion stérique S200 16/60. A : Profil d'élution de SBP1 après passage sur colonne d'exclusion stérique (S200 16/60). Le volume des fractions collectées est de 1,5 mL, les fractions les plus riches (volume d'élution allant de 75 à 85 mL) sont conservées. B : Gel SDS-PAGE 15 % représentant SBP1 (10 µg) après passage sur la colonne de chromatographie d'exclusion stérique.

b) Purification de GGS-SBP1 et GYA-SBP1

Les protéines GGS-SBP1 (G¹⁶-I⁴⁹⁰) et GYA-SBP1 (G²⁸-I⁴⁹⁰) ont été purifiées dans les mêmes conditions que la protéine MAT-SBP1. Avant l'étape de passage sur colonne de chromatographie d'exclusion stérique, une électrophorèse sur gel SDS-PAGE a été réalisée et les différentes formes de SBP1 apparaissent comme faiblement contaminées par des protéines de poids moléculaires différents de celui de SBP1 (Figure 47 I). Les profils d'élutions observés après passage sur colonne de chromatographie d'exclusion stérique S200 16/60 (Figure 47 II) montrent que le pic correspondant à la protéine GGS-SBP1 est bien défini (Figure 47 II B). Le large pic pour lequel le profil d'élution va de 40 à 75 mL correspond aux agrégats et aux contaminants de poids moléculaire inférieur à celui de SBP1. Concernant GYA-SBP1, le pic correspondant à la protéine n'est pas défini (Figure 47 II C). Vu le faible taux de contaminants présents dans la solution protéique avant injection sur la colonne de chromatographie d'exclusion stérique, il est fort probable que le profil observé soit dû à un phénomène d'agrégation de GYA-SBP1. Ces observations laissent penser que la partie N terminale de SBP1 pourrait avoir de l'importance au niveau de sa stabilité.

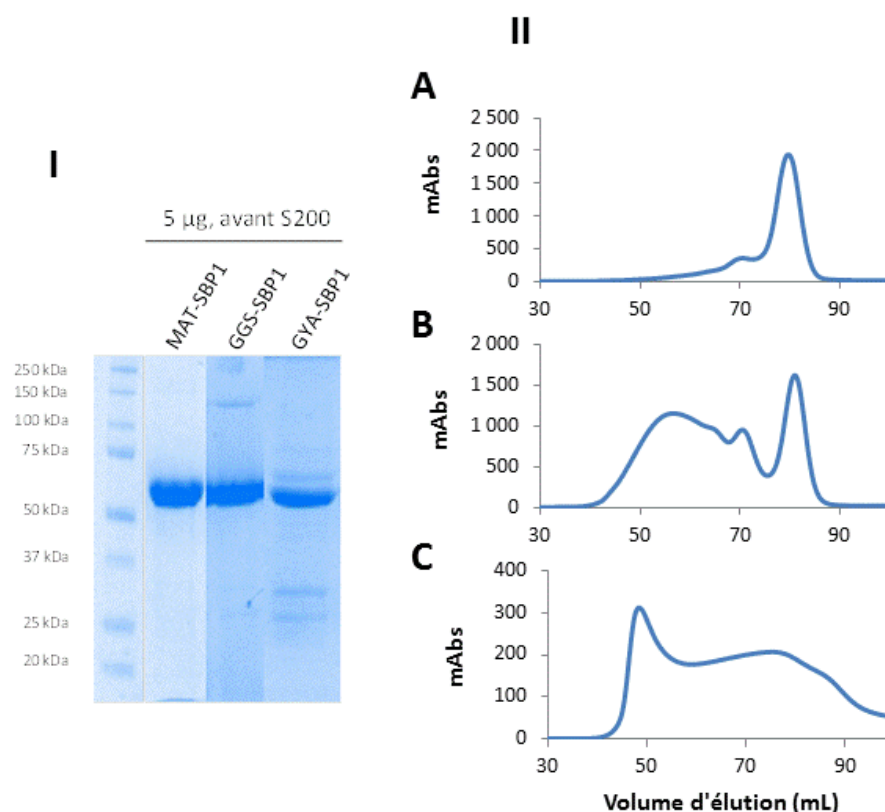


Figure 47 : Purification des protéines MAT-SBP1, GGS-SBP1 et GYA-SBP1. I : Analyse par électrophorèse SDS-PAGE 12 % de la pureté de MAT-SBP1, GGS-SBP1 et GYA-SBP1. Cette analyse a été réalisée pour 10 µg de chacune des protéines avant le passage sur la colonne de chromatographie d'exclusion stérique S200 16/60. **II : Passage de MAT-SBP1, GGS-SBP1 et GYA-SBP1 sur colonne de chromatographie d'exclusion stérique (S200 16/60).** **A : MAT-SBP1.** Le volume d'élution de MAT-SBP1 est de 79 mL. **B : GGS-SBP1.** Le volume d'élution de GGS-SBP1 est de 81 mL. **C : GYA-SBP1.** Le volume d'élution de GYA-SBP1 n'a pas pu être déterminé.

Les essais de cristallogénèse ont été réalisés pour différentes formes de SBP1, en présence de différents ligands et de différents types de réducteurs (Tableau 11). Plusieurs kits permettant de tester 96 conditions de cristallisation ont été utilisés pour chacune des conditions de SBP1. Les paramètres qui varient entre les différentes conditions de cristallisation sont la nature et la concentration du précipitant, du tampon et du sel ainsi que la présence éventuelle de ligands. Ces cribles ont été réalisés avec le robot de cristallisation de l'European Molecular Biology Laboratory (EMBL, Grenoble) en collaboration avec R. Dumas du Laboratoire de Physiologie Cellulaire et Végétale (LPCV, Grenoble) et D. Cobessi de l'Institut de Biologie Structurale (IBS, Grenoble). L'ensemble des cribles a été réalisé à 4°C pour une concentration en protéine de 5 mg/mL dans du tampon HEPES 10 mM pH 7,4, NaCl 150 mM. La technique utilisée par le robot pour le crible de cristallogénèse est appelée « Technique de la goutte assise » (technique décrite page 79). Cette technique repose sur le processus d'équilibration entre la protéine et la solution de cristallisation.

Tableau 11 : Différentes conditions de cristallisation testées lors des cribles de cristallogénèse.

Condition	Concentration protéine (μM)	Ligand	Concentration ligand (μM)	Réducteur	Concentration réducteur (mM)	Observations
SBP1	89					R.A.S
SBP1 + Cd^{2+}	89	Cd^{2+}	534			R.A.S
SBP1 + Zn^{2+}	89	Zn^{2+}	534			R.A.S
SBP1 + SeO_3^{2-}	89	SeO_3^{2-}	89			R.A.S
SBP1 + DTT	89			DTT	1	R.A.S
SBP1 + TCEP	89			TCEP	1	1 condition positive
SBP1 + Cd^{2+} + TCEP	89	Cd^{2+}	356	TCEP	1	R.A.S
SBP1 + SeO_3^{2-} + TCEP	89	SeO_3^{2-}	107	TCEP	1	R.A.S
GST-SBP1 + TCEP	59			TCEP	1	R.A.S
GST-SBP1 + TCEP + Cd^{2+}	59	Cd^{2+}	236	TCEP	1	R.A.S
GST-SBP1 + TCEP + SeO_3^{2-}	59	SeO_3^{2-}	71	TCEP	1	R.A.S
MAT-SBP1	89			TCEP	1	R.A.S
MAT-SBP1 + Cd^{2+}	89	Cd^{2+}	534	TCEP	1	R.A.S
MAT-SBP1 + SeO_3^{2-}	89	SeO_3^{2-}	89	TCEP	1	R.A.S
GGs-SBP1	89			TCEP	1	R.A.S
GGs-SBP1 + Cd^{2+}	89	Cd^{2+}	534	TCEP	1	R.A.S
GGs-SBP1 + SeO_3^{2-}	89	SeO_3^{2-}	89	TCEP	1	R.A.S

Dans un premier temps, malgré la présence des vingt acides supplémentaires en N terminal, des essais de cristallogénèse ont été réalisés avec la protéine SBP1 clivée de son étiquette GST. Les conditions testées ont été les suivantes : SBP1, SBP1 + Cd^{2+} , SBP1 + Zn^{2+} , SBP1 + SeO_3^{2-} et SBP1 + DTT. Le Cd^{2+} et le SeO_3^{2-} ont été testés car ce sont les ligands modèles pour lesquels la caractérisation biochimique des capacités de liaison de SBP1 a été étudiée. Le Zn^{2+} a également été choisi car lors des expériences de TSA (Figure 24 page 88), ce ligand entraînait une forte augmentation de la température de dénaturation de SBP1. Il apparaît donc comme un facteur pouvant stabiliser SBP1 et donc augmenter sa capacité à cristalliser.

La condition SBP1 + DTT a été testée afin d'observer si la présence de réducteur pouvait optimiser la capacité de SBP1 à cristalliser. Les résultats obtenus ont montré que la majorité des conditions de cristallisation entraînait une dénaturation de SBP1. Ce phénomène a été particulièrement accentué pour la condition SBP1 + Zn^{2+} . Ce ligand, malgré sa capacité à stabiliser SBP1 entraîne donc sa dénaturation lors du crible de cristallogénèse. Le crible réalisé avec SBP1+DTT montre que la présence de réducteur semble diminuer la probabilité de dénaturation de SBP1. L'ajout de DTT dans le mélange SBP1 + Cd^{2+} entraîne la précipitation de la protéine. Des essais réalisés avec le TCEP montrent que ce réducteur ne provoque pas la précipitation de SBP1 + Cd^{2+} . Le TCEP a donc été utilisé pour les autres cribles de cristallogénèse.

Les essais ont donc été à nouveau réalisés en présence de TCEP 1mM avec la protéine SBP1 clivée de l'étiquette GST, la protéine MAT-SBP1 et la protéine GGS-SBP1. L'ensemble de ces cribles a permis d'obtenir des cristaux pour une seule des conditions (Figure 48) : [SBP1] = 89 μ M, [TCEP] = 1 mM ; solution de cristallisation : [CaCl₂] = 0,2 M, [HEPES Na] = 0,1 M pH = 7,5, PEG 400 28 % [v/v] ; température : 4°C. Ces cristaux ont ensuite été testés sur une ligne de diffraction des rayons X et le résultat obtenu a montré qu'il s'agissait de cristaux de sel.

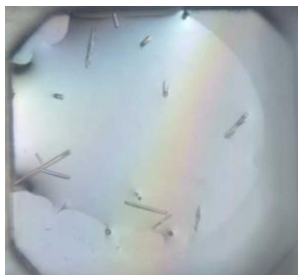


Figure 48 : Cristaux obtenus pour la condition SBP1 + TCEP. [SBP1] = 89 μ M, [TCEP] = 1 mM. Solution de cristallisation : [CaCl₂] = 0,2 M, [HEPES Na] = 0,1 M pH = 7,5, PEG 400 28 % [v/v]. Température : 4°C.

En parallèle, des cribles de cristallogénèse ont également été réalisés avec la protéine GST-SBP1 dans les conditions suivantes : GST-SBP1 + TCEP, GST-SBP1 + TCEP + Cd²⁺ et GST-SBP1 + TCEP + SeO₃²⁻. Dans le cas de SBP1, l'utilisation de l'étiquette GST n'a pas permis d'obtenir des cristaux. D'autres approches devront être envisagées.

C. Discussion

SBP1 est une protéine conservée chez un grand nombre d'organismes, tout particulièrement les organismes photosynthétiques. Plusieurs sites de liaison aux métaux impliquant des cystéines et des histidines sont conservés. De plus, différents métaux essentiels ou non ainsi que du Se peuvent se lier à SBP1 chez *Arabidopsis thaliana*. La fonction de cette protéine pourrait donc potentiellement être liée à sa capacité à lier différents ligands. Ainsi, en complément de l'analyse de la structure primaire des différentes SBPs, sa structure tridimensionnelle a été étudiée afin de caractériser plus précisément des sites potentiels de liaison aux métaux.

Chez *Arabidopsis thaliana*, SBP1 est une protéine de la famille des bêta-propeller. Sa structure a pu être modélisée à partir de la structure existante obtenue par rayons X de SBP1 chez *Sulfolobus tokodaii*. La particularité des bêta-propellers concernant le rapport structure/fonction repose sur le fait que ces protéines possèdent un tunnel (ou cœur ou cavité centrale) souvent important dans la fonction de la protéine. Ce tunnel, pour la plupart des bêta-propeller, est impliqué dans la coordination de ligands ou dans l'activité catalytique de la protéine (Pons *et al.*, 2003). Par exemple, dans le cas de la di-isopropylfluorophosphatase (DFPase) chez *Loligo vulgaris*, la résolution

de la structure de cette enzyme (Scharff *et al.*, 2001), impliquée dans la détoxification des composés chimiques phosphatés neurotoxiques *via* une hydrolyse, a permis de mettre en évidence la présence de deux atomes de Ca^{2+} situé dans le tunnel de la protéine. Ces deux atomes ont un rôle dans la structure et la fonction de la DFPase (Scharff *et al.*, 2001). En effet, la dissociation de l'atome de Ca^{2+} le moins affin entraîne une chute de l'activité de la DFPase, tandis que la dissociation de l'atome de Ca^{2+} le plus affin provoque une dénaturation de la protéine. Certains béta-propellers ont une activité qui n'est pas dépendante d'une interaction de ligands ou d'une activité catalytique liée à la présence du tunnel. Chez *Arabidopsis thaliana*, c'est le cas du photorécepteur UVR8 (UV Resistance Locus 8) (Christie *et al.*, 2012). En conditions normales d'exposition à la lumière, UVR8 est sous forme dimérique et les deux monomères sont reliés par des ponts salins. En condition de stress lumineux (UV-B), les ponts salins sont rompus et UVR8 se dissocie alors en monomère (réaction réversible). Cette monomérisation est également due à la présence de « pyramides » de tryptophanes jouant un rôle dans la photoréception. L'ensemble des acides aminés impliqués dans les réactions de dimérisation/monomérisation chez UVR8 en réponse au stress lumineux ne sont pas situés dans le tunnel central. En effet, ces acides aminés interagissent pour former des liaisons inter-protéiques et sont donc orientés à l'extérieur de la protéine, et non vers son cœur.

Dans le cas de SBP1 chez *Arabidopsis thaliana*, l'observation du cœur montre l'existence d'un site composé de quatre histidines (H^{90} , H^{91} , H^{154} et H^{475}) et d'une tyrosine (Y^{205}). D'après les résultats obtenus lors des analyses de spectroscopie d'absorption des rayons X, il semblerait que 2 ou 3 groupes carboxyles ou de l'eau soient impliquées dans la liaison du Cd^{2+} à SBP1. Les histidines présentent au niveau du cœur de la protéine SBP1 apparaissent donc comme des candidates potentielles impliquées dans la liaison du Cd^{2+} à cette protéine. Les quantités de protéines obtenues lors de la purification des différents mutants (mutation des histidines) ainsi que l'analyse de la pureté de chacun des mutants sont corrélées aux analyses préliminaires de thermostabilité par fluorescence réalisées sur les différentes protéines mutantes. Celles-ci semblent montrer que la mutation des histidines « déstabilise » la protéine. La cavité centrale de SBP1 semble donc avoir un rôle important sur la stabilité de la protéine. Ces résultats restent à confirmer et la production de la protéine GST-SBP1-Y205A devra être réalisée, ainsi que l'analyse de sa stabilité à l'aide de la thermostabilité par fluorescence.

Afin d'obtenir des informations sur la structure tridimensionnelle de SBP1 ainsi que sur les différentes cystéines libres et accessibles, les cystéines réduites ont été dosées. Ces dosages ainsi que l'observation de la structure modélisée de SBP1 chez *Arabidopsis thaliana* ont permis de mettre en évidence l'existence d'un potentiel pont disulfure au niveau des cystéines 97 et 158 qui pourrait avoir un rôle structural pour SBP1. Ce dosage permet également de définir les cystéines 21, 22, 100

et 485 comme des candidates potentielles impliquées dans la liaison au Cd^{2+} . Cette liaison au Cd^{2+} pourrait également impliquer des méthionines. L'observation de la simulation de la structure de At_SBP1 a permis d'identifier les méthionines 1, 36, 324, 407, 436 et 477 comme potentiellement impliquées dans la liaison au Cd^{2+} . Les vecteurs permettant de produire les différentes protéines mutantes ont été générés. Dans un futur proche, les protéines pourront être produites puis analysées à l'aide de la thermostabilité par fluorescence. Si leur stabilité est satisfaisante, des analyses de liaison du Cd^{2+} seront réalisées.

Les protéines mutantes produites à ce jour ne peuvent être utilisées pour identifier les acides aminés impliqués dans la liaison au Cd^{2+} . Ainsi, l'obtention de la structure du complexe SBP1- Cd^{2+} par rayons X apparaît comme la meilleure alternative. Pour cela, des expériences de cristallogénèse ont été menées. Celles-ci ont donc été réalisées en présence de Cd^{2+} , mais également sous la forme apoprotéique et en présence de SeO_3^{2-} . Ces deux dernières conditions ont été choisies car la structure de SBP1 sous sa forme apoprotéique permettrait de donner des indices sur sa fonction ainsi que sur les sites de liaison. La structure du complexe SBP1-Se permettrait de confirmer les données de spectroscopie d'absorption des rayons X (liaison de type R-S-Se-S-R faisant intervenir les cystéines 21 et 22) et de connaître la conformation de la partie N terminale lorsque le Se y est lié. Les cribles réalisés à ce jour sur la protéine SBP1 clivée de son étiquette GST ainsi que sur différentes formes tronquées en N terminal n'ont pas permis d'obtenir la structure de la protéine. Lors de la purification des protéines de différentes longueurs (MAT-SBP1, GGS-SBP1 et GYA-SBP1), il a été mis en évidence que la partie N terminale de SBP1 semblait indispensable à sa stabilité. Ceci semble être confirmé par les résultats du crible de cristallogénèse qui ont montré que la suppression de la partie N terminale ne permettait pas d'obtenir des cristaux.

L'utilisation d'une protéine avec une étiquette de large affinité telle que la GST, la MBP (maltose-binding protein) et la TRX (thioredoxine) a été décrite (Smyth *et al.*, 2003) comme une alternative dans le cas de protéines ne cristallisant pas. Concernant l'utilisation de protéines liées à une étiquette GST, cette technique de cristallisation a été décrite (Zhan *et al.*, 2001) puis utilisée pour cristalliser le domaine de liaison à l'ADN du facteur de transcription DREF (DNA replication-related element-binding factor) (Kuge *et al.*, 1997). Dans le cas de SBP1, les tests de cristallogénèse réalisés avec l'étiquette GST se sont révélés infructueux.

Conclusion

SBP1 est une protéine de type bêta-propeller possédant une cavité centrale qui s'apparente à un centre actif. Actuellement, la seule activité potentielle décrite de SBP1 chez *Arabidopsis thaliana* est la capacité du Cd^{2+} et du Se à se lier à cette protéine. Le tunnel central n'est pas impliqué dans la

liaison au Se (cette liaison se fait de manière covalente *via* les cystéines 21 et 22) et les expériences menées ne permettent pas actuellement de caractériser le rôle potentiel de ce tunnel dans la liaison au Cd^{2+} . En effet, la mutation des acides aminés du cœur déstabilise SBP1, les tests de liaison du Cd^{2+} aux différentes protéines mutantes n'ont donc pas pu être réalisés. La protéine GST-SBP1-Y205A sera analysée très prochainement. Les protéines GST-SBP1-C21S, GST-SBP1-C22S, GST-SBP1-C100S, GST-SBP1-M1S, GST-SBP1-M36S, GST-SBP1-M324S, GST-SBP1-M407S, GST-SBP1-M436S et GST-SBP1-M477S seront également produites afin d'analyser l'impact de ces acides aminés soufrés sur la liaison au Cd^{2+} . Les analyses de cristallogénèse réalisées n'ont pas permis d'obtenir de cristaux mais de nouvelles approches sont envisagées. Une technique appelée protéolyse limitée (Fontana *et al.*, 2004) permettant de caractériser les sous domaines stables ainsi que les régions instables de la protéine pourrait être utilisée. Il pourrait aussi être envisagé des essais de cristallogénèse avec les deux autres isoformes SBP2 et SBP3 car elles présentent des parties N terminale très différentes.

VI. CHAPITRE 3 : Analyse *in planta* de la protéine « Selenium Binding Protein 1 » (SBP1) chez *Arabidopsis thaliana*

A. Analyse de la localisation sub-cellulaire de SBP1

La localisation subcellulaire d'une protéine est importante pour obtenir des informations supplémentaires sur sa fonction, c'est pourquoi des vecteurs permettant l'expression de la protéine GFP (Green Fluorescent Protein) en N terminal ou en C terminal de SBP1 ont été produits. L'émission de fluorescence de la GFP a été observée par microscopie confocale en collaboration avec D. Grunwald (CEA, Grenoble).

Dans un premier temps, des analyses d'expression transitoire des deux protéines recombinantes GFP-SBP1 et SBP1-GFP ont été réalisées sur des feuilles de tabac. Dans ces conditions, SBP1 exprimée sous la forme GFP-SBP1 ou SBP1-GFP est nucléaire et cytosolique (Figure 49).

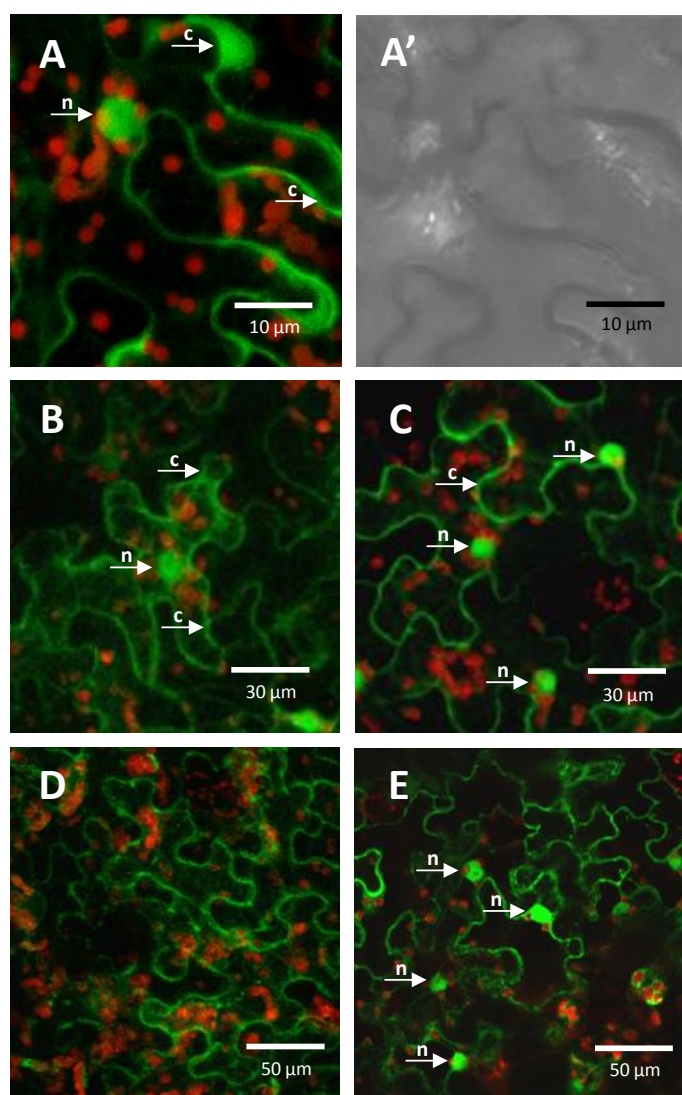


Figure 49 : Localisation sub-cellulaire des protéines GFP-SBP1 et SBP1-GFP exprimées dans des feuilles de tabac 3 jours après agro-infiltration. La longueur d'onde d'excitation est de 488 nm et 550 nm pour la GFP et la chlorophylle respectivement. La longueur d'émission est de 650 nm pour la GFP et 720 nm pour la chlorophylle. **A et B : Localisation sub-cellulaire de la protéine GFP-SBP1.** **A' : Enregistrement par microscopie à transmission de la feuille représentée en A.** **C : Localisation sub-cellulaire de la protéine SBP1-GFP.** **D : Contrôle cytosolique.** Utilisation d'un vecteur *GUS :: GFP*. **E : Contrôle nucléaire.** Utilisation d'un vecteur exprimant la GFP seule. *c* = localisation cytosolique ; *n* = localisation nucléaire.

Ces analyses ont été complétées par des analyses d'expression stable de SBP1 couplée à la GFP chez *Arabidopsis thaliana*. Les lignées transgéniques ont été sélectionnées sur la base d'une émission de fluorescence détectable à la loupe binoculaire. Les observations réalisées ont montré que les lignées GFP-SBP1 avaient un meilleur niveau de fluorescence que les lignées SBP1-GFP pour lesquelles le signal émis par la GFP était difficilement détectable. Des analyses d'immunodétection ont confirmé le faible niveau d'expression de la protéine recombinante SBP1-GFP (Figure 50). Concernant la protéine GFP-SBP1, celle-ci a un niveau d'expression similaire à la protéine native dans le cas des lignées 1, 27 et 28 (Figure 50). Ces dernières ont donc été utilisées pour l'analyse de la localisation cellulaire chez *Arabidopsis thaliana*. Des analyses de microscopie confocale ont été réalisées sur la lignée 27. L'expression stable de la protéine recombinante GFP-SBP1 montre que celle-ci est cytosolique et nucléaire dans les racines et dans les feuilles (Figure 51). A partir d'extraits protéiques provenant des lignées GFP-SBP1, des analyses d'immunodétection réalisées avec des anticorps anti-GFP ont montré l'absence de produits de dégradation de la protéine GFP-SBP1. En effet, la localisation nucléaire observée aurait pu correspondre à l'expression de la GFP seule qui se localise dans le noyau.

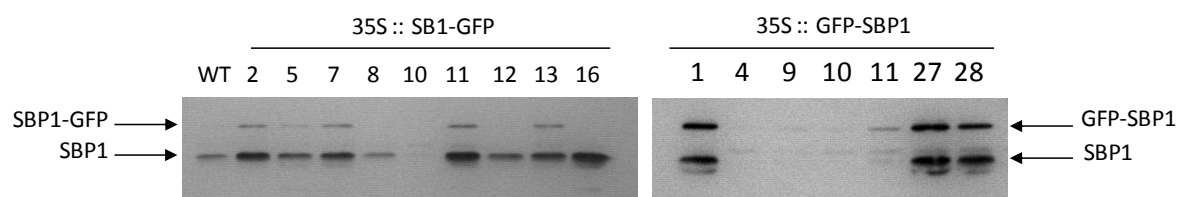


Figure 50 : Immunodétection des protéines SBP1, GFP-SBP1 et SBP1-GFP. Les westerns blots ont été réalisés à partir d'extraits protéiques des lignées 35S :: GFP-SBP1 et 35S :: SBP1-GFP respectivement. Des anticorps anti-SBP1 ont été utilisés pour détecter SBP1, SBP1-GFP et GFP-SBP1.

Par ailleurs, les outils de prédictions tel que Psort et les analyses protéomiques réalisées sur les organites purifiés ont permis de montrer que SBP1 n'était adressée ni au plaste, ni à la mitochondrie et ni à la vacuole. Par contre, SBP1 a été retrouvée dans les analyses protéomiques des protéines cytosoliques d'*Arabidopsis thaliana* (Ito *et al.*, 2011; Elmore *et al.*, 2012).

La localisation cytosolique et nucléaire de SBP1 se retrouve également chez l'homme (Chen *et al.*, 2004; Stammer *et al.*, 2008; Xia *et al.*, 2011).

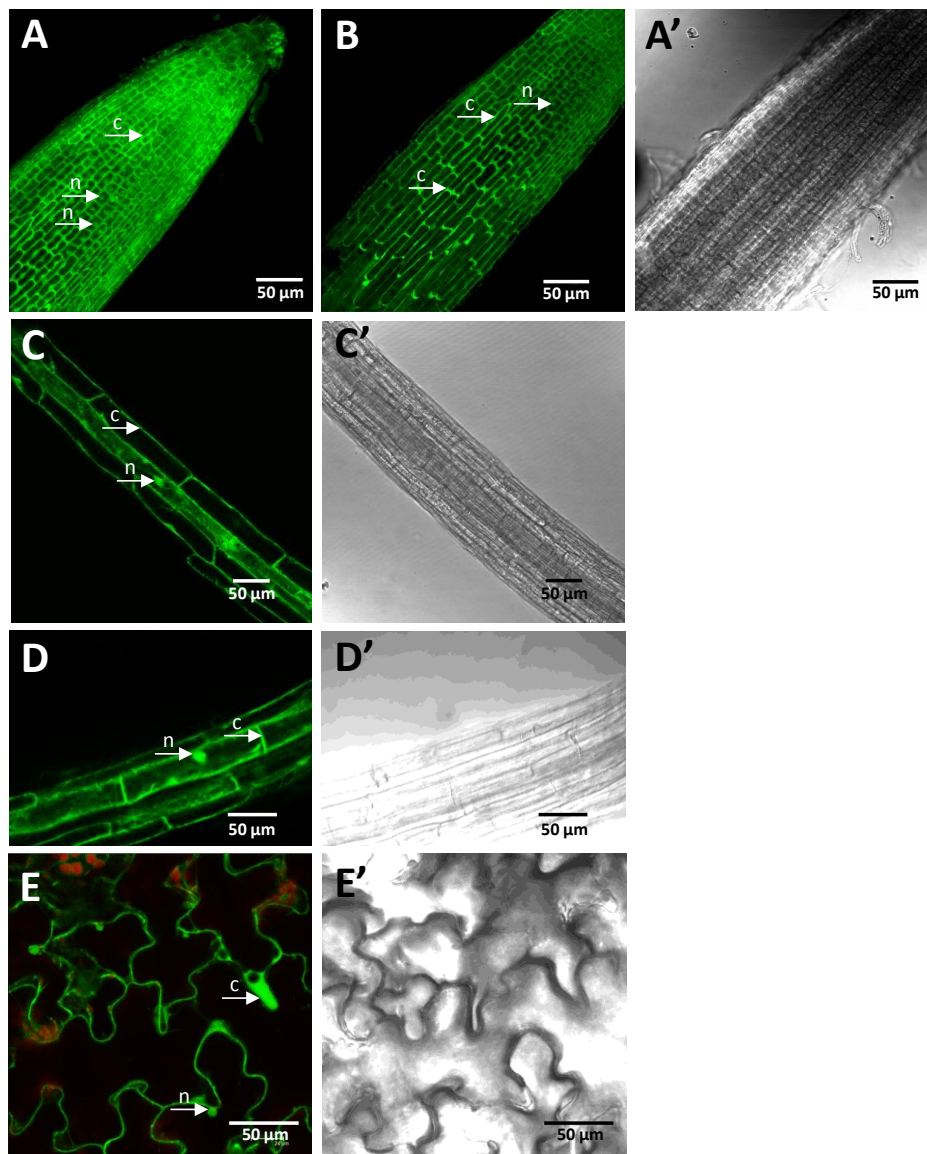


Figure 51 : Localisation sub-cellulaire de la protéine recombinante GFP-SBP1 exprimée chez *Arabidopsis thaliana*. Les mesures ont été effectuées sur la lignée 27 sur des plantes de 10 jours. La longueur d'onde d'excitation est de 488 nm et 550 nm pour la GFP et la chlorophylle respectivement. La longueur d'onde d'émission est de 650 nm pour la GFP et 720 nm pour la chlorophylle. **A et B : GFP-SBP1 dans la pointe racinaire.** **A' : Pointe racinaire observée par microscopie à transmission.** **C et D : GFP-SBP1 dans les racines.** **C' et D' : Racine observée par microscopie à transmission.** **E : GFP-SBP1 dans une feuille.** **E' : Feuille observée par microscopie à transmission.** c = localisation cytosolique ; n = localisation nucléaire.

B. Identification des motifs de régulation *cis* en réponse au stress dans le promoteur de *SBP1*

Des analyses du niveau d'expression de *SBP1* en réponse à différents stress ont été réalisées grâce à l'utilisation de lignées bioluminescentes (utilisation du gène rapporteur codant pour la luciférase sous le contrôle du promoteur de *SBP1*) et les résultats obtenus ont montré que *SBP1* était induite en réponse au Cd^{2+} , au Cu^{2+} , au SeO_4^{2-} , à l' H_2O_2 et à la carence en soufre (Hugouvieux *et al.*, 2009). Lors de ces analyses, un fragment de 1429 paires de base contenant la zone promotrice de *SBP1* a été utilisé pour contrôler l'expression de la luciférase. D'autre part, il a été mis en évidence que le profil d'expression de *SBP1* était identique au profil d'expression de *PRH43* (ou *APR2*), enzyme clef impliquée dans une des premières étapes de la voie d'assimilation du soufre. Ceci suggère qu'une demande en soufre pourrait être à l'origine de l'augmentation de l'expression de *SBP1* en réponse aux différents stress inducteurs (Hugouvieux *et al.*, 2009). Corrélié à ces résultats, le motif GAGAC indispensable à l'expression du transporteur racinaire de haute affinité de soufre *SULTR1;1* en réponse à la carence en soufre (Maruyama-Nakashita *et al.*, 2005) est présent en multicopies dans le promoteur de *SBP1*.

Au sein des 589 premières paires de base du fragment de 1429 paires cloné en amont de la luciférase (qui correspond à la zone intergénique prédite entre le gène *SBP1* et le gène précédent) figurent 4 copies de ce motif GAGAC : M1, M2, M3 et M4 (Figure 52 A). L'analyse de l'impact de ces motifs sur l'expression de *SBP1* en réponse à la carence en soufre et aux autres stress a été entreprise.

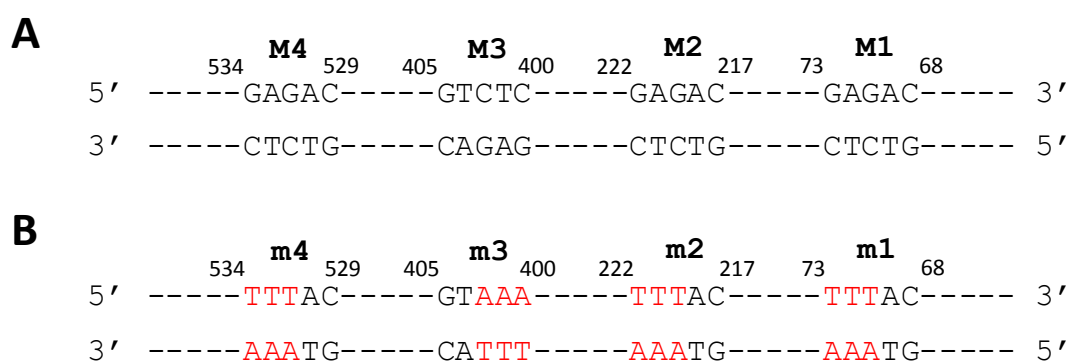


Figure 52 : Représentation schématique du promoteur de *SBP1*. A : Les différents motifs GAGAC M1, M2, M3 et M4 sont représentés. M1, M2 et M4 sont sur le brin sens tandis que M3 est sur le brin anti-sens. B : Les différents motifs mutés m1, m2, m3 et m4 sont représentés.

1. Lignées bioluminescentes produites pour l'analyse de la régulation du promoteur de *SBP1*

L'impact du motif GAGAC sur l'expression de *SBP1* a été analysé en générant par mutagenèse dirigée des versions mutantes du promoteur de 1429 paires de base. Les 4 premiers motifs GAGAC ont été mutés indépendamment et en combinaison en motif TTTAC pour m1, m2 et m4 et en motif GTAAA pour le motif m3 (Figure 52 B). Ces mutations sont celles qui abolissent le plus la fonction du motif GAGAC (Maruyama-Nakashita *et al.*, 2005). Les différentes versions du promoteur ont ensuite été sous clonées en amont du gène rapporteur de la luciférase dans le vecteur pLUC et des plantes transgéniques ont été générées. En parallèle, le fragment de la région promotrice de *SBP1* ne contenant que les 589 premières paires de base a également été utilisé afin de vérifier que celui-ci contient le(s) élément(s) *cis* de régulation en réponse à la carence en soufre. L'ensemble des vecteurs et lignées transgéniques générés sont répertoriés dans le tableau 12.

Mutation(s) réalisée(s)	Vecteur disponible	Lignée transgénique
WT	x	x
WT-P589 (589 paires de bases)	x	x
m1-M2-M3-M4	x	x
M1-m2-M3-M4	x	x
M1-M2-m3-M4	x	x
M1-M2-M3-m4	x	x
m1-m2-M3-M4	x	x
m1-M2-m3-M4	x	
m1-M2-M3-m4	x	
M1-m2-m3-M4	x	
M1-m2-M3-m4	x	
m1-m2-m3-M4	x	x
m1-m2-M3-m4	x	
m1-M2-m3-m4	x	
M1-m2-m3-m4	x	
m1-m2-m3-m4	x	x

Tableau 12 : Récapitulatif des différentes mutations réalisées au niveau des différents motifs GAGAC présents dans le promoteur de *SBP1*. La colonne « vecteur disponible » indique que la séquence du promoteur muté a été sous-clonée dans le pGEM-Teasy. La colonne « lignée transgénique » indique que la séquence du promoteur muté a été clonée dans le vecteur pLUC, que les plantes ont été transformées et que les lignées transgéniques homozygotes à une insertion sont disponibles.

2. Le motif M2 est fortement impliqué dans la régulation de l'expression de *SBP1* en réponse à la carence en soufre

Pour réaliser un premier crible permettant d'identifier rapidement si un ou plusieurs des 4 motifs est impliqué dans la réponse à la carence en soufre, des analyses préliminaires ont été réalisées sur les lignées hétérozygotes à une seule insertion. Le marqueur de sélection utilisé pour sélectionner les lignées transgéniques est la GFP. Il a donc été possible, par observation à la loupe

binoculaire, de sélectionner les graines fluorescentes et d'obtenir un lot de graines, pour chaque lignée, constitué d'1/3 de graines homozygotes à une insertion et de 2/3 de graines hétérozygotes à une insertion (le mélange initial contenait 1/4 de graines homozygotes, 1/4 de graines sauvages et 1/2 de graines hétérozygotes). Pour chacune des mutations, deux lignées indépendantes ont été choisies au hasard et testées.

Dans un premier temps, afin de s'assurer que le(s) motif(s) impliqué(s) dans la réponse à la carence en soufre est (sont) bien situé(s) dans les 589 premières paires de base du promoteur, les lignées *SBP1 :: LUC* et *SBP1-P589 :: LUC* ont été testées en réponse à ce stress (Figure 53 A). Les résultats obtenus ont montré que l'expression de la luciférase était induite sous le contrôle du promoteur de 589 paires de base et de 1429 paires de base après 7 jours d'exposition à une carence en soufre (Figure 53 A). La lignée L3 *SBP1 :: LUC* est la lignée homozygote de référence utilisée lors des expériences d'analyse de l'expression de *SBP1* en réponse au stress (Hugouvieux *et al.*, 2009), tandis que la lignée L5 *SBP1 :: LUC* et les lignées L4 et L10 *SBP1-P589 :: LUC* sont des lignées hétérozygotes. Les lignées *SBP1-P589 :: LUC* ont un niveau d'induction similaire à la lignée L3 *SBP1 :: LUC*, ce qui confirme *a priori* que le(s) élément(s) de régulation en réponse à la carence en soufre de *SBP1* sont bien situés dans le fragment de la région promotrice contenant les 589 premières paires de base.

Les lignées pour lesquelles seulement un seul motif a été muté (*SBP1m1 :: LUC*, *SBP1m2 :: LUC*, *SBP1m3 :: LUC* et *SBP1m4 :: LUC*) ainsi que les lignées pour lesquelles plusieurs motifs ont été mutés en combinaison (*SBP1m1m2 :: LUC*, *SBP1m1m2m3 :: LUC* et *SBP1m1m2m3m4 :: LUC*) ont également été testées. D'après les résultats obtenus dans la figure 53 B, dans le cas des lignées pour lesquelles les motifs M1, M3 et M4 ont été mutés indépendamment, l'expression de la luciférase est induite en réponse à la carence en soufre. Les taux d'induction des lignées *SBP1m3 :: LUC* sont similaires à ceux des lignées *SBP1 :: LUC* et *SBP1-P589 :: LUC*. Les taux d'induction chez les lignées *SBP1m1 :: LUC* et *SBP1m4 :: LUC*, bien que plus faibles que chez les lignées *SBP1 :: LUC* et *SBP1-P589 :: LUC* (entre 5 et 15), ne sont pas négligeables. Ceci signifie que ces motifs ne jouent apparemment pas un rôle prépondérant dans l'induction de l'expression de *SBP1* en réponse à la carence en soufre. Chez les lignées pour lesquelles le motif M2 a été muté, la carence en soufre n'entraîne pas d'augmentation nette de l'activité de la luciférase sur les deux lignées indépendantes testées. Ces premières analyses suggèrent que le motif M2 pourrait être un élément *cis* impliqué dans la régulation de l'expression de *SBP1* en réponse à ce stress.

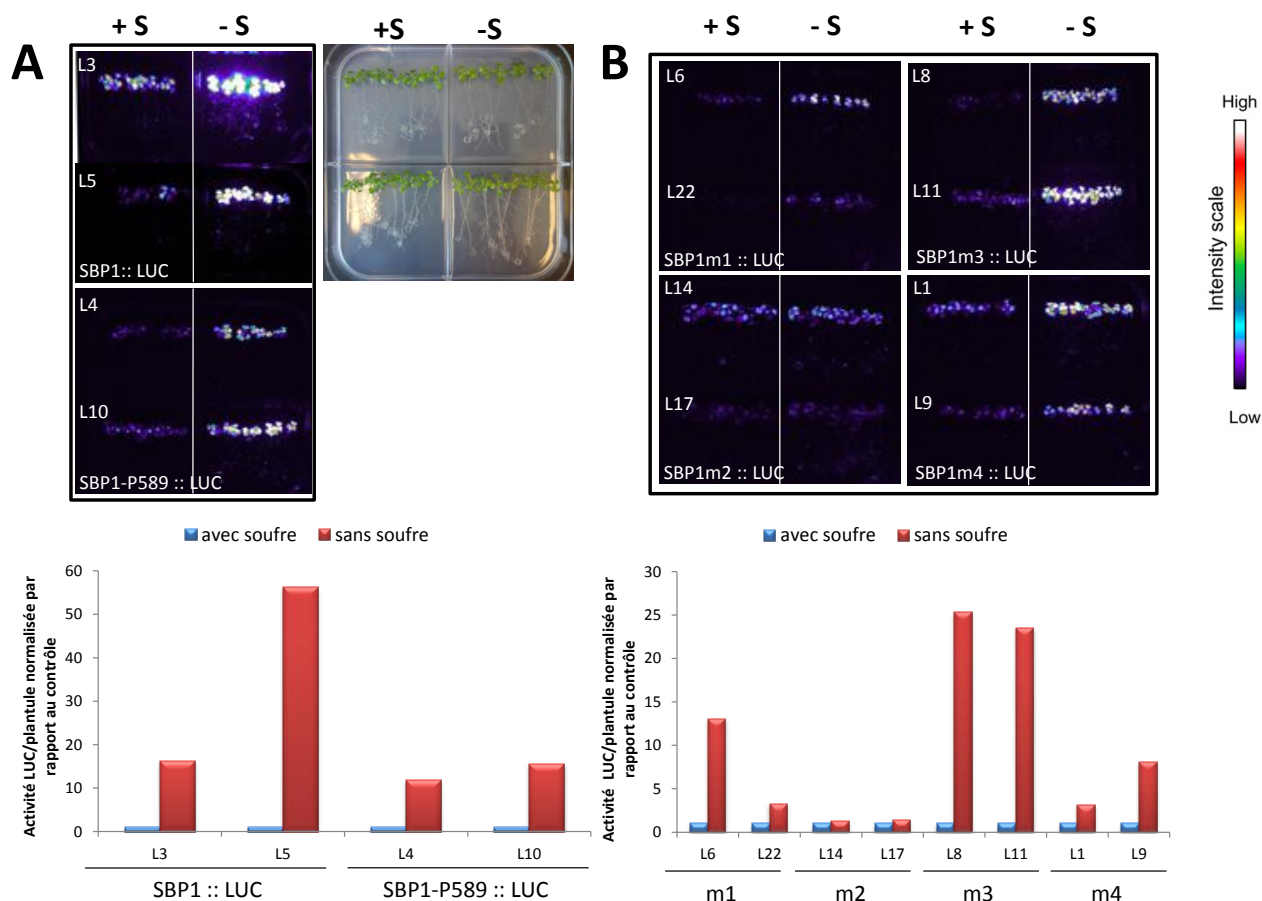


Figure 53 : Impact de la mutation des motifs M1, M2, M3 et M4 sur l'activité luciférase en réponse à la carence en soufre sur des plantules de 7 jours transférées 7 jours sur un milieu carencé en soufre (-S) ou non (+S). A : Enregistrement de l'activité luciférase chez les lignées SBP1::LUC et SBP1-P589::LUC. La lignée L3 SBP1::LUC est une lignée homozygote. La lignée L5 SBP1::LUC et les lignées L4 et L10 SBP1-P589::LUC sont des lignées hétérozygotes. Les photos de gauche représentent les enregistrements de la bioluminescence émise par la luciférase. Les enregistrements ont été réalisés pendant 5 min. La photo de droite représente les plantes sur lesquelles les enregistrements ont été réalisés. Le graphique représente l'induction de la luciférase normalisée par rapport au contrôle non carencé en soufre. **B : Enregistrement de l'activité luciférase chez les lignées SBP1m1::LUC, SBP1m2::LUC, SBP1m3::LUC et SBP1m4::LUC.** Les lignées L6 et L22 SBP1m1::LUC, L14 et L17 SBP1m2::LUC, L8 et L11 SBP1m3::LUC et SBP1m4::LUC sont des lignées hétérozygotes. Les photos représentent l'enregistrement de la bioluminescence émise par la luciférase. Les enregistrements ont été réalisés pendant 5 min. Le graphique représente l'induction de la luciférase normalisée par rapport au contrôle non carencé en soufre. m1 : SBP1m1::LUC, m2 : SBP1m2::LUC, m3 : SBP1m3::LUC et SBP1m4::LUC.

Concernant les lignées pour lesquelles plusieurs motifs ont été mutés (SBP1m1m2::LUC, SBP1m1m2m3::LUC et SBP1m1m2m3m4::LUC), le niveau d'expression à la base (en condition normales de culture) est très faible pour les lignées SBP1m1m2::LUC et SBP1m1m2m3m4::LUC, aucune induction en réponse à la carence en soufre n'est observée puisque le motif M2 est muté (Figure 54). Il semblerait que la mutation combinée de plusieurs motifs GAGAC puisse abolir

l'expression de SBP1 en conditions normales de culture. Des analyses ultérieures devront être menées pour tester si les combinaisons m1m2, m1m2m3 et m1m2m3m4 ont un impact sur l'expression de SBP1. Il a donc été décidé d'étudier seulement les lignées portant une mutation unique lors des expériences suivantes.

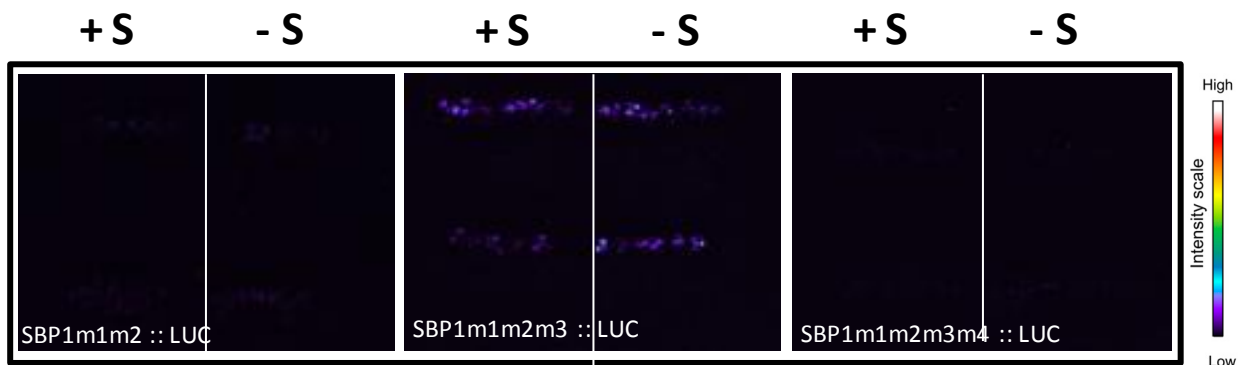


Figure 54 : Impact de la mutation combinée des différents motifs M1, M2, M3 et M4 sur la bioluminescence de la luciférase en réponse à la carence en soufre sur des plantules de 7 jours transférées 7 jours sur un milieu carencé en soufre (-S) ou non (+S). Les lignées testées sont des lignées hétérozygotes et 16 plantules par lignée ont été testées. Les enregistrements ont été réalisés pendant 5 min.

Afin de confirmer l'absence d'induction de la luciférase sur plusieurs lignées *SBP1m2 :: LUC*, 6 lignées hétérozygotes supplémentaires *SBP1m2 :: LUC* ont été testées (Figure 55). Une lignée possédant le promoteur 35S en amont du gène de la luciférase a été utilisée en tant que contrôle constitutif qui ne répond pas à la carence en S. Les activités de base des lignées *SBP1m2 :: LUC* varient de 860 à 11319 photons/s tandis que celles des lignées *SBP1 :: LUC* est de 2717 photons/s. L'enregistrement de l'activité LUC de ces différentes lignées ainsi que le calcul de l'induction de la luciférase lors d'une carence en soufre montrent qu'aucune des lignées n'est induite en réponse à cette carence et se comportent comme la lignée *35S :: LUC* qui est une lignée non inductible. L'ensemble de ces résultats obtenus sur 8 lignées indépendantes hétérozygotes confirme donc que l'expression de SBP1 n'est pas induite en réponse à la carence en S lorsque le motif M2 est muté.

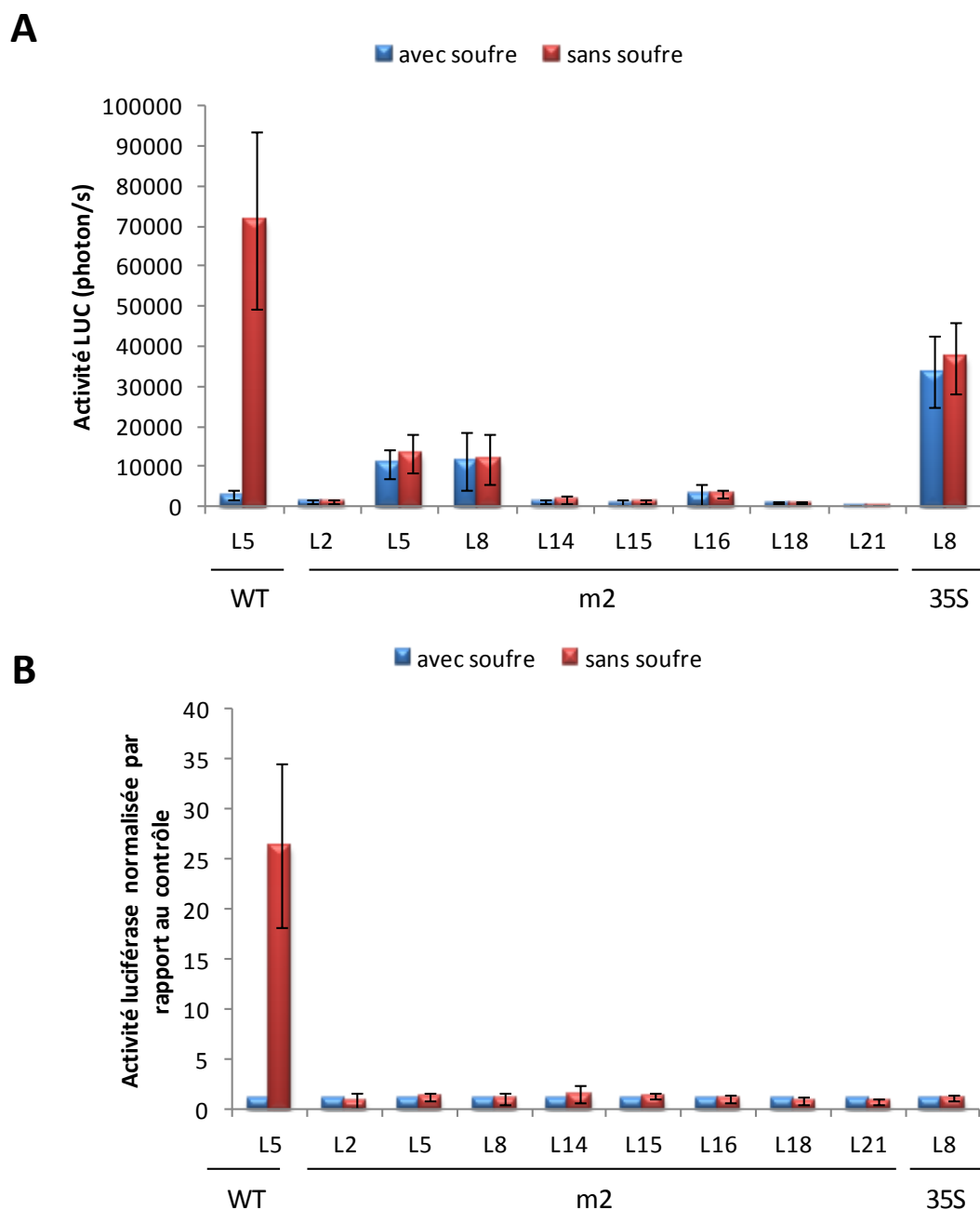


Figure 55 : Impact de la mutation du motif M2 sur l'activité luciférase en réponse à la carence en soufre sur des plantules de 7 jours transférées 7 jours sur un milieu carencé en soufre. Les lignées testées sont des lignées hétérozygotes et 16 plantules par lignée ont été testées. Les enregistrements ont été réalisés pendant 5 min. A : L'activité LUC est exprimée en photon/s/plantule. B : L'activité LUC est normalisée par rapport au contrôle non carencé en soufre. Elle est exprimée en unités arbitraires. WT : SBP1 :: LUC (L5), M2 : SBP1m2 :: LUC (L2, L5, L8, L14, L15, L16, L18 et L21) et 35S : 35S :: LUC (L8).

Ces résultats étant positifs, les expériences ultérieures ont été réalisées à partir de lignées homozygotes. Plusieurs lignées à une insertion *SBP1 :: LUC*, *SBP1-P589 :: LUC*, *SBP1m1 :: LUC*, *SBP1m2 :: LUC*, *SBP1m3 :: LUC* et *SBP1m4 :: LUC* ont été isolées et l'induction de la luciférase sous le contrôle du promoteur de SBP1 muté ou non a été à nouveau analysée en réponse à la carence en soufre 4 et 7 jours après transfert sur un milieu carencé en soufre. La toxicité liée à la carence en soufre a été suivie en pesant les plantules après 7 jours d'exposition au stress (Figure 56). La masse moyenne par plantule transférée 7 jours sur un milieu carencé ou non en soufre a montré que d'une manière générale, la carence en soufre n'entraînait pas de chute de masse importante après 7 jours. Pour l'ensemble des lignées analysées, l'augmentation de l'activité luciférase observée entre les enregistrements réalisés à 4 jours et ceux à 7 jours dans les conditions normales de culture s'explique par le gain de masse au cours du temps (Figures 57 et 58). L'induction de l'expression de la luciférase chez les lignées *SBP1 :: LUC* (WT) et *SBP1-P589 :: LUC* est confirmée après 4 jours et 7 jours d'exposition à un milieu carencé en soufre (facteur d'induction allant de 5 à 25 après 4 jours et de 8 à 35 après 7 jours). Ceci montre à nouveau que le promoteur de 589 paires de bases est suffisant pour réguler l'expression de SBP1 en réponse à la carence en soufre. Concernant les lignées *SBP1m1 :: LUC*, *SBP1m3 :: LUC* et *SBP1m4 :: LUC*, celles-ci présentent une augmentation de l'activité luciférase et donc une induction LUC en réponse à une carence en soufre 4 ou 7 jours après transfert (facteur d'induction allant de 3 à 9 après 4 jours et de 7 à 25 après 7 jours) très similaires aux valeurs observées dans le cas des lignées *SBP1 :: LUC* et *SBP1-P589 :: LUC*. En ce qui concerne le motif M2, une faible induction de la luciférase en réponse à la carence en soufre est observée lorsque celui-ci est muté (facteur d'induction allant de 1,4 à 1,9 à 4 jours et de 2,2 à 2,8 à 7 jours). Ces résultats obtenus sur les lignées homozygotes confirment que le motif M2 est le motif *cis* GAGAC fortement impliqué dans la réponse à la carence en soufre de SBP1. Cependant, il existe une légère induction observée pour ces lignées et ceci suggère qu'un ou plusieurs autres éléments de signalisation puissent intervenir dans la régulation de l'expression de SBP1 en réponse à la carence en soufre. La figure 59 montre les enregistrements de l'activité luciférase de deux lignées seulement pour chaque mutation réalisée. L'analyse du niveau d'induction de la luciférase montre que celui-ci augmente au cours du temps entre 4 et 7 jours (sauf pour la lignée L5 *SBP1 :: LUC* qui présente un facteur d'induction 2,7 fois moins élevé). L'induction de SBP1 en réponse à la carence en soufre n'apparaît pas comme un phénomène transitoire. Des cinétiques plus précises de l'induction de la luciférase dans le cas des lignées *SBP1 :: LUC* et *SBP1m2 :: LUC* devront être réalisées afin de caractériser plus précisément l'impact du motif M2 sur la régulation de l'expression de SBP1 en réponse à la carence en soufre.

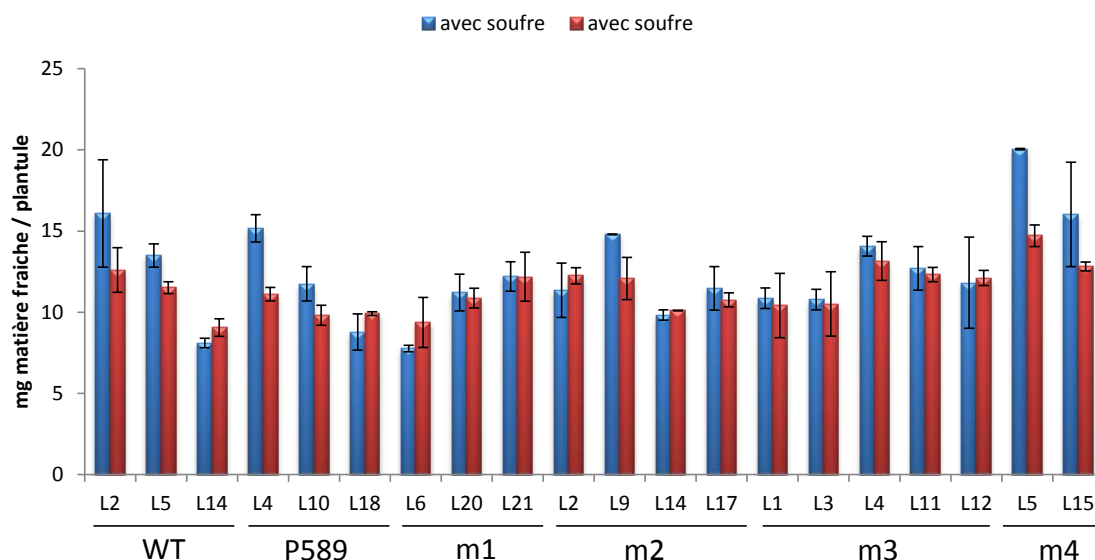


Figure 56 : Masse fraîche de chaque plantule chez les lignées SBP1 :: LUC, SBP1-P589 :: LUC, SBP1m1 :: LUC, SBP1m2 :: LUC, SBP1m3 :: LUC et SBP1m4 :: LUC. Les mesures ont été réalisées sur des plantules de 7 jours transférées 7 jours sur un milieu carencé en soufre. Pour chaque lignée, 16 plantules ont été analysées. WT : SBP1 :: LUC (L2, L5 et L14), P589 : SBP1-P589 :: LUC (L4, L10 et L18), M1 : SBP1m1 :: LUC (L6, L20 et L21), M2 : SBP1m2 :: LUC (L2, L9, L14 et L17), M3 : SBP1m3 :: LUC (L1, L3, L4, L11 et L12) et M4 : SBP1m4 :: LUC (L5 et L15).

1. Le motif m2 est fortement impliqué dans la régulation de l'expression de SBP1 en réponse au cadmium, au séléniate et au cuivre

Le motif M2 apparaissant comme un motif *cis* majoritairement impliqué dans la réponse de SBP1 à la carence en soufre, l'implication de celui-ci dans l'expression de SBP1 à différents stress a été étudiée. Les expériences ont été réalisées sur la lignée L5 SBP1 :: LUC et la lignée L14 SBP1m2 :: LUC, toutes deux choisies car elles présentent un niveau d'expression de la luciférase similaire en conditions normales de culture. Pour chacune de ces lignées, 16 plantules ont été analysées dans chaque condition. L'impact de la mutation m2 a été étudié sur la réponse de SBP1 au cadmium (Cd^{2+}) au séléniate (SeO_4^{2-}) et au cuivre (Cu^{2+}). Des analyses d'induction de la luciférase ont été réalisées sur des plantules exposées à différentes concentrations de Cd^{2+} , de SeO_4^{2-} et de Cu^{2+} (50 μM , 150 μM et 250 μM). Les enregistrements ont été réalisés à 24h et à 72h (Figures 60 A, 61 A et 62 A). La perte de masse par plantule a aussi été évaluée après 72h d'exposition (Figures 60 B, 61 B et 62 B).

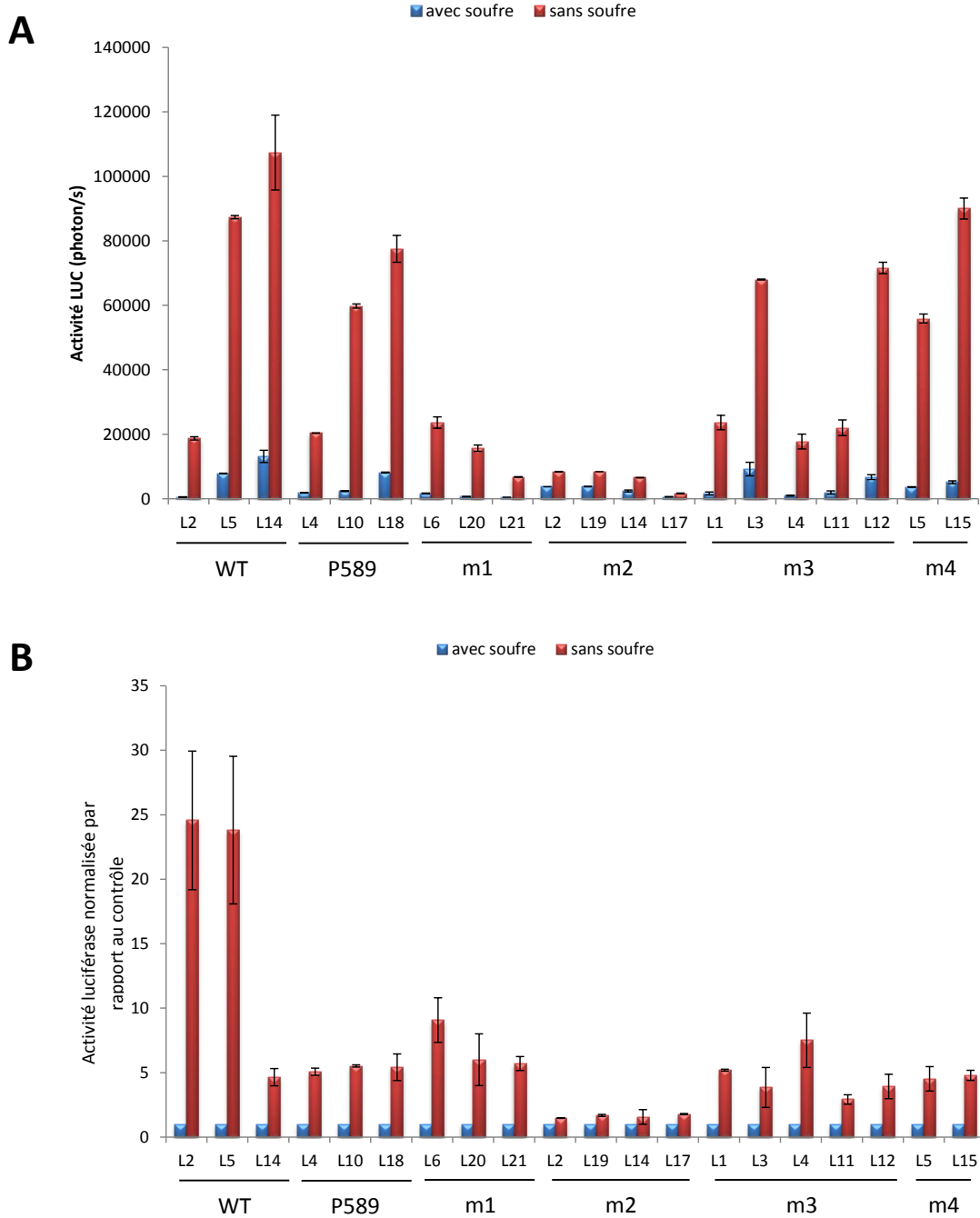


Figure 57 : Impact de la mutation indépendante des motifs M1, M2, M3 et M4 sur l'activité luciférase en réponse à la carence en soufre sur des plantules de 7 jours transférées 4 jours sur un milieu carencé en soufre ou non. Les lignées testées sont des lignées homozygotes et 16 plantules par lignée ont été testées. Les enregistrements ont été réalisés pendant 5 min. **A** : L'activité LUC est exprimée en photon/s/plantule. **B** : L'activité LUC est normalisée par rapport au contrôle non carencé en soufre. Elle est exprimée en unités arbitraires. WT : SBP1 :: LUC (L2, L5 et L14), P589 : SBP1-P589 :: LUC (L4, L10 et L18), M1 : SBP1m1 :: LUC (L6, L20 et L21), M2 : SBP1m2 :: LUC (L2, L19, L14 et L17), M3 : SBP1m3 :: LUC (L1, L3, L4, L11 et L12) et M4 : SBP1m4 :: LUC (L5 et L15).

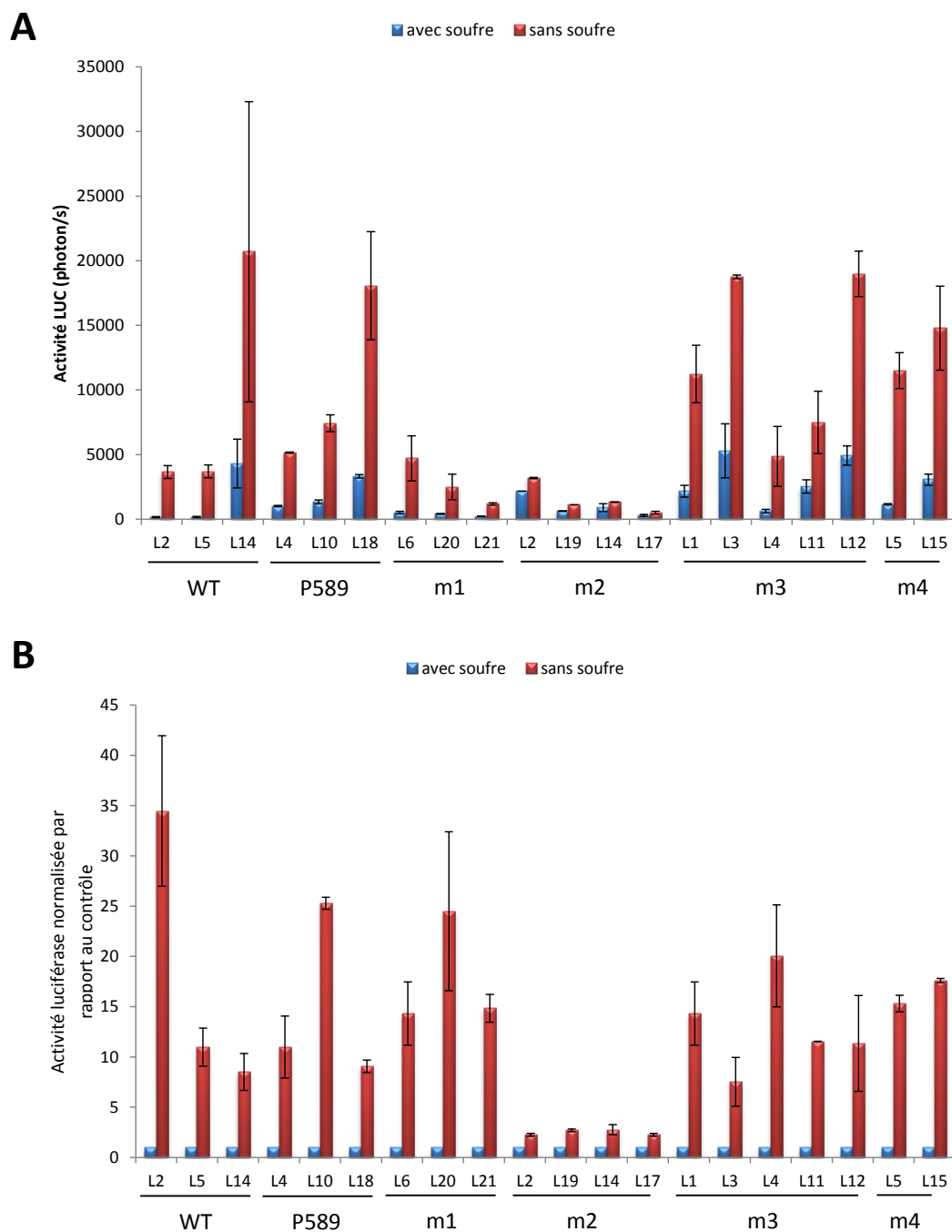


Figure 58: Impact de la mutation indépendante des motifs M1, M2, M3 et M4 sur l'activité luciférase en réponse à la carence en soufre sur des plantules de 7 jours transférées 7 jours sur un milieu carencé en soufre. Les lignées testées sont des lignées homozygotes et 16 plantules par lignée ont été testées. Les enregistrements ont été réalisés pendant 5 min. **A** : L'activité LUC est exprimée en photon/s/plantule. **B** : L'activité LUC est normalisée par rapport au contrôle non carencé en soufre. Elle est exprimée en unités arbitraires. WT : SBP1 :: LUC (L2, L5 et L14), P589 : SBP1-P589 :: LUC (L4, L10 et L18), M1 : SBP1m1 :: LUC (L6, L20 et L21), M2 : SBP1m2 :: LUC (L2, L19, L14 et L17), M3 : SBP1m3 :: LUC (L1, L3, L4, L11 et L12) et M4 : SBP1m4 :: LUC (L5 et L15).

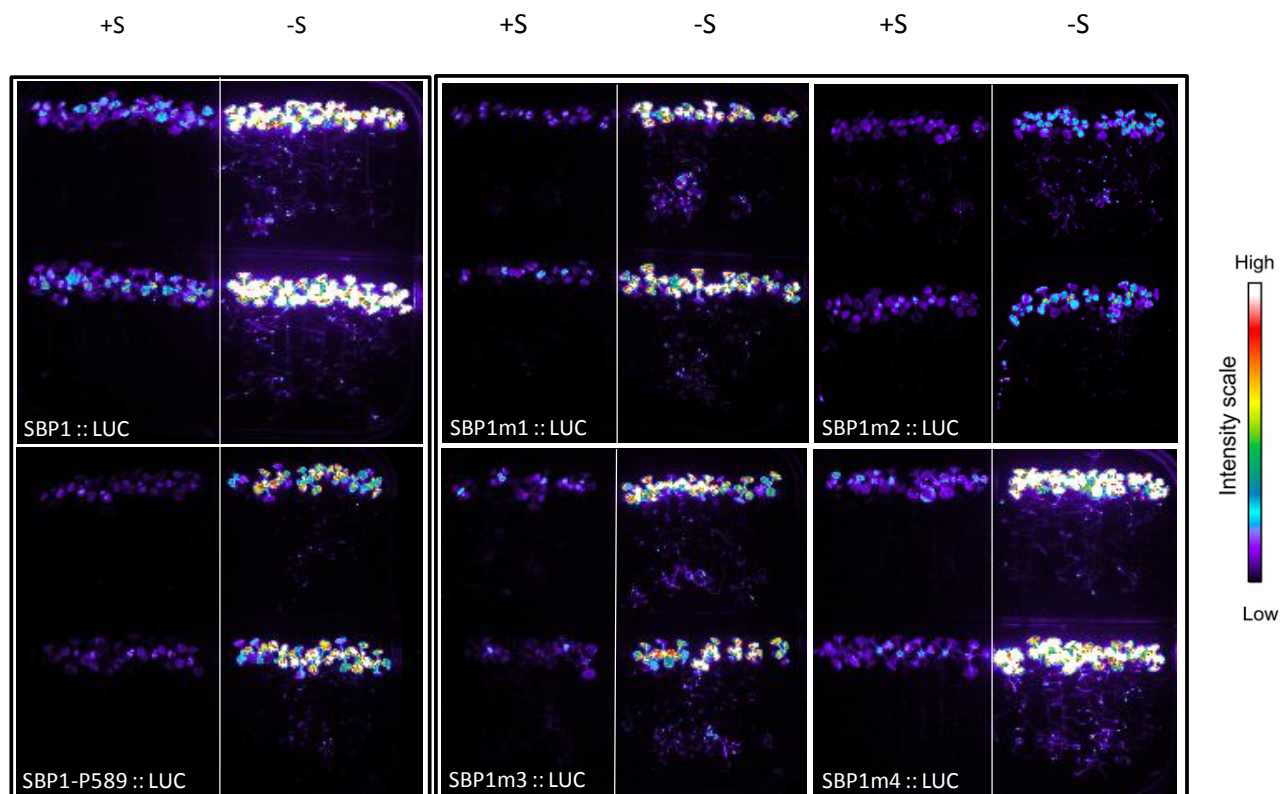


Figure 59 : Impact de la mutation des motifs M1, M2, M3 et M4 sur la bioluminescence de la luciférase sur des plantules de 7 jours transférées 4 jours sur un milieu carencé en soufre (-S) ou non (+S). **Les lignées testées sont des lignées homozygotes et 16 plantules par lignée ont été testées. Les enregistrements ont été réalisés pendant 5 min.** A : SBP1 :: LUC et SBP1-P589 :: LUC Contrôles positifs permettant de vérifier l'induction de SBP1 en réponse à la carence en soufre. B : SBP1m1 :: LUC, SBP1m2 :: LUC, SBP1m3 :: LUC et SBP1m4 :: LUC.

Les expériences menées sur les plantes exposées au Cd^{2+} montrent que les lignées ont une perte de masse similaire par rapport au toxique. L'induction de l'activité luciférase en réponse au Cd^{2+} chez la lignée L5 SBP1 :: LUC est, comme attendu, un phénomène dose-dépendant à 24h (facteur d'induction allant de 1,5 à 2,2) (Figure 60 A). Chez la lignée L14 SBP1m2 :: LUC, l'activité luciférase par plantule n'est pas induite 24h après transfert pour des concentrations de 50 μM et 150 μM mais elle est légèrement induite (facteur d'induction de 1,5) pour une concentration de 250 μM de Cd^{2+} . A 72h, la réponse des lignées L5 SBP1 :: LUC et L14 SBP1m2 :: LUC sont similaires ainsi que la perte de masse (Figure 60 B). La mutation du motif M2 semble donc affecter l'expression de la luciférase en réponse à une exposition au Cd^{2+} aux temps précoces.

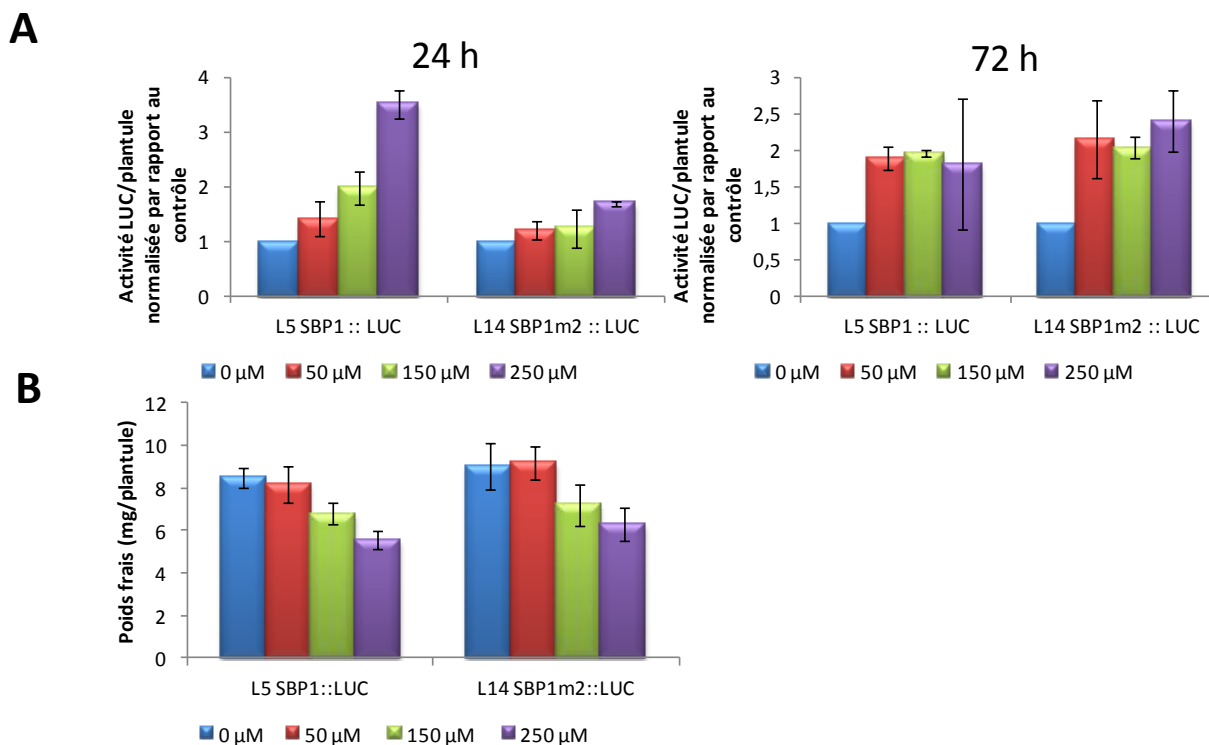


Figure 60 : Implication du motif M2 dans la réponse de la plante au Cd^{2+} . **A : Comparaison de l'induction de l'activité luciférase chez les lignées L5 SBP1 :: LUC et L14 SBP1m2 :: LUC en réponse au Cd^{2+} .** Les analyses ont été réalisées sur des plantules de 7 jours transférées 24 h ou 72 h sur un milieu contenant 50 μM , 150 μM ou 250 μM de Cd^{2+} . Les enregistrements ont été réalisés pendant 5 min. Pour chaque lignée et chaque condition, 16 plantules ont été analysées. L'induction LUC normalisée par rapport au contrôle non exposé au Cd^{2+} est exprimée en unités arbitraires. **B : Poids frais de chaque plantule chez les lignées L5 SBP1 :: LUC et L14 SBP1m2 :: LUC.** Les analyses ont été réalisées sur des plantules de 7 jours transférées 72 h sur un milieu contenant 50 μM , 150 μM ou 250 μM de Cd^{2+} . Pour chaque lignée, 16 plantules ont été analysées.

Concernant l'exposition au SeO_4^{2-} pendant 24h de la lignée L5 SBP1 :: LUC, l'expression de la luciférase est, comme attendu, dose-dépendante par rapport aux concentrations de SeO_4^{2-} (facteur d'induction allant de 2,4 à 4) (Figure 61 A). L'expression de la luciférase au niveau des plantules chez la lignée L14 SBP1m2 :: LUC n'est quasiment pas induite en réponse au SeO_4^{2-} (facteur d'induction allant de 1,5 à 1,8). Dans le cas d'une exposition de 72h au SeO_4^{2-} , l'induction de la luciférase observée chez la lignée L5 SBP1 :: LUC est plus importante qu'à 24h (facteur d'induction allant de 1,9 à 4,2) et s'accompagne d'une perte de masse (Figure 61 B). Comme dans le cas du Cd^{2+} , les deux lignées comparées présentent la même perte de masse en réponse au SeO_4^{2-} (Figure 61 B). Chez la lignée L14 SBP1m2 :: LUC, l'induction de la luciférase est similaire à 24h donc quasi inexistante (facteur d'induction allant de 0,8 à 1,3). La mutation du motif M2 semble donc affecter l'expression de la luciférase en réponse à une exposition au SeO_4^{2-} de façon similaire à 24h et 72h.

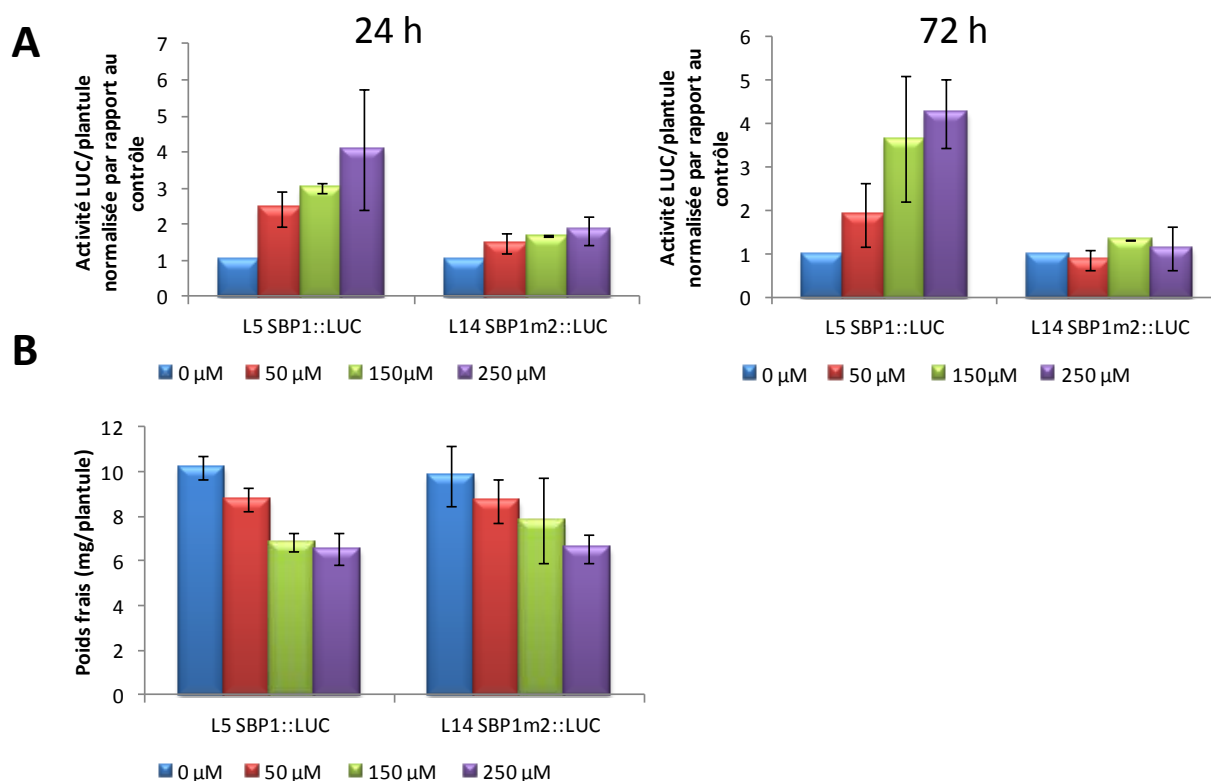


Figure 61 : Implication du motif M2 dans la réponse de la plante au SeO_4^{2-} . **A :** Comparaison de l'induction de l'activité luciférase chez les lignées L5 SBP1 :: LUC et L14 SBP1m2 :: LUC en réponse au SeO_4^{2-} . Les analyses ont été réalisées sur des plantules de 7 jours transférées 24 h ou 72 h sur un milieu contenant 50 μ M, 150 μ M ou 250 μ M de SeO_4^{2-} . Les enregistrements ont été réalisés pendant 5 min. Pour chaque lignée et chaque condition, 16 plantules ont été analysées. L'induction LUC normalisée par rapport au contrôle non exposé au SeO_4^{2-} est exprimée en unités arbitraires. **B :** Poids frais de chaque plantule chez les lignées L5 SBP1 :: LUC et L14 SBP1m2 :: LUC. Les analyses ont été réalisées sur des plantules de 7 jours transférées 72 h sur un milieu contenant 50 μ M, 150 μ M ou 250 μ M de SeO_4^{2-} . Pour chaque lignée, 16 plantules ont été analysées.

Les lignées L5 SBP1 :: LUC et L14 SBP1m2 :: LUC ont également été étudiées en réponse à des concentrations croissantes de Cu^{2+} . Dans ce cas également, les deux lignées L5 SBP1 :: LUC et L14 SBP1m2 :: LUC ont perdu la même masse après 72 h d'exposition aux différentes concentrations de Cu^{2+} . Après 24h, pour la lignée L5 SBP1 :: LUC, l'exposition au Cu^{2+} est celle qui entraîne la plus forte induction (facteur d'induction allant de 3,2 à 3,7) (Figure 62 A). Le phénomène dose-dépendant est moins marqué que dans le cas de l'exposition aux concentrations croissantes de Cd^{2+} et de SeO_4^{2-} . L'induction de la luciférase est très faible dans le cas de la lignée SBP1m2 :: LUC (facteur d'induction allant de 1,1 à 1,7). A 72h, la perte de masse pour une exposition de 150 μ M ou 250 μ M de Cu^{2+} varie de 50 % à 70 %, ce qui est beaucoup plus important que dans le cas d'une exposition au Cd^{2+} ou au SeO_4^{2-} . Ceci est dû à la forte toxicité du Cu^{2+} (Figure 62 B). A 72h, l'activité luciférase exprimée par plantule décroît à partir de 150 μ M comparé au contrôle et ceci est dû à la forte perte de masse à ces

concentrations. La mutation du motif M2 semble donc affecter l'expression de la luciférase lors d'une exposition au Cu^{2+} à 24h et à 72h.

L'ensemble de ces analyses réalisées en parallèle sur une lignée L5 *SBP1 :: LUC* et L14 *SBP1m2 :: LUC* semble indiquer que le motif M2, impliqué dans l'induction de SBP1 en réponse à la carence en soufre, régule également fortement le niveau d'expression de SBP1 en réponse au stress induit par une exposition au Cd^{2+} , au SeO_4^{2-} et au Cu^{2+} . Ce phénomène de régulation semble particulièrement marqué 24h après transfert sur les différents milieux contenant les toxiques. Ces analyses devront être reproduites à partir de plusieurs lignées L5 *SBP1 :: LUC* et L14 *SBP1m2 :: LUC*. Ces résultats démontrent l'existence d'un lien fonctionnel entre l'expression de SBP1 et la réponse de la cellule à une demande en soufre.

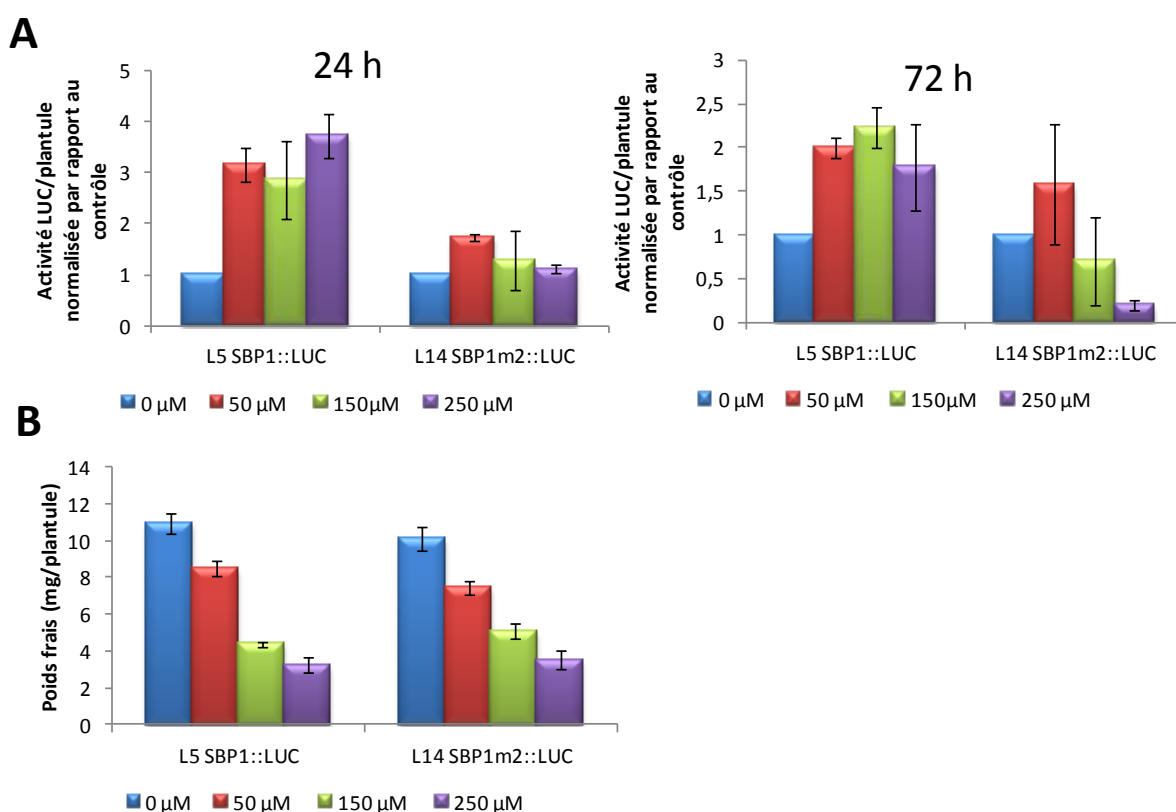


Figure 62 : Implication du motif M2 dans la réponse de la plante au Cu^{2+} . A : Comparaison de l'induction de l'activité luciférase chez les lignées L5 *SBP1 :: LUC* et L14 *SBP1m2 :: LUC* en réponse au Cu^{2+} . Les analyses ont été réalisées sur des plantules de 7 jours transférées 24 h ou 72 h sur un milieu contenant 50 μM , 150 μM ou 250 μM de Cu^{2+} . Les enregistrements ont été réalisés pendant 5 min. Pour chaque lignée et chaque condition, 16 plantules ont été analysées. L'induction LUC normalisée par rapport au contrôle non exposé au Cu^{2+} est exprimée en unités arbitraires. B : Poids frais de chaque plantule chez les lignées L5 *SBP1 :: LUC* et L14 *SBP1m2 :: LUC*. Les analyses ont été réalisées sur des plantules de 7 jours transférées 72h sur un milieu contenant 50 μM , 150 μM ou 250 μM de Cu^{2+} . Pour chaque lignée, 16 plantules ont été analysées.

C. Impact de la variation de l'expression de SBP1 sur le métabolisme du Sélénium

Le Sélénium (Se) est capable de se lier à SBP1 lorsque celui-ci est initialement sous la forme SeO_3^{2-} . Il a également été montré que la surexpression de SBP1 chez *Arabidopsis thaliana* augmentait la tolérance au SeO_3^{2-} tandis que la sous expression de SBP1 augmentait la sensibilité à ce même toxique (Agalou *et al.*, 2005). Dans l'hypothèse d'une liaison du Se à SBP1 *in planta* qui conférerait à SBP1 un rôle potentiel dans l'accumulation et la détoxification du Se, l'impact de SBP1 sur l'accumulation des 2 formes chimiques du Se (SeO_3^{2-} et SeO_4^{2-}) a été étudié. Des analyses de spéciation ont ensuite été menées dans les mêmes conditions.

a) Lignées surexprimant SBP1 ou sous exprimant la famille des SBPs

Les expériences ont été réalisées chez des lignées surexprimant SBP1 sous le contrôle du promoteur 35S dans le fond génétique WT et *cad2-1*. Les lignées *cad2-1* sont des lignées déficientes en glutathion (GSH) et donc en phytochélatines (PCs). Des analyses d'immunodétection réalisées chez ces différentes lignées, au niveau des feuilles et des racines, ont montré qu'il y avait bien surexpression de SBP1 de façon homogène au niveau des racines (Dutilleul *et al.*, 2008) (Figure 63). Ces lignées ne présentent pas de phénotype au niveau macroscopique en conditions normales de culture mais elles présentent dans le fond génétique du mutant *cad2-1*, de façon très reproductible, une augmentation de tolérance au Cd^{2+} , au SeO_4^{2-} et à l' H_2O_2 (Dutilleul *et al.*, 2008). Cette augmentation de tolérance est beaucoup moins marquée chez les lignées WT surexprimant SBP1, où seule la lignée 4 a un phénotype assez marqué.

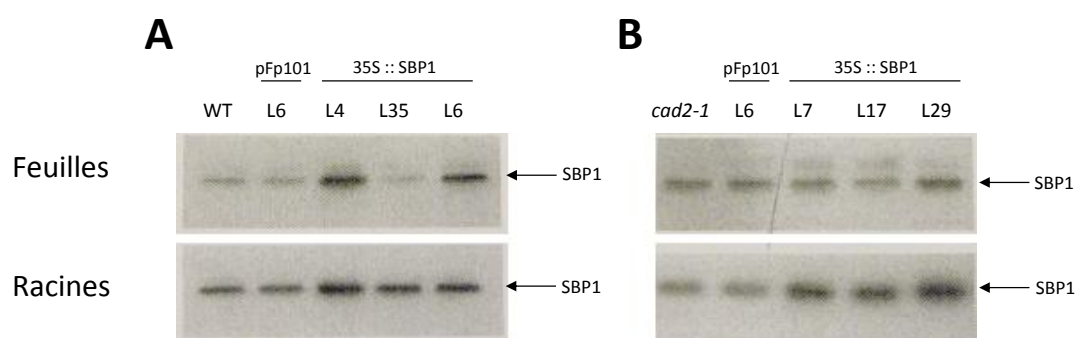
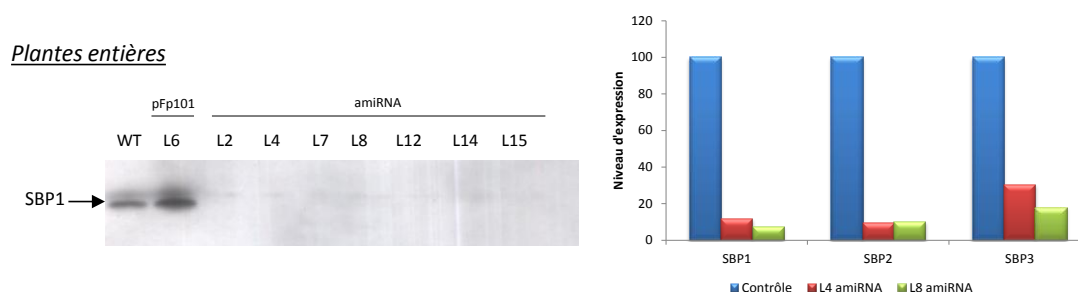


Figure 63 : Immunodétection de la protéine SBP1 exprimée sous le contrôle du promoteur 35S dans le fond génétique WT (A) et *cad2-1* (B). Les protéines ont été extraites des racines et des feuilles indépendamment à partir de lignées d'*Arabidopsis thaliana* WT et *cad2-1* non transformées, transformées avec le vecteur vide (pFp101) et transformées avec le vecteur permettant l'expression de SBP1 sous le contrôle du promoteur 35S (35 S :: SBP1) (3 lignées indépendantes pour chaque fond génétique). Des anticorps polyclonaux anti-SBP1 ont été utilisés pour détecter SBP1.

En parallèle, des lignées sous exprimant la famille des SBPs suite à l'insertion d'un microARN artificiel (amiRNA) ont été produites. En effet, des lignées KO pour le gène *SBP1* présentaient une augmentation de l'expression de *SBP2* (Dutilleul *et al.*, 2008), ce qui suggère une redondance d'activité entre *SBP1* et *SBP2*. Pour rechercher un phénotype en lien avec le niveau d'expression de *SBP1*, un amiRNA dirigé contre les 3 isoformes de SBPs a donc été utilisé. Ces lignées ont été sélectionnées dans un premier temps par western blot pour vérifier la perte d'expression de *SBP1* (Figure 64). Des analyses de PCR quantitative en temps réel ont ensuite été réalisées sur 2 lignées indépendantes pour vérifier la sous-expression de *SBP2* et *SBP3* (Figure 64). L'ensemble de ces résultats ont montré qu'il y avait bien sous-expression de *SBP1* ainsi que de *SBP2* et *SBP3*.

A Fond génétique WT



B Fond génétique *cad2-1*

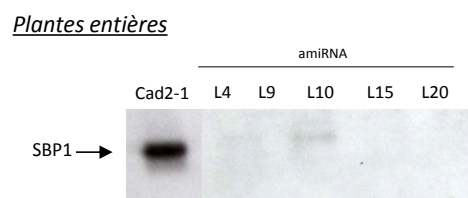


Figure 64 : Analyse de la sous expression de la famille des SBPs chez les lignées amiRNA par immunodétection et par PCR quantitative en temps réel. A : Immunodétection par Western Blot de la protéine SBP1 chez des lignées possédant un amiRNA empêchant l'expression des 3 isoformes de la famille des SBPs dans le fond génétique WT. Les protéines ont été extraites à partir de plantes entières d'*Arabidopsis thaliana* WT non transformées, transformées avec le vecteur vide (pFp101) et transformées avec le vecteur permettant l'expression d'un amiRNA dirigé contre les 3 isoformes de la famille des SBPs (7 lignées indépendantes). Des anticorps polyclonaux anti-SBP1 ont été utilisés pour détecter SBP1. **Analyse par PCR quantitative en temps réel du niveau d'expression des 3 isoformes de la famille des SBPs.** Les analyses ont été réalisées sur une lignée sauvage (contrôle) et sur deux lignées (L4 et L8) transformées avec un vecteur permettant l'expression d'un amiRNA qui empêche l'expression des 3 SBPs. **B : Immunodétection par Western Blot de la protéine SBP1 chez des lignées possédant un amiRNA empêchant l'expression des 3 isoformes de la famille des SBPs dans le fond génétique *cad2-1*.** Les protéines ont été extraites indépendamment des feuilles et des racines d'*Arabidopsis thaliana cad2-1* non transformées et transformées avec le vecteur permettant l'expression d'un amiRNA dirigé contre les 3 isoformes de la famille des SBPs (5 lignées indépendantes). Des anticorps polyclonaux anti-SBP1 ont été utilisés pour détecter SBP1.

Les lignées exprimant l'amiRNA ont été mises en sol afin d'observer si celles-ci présentaient un phénotype en conditions normales de culture (Figure 65). Au niveau macroscopique, les plantes WT et amiRNA de 2 semaines et de 6 semaines ne présentent pas de différences marquantes dans leur développement. La sous expression des 3 isoformes de la famille des SBPs n'a donc pas d'impact sur le phénotype des plantes.

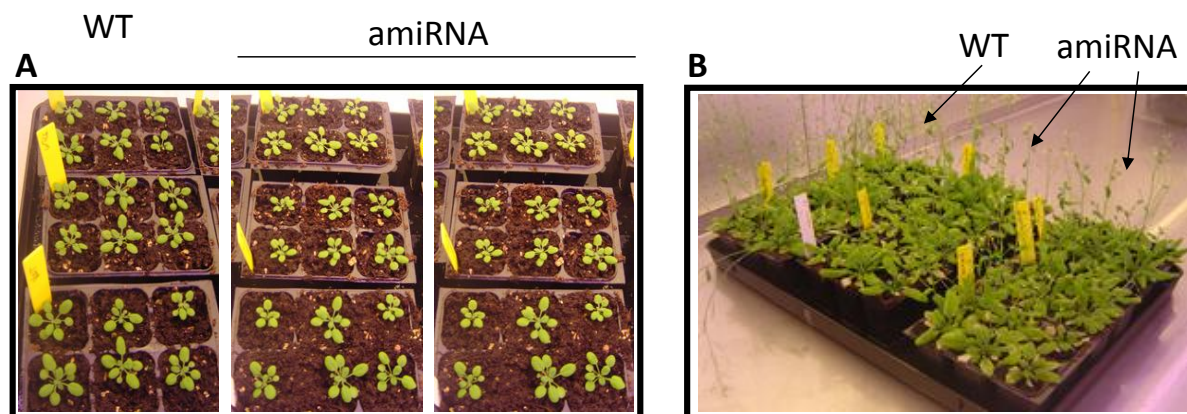


Figure 65 : Phénotype des lignées WT et amiRNA en conditions normales de culture. A : Plantes de 2 semaines. B : Plantes de 6 semaines.

Dans les mêmes conditions que celles décrites par Agalou *et al.* (2005), c'est-à-dire après 2 à 3 semaines de croissance depuis la germination, sur un milieu contenant $60 \mu\text{M}$ de SeO_3^{2-} , les lignées amiRNA dans le fond génétique WT présentent une augmentation de sensibilité à ce toxique (Figure 66). Ces analyses seront prochainement réalisées dans le fond génétique *cad2-1*.

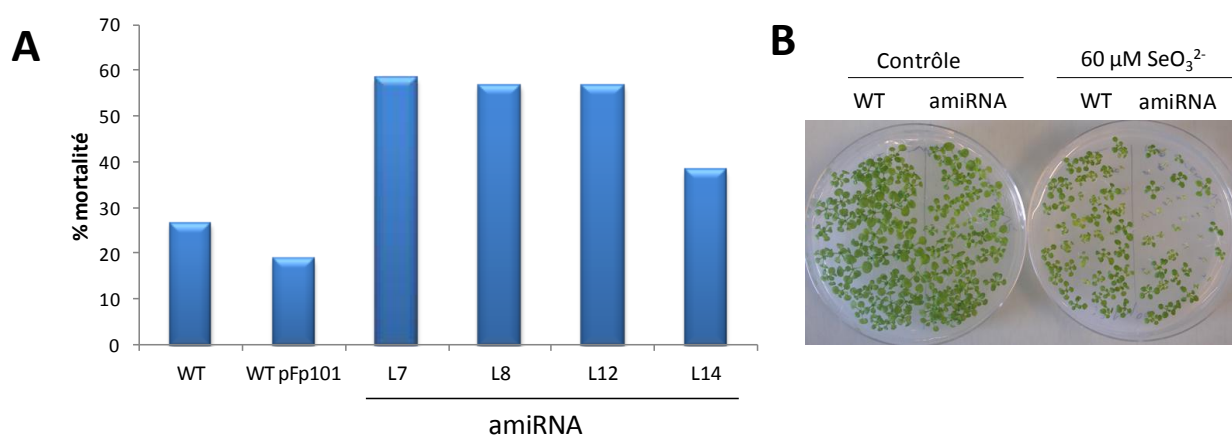


Figure 66 : Phénotype des lignées WT et amiRNA après 2 semaines de croissance sur un milieu contrôlé et sur un milieu contenant $60 \mu\text{M}$ de SeO_3^{2-} . A : Pourcentage de mortalité observé chez les lignées amiRNA. Les lignées WT et WT vecteur vide (pFp101) ont été utilisées en tant que lignées contrôle. Les lignées L7, L8, L12 et L14 amiRNA ont été testées. B : Exemple de phénotype observé dans le cas d'une lignée WT et d'une lignée amiRNA.

Afin de déterminer si SBP1 peut jouer un rôle dans l'accumulation du Se, les lignées précédemment décrites sous exprimant la famille des SBPs et surexprimant SBP1 dans différents fonds génétiques (WT et *cad2-1*), ont été étudiées. Des plantules de 7 jours ont été transférées 3 jours sur un milieu contenant 100 μM de SeO_3^{2-} . Cette concentration a été choisie d'après les expériences de sensibilité au SeO_3^{2-} réalisées par Hugouvieux *et al.* (2009) qui montrent qu'il y a une accumulation dose dépendante du Se lorsque la plante est exposée à 50 et 500 μM de SeO_3^{2-} . La concentration de 100 μM est modérément toxique dans nos conditions expérimentales. En effet, la diminution de poids des plantules est de 10 % et la diminution de la taille des racines est de 20 % par rapport aux plantes contrôles et les plantes sont encore bien vertes. Le Se est un toxique qui est rapidement transporté dans les feuilles (Arvy, 1993; Zayed *et al.*, 1998; Hugouvieux *et al.*, 2009), c'est pourquoi la quantification du Se a été réalisée dans les parties aériennes uniquement.

La figure 67 montre que la même quantité de Se est accumulée (entre 0,3 et 0,5 nmoles de Se/mg MF suivant les expériences) dans les parties aériennes des lignées WT et *cad2-1* non transformées ou transformées avec le vecteur vide exposées à 100 μM de SeO_3^{2-} . La forte réduction de la quantité de GSH chez le mutant *cad2-1* n'a donc pas d'influence sur la quantité de Se accumulé au niveau des parties aériennes.

Concernant les lignées sous exprimant la famille des SBPs, 4 à 5 lignées indépendantes ont été testées dans chacun des fonds génétiques. Aucune différence d'accumulation du Se n'a été observée entre les différentes lignées (Figure 67 A). La sous-expression de la famille des SBPs, quel que soit le fond génétique, n'a donc pas d'impact sur l'accumulation du Se lorsque la plante est exposée à 100 μM de SeO_3^{2-} pendant 3 jours.

A l'inverse, dans le cas de la surexpression de SBP1, des différences au niveau de la quantité de Se accumulé au niveau des feuilles sont observées entre les lignées surexprimant SBP1 et les plantes non transformées ou transformées avec le vecteur vide. Les lignées surexprimant SBP1 dans le fond génétique WT ne montrent pas de différence d'accumulation de Se au niveau des feuilles sauf la lignée 4 qui en accumule 2 fois plus. Dans le cas du fond génétique *cad2-1*, la quantité de Se accumulée par les lignées surexprimant SBP1 est 0,5 à 2 fois supérieur à la quantité de Se accumulée par les lignées *cad2-1* non transformées ou transformées avec le vecteur vide (Figure 67 B). Il semblerait donc que la surexpression de SBP1, préférentiellement dans le fond *cad2-1*, ait un rôle dans l'accumulation du Se lorsque celui-ci est initialement sous la forme SeO_3^{2-} .

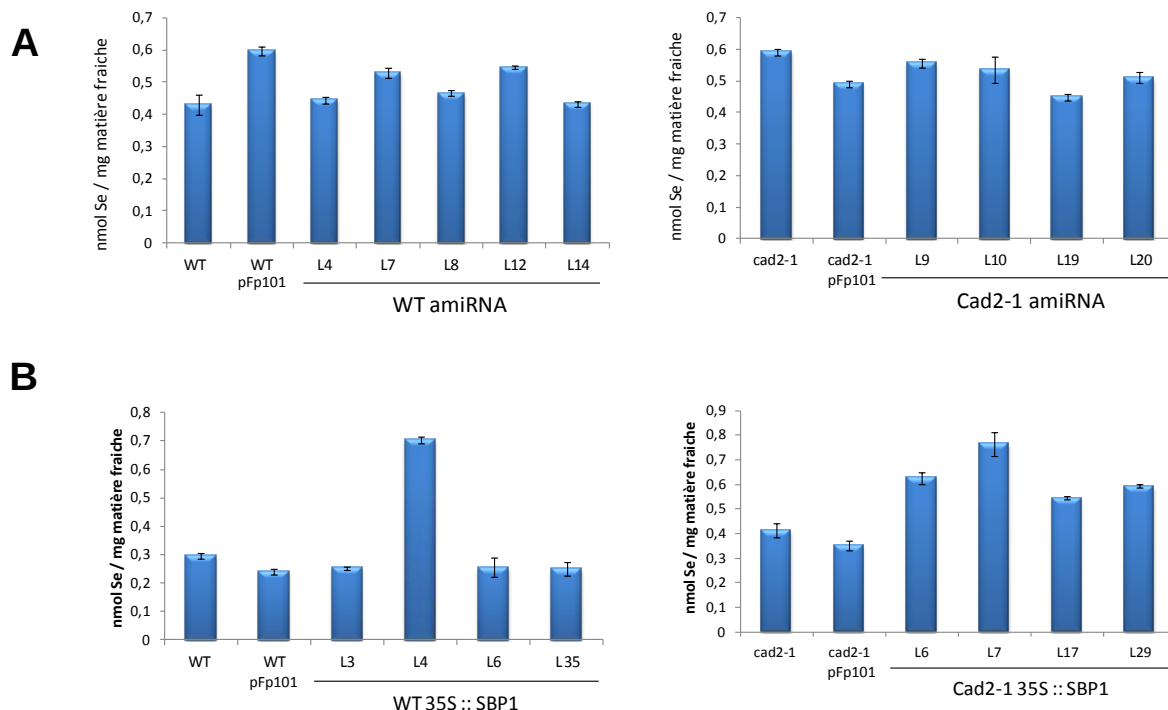


Figure 67 : Effet de la sous expression de la famille des SBPs et de la surexpression de SBP1 sur la quantité de Se accumulée dans les parties aériennes lors d'une exposition au SeO_3^{2-} dans les fonds génétiques WT et *cad2-1*. Des plantules de 7 jours ont été transférées 3 jours sur un milieu contenant 100 μM de SeO_3^{2-} . La quantité de Se présente dans les feuilles a été dosée par ICP-MS. Les lignées WT et *cad2-1* ont été transformées avec le vecteur vide (pFp101) et servent de contrôle. **A** : La famille des SBPs a été sous exprimée dans chacun des fonds génétiques et 4 à 5 lignées indépendantes (L4, L7, L8, L12 et L14 pour le fond génétique WT; L9, L10, L19 et L20 pour le fond génétique *cad2-1*) ont été testées. **B** : SBP1 a été surexprimée dans chacun des fonds génétiques et 4 lignées indépendantes (L3, L4, L6 et L35 pour le fond génétique WT; L6, L7, L17 et L29 pour le fond génétique *cad2-1*) ont été testées.

Les expériences suivantes ont été poursuivies uniquement chez le surexprimeurs car ces lignées présentent un phénotype clair d'accumulation. Afin de confirmer ces résultats obtenus sur le surexprimeurs et d'étudier si cette accumulation est dose-dépendante, des expériences d'accumulation en présence de 50 et 100 μM de SeO_3^{2-} ont été réalisées sur les lignées surexprimant SBP1 dans les fonds génétiques WT et *cad2-1*.

Il a été montré précédemment qu'il n'y avait pas de différence d'accumulation du Se entre les lignées WT et *cad2-1* (Figure 67) lorsque les plantes sont exposées à 100 μM de SeO_3^{2-} . Ce même phénomène est observé lorsque les plantes sont exposées à 50 μM de SeO_3^{2-} (figure 68). L'accumulation du Se est dose-dépendante par rapport à la quantité de SeO_3^{2-} à laquelle la plante est exposée. En effet, la plante accumule plus de Se lorsqu'elle est exposée à 100 μM qu'à 50 μM de SeO_3^{2-} (1,3 à 2 fois plus de Se) (Figure 68 A). Dans le cas du fond génétique WT, aucune différence d'accumulation n'est observée chez les différentes lignées lorsque celles-ci sont exposées à 50 μM de

SeO_3^{2-} sauf pour la lignée 4 qui accumule 2 à 3 fois plus de Se. Ce phénotype est similaire à celui décrit dans le cas des lignées exposées à $100 \mu\text{M}$ de SeO_3^{2-} . Dans le cas du fond génétique *cad2-1*, la plante accumule plus de Se lorsque SBP1 est surexprimée (Figure 68 B), quelle que soit la concentration de SeO_3^{2-} à laquelle la plante est exposée ($50 \mu\text{M}$ ou $100 \mu\text{M}$). Ce phénomène est également dose-dépendant car le niveau d'accumulation est plus élevé lorsque la plante est exposée à $100 \mu\text{M}$ qu'à $50 \mu\text{M}$ de SeO_3^{2-} (1,5 à 2 fois plus de Se). Ces résultats montrent clairement que la surexpression de SBP1 dans le fond génétique *cad2-1* entraîne également une augmentation de l'accumulation de Se dans les parties aériennes lorsque la plante est exposée à $50 \mu\text{M}$ de SeO_3^{2-} .

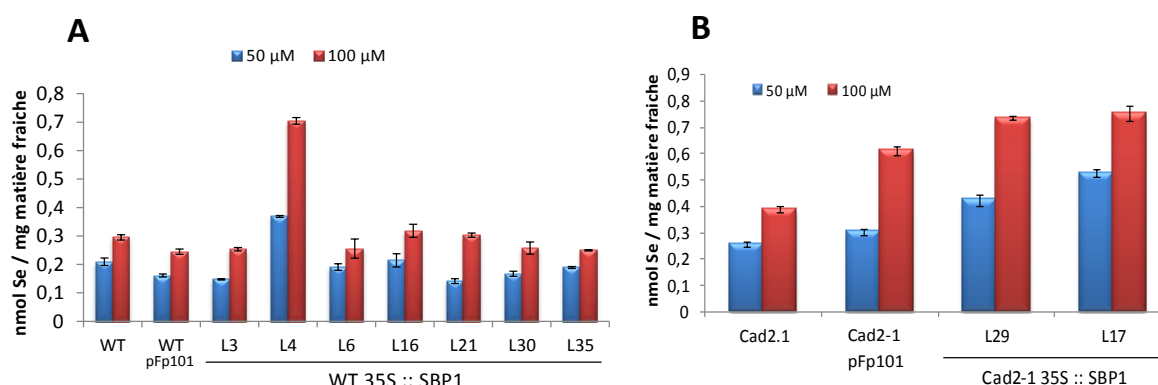


Figure 68 : Effet de la surexpression de SBP1 sur la quantité de Se accumulé dans les parties aériennes lors d'une exposition à $50 \mu\text{M}$ et $100 \mu\text{M}$ de SeO_3^{2-} dans les fonds génétiques sauvage (WT) et *cad2-1*. Des plantules de 7 jours ont été transférées 3 jours sur un milieu contenant 50 ou $100 \mu\text{M}$ de SeO_3^{2-} . La quantité de Se présente dans les feuilles a été dosée par ICP-MS. Les lignées WT et *Cad2-1* ont été transformées avec le vecteur vide (pFp101) et servent de contrôle. SBP1 a été surexprimée dans chacun des fonds génétiques et 2 à 7 lignées indépendantes (L3, L4, L6, L12, L16, L21, L30 et L35 pour le fond génétique WT; L29 et 17 pour le fond génétique *Cad2-1*) ont été testées.

La forme prédominante de Se présente dans les sols est la forme SeO_4^{2-} (Terry *et al.*, 2000; Sors *et al.*, 2005; Missana *et al.*, 2009). Des analyses de sensibilité préalablement publiées dans l'équipe ont montré que la surexpression de SBP1 augmentait la tolérance au SeO_4^{2-} dans le fond génétique *cad2-1* préférentiellement (Hugouvieux *et al.*, 2009). Ce phénomène est existant mais moins marqué dans le fond génétique WT ou seule la lignée 4, encore une fois, présente ce phénotype. Le Se ne se lie pas à SBP1 lorsque celui-ci est initialement sous la forme SeO_4^{2-} mais le niveau d'expression de SBP1 semble impliqué dans l'accumulation du Se et donc potentiellement dans la voie d'assimilation de ce composé. Ainsi, l'accumulation du Se lorsque la plante est exposée à 50 et $100 \mu\text{M}$ de SeO_4^{2-} a également été analysée dans les fonds génétiques WT et *cad2-1* pour des lignées non transformées ou transformées avec le vecteur vide ainsi qu'avec des lignées surexprimant SBP1.

Les résultats obtenus lors des analyses d'accumulation du Se lorsque les plantes, dans le fond génétique WT, sont exposées à 50 ou 100 μM de SeO_4^{2-} montrent que la surexpression de SBP1 n'a pas d'effet sur l'accumulation du Se sauf à nouveau dans le cas de la lignée 4 (Figure 69 A). Cette lignée, qui accumule 2 fois plus de Se lorsqu'elle est exposée au SeO_3^{2-} accumule 2 fois moins de Se lorsqu'elle est exposée au SeO_4^{2-} par rapport aux plantes contrôles non transformées ou transformées avec le vecteur vide. Pour l'ensemble des lignées, la différence d'accumulation est à nouveau dose-dépendante. En effet, le niveau d'accumulation est plus élevé lorsque la plante est exposée à 100 qu'à 50 μM de SeO_4^{2-} (1,4 à 2 fois plus de Se). Dans le cas du fond génétique *cad2-1*, la surexpression de SBP1 entraîne une diminution de la quantité de Se accumulée (1,4 à 1,6 fois moins) lorsque les plantes sont exposées à 50 et 100 μM de SeO_4^{2-} (Figure 69 B). Ces résultats montrent que dans le fond génétique *cad2-1*, la surexpression de SBP1 entraîne une diminution de l'accumulation de Se dans les parties aériennes lorsque la plante est exposée 3 jours à 50 et 100 μM de SeO_4^{2-} . Ce phénotype pourrait être à l'origine de l'augmentation de tolérance observée chez ces plantes exposées au SeO_4^{2-} (Hugouvieux *et al.*, 2009).

Ces résultats démontrent que la surexpression de SBP1 perturbe l'accumulation du Se dans les parties aériennes de façon opposée suivant la forme chimique à laquelle elle est exposée. Les principales différences dans le métabolisme du Se entre les deux formes chimiques du SeO_3^{2-} et du SeO_4^{2-} se situent d'une part au niveau de leur l'absorption (qui fait intervenir des transporteurs de phosphate et de sulfate respectivement) et d'autre part au niveau d'une étape précoce de la voie d'assimilation du Se qui correspond à la réduction du SeO_4^{2-} en SeO_3^{2-} . Ces résultats suggèrent que la surexpression de SBP1 pourrait influencer les premières étapes du métabolisme du Se.

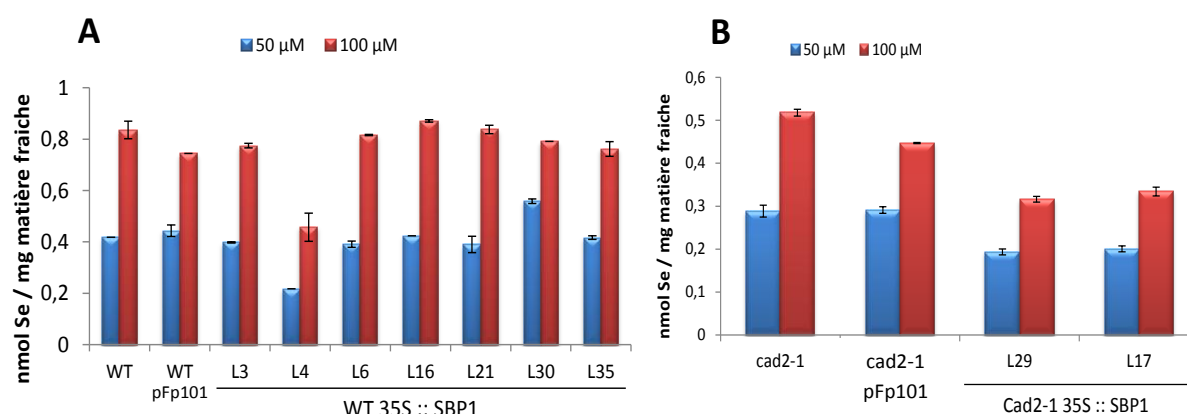


Figure 69 : Effet de la surexpression de SBP1 sur la quantité de Se accumulé dans les parties aériennes lors d'une exposition au SeO_4^{2-} (B) dans les fonds génétiques sauvage (WT) et *cad2-1*. Des plantules de 7 jours ont été transférées 3 jours sur un milieu contenant 50 ou 100 μM de SeO_4^{2-} . La quantité de Se présente dans les feuilles a été dosée par ICP-MS. Les lignées WT et *cad2-1* ont été transformées avec le vecteur vide (pFp101) et servent de contrôle. SBP1 a été surexprimée dans chacun des fonds génétiques et 2 à 7 lignées indépendantes (L3, L4, L6, L12, L16, L21, L30 et L35 pour le fond génétique WT; L29 et L17 pour le fond génétique *cad2-1*) ont été testées.

c) Analyse de la spéciation du Se

D'après les résultats précédemment obtenus, la surexpression de SBP1 influence la quantité de Se accumulé dans la plante et ceci est fonction de la spéciation du Se avec laquelle la plante est mise en contact (SeO_3^{2-} ou SeO_4^{2-}). L'impact du niveau d'expression de SBP1 sur la spéciation du Se dans la plante en fonction des deux formes chimiques a ensuite été étudié. Cette spéciation du Se a été étudiée grâce à une technique utilisant le rayonnement synchrotron : le XANES (spectroscopie d'absorption des rayons X au voisinage du seuil d'absorption). Cette technique permet d'obtenir, pour un échantillon de plantes, le pourcentage de différents types de composés sélénés présentant des signatures spectrales différentes. Cette technique permet de différencier facilement des composés ayant des degrés d'oxydation différents, et également des composés de même degré d'oxydation mais dont la structure locale autour du Se varie. Ces expériences ont été réalisées sur la ligne CRG/FAME de l'ESRF (European Radiation Synchrotron Facility, Grenoble) en collaboration avec D. Testemale. Pour cela, différentes lignées présentant différents niveaux d'expression de SBP1 (lignées WT, lignées *35S::SBP1* et lignées amiRNA sous exprimant l'ensemble de la famille des SBPs) dans différents fonds génétiques (WT et *cad2-1*) ont été testées. Des plantules de sept jours de chacune de ces lignées ont été mises en contact avec 100 μM SeO_3^{2-} ou 100 μM SeO_4^{2-} pendant trois jours. Les parties aériennes des plantes ont ensuite été broyées dans l'azote liquide afin d'obtenir un échantillon homogène puis les analyses XANES ont été réalisées à basse température. Différents étalons représentant les différentes formes de Se pouvant être présentes chez la plante ont été

analysées en XANES. Ces étalons sont les suivants : Na Séléniate (SeO_4^{2-}), Na Sélénite (SeO_3^{2-}), Sélénométhionine (SeMet) et Sélénométhylcystéine (SeMetCys) qui correspondent au Se lorsqu'il est incorporé sous forme organique (R-Se-R), Se Cystine qui correspond au Se lorsqu'il est incorporé sous la forme R-Se-Se-R et le Sélénodiglutathion (SediGSH) qui correspond au Se lorsque celui-ci est lié à deux atomes de soufre (S) (Figure 70 A). Des combinaisons linéaires ont été réalisées grâce au logiciel Athéna pour une gamme d'énergie allant de -10,153 eV à 7,410 eV à partir des spectres étalons. Celles-ci ont ensuite permis de déterminer la composition en éléments sélénés de chacune des lignées analysées. Concernant les différents spectres standards utilisés, il n'est pas possible lors des combinaisons linéaires de distinguer la SeMet et la SeCysMet. Ces analyses ont été réalisées en collaboration avec G. Sarret d'ISTerre (Institut des Sciences de la Terre, Grenoble). L'ensemble des données obtenues pour les différentes lignées exposées au SeO_3^{2-} ou au SeO_4^{2-} est présenté dans la figure 70 B. Le tableau 13 représente les pourcentages des différentes espèces sélénées présentes dans les parties aériennes de chaque lignée.

Les analyses XANES réalisées à partir des parties aériennes des plantes exposées au SeO_3^{2-} montrent que quel que soit le fond génétique et le niveau d'expression de SBP1, le Se se retrouve entièrement sous forme organique (R-Se-R) chez *Arabidopsis thaliana* (Tableau 13). Ce résultat est en accord avec les données de la littérature qui montrent que le SeO_3^{2-} est directement incorporé sous forme organique dans les racines, puis transloqué, ce qui explique en partie sa forte toxicité (Li *et al.*, 2008; Zhu *et al.*, 2009). Le niveau de GSH ainsi que le niveau d'expression de SBP1 ne semblent donc pas jouer de rôle sur la spéciation du Se lorsque les plantes sont exposées au SeO_3^{2-} . Celui-ci peut être sous différentes formes organiques mais seulement des analyses par spectrométrie de masse permettraient de différencier ces différentes formes.

Les analyses XANES réalisées sur les parties aériennes des plantes exposées au SeO_4^{2-} montrent que pour l'ensemble des lignées testées, le Se est majoritairement sous forme SeO_4^{2-} (59 à 75 %) et minoritairement sous forme organique R-Se-R (25 à 41 %) (Tableau 13). Les données obtenues sur les lignées WT sont en accord avec les données de la littérature (de Souza *et al.*, 1998; Zayed *et al.*, 1998; Pilon-Smits *et al.*, 1999). En effet, la réduction du SeO_4^{2-} en SeO_3^{2-} est une étape limitante, ce qui explique la forte proportion de SeO_4^{2-} non réduit retrouvé dans les parties aériennes de la plante.

Pour chacun des fonds génétiques, il ne semble pas qu'il y ait d'impact du niveau d'expression de SBP1 sur la spéciation du Se. Par contre, les résultats obtenus mettent en évidence un pourcentage de Se sous forme organique plus élevé chez les lignées *cad2-1* (43 % de R-Se-R) que chez les lignées WT (25 %). Ceci est particulièrement observé dans le cas des lignées contrôles pour

lesquelles les 3 isoformes de la famille des SBPs sont sous exprimées (lignées amiRNA). Les résultats obtenus suggèrent que la déficience en GSH entraîne une incorporation plus importante du Se sous forme organique. Ce résultat très intéressant pourrait expliquer pourquoi les lignées *cad2-1* sont hypersensibles au SeO_4^{2-} (Hugouvieux *et al.*, 2009).

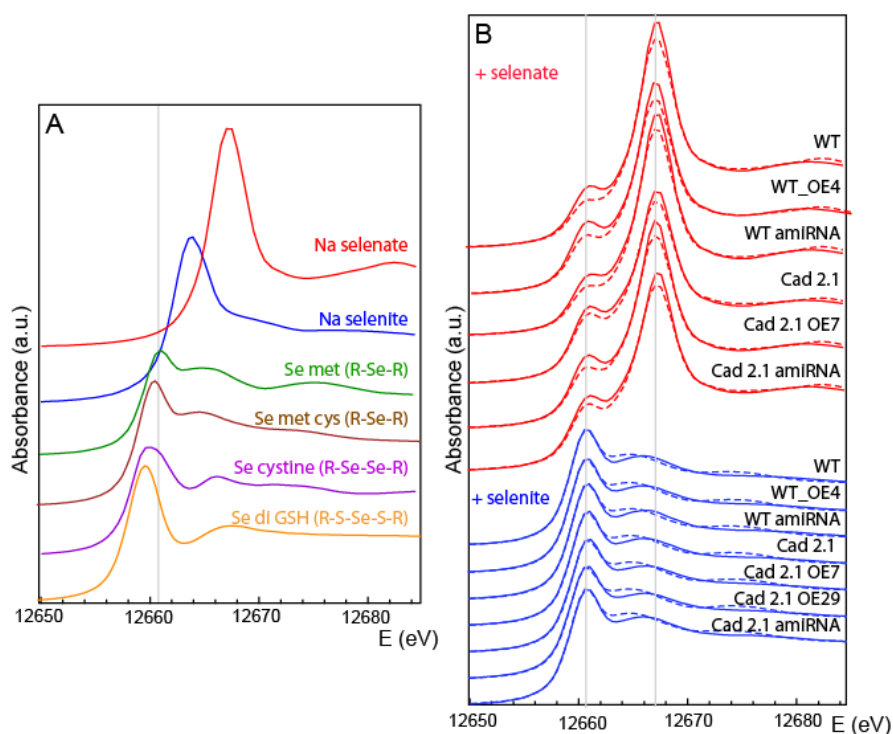


Figure 70 : Spectre XANES au seuil K du Se. **A** : Les différents standards utilisés sont les suivants : Na Selenate : 5000 ppm SeO_4^{2-} ; Na Selenite : 5000 ppm SeO_3^{2-} ; SeMet : Selenométhionine (R-Se-R) 5000 ppm ; SeMet Cys : Selenométhylcystéine 5000 ppm (R-Se-R) ; SeCystine : Selenocystine 5000 ppm (R-Se-Se-R) et SediGSH : Selenodiglutathion (R-S-Se-S-R) 1000 ppm. **B** : Les traits pleins représentent les spectres XANES des lignées WT (fond génétique sauvage), WT_OE4 (fond génétique sauvage, surexpression de SBP1, lignée 4), WT amiRNA (fond génétique sauvage, sous expression de la famille des SBPs), Cad2-1 (fond génétique Cad2-1), Cad2-1 OE7 et Cad2-1 OE29 (fond génétique Cad2-1, surexpression de SBP1, lignées 7 et 29) et Cad2-1 amiRNA (fond génétique Cad2-1, sous expression de la famille des SBPs). Les pointillés représentent les simulations réalisées par combinaisons linéaires. Pour l'ensemble de ces lignées, des plantules de 7 jours ont été transférées 3 jours sur un milieu contenant 100 μM de SeO_4^{2-} ou de SeO_3^{2-} .

L'ensemble des données obtenues suite à ces analyses d'accumulation et de spéciation du Se chez des lignées ayant différents niveaux d'expression de SBP1 dans différents fonds génétiques ont permis de mettre en évidence l'implication de SBP1 dans le métabolisme du Se. Les résultats obtenus dans le cas du SeO_3^{2-} et du SeO_4^{2-} étant différents, il semblerait que SBP1 puisse avoir des fonctions différentes au niveau du métabolisme du Se.

Tableau 13 : Quantité de chacune des espèces présentes en fonction du fond génétique, du niveau d'expression de SBP1 et de la spéciation du Se (SeO_4^{2-} ou SeO_3^{2-}) présent dans le milieu de culture. Ces calculs ont été réalisés à partir des simulations présentées dans la figure 70. Les simulations ont été réalisées par combinaisons linéaires pour des valeurs de E allant de -10,153 eV à 7,410 eV. Les spectres du Na Selenate et du Se organique (R-Se-R) ont été utilisés dans le cas des plantes exposées au SeO_4^{2-} et les spectres du Se organique (R-Se-R) ont été utilisés dans le cas des plantes exposées au SeO_3^{2-} . La sensibilité de la technique utilisée pour les combinaisons linéaires n'est pas suffisante pour distinguer les différentes formes organiques SeMet et SeMetCys. Le facteur R représente la valeur résiduelle entre la simulation et le spectre expérimental.

SeO_3^{2-}

lignée	R-Se-R (%)	Facteur R
WT	100	0,0043
WTOE 4 (L4)	100	0,0048
WTamiRNA 15 (L15)	100	0,0039
cad 2-1	100	0,0022
cad 2-1 OE 7 (L7)	100	0,0033
cad 2-1 OE 29 (L29)	100	0,0014
cad 2-1 amiRNA 20 (L20)	100	0,0027

SeO_4^{2-}

lignée	SeO_4^{2-} (%)	R-Se-R (%)	Facteur R
WT	75	25	0,0043
WTOE 4 (L4)	66	34	0,0048
WTamiRNA 15 (L15)	73	27	0,0039
cad 2-1	57	43	0,0022
cad 2-1 OE 7 (L7)	64	36	0,0033
cad 2-1 amiRNA 20 (L20)	59	41	0,0027

D. Discussion

Les analyses réalisées *in planta* ont permis de déterminer la localisation sub cellulaire de SBP1, d'identifier un élément *cis* de régulation indispensable à son expression en réponse au stress et de démontrer l'impact de son expression sur l'accumulation et la sensibilité au Se.

SBP1 est cytosolique et nucléaire

Les analyses réalisées en microscopie confocale ont montré que SBP1 était nucléaire et cytosolique. Ces données sont en accord avec celles obtenues pour la protéine SBP1 chez l'homme (Chen *et al.*, 2004; Stammer *et al.*, 2008; Xia *et al.*, 2011). Bien que les analyses en expression stable chez *Arabidopsis thaliana* aient été réalisées avec la forme GFP-SBP1, il est important de noter qu'il n'existe pas de séquence signal d'adressage en N terminal chez SBP1. En expression transitoire chez le tabac, les protéines recombinantes GFP-SBP1 et SBP1-GFP sont toutes deux localisées dans le cytosol et le noyau, ce qui confirme cette localisation chez *Arabidopsis thaliana*. De plus, la localisation cytosolique de SBP1 a été récemment validée par des analyses protéomiques (Ito *et al.*, 2011; Elmore *et al.*, 2012). Nos résultats ont suggéré que SBP1 semblait être impliquée dans la détoxification d'éléments métalliques tel que le Cd²⁺ ou non métalliques tel que le Se *via* un phénomène de chélation. Ce rôle pourrait être exercé par SBP1 lorsque celle-ci est cytosolique. La présence de SBP1 dans le noyau suggère que SBP1 pourrait aussi avoir une autre fonction dans la régulation de l'expression de certains gènes.

Le motif M2 GAGAC est un élément *cis* de régulation du promoteur du gène *SBP1* en réponse à la carence en soufre ainsi qu'à d'autres stress

Des plantes ont été transformées avec le promoteur de *SBP1* muté ou non en amont du gène codant pour la luciférase. Les enregistrements de l'activité luciférase ont été réalisés sur différentes lignées pour lesquelles un ou plusieurs motifs GAGAC présents dans le promoteur de *SBP1* ont été mutés. Le motif GAGAC a été identifié en tant qu'élément *cis* de régulation en réponse à la carence en soufre au niveau du promoteur du transporteur racinaire *SULTR1;1* chez *Arabidopsis thaliana* (Maruyama-Nakashita *et al.*, 2005). Les analyses réalisées ont permis de mettre en évidence que parmi les différents motifs GAGAC présents dans le promoteur de *SBP1*, le motif M2 situé entre les bases 217 et 221 en amont de l'ATG apparait comme un acteur principal régulant l'expression de *SBP1* en réponse à la carence en soufre. En effet, 4 et 7 jours après transfert sur milieu carencé en soufre, l'augmentation de l'activité LUC des lignées *SBP1m2 :: LUC* est nettement réduite par rapport aux lignées *SBP1 :: LUC* ou *SBP1-P589 :: LUC*, mais pas complètement abolie. La réduction de

l'induction de la luciférase semble plus importante à 4 jours qu'à 7 jours, ce qui suggère qu'au cours du temps, d'autres mécanismes moléculaires pourraient intervenir dans l'induction de *SBP1*. Il serait d'ailleurs intéressant d'étudier ces lignées *SBP1m2 :: LUC* à des temps plus précoces. Parmi les différents mécanismes connus dans la régulation des gènes en réponse à la carence en soufre figure l'induction de gène *via* le facteur de transcription SLIM1 (Sulfur LIMitation 1) (Maruyama-Nakashita *et al.*, 2006). Celui-ci intervient dans l'induction du transporteur SULTR1;2, localisé au niveau des racines et qui joue un rôle majeur dans l'absorption du sulfate (Shibagaki *et al.*, 2002; Yoshimoto *et al.*, 2002). Chez les lignées *slim1*, *SULTR1;2* n'est pas induit lors d'une carence en soufre, ce qui montre que ce transporteur est régulé principalement par SLIM1. Le transporteur SULTR1;1 est également induit en réponse à la carence en soufre mais son niveau d'expression n'est pas complètement abolie chez le mutant *slim1*. L'induction de *SULTR1;1* en réponse à cette carence est également connue pour être régulée par l'élément *cis* GAGAC présent au niveau du promoteur (Maruyama-Nakashita *et al.*, 2005) et chez les lignées *slim1*, *SULTR1;1*, contrairement à *SULTR1;2*, présente une induction en réponse à la carence en soufre (3 fois plus faible que chez le sauvage). Ceci montre donc que l'expression de *SULTR1;1* est régulée à la fois par l'élément *cis* GAGAC et par le facteur de transcription SLIM1. Dans le cas de *SBP1*, il se pourrait donc, qu'au cours du temps, son expression soit régulée par SLIM1. La séquence reconnue par SLIM1 n'est actuellement pas connue mais le motif AYGWAYCT est présent dans le promoteur de plusieurs gènes dont le niveau de transcrit est dépendant de SLIM1. Il est intéressant de noter que ce motif est présent dans le promoteur de *SBP1*. Afin d'analyser plus précisément les différents mécanismes moléculaires impliqués dans la régulation de l'expression de *SBP1* en réponse à la carence en soufre, des analyses du niveau d'expression de cette protéine chez les lignées *slim1* pourraient être menées. Parmi les différents acteurs intervenant dans la réponse à la carence en soufre figure également le microARN395 qui joue un rôle important dans la translocation du soufre vers les parties aériennes (Kawashima *et al.*, 2011). Le microARN395 permet de maintenir un niveau de transcription optimal de l'ATP sulfurylase et du transporteur de soufre de faible affinité SULTR2;1. Afin d'étudier l'impact du microARN395 sur *SBP1*, des analyses du niveau d'expression de *SBP1* pourraient être menées sur des plantes surexprimant ou n'exprimant pas le microARN395 en condition de carence en soufre. Il existe également un mécanisme moléculaire qui régule l'expression de PRH43 (ou APR2) et qui fait intervenir deux facteurs de transcription de la famille des MYB, MYB122 et MYB76, impliqués également dans la régulation de la biosynthèse des glucosinolates (Yatusevich *et al.*, 2010). L'APS, qui est également impliqué dans une des étapes précoces de la voie d'assimilation du soufre et donc du Se, est aussi régulée par un facteur de transcription de la famille des MYB. Il se pourrait donc que *SBP1*, potentiellement impliquée dans une des étapes précoces du métabolisme du Se, soit également régulée par un de ces facteurs de transcription.

SBP1 est induite en réponse à la carence en soufre, mais également lors d'une exposition au Cd^{2+} , au SeO_4^{2-} et au Cu^{2+} (Dutilleul *et al.*, 2008; Hugouvieux *et al.*, 2009). Les analyses préliminaires d'activité luciférase réalisées sur une lignée *SBP1m2 :: LUC* (L14) en comparaison avec la lignée *SBP1 :: LUC* (L5) ont montré que l'induction de *SBP1* en réponse à ces différents stress était fortement régulée par le motif M2 et ceci de façon plus prononcée à 24h notamment dans le cas du Cd^{2+} . Les travaux antérieurs dans l'équipe avaient suggéré qu'une demande en soufre pouvait être le signal responsable de l'induction de *SBP1* en réponse au stress (Hugouvieux *et al.*, 2009). L'exposition au Cd^{2+} et au SeO_4^{2-} entraînent une chute de GSH significative chez la plante car celui-ci intervient dans les processus de détoxification (Sarry *et al.*, 2006; Hugouvieux *et al.*, 2009). En présence de Cu^{2+} , la lutte contre le stress oxydant fait intervenir le GSH. Il semblerait donc que l'exposition au Cd^{2+} , au SeO_4^{2-} et au Cu^{2+} , en faisant chuter le taux de GSH augmente la demande en soufre de la cellule. Le fait que la mutation du motif M2 abolisse en partie l'expression de *SBP1* en réponse au Cd^{2+} , au SeO_4^{2-} et au Cu^{2+} confirme cette hypothèse. Ces résultats confirment l'importance et le rôle de *SBP1* en réponse à la carence en soufre.

La surexpression de *SBP1* a un impact sur le métabolisme du Se

L'ensemble des analyses d'accumulation et de spéciation du Se ont été réalisées sur des lignées présentant différents niveaux d'expression de *SBP1* dans le fond génétique WT et le fond génétique *cad2-1*. Les résultats démontrent l'implication de *SBP1* dans le métabolisme du Se. En effet, l'accumulation du Se dans les parties aériennes est fortement affectée dans les plantes surexprimant *SBP1*. Le niveau d'accumulation augmente lorsque la plante est exposée à 100 μM de SeO_3^{2-} et diminue lorsqu'elle est exposée à 100 μM de SeO_4^{2-} . Ce phénotype sur l'accumulation est observé de façon très reproductible chez les lignées surexprimant *SBP1* déficientes en GSH. Il serait très intéressant de rechercher maintenant plus précisément pourquoi ce phénotype est observé plus particulièrement dans le cas du fond génétique *cad2-1*. L'absence de GSH pourrait en effet jouer un rôle sur l'activité de *SBP1* ou sur son niveau d'expression chez les lignées *cad2-1*. Des analyses de PCR quantitative devront être réalisées afin d'analyser le niveau d'induction chez les surexprimeurs de *SBP1* dans les deux fonds génétiques WT et *cad2-1*.

Influence du GSH sur le métabolisme du Se

Les lignées WT et *cad2-1* accumulent, au niveau des parties aériennes, plus de Se lorsqu'elles sont exposées au SeO_4^{2-} que lorsqu'elles sont exposées au SeO_3^{2-} . Les quantités de Se accumulées sont variables en fonction de la spéciation initiale du Se mais elles ne varient pas en fonction du fond génétique. Ceci montre que la déficience en GSH n'a pas d'influence sur l'accumulation du Se. L'accumulation plus importante de Se en présence de SeO_4^{2-} a été observé chez plusieurs espèces

telles que *Brassica oleacea*, *Brassica juncea*, *Beta vulgaris*, *Triticum aestivum* et *Oriza sativa* (Zayed *et al.*, 1998; de Souza *et al.*, 1999; Cubadda *et al.*, 2010). Ceci peut s'expliquer par le fait que le SeO_4^{2-} est majoritairement transféré vers les parties aériennes puis réduit en Se organique alors que le SeO_3^{2-} est réduit en Se organique au niveau des racines puis transféré (Zhu *et al.*, 2009 ; Li *et al.*, 2008).

D'après les données connues sur la voie d'assimilation du SeO_3^{2-} , sa réduction en Se^{2-} a lieu majoritairement au niveau du cytosol *via* le GSH. La réduction du SeO_3^{2-} peut également se faire au niveau du chloroplaste *via* une enzyme, la sulfite réductase (SiR), ou *via* le GSH. Les analyses de spéciation du Se ont montré que les lignées WT et *cad2-1* exposées au SeO_3^{2-} présentaient 100 % de Se sous forme organique. La réduction du taux de GSH chez les lignées *cad2-1*, malgré son implication dans l'assimilation du SeO_3^{2-} , n'a donc pas d'influence sur la réduction du SeO_3^{2-} . Il se pourrait donc que la quantité de GSH chez les lignées *cad2-1* soit suffisante dans ces conditions de stress pour réduire le SeO_3^{2-} , ou bien il se pourrait que la déficience en GSH induise une plus forte expression ou une plus forte activité de l'enzyme SiR. Ceci pourrait être analysé en testant des concentrations beaucoup plus fortes en SeO_3^{2-} , ou bien en étudiant notamment l'impact du niveau de GSH sur l'expression de la SiR.

Concernant l'assimilation du SeO_4^{2-} , celui-ci rentre *via* les transporteurs de SO_4^{2-} , tout particulièrement SULTR1;2 (El Kassis *et al.*, 2007) puis est réduit en SeO_3^{2-} lors d'une étape limitante faisant intervenir l'ATP Sulfurylase (de Souza *et al.*, 1998). Les étapes suivantes de la réduction du SeO_3^{2-} sous forme organique se font exclusivement au niveau chloroplastique *via* la SiR et/ou le GSH. Les analyses de spéciation ont montré que lors d'une exposition au SeO_4^{2-} , les lignées WT accumulaient le Se sous la forme SeO_4^{2-} et sous forme organique. Dans le cas des lignées *cad2-1*, la proportion de Se accumulé sous forme organique est plus élevée. Il a été montré que les lignées *cad2-1* présentaient une augmentation de la sensibilité au SeO_4^{2-} (Hugouvieux *et al.*, 2009). En parallèle, une chute de GSH est observée chez une plante sauvage traitée au SeO_4^{2-} (Hugouvieux *et al.*, 2009). Le GSH pourrait donc permettre de détoxifier le SeO_4^{2-} . La toxicité du Se chez la plante s'explique par l'incorporation non-spécifique du Se au niveau des protéines. Chez les lignées *cad2-1*, le manque de GSH favoriserait donc la disponibilité du Se pour être incorporé dans les protéines. L'augmentation de la proportion de Se sous forme organique dans le cas des lignées *cad2-1* est donc en accord avec l'augmentation de sensibilité au SeO_4^{2-} observée (Hugouvieux *et al.*, 2009).

Influence de SBP1 sur le métabolisme du Se

Les analyses de spéciation réalisées ont montré que quelque soit le niveau d'expression de SBP1 et quelque soit le fond génétique, le Se est accumulé sous forme organique au niveau des

parties aériennes lorsque les plantes sont exposées au SeO_3^{2-} . Les analyses d'accumulation du Se ont montré que la surexpression de SBP1 dans le fond génétique *cad2-1* augmentait l'accumulation de Se lors d'une exposition au SeO_3^{2-} . Dans le cas du fond génétique WT, le même phénotype d'accumulation est observé uniquement pour la lignée 4 dont le niveau de surexpression de SBP1 est plus important que celui des autres lignées. L'ensemble de ces résultats montre donc que la surexpression de SBP1 lorsque les plantes sont exposées au SeO_3^{2-} permet d'augmenter la quantité de Se sous forme organique dans les parties aériennes et ce, plus particulièrement lors d'une déficience en GSH. Le SeO_3^{2-} est majoritairement réduit au niveau des racines dans le cytosol *via* le GSH. Le SeO_3^{2-} étant réduit dans la fond génétique *cad2-1* déficient en GSH, il se pourrait que SBP1 *in planta* soit impliquée dans la réduction du SeO_3^{2-} , réduction qu'elle semble capable d'effectuer *in vitro*. La localisation cytosolique de SBP1 et le rôle suggéré agoniste au GSH de SBP1 (Hugouvieux *et al.*, 2009) sont en accord avec ce résultat. L'augmentation de la quantité de Se accumulé pourrait, de façon complémentaire, s'expliquer par l'augmentation de l'expression ou de l'activité de la SiR chloroplastique en réponse à la déficience en GSH.

Les plantes sous exprimant l'ensemble de la famille des SBPs ne présentent pas de phénotype en conditions normales de culture. L'analyse du niveau d'expression de ces 3 isoformes réalisée par PCR quantitative a montré que les lignées amiRNA présentaient un niveau d'expression résiduel de *SBP1-2* et *SBP3* d'environ 10 % et 20 % respectivement. Il se pourrait donc que l'absence de phénotype chez les lignées amiRNA soit due à l'expression résiduelle de ces 3 isoformes. Des lignées *sbp1*, *sbp3* et *sbp1×sbp3* sont actuellement disponibles au laboratoire et celles-ci ne présentent aucun phénotype (Dutilleul *et al.*, 2008). Afin de réduire au maximum l'expression des 3 isoformes de la famille des SBPs, ces lignées ont été transformées avec le vecteur codant pour l'expression de l'amiRNA. Les lignées sont en cours de sélection. Des analyses de sensibilité ont également montré qu'en présence de 60 μM de SeO_3^{2-} , un phénotype d'hypersensibilité était observé chez les lignées amiRNA. Ce phénotype devra être confirmé par complémentation. Pour cela, des lignées amiRNA SBP1 ont été transformées avec un vecteur permettant l'expression de SBP1 avec un ARN messenger non reconnu par le microARN artificiel. Des analyses de sensibilité au SeO_3^{2-} devront être réalisées sur ces lignées. Les lignées amiRNA ne montrent pas de différence d'accumulation et de spéciation du Se. L'analyse de l'accumulation et de la spéciation chez ces lignées lors d'une exposition au SeO_3^{2-} devra être réalisée au cours du temps afin de valider l'impact ou non de la sous expression des SBPs dans le métabolisme du Se.

Lors d'une exposition au SeO_4^{2-} , le niveau d'expression de SBP1 n'a pas d'influence sur la spéciation du Se. Les analyses d'accumulation du Se ont mis en évidence que la surexpression de SBP1 dans le fond génétique *cad2-1* entraînait une diminution de la quantité de Se accumulé au

niveau des parties aériennes. Ces résultats sont en accord avec les données précédemment publiées (Hugouvieux *et al.*, 2009) qui montrent que la surexpression de SBP1 dans le fond génétique *cad2-1* restaure la tolérance au SeO_4^{2-} . Cette tolérance, observée au niveau des feuilles et des racines, s'expliquerait donc par une diminution de la quantité de Se accumulé. La diminution d'accumulation du Se au niveau des racines devra tout de même être vérifiée. Lors d'une exposition au SeO_4^{2-} , SBP1 est induite *via* le motif *cis* GAGAC. Il se pourrait donc que l'induction de SBP1 *via* ce motif lui confère un rôle dans la régulation de l'absorption. SBP1 pourrait aussi être impliquée dans le transfert du SeO_4^{2-} vers les parties aériennes. L'expression des différents transporteurs capables de transporter le SeO_4^{2-} devra être quantifiée en fonction de l'expression de SBP1.

Conclusion

Ces expériences ont permis de déterminer que SBP1 est cytosolique et nucléaire. L'augmentation de l'expression de SBP1 en réponse au stress fait intervenir l'élément *cis* GAGAC. L'identification de cet élément démontre un lien fonctionnel entre SBP1 et une demande en soufre de la cellule. La surexpression de SBP1 perturbe l'accumulation du Se dans la plante. Ces résultats suggèrent que SBP1 est impliquée dans des étapes précoces du métabolisme du Se.

VII. CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

La protéine SBP1 a été identifiée dans l'équipe comme un candidat potentiel impliqué dans un nouveau mécanisme de lutte que la plante peut mettre en place pour faire face à la toxicité des métaux lourds dans les sols. Par exemple, dans le cas de la réponse de la plante au stress métallique provoqué par le cadmium (Cd), SBP1 présente différentes caractéristiques importantes et favorables pour intervenir dans la lutte contre ce stress. Tout d'abord, SBP1 s'accumule précocement en réponse au Cd^{2+} . De plus, la surexpression de SBP1 chez *Arabidopsis thaliana* augmente la tolérance à ce métal. Enfin, la protéine *in vitro* est capable de chélater le Cd^{2+} . SBP1 est également induite en réponse à différents stress et possède dans sa séquence primaire de nombreux sites de liaison aux métaux. En parallèle, il a été montré que sa surexpression augmentait la tolérance à différents stress.

Suite à ces différents résultats, l'objectif de ma thèse a donc été de poursuivre l'analyse fonctionnelle intégrée de SBP1 chez *Arabidopsis thaliana* afin de mieux comprendre son rôle dans la réponse au stress. Pour cela des analyses complémentaires *in vitro* et *in planta* ont été menées. Le but des analyses *in vitro* a été de rechercher si différents ligands comme des métaux autres que le Cd^{2+} étaient capables de se lier à SBP1 et de déterminer si le sélénium (Se) était également capable de se lier à celle-ci comme son homologue chez les mammifères. Il a été mis en évidence que différents métaux essentiels ou non ainsi que le Se avaient la capacité de se lier à SBP1. Ceci est en accord avec la présence de nombreux sites de liaisons dans la séquence de la protéine. Les acides aminés impliqués dans la liaison du Se à SBP1 ainsi que la nature de la liaison ont été caractérisés. Dans le cas du Cd^{2+} , l'affinité du métal pour SBP1 a été déterminée et la nature des résidus (soufrés) impliqués dans la liaison a été identifiée. Grâce à la structure 3D de SBP1 obtenue par modélisation, il a été mis en évidence que SBP1 adoptait une structure de type beta propeller dont le centre, riche en résidus histidines, semble important dans la stabilité de la protéine. Les analyses *in planta* ont permis d'obtenir des informations caractéristiques de SBP1 dans le contexte cellulaire. L'objectif de ces analyses a été d'étudier la localisation cellulaire de SBP1, d'identifier des éléments clefs impliqués dans la régulation de l'expression du gène en réponse au stress et enfin, d'étudier l'impact de SBP1 sur l'accumulation et la sensibilité à un de ces ligands. Il a été montré que SBP1 était localisée dans le cytosol et dans le noyau. L'élément *cis* de régulation GAGAC a été caractérisé en tant qu'élément majeur impliqué dans la régulation de SBP1 en réponse aux différents stress inducteurs de celle-ci. Enfin, corrélé à la capacité du Se à se lier à SBP1 *in vitro* et son implication dans la réponse à la carence en soufre, il a été montré que la surexpression de SBP1 modifiait le niveau d'accumulation du Se dans la plante ainsi que sa sensibilité. L'ensemble de ces résultats va être discuté afin de mieux comprendre comment SBP1 pourrait intervenir dans les processus de détoxification par chélation en réponse à des composés toxiques et quelles sont les expériences à réaliser pour valider et compléter les différentes hypothèses.

A. SBP1, une protéine impliquée dans la détoxification du Cd²⁺ et du Se

1. Un rôle potentiel dans la chélation du Cd²⁺

Afin de caractériser *in vitro* la liaison Cd²⁺-SBP1, différentes techniques biochimiques ont été utilisées. La confirmation du ratio de liaison Cd²⁺/SBP1 a été réalisée par ICP-MS, la détermination du K_D de 2,2 × 10⁻⁷ M a été menée par fluorimétrie tandis que la caractérisation des sites de liaison qui a montré que la liaison du Cd²⁺ à SBP1 se faisait majoritairement via des acides aminés soufrés a été réalisée par spectroscopie d'absorption des rayons X. La liaison *via* des acides aminés soufrés rappelle la liaison du Cd²⁺ aux métallothionéines et aux phytochélatines (PCs) qui sont les principaux chélatants du Cd²⁺ dans la cellule végétale. *In planta*, la surexpression de SBP1 augmente la tolérance au Cd²⁺ (Dutilleul *et al.*, 2008) surtout dans le fond génétique *cad2-1* qui ne possède plus de PCs. Il a été montré que l'induction de SBP1 en réponse au Cd²⁺ se faisait *via* le motif *cis* M2 GAGAC qui permet une induction précoce de l'expression du gène, tout comme celle du gène *SULTR1;1* dont l'expression est très sensible au taux de GSH en réponse à ce stress. L'ensemble de ces résultats est en faveur d'une augmentation de l'expression de SBP1 en réponse au Cd²⁺ pour permettre en parallèle au GSH (*via* la synthèse des PCs) le piégeage d'une partie du Cd²⁺ au niveau du cytosol. Cette fonction de SBP1 serait masquée dans le fond génétique WT qui peut produire des PCs, mais révélée chez le mutant *cad2-1*. Ce phénomène est représenté sur la figure 71. Ce rôle potentiel agoniste au GSH, *via* ses propriétés chélatrices et son implication dans la détoxification du Cd²⁺, avait déjà été suggéré pour SBP1 (Dutilleul *et al.*, 2008, Hugouvieux *et al.*, 2009).

Cependant, pour valider cette fonction de SBP1, il sera nécessaire de mener des expériences complémentaires. Il serait important de valider l'existence de la liaison SBP1-Cd²⁺ *in planta*. Pour cela, des analyses d'immunoprécipitation de SBP1 *in planta* (native ou étiquetée) à partir d'extraits de plantes exposées au Cd²⁺ couplées à des analyses ICP-MS seront envisagées. Ces analyses permettront probablement de vérifier si SBP1 est capable de lier le Cd²⁺ *in planta*. D'autre part, couplées à des analyses protéomiques, ces expériences permettraient également d'identifier des partenaires protéiques éventuels à SBP1. En effet, le rôle potentiel de SBP1 dans la détoxification du Cd²⁺ par chélation ne peut s'expliquer si elle agit seule vue sa localisation et vue la quantité de SBP1 qui a été estimée à 0,1 pmole/mg de matière fraîche lorsque la plante est exposée à 25 µM de Cd²⁺. Si SBP1 est capable de transférer le Cd²⁺ à une protéine avec qui elle interagit (par exemple un transporteur vacuolaire), ceci lui permettrait d'être disponible pour lier à nouveau du Cd²⁺. Elle pourrait également intervenir dans un mécanisme de chélation/séquestration du Cd²⁺ dans la vacuole.

Lorsque les sites de liaisons au Cd^{2+} auront été identifiés, les protéines mutantes pourront être surexprimées chez le mutant *cad2-1*. Ceci permettra de définir si la liaison au Cd^{2+} est responsable du phénotype de tolérance observé chez les lignées *cad2-1* lors d'une exposition au Cd^{2+} .

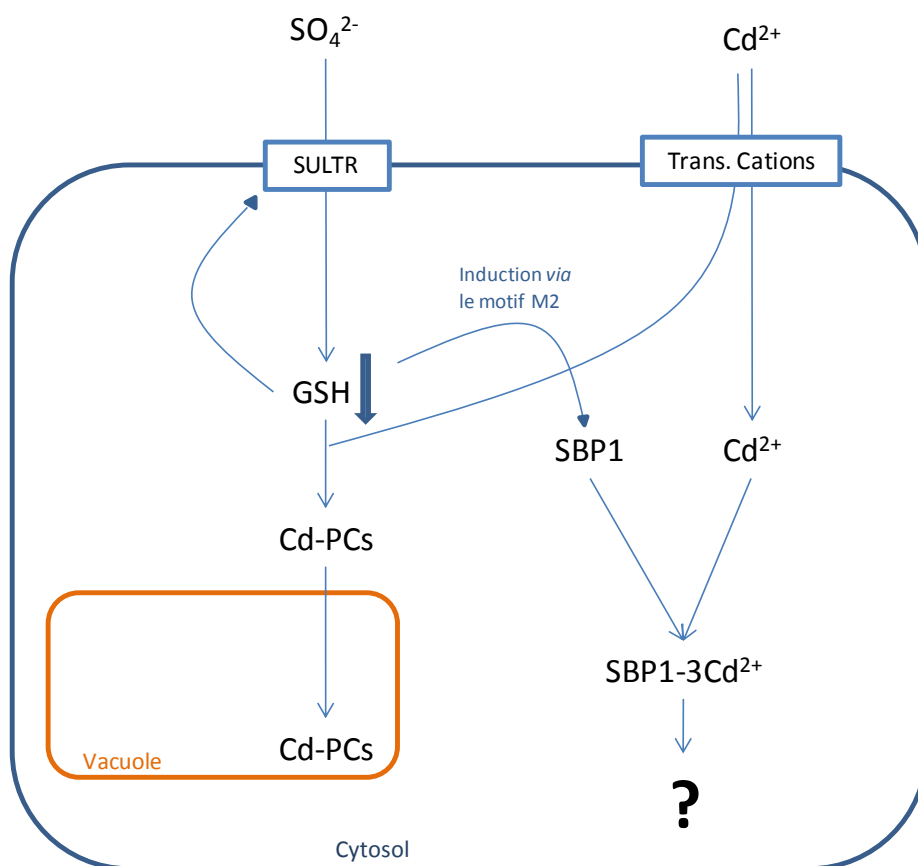


Figure 71 : Rôle potentiel de SBP1 lors d'une exposition au Cd^{2+} . Le Cd^{2+} est absorbé via différents transporteurs de cations (Trans. Cations). L'exposition au Cd^{2+} entraîne une chute de GSH qui est utilisé pour la synthèse des PCs. La chute de GSH entraîne l'induction précoce de SULTR1-1 (Herbette et al., 2006) afin d'augmenter l'absorption du sulfate (SO_4^{2-}) pour permettre à nouveau la synthèse de cystéine et de GSH. Le Cd^{2+} et le GSH vont pouvoir à nouveau former des complexes Cd-PCs qui seront séquestrés au niveau de la vacuole. La chute de GSH entrainerait également l'induction précoce de SBP1 via le motif M2 GAGAC. Le Cd^{2+} peut se lier, au niveau du cytosol, à SBP1. Dans le fond génétique sauvage, la surexpression de SBP1 augmente modérément la tolérance au Cd^{2+} . Dans le cas du fond génétique *cad2-1*, la plante ne possède plus la voie de détoxification impliquant les PCs et la principale voie de détoxification du métal se fait alors grâce à SBP1. C'est pourquoi la surexpression de SBP1 chez les lignées *cad2-1* restaure la tolérance au Cd^{2+} . Pour être efficace, ce système de détoxification implique que SBP1 puisse transférer le métal à un compartiment de stockage comme la vacuole ou qu'elle transfère le Cd^{2+} à une autre protéine (phénomène représenté par le point d'interrogation). SBP1 est alors à nouveau libre pour chélater à nouveau du Cd^{2+} libre dans le cytosol.

2. Un rôle potentiel dans la réduction et la détoxification du SeO_3^{2-}

L'approche *in vitro* a permis de mettre en évidence que le Se se liait à SBP1 chez *Arabidopsis thaliana* comme chez les mammifères, c'est pourquoi la liaison Se-SBP1 chez la plante a été étudiée plus en détail. La caractérisation biochimique de la liaison du Se à SBP1 a montré que lorsque le SeO_3^{2-} était incubé en présence de SBP1, un complexe Se-SBP1 se formait. La liaison du Se à SBP1 a été analysée par spectrométrie de masse et par spectroscopie d'absorption des rayons X. Il a été mis en évidence que celle-ci était du type R-S-Se-S-R et qu'elle se faisait de façon covalente *via* les cystéines 21 et 22. Les analyses *in planta* ont montré que lors d'une déficience en GSH (lignées *cad2-1*), la surexpression de SBP1 entraînait une augmentation de Se accumulé au niveau des feuilles lorsque les plantes sont exposées au SeO_3^{2-} . Il se pourrait donc que SBP1 puisse être impliquée dans la réduction du SeO_3^{2-} en Se^{2-} dans le cytosol et que l'intermédiaire de cette réaction soit le complexe Se-SBP1 (Figure 72). SBP1 apparaît ainsi comme une protéine impliquée dans la détoxification du SeO_3^{2-} , composé fortement toxique pour la plante, en évitant son accumulation. Ce rôle potentiel de SBP1 appuie à nouveau l'hypothèse du rôle agoniste au GSH. Effectivement, chez une plante WT, lors d'une exposition au SeO_3^{2-} , la réduction de celui-ci en Se^{2-} se fait au niveau du cytosol grâce au GSH lors de la formation d'un intermédiaire GS-Se-SG (sélénodiglutathion ou SediGSH).

Comme dans le cas du Cd, ce modèle devra être validé. Des analyses permettant d'étudier la capacité de SBP1 à réduire le SeO_3^{2-} *in vitro* seront réalisées. Il sera aussi nécessaire de valider l'existence de la liaison SBP1-Se *in planta*. Pour cela, des analyses d'immunoprécipitation de SBP1 *in planta* à partir d'extraits de plantes exposées au SeO_3^{2-} couplées à des analyses ICP-MS permettront probablement de vérifier si le Se est capable de se lier à SBP1 *in planta*. De la même façon que dans le cas du Cd^{2+} , couplées à des analyses protéomiques, ces expériences permettront d'identifier des partenaires protéiques éventuels. En effet, le rôle de SBP1 dans la détoxification du Se pourrait être lié à sa capacité à transférer celui-ci à une autre protéine impliquée à son tour dans sa détoxification/séquestration (Figure 72). Le Se chez *Arabidopsis thaliana* semble s'accumuler dans les tissus vasculaires (Sarret *et al.*, 2013). Des plantes exprimant SBP1 mutée au niveau des cystéines 21 et 22 impliquées dans la liaison au Se pourraient également être générées dans les fonds génétiques WT et *cad2-1*. Des analyses d'accumulation et de spéciation sur ces différentes lignées permettraient de confirmer le rôle de la liaison Se-SBP1 dans l'accumulation du Se et d'expliquer le phénotype d'accumulation observé lors d'une exposition au SeO_3^{2-} .

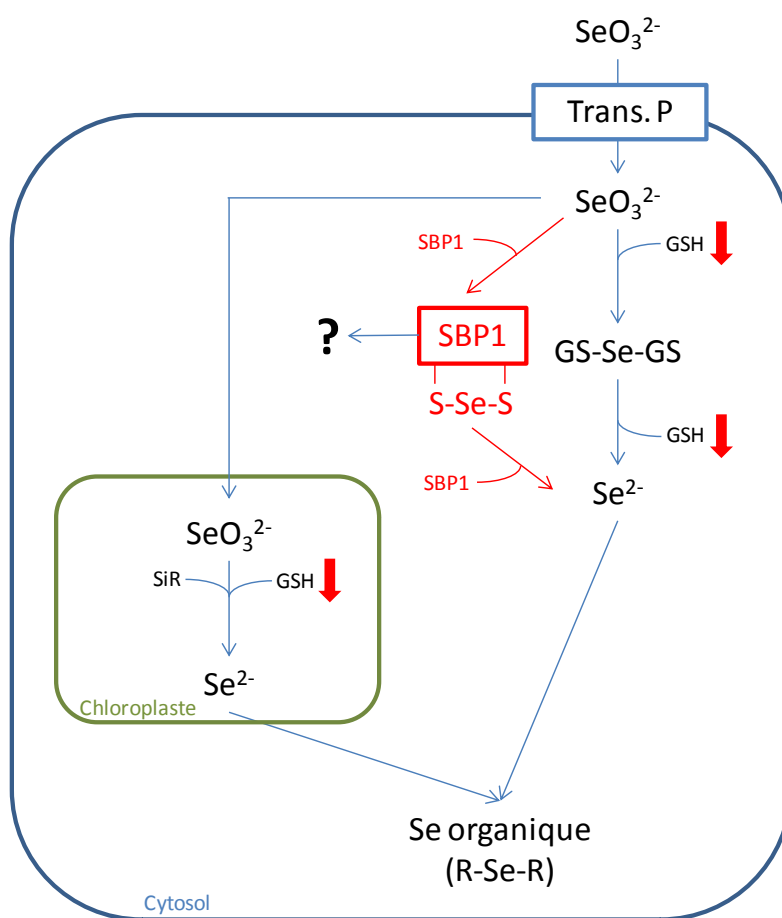


Figure 72 : Rôle potentiel de SBP1 lors d'une exposition au SeO_3^{2-} . Le SeO_3^{2-} est absorbé via les transporteurs de phosphate (Trans. P). Dans le cytosol il est réduit sous forme de Se^{2-} par le GSH. Sa réduction dans le chloroplaste se fait via le GSH ou enzymatiquement avec le SiR. Les flèches bleues représentent la voie d'assimilation du Se dans le cas des lignées WT. Les phénomènes observés lors d'une déficience en GSH (lignées *cad2-1*) sont représentés en rouge. Il semblerait que SBP1 puisse réduire le SeO_3^{2-} en Se^{2-} , c'est pourquoi la surexpression de SBP1 entraîne une augmentation de la quantité de Se accumulée au niveau des parties aériennes. La sous expression de la famille des SBP n'influence pas le niveau d'accumulation du SeO_3^{2-} ni sa spéciation. Lorsque SBP1 est sous exprimée dans le fond génétique *cad2-1*, le Se est donc réduit correctement en Se organique et l'étape de réduction ne peut donc se faire qu'au niveau du chloroplaste via la SiR. Une fois lié à SBP1, le sélénium pourrait être transféré à une protéine prenant à son tour en charge le composé toxique (phénomène représenté par le point d'interrogation).

3. Un rôle potentiel dans la chélation de métaux essentiels

Les analyses de capacités de liaison menées *in vitro*, ont montré que le Zn^{2+} était également capable de se lier à SBP1 avec un ratio métal/SBP1 de 3, identique à celui du Cd^{2+} . SBP1 est une protéine exprimée très précocement lors du développement et elle est présente dans tous les tissus analysés. Il se pourrait donc que SBP1 joue un rôle dans l'homéostasie de ce métal avec un

mécanisme moléculaire proche de celui observé dans le cas du Cd^{2+} . Comme décrit dans le cas du Cd^{2+} , des analyses d'immunoprécipitation couplées à des analyses ICP-MS devront être menées sur des extraits de plantes cultivées en conditions normales de culture afin d'identifier une potentielle liaison *in planta* du Zn^{2+} à SBP1. L'accumulation de Zn^{2+} chez des lignées surexprimant SBP1 ou sous exprimant la famille des SBPs devra également être analysée. Ces analyses permettront d'identifier si la liaison du Zn^{2+} à SBP1 *in planta* joue un rôle dans l'homéostasie de ce métal.

B. SBP1, une protéine impliquée dans la réponse à une carence en soufre

Dans le but de mieux comprendre la fonction de SBP1, les mécanismes potentiels à l'origine de l'induction de l'expression de SBP1 en réponse à différents stress ont été étudiés. L'utilisation de lignées transgéniques bioluminescentes exprimant le gène de la luciférase sous le contrôle du promoteur sauvage (WT) de *SBP1* ou de différentes versions mutées de celui-ci a permis de montrer que le motif *cis* de régulation GAGAC était responsable d'une grande partie de l'induction de l'expression de SBP1 lors d'un stress (carence en soufre ou autres stress). Ce motif régule l'expression du gène *SULTR1;1*, impliqué dans l'absorption du soufre, en réponse à une carence en soufre et notamment en réponse à une chute de GSH. Ce résultat démontre qu'il existe un lien entre les différents stress qui induisent l'expression de SBP1 et que ce lien semble lié à une augmentation de la demande en soufre de la cellule en condition de stress. SBP1 a donc une fonction dans la réponse à la carence en soufre. Les analyses antérieures réalisées au laboratoire avaient suggéré dans le cas de la réponse au Cd (Dutilleul *et al.*, 2008), ainsi qu'au SeO_4^{2-} et à l' H_2O_2 (Hugouvieux *et al.*, 2009), une fonction agoniste au GSH de SBP1. Certaines de ces fonctions sont illustrées dans les figures 71 et 72 où l'on suggère que les capacités chélatrices de SBP1 sont impliquées dans sa fonction. Afin d'étudier d'autres fonctions potentielles de SBP1 dans la carence en soufre, des lignées surexprimant SBP1 et sous exprimant la famille entière des SBPs disponibles au laboratoire pourront être utilisées. Il sera intéressant d'étudier si le niveau d'accumulation de SBP1 a une influence sur la sensibilité en réponse à la carence en soufre et également sur la quantité totale de soufre absorbé ainsi que sur sa répartition entre les différents métabolites soufrés. SBP1 étant induite très précocement *via* le motif GAGAC, elle pourrait être un « régulateur positif de cette voie ». La localisation de SBP1 dans le noyau suggère qu'elle pourrait intervenir comme régulateur de l'expression de certains gènes. En fonction du niveau d'expression de SBP1, des analyses du niveau d'expression des différents gènes impliqués dans la voie d'absorption et d'assimilation du soufre ou dans sa régulation permettraient de confirmer ou non cette hypothèse. Il sera intéressant d'étudier par la suite si la localisation nucléaire fait intervenir la liaison d'un métal à SBP1. SBP1 est, d'un point de vue tridimensionnel, un béta-propeller. Les fonctions des protéines ayant ce type de structure

sont très variées. Parmi celles-ci figure la protéine de la drosophile Groucho/TLE1 capable d'interagir avec des facteurs de transcription et des histones afin de réprimer l'expression de certains gènes (Pickles *et al.*, 2002). Il se pourrait donc que SBP1 exerce une fonction similaire dans le noyau.

Le métabolisme du Se est intimement lié à celui du soufre. Le phénotype observé chez le mutant *cad2-1* surexprimant *SBP1* (accumulation plus importante de Se en réponse au SeO_3^{2-} , mais accumulation moins importante en réponse au SeO_4^{2-}) pourrait donc être dû à un rôle spécifique de SBP1 en réponse à cet élément ou bien être la conséquence du rôle de SBP1 dans la carence en soufre. Si SBP1 est un « régulateur positif » de cette voie et que celle-ci favorise le flux de soufre et son assimilation, ceci permet d'expliquer les deux résultats opposés obtenus chez les plantes surexprimant SBP1. En effet, dans nos conditions expérimentales, le SeO_4^{2-} est fourni dans un milieu contenant un excès du sulfate. Chez la plante ne surexprimant pas SBP1, le SeO_4^{2-} rentre tout d'abord par le transporteur constitutivement exprimé SULTR1;2. Suite à l'absorption de SeO_4^{2-} , il se produit une chute de GSH mesurée en réponse à ce stress (Hugouvieux *et al.*, 2009) qui entraîne une perception de la carence en soufre. De la même façon que SULTR1;1, SBP1 est induite très précocement *via* le motif GAGAC. SBP1 active la voie d'assimilation du soufre et favorise son métabolisme. Chez une plante surexprimant SBP1, la voie est déjà activée car SBP1 est surexprimée. Le sulfate (SO_4^{2-}) étant en excès par rapport au SeO_4^{2-} dans le milieu extérieur, ceci pourrait entraîner une compétition entre le S et le Se au niveau des transporteurs de soufre qui en présence de SeO_4^{2-} favorisent l'entrée du SO_4^{2-} par rapport au SeO_4^{2-} (White *et al.*, 2004). Les plantes surexprimant SBP1 absorbant moins de SeO_4^{2-} sont alors plus tolérantes au SeO_4^{2-} . Dans le cas d'une exposition au SeO_3^{2-} , celui-ci est directement incorporé dans les parties aériennes sous forme organique. Dans nos conditions expérimentales, il n'entraîne pas de chute de GSH et n'entraîne pas de perception de carence en soufre (Hugouvieux *et al.*, 2009). SBP1 n'est donc pas induite. Par contre SBP1 est présente dans la cellule et le Se initialement sous la forme SeO_3^{2-} peut donc se lier à celle-ci. Chez les surexprimeurs, le niveau d'accumulation de SBP1 est plus important et l'accumulation du Se favorisée.

SBP1 semble impliquée dans la voie d'assimilation du soufre et le SeO_3^{2-} est capable de se lier à SBP1. L'homologue soufré du SeO_3^{2-} est le sulfite (SO_3^{2-}), élément fortement toxique pour la plante. Il serait donc intéressant de tester les capacités de liaison du SO_3^{2-} à SBP1. En effet, SBP1 pourrait être impliquée dans l'homéostasie du sulfite potentiellement *via* une liaison S-SBP1.

L'ensemble de ces perspectives permettrait à long terme de caractériser les mécanismes moléculaires impliquant SBP1 dans la réponse de la plante au stress induit par différents toxiques tels que le SeO_3^{2-} , le SeO_4^{2-} et le Cd^{2+} ainsi que dans la réponse à la carence en soufre. D'un point de vue

physiologique, ces perspectives permettraient également de caractériser la fonction de SBP1 chez *Arabidopsis thaliana* en rapport avec des éléments essentiels.

VIII. ANNEXES

A Séquence protéique de SBP1 (At4g14030)

MATETEVVAPVTVSNGGSKGCCYGGPGYATPLAAMSGPSEKLIYVTAVYTGIDKPDYLATVDVDPSSPSYSSVI
 HRLPMPFVGDELHHSWNSCSCCHGDASVDRRYLVPLSLISGRIYAIDTKENPRAPSLYKYVDPKEIADKTGLAFPHT
 AHCLATGEILVSLGDEEGNAKNGFLLDSDFNINRWEKPGHSPLYGYDFWYQPRHKTMISTSWGAPKAFSKGF
 NLQHVADGLYGSHLHVYSWPGGEIKQLIDLGPGLLEIRFLHDPKDTGFVGSALSSNMIRFFKNSDETWSHEVVI
 SVKPLKVENWILPEMPGLITDFLISLDDRFIYFVNWLHGDIRQYNIEDPKNPVLTGQIWVGGLLQKGSVPKAVGEDG
 NTFQFEVPQIKGKSLRGGPQMIQLSLDGKRLYATNSLFAWDRQFYPEIMEKGSIIQIDVDTEKGGLTINPDFFVD
 GDEPDGPSLAHEMRYPGGDCTSDIWI

B Séquence protéique de GST-SBP1

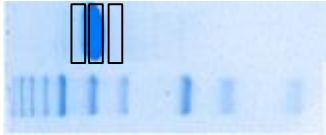
MSPILGYWKIKGLVQPTRLLLEYLEEKYEEHLYERDEGDKWRNKKFELGLEFPNLPYYIDGDVKLTQSMIIRYIADKH
 NMLGGCPKERAIEISMLEGAVLDIRYGVSRAYSDFETLKVDLFLSKLPEMLKMFEDRLCHKTYLNGDHVTHPDFMLY
 DALDVVLYMDPMCLDAFPKLVCFKKRIEAIPIQIDKYLKSSKYIAPLQGWQATFGGGDHPPKSDLEGRGITSLYKK
 AGSAAALFNFKKEPFTMATETEVVAPVTVSNGGSKGCCYGGPGYATPLAAMSGPSEKLIYVTAVYTGIDKPDY
 ATVDVDPSSPSYSSVIHRLPMPFVGDELHHSWNSCSCCHGDASVDRRYLVPLSLISGRIYAIDTKENPRAPSLYKYV
 DPKEIADKTGLAFPHTAHCLATGEILVSLGDEEGNAKNGFLLDSDFNINRWEKPGHSPLYGYDFWYQPRHKT
 MISTSWGAPKAFSKGFNLQHVADGLYGSHLHVYSWPGGEIKQLIDLGPGLLEIRFLHDPKDTGFVGSALSSNM
 IRFFKNSDETWSHEVVISVKPLKVENWILPEMPGLITDFLISLDDRFIYFVNWLHGDIRQYNIEDPKNPVLTGQIWVG
 GLLQKGSVPKAVGEDGNTFQFEVPQIKGKSLRGGPQMIQLSLDGKRLYATNSLFAWDRQFYPEIMEKGSIIQIDV
 DTEKGGLTINPDFFVDGDEPDGPSLAHEMRYPGGDCTSDIWI

C Séquence protéique de His₆-SBP1

MKHHHHHHHMSDYDIPTTENLYFEGAMATETEVVAPVTVSNGGSKGCCYGGPGYATPLAAMSGPSEKLIYVTAV
 YTGIDKPDYLATVDVDPSSPSYSSVIHRLPMPFVGDELHHSWNSCSCCHGDASVDRRYLVPLSLISGRIYAIDTKE
 NPRAPSLYKYVDPKEIADKTGLAFPHTAHCLATGEILVSLGDEEGNAKNGFLLDSDFNINRWEKPGHSPLYGY
 DFWYQPRHKTMISTSWGAPKAFSKGFNLQHVADGLYGSHLHVYSWPGGEIKQLIDLGPGLLEIRFLHDPKDT
 GFVGSALSSNMIRFFKNSDETWSHEVVISVKPLKVENWILPEMPGLITDFLISLDDRFIYFVNWLHGDIRQYNIEDPK
 NPVLTGQIWVGGLLQKGSVPKAVGEDGNTFQFEVPQIKGKSLRGGPQMIQLSLDGKRLYATNSLFAWDRQFYPEI
 MEKGSIIQIDVDTEKGGLTINPDFFVDGDEPDGPSLAHEMRYPGGDCTSDIWI

Annexe 1 : Séquences des protéines SBP1, GST-SBP1 et His₆-SBP1. **A :** Séquence de la protéine SBP1 chez *Arabidopsis thaliana* (TAIR : At4g14030). **B :** Séquence de la protéine GST-SBP1. La séquence protéique de la protéine GST est représentée en vert, les acides aminés présents entre la GST et SBP1 sont représentés en rouge et la séquence protéique de la protéine SBP1 est représentée en noir. Le site de clivage au facteur Xa est encadré en rouge et le clivage a lieu après l'arginine R. **C :** Séquence de la protéine His₆-SBP1. La séquence protéique de l'étiquette His₆ est représentée en vert, les acides aminés présents entre l'étiquette His₆ et SBP1 sont représentés en rouge et la séquence protéique de la protéine SBP1 est représentée en noir. Le site de clivage à la TEV est encadré en rouge et le clivage a lieu après l'acide glutamique E.

A



B

DESCRIPTION	Locus	Score	Masse (Da)	# peptides
BANDE 1				
DNAK_ECOLI Chaperone protein dnaK OS=Escherichia coli (strain K12) GN=dnaK PE=1 SV=2	DNAK_ECOLI	3689,87	69120,47	0,00
SBP1_Ath (selenium-binding protein 1)	AT4G14030.1	1562,01	54358,77	48,99
CH60_ECOLI 60 kDa chaperonin OS=Escherichia coli (strain K12) GN=groL PE=1 SV=2	CH60_ECOLI	603,38	57436,64	0,00
THIO_ECOLI Thioredoxin-1 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=trxA PE=1 SV=2	THIO_ECOLI	177,10	11895,08	0,00
BANDE 2				
SBP1_Ath (selenium-binding protein 1)	AT4G14030.1	2059,60	54358,77	23
CH60_ECOLI 60 kDa chaperonin OS=Escherichia coli (strain K12) GN=groL PE=1 SV=2	CH60_ECOLI	1598,67	57436,64	21
BANDE 3				
SBP1_Ath (selenium-binding protein 1)	AT4G14030.1	1690,20	54358,77	53,64

Annexe 2 : Identification des protéines de masse moléculaire proche de SBP1 (56 kDa) présentes dans la solution de SBP1 purifiée avant passage sur colonne de chromatographie d'exclusion stérique. A : SBP1 purifiée après clivage de l'étiquette GST a été déposée sur Gel SDS-PAGE 12% et 3 bandes ont été découpées puis analysées par spectrométrie de masse. B : Les scores MASCOT, la masse des protéines (en Da), ainsi que le nombre de peptides identifiés dans chacune des bandes, sont mentionnés.

A

70 mL78.5 mL

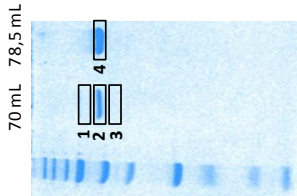
1

2

3

4

</



Annexe 3 : Identification des protéines contenues dans les fractions d'éluion après passage de SBP1 purifiée sur colonne de chromatographie d'exclusion stérique. A : Un échantillon des fractions correspondant à l'épaulement (70 mL) observé avant le pic principal (78 mL) sont déposées sur gel SDS-PAGE 12 %. Quatre bandes sont découpées puis analysées par spectrométrie de masse. B : Les scores MASCOT, la masse des protéines (en Da), ainsi que le nombre de peptides identifiés, sont mentionnés.

IX. BIBLIOGRAPHIE

- Agalou, A., Roussis, A., and Spaink, H.P.** (2005). The Arabidopsis selenium-binding protein confers tolerance to toxic levels of selenium. *Functional Plant Biology* **32**, 881-890.
- Ahsan, N., Lee, S.H., Lee, D.G., Lee, H., Lee, S.W., Bahk, J.D., and Lee, B.H.** (2007). Physiological and protein profiles alternation of germinating rice seedlings exposed to acute cadmium toxicity. *Comptes Rendus Biologies* **330**, 735-746.
- Aina, R., Labra, M., Fumagalli, P., Vannini, C., Marsoni, M., Cucchi, U., Bracale, M., Sgorbati, S., and Citterio, S.** (2007). Thiol-peptide level and proteomic changes in response to cadmium toxicity in *Oryza sativa* L. roots. *Environmental and Experimental Botany* **59**, 381-392.
- Alvarez, S., Berla, B.M., Sheffield, J., Cahoon, R.E., Jez, J.M., and Hicks, L.M.** (2009). Comprehensive analysis of the *Brassica juncea* root proteome in response to cadmium exposure by complementary proteomic approaches. *Proteomics* **9**, 2419-2431.
- Anderson, J.W.** (1993). Selenium Interactions in Sulfur Metabolism. In *Sulfur Nutrition and Assimilation in Higher Plants*, L.S. DeKok, I; Rennenberg, H; Brunold, C; Rauser, WE, ed, pp. 49-60.
- Arvy, M.P.** (1993). Selenate and Selenite Uptake and Translocation in Bean-Plants (*Phaseolus-Vulgaris*). *J Exp Bot* **44**, 1083-1087.
- Bansal, M.P., Cook, R.G., Danielson, K.G., and Medina, D.** (1989). A 14-kilodalton selenium-binding protein in mouse liver is fatty acid-binding protein. *J Biol Chem* **264**, 13780-13784.
- Bansal, M.P., Mukhopadhyay, T., Scott, J., Cook, R.G., Mukhopadhyay, R., and Medina, D.** (1990). DNA Sequencing of a Mouse-Liver Protein That Binds Selenium - Implications for Seleniums Mechanism of Action in Cancer Prevention. *Carcinogenesis* **11**, 2071-2073.
- Banuelos, G., Terry, N., Leduc, D.L., Pilon-Smits, E.A., and Mackey, B.** (2005a). Field trial of transgenic Indian mustard plants shows enhanced phytoremediation of selenium-contaminated sediment. *Environ Sci Technol* **39**, 1771-1777.
- Banuelos, G.S., and Lin, Z.Q.** (2005b). Phytoremediation management of selenium-laden drainage sediments in the San Luis Drain: a greenhouse feasibility study. *Ecotoxicol Environ Saf* **62**, 309-316.
- Banuelos, G.S., Fakra, S.C., Walse, S.S., Marcus, M.A., Yang, S.I., Pickering, I.J., Pilon-Smits, E.A., and Freeman, J.L.** (2011). Selenium accumulation, distribution, and speciation in spineless prickly pear cactus: a drought- and salt-tolerant, selenium-enriched nutraceutical fruit crop for biofortified foods. *Plant Physiol* **155**, 315-327.
- Barberon, M., Berthomieu, P., Clairotte, M., Shibagaki, N., Davidian, J.C., and Gosti, F.** (2008). Unequal functional redundancy between the two Arabidopsis thaliana high-affinity sulphate transporters SULTR1;1 and SULTR1;2. *New Phytologist* **180**, 608-619.
- Behne, D., and Kyriakopoulos, A.** (2001). Mammalian selenium-containing proteins. *Annu Rev Nutr* **21**, 453-473.
- Behne, D., Kyriakopoulos, A., Scheid, S., and Gessner, H.** (1991). Effects of chemical form and dosage on the incorporation of selenium into tissue proteins in rats. *J Nutr* **121**, 806-814.
- Berezin, I., Mizrachy-Dagry, T., Brook, E., Mizrahi, K., Elazar, M., Zhuo, S., Saul-Tcherkas, V., and Shaul, O.** (2008). Overexpression of AtMHX in tobacco causes increased sensitivity to Mg²⁺, Zn²⁺, and Cd²⁺ ions, induction of V-ATPase expression, and a reduction in plant size. *Plant Cell Rep* **27**, 939-949.
- Berreau, L.M., Makowska-Grzyska, M.M., and Arif, A.M.** (2000). Amide alcoholysis in mononuclear zinc and cadmium complexes ligated by thioether sulfur and nitrogen donors. *Inorg Chem* **39**, 4390-4391.
- Berry, M.J., Martin, G.W., and Low, S.C.** (1997). RNA and protein requirements for eukaryotic selenoprotein synthesis. *Biomedical and Environmental Sciences* **10**, 182-189.
- Bradford, M.M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-254.
- Brown, T.A., and Shrift, A.** (1981). Exclusion of selenium from proteins of selenium-tolerant *astragalus* species. *Plant Physiol* **67**, 1051-1053.

- Brown, T.A., and Shrift, A.** (1982). Selenium - Toxicity and Tolerance in Higher-Plants. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society* **57**, 59-84.
- Broyer, T.C., Johnson, C.M., and Huston, R.P.** (1972). Selenium and Nutrition of *Astragalus* .2. Ionic Sorption Interactions among Selenium, Phosphate, and Macronutrient and Micronutrient Cations. *Plant and Soil* **36**, 651-&.
- Byrne, C., Divekar, S.D., Storch, G.B., Parodi, D.A., and Martin, M.B.** (2009). Cadmium-a metallo hormone? *Toxicol Appl Pharmacol* **238**, 266-271.
- Cazale, A.C., and Clemens, S.** (2001). *Arabidopsis thaliana* expresses a second functional phytochelatin synthase. *FEBS Lett* **507**, 215-219.
- Chan, H.M., Zhu, L.F., Zhong, R., Grant, D., Goyer, R.A., and Cherian, M.G.** (1993). Nephrotoxicity in rats following liver transplantation from cadmium-exposed rats. *Toxicol Appl Pharmacol* **123**, 89-96.
- Chan, J., Merrifield, M.E., Soldatov, A.V., and Stillman, M.J.** (2005). XAFS spectral analysis of the cadmium coordination geometry in cadmium thiolate clusters in metallothionein. *Inorg Chem* **44**, 4923-4933.
- Chang, P.W., Tsui, S.K., Liew, C., Lee, C.C., Waye, M.M., and Fung, K.P.** (1997). Isolation, characterization, and chromosomal mapping of a novel cDNA clone encoding human selenium binding protein. *J Cell Biochem* **64**, 217-224.
- Chen, G., Wang, H., Miller, C.T., Thomas, D.G., Gharib, T.G., Misek, D.E., Giordano, T.J., Orringer, M.B., Hanash, S.M., and Beer, D.G.** (2004). Reduced selenium-binding protein 1 expression is associated with poor outcome in lung adenocarcinomas. *J Pathol* **202**, 321-329.
- Chong, L.X., Ash, M.R., Maher, M.J., Hinds, M.G., Xiao, Z., and Wedd, A.G.** (2009). Unprecedented binding cooperativity between Cu(I) and Cu(II) in the copper resistance protein CopK from *Cupriavidus metallidurans* CH34: implications from structural studies by NMR spectroscopy and X-ray crystallography. *J Am Chem Soc* **131**, 3549-3564.
- Christie, J.M., Arvai, A.S., Baxter, K.J., Heilmann, M., Pratt, A.J., O'Hara, A., Kelly, S.M., Hothorn, M., Smith, B.O., Hitomi, K., Jenkins, G.I., and Getzoff, E.D.** (2012). Plant UVR8 photoreceptor senses UV-B by tryptophan-mediated disruption of cross-dimer salt bridges. *Science* **335**, 1492-1496.
- Clemens, S.** (2006). Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of tolerance in plants. *Biochimie* **88**, 1707-1719.
- Clemens, S., Kim, E.J., Neumann, D., and Schroeder, J.I.** (1999). Tolerance to toxic metals by a gene family of phytochelatin synthases from plants and yeast. *EMBO J* **18**, 3325-3333.
- Clemens, S., Aarts, M.G., Thomine, S., and Verbruggen, N.** (2012). Plant science: the key to preventing slow cadmium poisoning. *Trends in Plant Science*, 92-99.
- Clemens, S., Antosiewicz, D.M., Ward, J.M., Schachtman, D.P., and Schroeder, J.I.** (1998). The plant cDNA LCT1 mediates the uptake of calcium and cadmium in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 12043-12048.
- Clough, S.J., and Bent, A.F.** (1998). Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **16**, 735-743.
- Cobbett, C., and Goldsbrough, P.** (2002). Phytochelatin and metallothioneins: roles in heavy metal detoxification and homeostasis. *Annu Rev Plant Biol* **53**, 159-182.
- Cobbett, C.S.** (2000). Phytochelatin and their roles in heavy metal detoxification. *Plant Physiol* **123**, 825-832.
- Cobbett, C.S., May, M.J., Howden, R., and Rolls, B.** (1998). The glutathione-deficient, cadmium-sensitive mutant, *cad2-1*, of *Arabidopsis thaliana* is deficient in gamma-glutamylcysteine synthetase. *Plant J* **16**, 73-78.
- Cohen, S.D., Pumford, N.R., Khairallah, E.A., Boekelheide, K., Pohl, L.R., Amouzadeh, H.R., and Hinson, J.A.** (1997). Selective protein covalent binding and target organ toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* **143**, 1-12.

- Connolly, E.L., Fett, J.P., and Guerinot, M.L.** (2002). Expression of the IRT1 metal transporter is controlled by metals at the levels of transcript and protein accumulation. *Plant Cell* **14**, 1347-1357.
- Cubadda, F., Aureli, F., Ciardullo, S., D'Amato, M., Raggi, A., Acharya, R., Reddy, R.A., and Prakash, N.T.** (2010). Changes in selenium speciation associated with increasing tissue concentrations of selenium in wheat grain. *J Agric Food Chem* **58**, 2295-2301.
- Curie, C., Alonso, J.M., Le Jean, M., Ecker, J.R., and Briat, J.F.** (2000). Involvement of NRAMP1 from *Arabidopsis thaliana* in iron transport. *Biochem J* **347 Pt 3**, 749-755.
- de Souza, M.P., Chu, D., Zhao, M., Zayed, A.M., Ruzin, S.E., Schichnes, D., and Terry, N.** (1999). Rhizosphere bacteria enhance selenium accumulation and volatilization by indian mustard. *Plant Physiol* **119**, 565-574.
- de Souza, M.P., Pilon-Smits, E.A., Lytle, C.M., Hwang, S., Tai, J., Honma, T.S., Yeh, L., and Terry, N.** (1998). Rate-limiting steps in selenium assimilation and volatilization by indian mustard. *Plant Physiol* **117**, 1487-1494.
- Desikan, R., S, A.H.-M., Hancock, J.T., and Neill, S.J.** (2001). Regulation of the *Arabidopsis* transcriptome by oxidative stress. *Plant physiology* **127**, 159-172.
- Dian, C., Vitale, S., Leonard, G.A., Bahlawane, C., Fauquant, C., Leduc, D., Muller, C., de Reuse, H., Michaud-Soret, I., and Terradot, L.** (2011). The structure of the *Helicobacter pylori* ferric uptake regulator Fur reveals three functional metal binding sites. *Mol Microbiol* **79**, 1260-1275.
- Ducruix, C., Junot, C., Fievet, J.B., Villiers, F., Ezan, E., and Bourguignon, J.** (2006). New insights into the regulation of phytochelatin biosynthesis in *A. thaliana* cells from metabolite profiling analyses. *Biochimie* **88**, 1733-1742.
- Ducruix, C., Vailhen, D., Werner, E., Fievet, J.B., Bourguignon, J., Tabet, J.C., Ezan, E., and Junot, C.** (2008). Metabolomic investigation of the response of the model plant *Arabidopsis thaliana* to cadmium exposure: Evaluation of data pretreatment methods for further statistical analyses. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* **91**, 67-77.
- Dupierris, V., Masselon, C., Court, M., Kieffer-Jaquinod, S., and Bruley, C.** (2009). A toolbox for validation of mass spectrometry peptides identification and generation of database: IRMa. *Bioinformatics* **25**, 1980-1981.
- Dutilleul, C., Jourdain, A., Bourguignon, J., and Hugouvieux, V.** (2008). The *Arabidopsis* putative selenium-binding protein family: expression study and characterization of SBP1 as a potential new player in cadmium detoxification processes. *Plant Physiol* **147**, 239-251.
- EFSA.** (2009). Scientific opinion of the panel on contaminants on the food chain on a request from the european comission on caadmium in food. *EFSA J.* **980**, 1-139.
- El Kassis, E., Cathala, N., Rouached, H., Fourcroy, P., Berthomieu, P., Terry, N., and Davidian, J.C.** (2007). Characterization of a selenate-resistant *Arabidopsis* mutant. Root growth as a potential target for selenate toxicity. *Plant Physiol* **143**, 1231-1241.
- Ellis, D.R., Sors, T.G., Brunk, D.G., Albrecht, C., Orser, C., Lahner, B., Wood, K.V., Harris, H.H., Pickering, I.J., and Salt, D.E.** (2004). Production of Se-methylselenocysteine in transgenic plants expressing selenocysteine methyltransferase. *BMC Plant Biol* **4**, 1.
- Elmore, J.M., Liu, J., Smith, B., Phinney, B., and Coaker, G.** (2012). Quantitative proteomics reveals dynamic changes in the plasma membrane during *Arabidopsis* immune signaling. *Mol Cell Proteomics* **11**, M111 014555.
- Eren, E., and Arguello, J.M.** (2004). *Arabidopsis* HMA2, a divalent heavy metal-transporting P(IB)-type ATPase, is involved in cytoplasmic Zn²⁺ homeostasis. *Plant Physiol* **136**, 3712-3723.
- Eren, E., Gonzalez-Guerrero, M., Kaufman, B.M., and Arguello, J.M.** (2007). Novel Zn²⁺ coordination by the regulatory N-terminus metal binding domain of *Arabidopsis thaliana* Zn(2+)-ATPase HMA2. *Biochemistry* **46**, 7754-7764.
- Everett, C.J., and Frithsen, I.L.** (2008). Association of urinary cadmium and myocardial infarction. *Environ Res* **106**, 284-286.

- Fagioni, M., and Zolla, L.** (2009). Does the Different Proteomic Profile Found in Apical and Basal Leaves of Spinach Reveal a Strategy of This Plant toward Cadmium Pollution Response? *Journal of Proteome Research* **8**, 2519-2529.
- Faller, P., Kienzler, K., and Krieger-Liszkay, A.** (2005). Mechanism of Cd²⁺ toxicity: Cd²⁺ inhibits photoactivation of Photosystem II by competitive binding to the essential Ca²⁺ site. *Biochim Biophys Acta* **1706**, 158-164.
- Fang, W., Goldberg, M.L., Pohl, N.M., Bi, X., Tong, C., Xiong, B., Koh, T.J., Diamond, A.M., and Yang, W.** (2010). Functional and physical interaction between the selenium-binding protein 1 (SBP1) and the glutathione peroxidase 1 selenoprotein. *Carcinogenesis* **31**, 1360-1366.
- Fauchon, M., Lagniel, G., Aude, J.C., Lombardia, L., Soularue, P., Petat, C., Marguerie, G., Sentenac, A., Werner, M., and Labarre, J.** (2002). Sulfur sparing in the yeast proteome in response to sulfur demand. *Mol Cell* **9**, 713-723.
- Feng, R.W., Wei, C.Y., and Tu, S.X.** (2013). The roles of selenium in protecting plants against abiotic stresses. *Environmental and Experimental Botany* **87**, 58-68.
- Flemetakis, E., Agalou, A., Kavroulakis, N., Dimou, M., Martsikovskaya, A., Slater, A., Spaink, H.P., Roussis, A., and Katinakis, P.** (2002). Lotus japonicus gene Ljsbp is highly conserved among plants and animals and encodes a homologue to the mammalian selenium-binding proteins. *Mol Plant Microbe Interact* **15**, 313-322.
- Fontana, A., de Laureto, P.P., Spolaore, B., Frare, E., Picotti, P., and Zamboni, M.** (2004). Probing protein structure by limited proteolysis. *Acta Biochim Pol* **51**, 299-321.
- Freeman, J.L., Zhang, L.H., Marcus, M.A., Fakra, S., McGrath, S.P., and Pilon-Smits, E.A.** (2006). Spatial imaging, speciation, and quantification of selenium in the hyperaccumulator plants *Astragalus bisulcatus* and *Stanleya pinnata*. *Plant Physiol* **142**, 124-134.
- Freisinger, E.** (2011). Structural features specific to plant metallothioneins. *J Biol Inorg Chem* **16**, 1035-1045.
- Fu, L.H., Wang, X.F., Eyal, Y., She, Y.M., Donald, L.J., Standing, K.G., and Ben-Hayyim, G.** (2002). A selenoprotein in the plant kingdom. Mass spectrometry confirms that an opal codon (UGA) encodes selenocysteine in *Chlamydomonas reinhardtii* glutathione peroxidase. *J. Biol. Chem.* **277**, 25983-25991.
- Galeas, M.L., Zhang, L.H., Freeman, J.L., Wegner, M., and Pilon-Smits, E.A.** (2007). Seasonal fluctuations of selenium and sulfur accumulation in selenium hyperaccumulators and related nonaccumulators. *New Phytologist* **173**, 517-525.
- Ganther, H.** (1968). Selenotrisulfides. Formation by the reaction of thiols with selenious acid. *Biochemistry* **7**, 2898-2905.
- Gardea-Torresdey, J.L., Peralta-Videa, J.R., de la Rosa, G., and Parsons, J.G.** (2005). Phytoremediation of heavy metals and study of the metal coordination by X-ray absorption spectroscopy. *Coordination Chemistry Reviews* **249**, 1797-1810.
- Gekeler, W., Grill, E., Winnacker, E.L., and Zenk, M.H.** (1989). Survey of the Plant Kingdom for the Ability to Bind Heavy-Metals through Phytochelatins. *Zeitschrift Fur Naturforschung C-a Journal of Biosciences* **44**, 361-369.
- Gianazza, E., Wait, R., Sozzi, A., Regondi, S., Saco, D., Labrac, M., and Agradi, E.** (2007). Growth and protein profile changes in *Lepidium sativum* L. plantlets exposed to cadmium. *Environmental and Experimental Botany* **59**, 179-187.
- Giometti, C.S., Liang, X., Tollaksen, S.L., Wall, D.B., Lubman, D.M., Subbarao, V., and Rao, M.S.** (2000). Mouse liver selenium-binding protein decreased in abundance by peroxisome proliferators. *Electrophoresis* **21**, 2162-2169.
- Giuliani, S.E., Frank, A.M., Corgliano, D.M., Seifert, C., Hauser, L., and Collart, F.R.** (2011). Environment sensing and response mediated by ABC transporters. *BMC Genomics* **12 Suppl 1**, S8.
- Glatt, S.J., Everall, I.P., Kremen, W.S., Corbeil, J., Sasik, R., Khanlou, N., Han, M., Liew, C.C., and Tsuang, M.T.** (2005). Comparative gene expression analysis of blood and brain provides

- concurrent validation of SELENBP1 up-regulation in schizophrenia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 15533-15538.
- Goldhaber, S.B.** (2003). Trace element risk assessment: essentiality vs. toxicity. *Regul Toxicol Pharmacol* **38**, 232-242.
- Good, M., and Vasak, M.** (1986). Iron(II)-substituted metallothionein: evidence for the existence of iron-thiolate clusters. *Biochemistry* **25**, 8353-8356.
- Grant, K., Carey, N.M., Mendoza, M., Schulze, J., Pilon, M., Pilon-Smits, E.A., and van Hoewyk, D.** (2011). Adenosine 5'-phosphosulfate reductase (APR2) mutation in *Arabidopsis* implicates glutathione deficiency in selenate toxicity. *Biochem J* **438**, 325-335.
- Gravot, A., Lieutaud, A., Verret, F., Auroy, P., Vavasseur, A., and Richaud, P.** (2004). AtHMA3, a plant P1B-ATPase, functions as a Cd/Pb transporter in yeast. *FEBS Lett* **561**, 22-28.
- Grotz, N., Fox, T., Connolly, E., Park, W., Guerinot, M.L., and Eide, D.** (1998). Identification of a family of zinc transporter genes from *Arabidopsis* that respond to zinc deficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 7220-7224.
- Guerinot, M.L.** (2000). The ZIP family of metal transporters. *Biochim Biophys Acta* **1465**, 190-198.
- Guo, W.J., Meetam, M., and Goldsbrough, P.B.** (2008). Examining the specific contributions of individual *Arabidopsis* metallothioneins to copper distribution and metal tolerance. *Plant Physiol* **146**, 1697-1706.
- Gutierrez-Marcos, J.F., Roberts, M.A., Campbell, E.I., and Wray, J.L.** (1996). Three members of a novel small gene-family from *Arabidopsis thaliana* able to complement functionally an *Escherichia coli* mutant defective in PAPS reductase activity encode proteins with a thioredoxin-like domain and "APS reductase" activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 13377-13382.
- Ha, S.B., Smith, A.P., Howden, R., Dietrich, W.M., Bugg, S., O'Connell, M.J., Goldsbrough, P.B., and Cobbett, C.S.** (1999). Phytochelatin synthase genes from *Arabidopsis* and the yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Plant Cell* **11**, 1153-1164.
- Hajdich, M., Rakwal, R., Agrawal, G.K., Yonekura, M., and Pretova, A.** (2001). High-resolution two-dimensional electrophoresis separation of proteins from metal-stressed rice (*Oryza sativa* L.) leaves: Drastic reductions/fragmentation of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase and induction of stress-related proteins. *Electrophoresis* **22**, 2824-2831.
- Hamilton, S.J.** (2004). Review of selenium toxicity in the aquatic food chain. *Sci Total Environ* **326**, 1-31.
- Hao, P., Ren, Y., Alpert, A.J., and Sze, S.K.** (2011). Detection, evaluation and minimization of nonenzymatic deamidation in proteomic sample preparation. *Mol Cell Proteomics* **10**, O111009381.
- Harada, E., Yamaguchi, Y., Koizumi, N., and Sano, H.** (2002). Cadmium stress induces production of thiol compounds and transcripts for enzymes involved in sulfur assimilation pathways in *Arabidopsis*. *Journal of Plant Physiology* **159**, 445-448.
- Hartikainen, H.** (2005). Biogeochemistry of selenium and its impact on food chain quality and human health. *J Trace Elem Med Biol* **18**, 309-318.
- Hartikainen, H., Xue, T.L., and Piironen, V.** (2000). Selenium as an anti-oxidant and pro-oxidant in ryegrass. *Plant and Soil* **225**, 193-200.
- Haydon, M.J., and Cobbett, C.S.** (2007). Transporters of ligands for essential metal ions in plants. *New Phytologist* **174**, 499-506.
- Hazemann, J.L., Proux, O., Nassif, V., Palancher, H., Lahera, E., Da Silva, C., Brillard, A., Testemale, D., Diot, M.A., Alliot, I., Del Net, W., Manceau, A., Gelebart, F., Morand, M., Dermigny, Q., and Shukla, A.** (2009). High-resolution spectroscopy on an X-ray absorption beamline. *Journal of Synchrotron Radiation* **16**, 283-292.
- Heiss, S., Schafer, H.J., Haag-Kerwer, A., and Rausch, T.** (1999). Cloning sulfur assimilation genes of *Brassica juncea* L.: cadmium differentially affects the expression of a putative low-affinity

- sulfate transporter and isoforms of ATP sulfurylase and APS reductase. *Plant Mol Biol* **39**, 847-857.
- Herbette, S., Taconnat, L., Hugouvieux, V., Piette, L., Magniette, M.L., Cuine, S., Auroy, P., Richaud, P., Forestier, C., Bourguignon, J., Renou, J.P., Vavasseur, A., and Leonhardt, N.** (2006). Genome-wide transcriptome profiling of the early cadmium response of *Arabidopsis* roots and shoots. *Biochimie* **88**, 1751-1765.
- Hopper, J.L., and Parker, D.R.** (1999). Plant availability of selenite and selenate as influenced by the competing ions phosphate and sulfate. *Plant and Soil* **210**, 199-207.
- Howden, R., Andersen, C.R., Goldsbrough, P.B., and Cobbett, C.S.** (1995a). A cadmium-sensitive, glutathione-deficient mutant of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* **107**, 1067-1073.
- Howden, R., Goldsbrough, P.B., Andersen, C.R., and Cobbett, C.S.** (1995b). Cadmium-sensitive, *cad1* mutants of *Arabidopsis thaliana* are phytochelatin deficient. *Plant Physiol* **107**, 1059-1066.
- Hradilova, J., Rehulka, P., Rehulkova, H., Vrbova, M., Griga, M., and Brzobohaty, B.** (2010). Comparative analysis of proteomic changes in contrasting flax cultivars upon cadmium exposure. *Electrophoresis* **31**, 421-431.
- Huang, C., Ding, G., Gu, C., Zhou, J., Kuang, M., Ji, Y., He, Y., Kondo, T., and Fan, J.** (2012). Decreased Selenium-Binding Protein 1 Enhances Glutathione Peroxidase 1 Activity and Downregulates HIF-1 α to Promote Hepatocellular Carcinoma Invasiveness. *Clin Cancer Res* **18**, 3042-3053.
- Hugouvieux, V., Dutilleul, C., Jourdain, A., Reynaud, F., Lopez, V., and Bourguignon, J.** (2009). *Arabidopsis* putative selenium-binding protein1 expression is tightly linked to cellular sulfur demand and can reduce sensitivity to stresses requiring glutathione for tolerance. *Plant Physiol* **151**, 768-781.
- Hussain, D., Haydon, M.J., Wang, Y., Wong, E., Sherson, S.M., Young, J., Camakaris, J., Harper, J.F., and Cobbett, C.S.** (2004). P-type ATPase heavy metal transporters with roles in essential zinc homeostasis in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **16**, 1327-1339.
- Ishiwatari, Y., Fujiwara, T., McFarland, K.C., Nemoto, K., Hayashi, H., Chino, M., and Lucas, W.J.** (1998). Rice phloem thioredoxin h has the capacity to mediate its own cell-to-cell transport through plasmodesmata. *Planta* **205**, 12-22.
- Ito, J., Batth, T.S., Petzold, C.J., Redding-Johanson, A.M., Mukhopadhyay, A., Verboom, R., Meyer, E.H., Millar, A.H., and Heazlewood, J.L.** (2011). Analysis of the *Arabidopsis* cytosolic proteome highlights subcellular partitioning of central plant metabolism. *J Proteome Res* **10**, 1571-1582.
- Janik, E., Maksymiec, W., Mazur, R., Garstka, M., and Gruszecki, W.I.** (2010). Structural and functional modifications of the major light-harvesting complex II in cadmium- or copper-treated *Secale cereale*. *Plant Cell Physiol* **51**, 1330-1340.
- Jarup, L., and Akesson, A.** (2009). Current status of cadmium as an environmental health problem. *Toxicol Appl Pharmacol* **238**, 201-208.
- Jarup, L., Alfven, T., Persson, B., Toss, G., and Elinder, C.G.** (1998). Cadmium may be a risk factor for osteoporosis. *Occup Environ Med* **55**, 435-439.
- Jeong, J.Y., Wang, Y., and Sytkowski, A.J.** (2009). Human selenium binding protein-1 (hSP56) interacts with VDU1 in a selenium-dependent manner. *Biochem Biophys Res Commun* **379**, 583-588.
- Jesu Jaya Sudan, R., and Sudandiradoss, C.** (2012). Pattern prediction and coordination geometry analysis from cadmium-binding proteins: a computational approach. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **68**, 1346-1358.
- Jozefczak, M., Remans, T., Vangronsveld, J., and Cuypers, A.** (2012). Glutathione is a key player in metal-induced oxidative stress defenses. *Int J Mol Sci* **13**, 3145-3175.
- Jung, H.J., and Seo, Y.R.** (2010). Current issues of selenium in cancer chemoprevention. *Biofactors* **36**, 153-158.
- Kanazawa, T., Glatt, S.J., Faraone, S.V., Hwu, H.G., Yoneda, H., and Tsuang, M.T.** (2009). Family-based association study of SELENBP1 in schizophrenia. *Schizophr Res* **113**, 268-272.

- Kanazawa, T., Chana, G., Glatt, S.J., Mizuno, H., Masliah, E., Yoneda, H., Tsuang, M.T., and Everall, I.P. (2008). The utility of SELENBP1 gene expression as a biomarker for major psychotic disorders: replication in schizophrenia and extension to bipolar disorder with psychosis. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* **147B**, 686-689.
- Kato, M.A., Finley, D.J., Lubitz, C.C., Zhu, B., Moo, T.A., Loeven, M.R., Ricci, J.A., Zarnegar, R., Katdare, M., and Fahey, T.J., 3rd. (2010). Selenium decreases thyroid cancer cell growth by increasing expression of GADD153 and GADD34. *Nutr Cancer* **62**, 66-73.
- Kawashima, D., Matthewman, C., Huang, S., Lee, B., Yoshimoto, N., Koprivova, A., Rubio-Somoza, I., Todesco, M., Rathjen, T., Saito, K., Takahashi, H., Dalmay, T., and Kopriva, S. (2011). Interplay of SLIM1 and miR395 in the regulation of sulfate assimilation in Arabidopsis. *Plant J* **66**, 863-876.
- Kieffer, P., Planchon, S., Oufir, M., Ziebel, J., Dommes, J., Hoffmann, L., Hausman, J.F., and Renaut, J. (2009). Combining Proteomics and Metabolite Analyses To Unravel Cadmium Stress-Response in Poplar Leaves. *Journal of Proteome Research* **8**, 400-417.
- Kim, H., Kang, H.J., You, K.T., Kim, S.H., Lee, K.Y., Kim, T.I., Kim, C., Song, S.Y., Kim, H.J., and Lee, C. (2006). Suppression of human selenium-binding protein 1 is a late event in colorectal carcinogenesis and is associated with poor survival. *Proteomics* **6**, 3466-3476.
- Klapheck, S., Chrost, B., Starke, J., and Zimmermann, H. (1992). Gamma-Glutamylcysteinylserine - a New Homolog of Glutathione in Plants of the Family Poaceae. *Botanica Acta* **105**, 174-179.
- Kojima, Y. (1991). *Methods in Enzymology : Metallobiochemistry. Part B Metallothionein and related molecules.* ed J. F. Riordan and B. L. Vallée, Academic Press, Inc, San Diego **205**, 8-10.
- Kondo, N., Imai, K., Isobe, M., Goto, T., Murasugi, A., Wadanakagawa, C., and Hayashi, Y. (1984). Cadystin-a and Cadystin-B, Major Unit Peptides Comprising Cadmium Binding Peptides Induced in a Fission Yeast - Separation, Revision of Structures and Synthesis. *Tetrahedron Letters* **25**, 3869-3872.
- Koren'kov, V., Park, S., Cheng, N.H., Sreevidya, C., Lachmansingh, J., Morris, J., Hirschi, K., and Wagner, G.J. (2007). Enhanced Cd²⁺ -selective root-tonoplast-transport in tobaccos expressing Arabidopsis cation exchangers. *Planta* **225**, 403-411.
- Korenkov, V., Hirschi, K., Crutchfield, J.D., and Wagner, G.J. (2007). Enhancing tonoplast Cd/H antiport activity increases Cd, Zn, and Mn tolerance, and impacts root/shoot Cd partitioning in *Nicotiana tabacum* L. *Planta* **226**, 1379-1387.
- Kramer, U., Talke, I.N., and Hanikenne, M. (2007). Transition metal transport. *FEBS Lett* **581**, 2263-2272.
- Kuge, M., Fujii, Y., Shimizu, T., Hirose, F., Matsukage, A., and Hakoshima, T. (1997). Use of a fusion protein to obtain crystals suitable for X-ray analysis: crystallization of a GST-fused protein containing the DNA-binding domain of DNA replication-related element-binding factor, DREF. *Protein Sci* **6**, 1783-1786.
- Kupper, H., Parameswaran, A., Leitenmaier, B., Trtilek, M., and Setlik, I. (2007). Cadmium-induced inhibition of photosynthesis and long-term acclimation to cadmium stress in the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *New Phytologist* **175**, 655-674.
- Lacourciere, G.M., Levine, R.L., and Stadtman, T.C. (2002). Direct detection of potential selenium delivery proteins by using an *Escherichia coli* strain unable to incorporate selenium from selenite into proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 9150-9153.
- Lane, B., Kajioka, R., and Kennedy, T. (1987). The Wheat-Germ-Ec Protein Is a Zinc-Containing Metallothionein. *Biochemistry and Cell Biology-Biochimie Et Biologie Cellulaire* **65**, 1001-1005.
- Lane, T.W., Saito, M.A., George, G.N., Pickering, I.J., Prince, R.C., and Morel, F.M. (2005). Biochemistry: a cadmium enzyme from a marine diatom. *Nature* **435**, 42.
- Lanfear, J., Fleming, J., Walker, M., and Harrison, P. (1993). Different patterns of regulation of the genes encoding the closely related 56 kDa selenium- and acetaminophen-binding proteins in normal tissues and during carcinogenesis. *Carcinogenesis* **14**, 335-340.

- Lanquar, V., Lelievre, F., Bolte, S., Hames, C., Alcon, C., Neumann, D., Vansuyt, G., Curie, C., Schroder, A., Kramer, U., Barbier-Brygoo, H., and Thomine, S.** (2005). Mobilization of vacuolar iron by AtNRAMP3 and AtNRAMP4 is essential for seed germination on low iron. *EMBO J* **24**, 4041-4051.
- Lauchli, A.** (1993). Selenium in Plants - Uptake, Functions, and Environmental Toxicity. *Botanica Acta* **106**, 455-468.
- Lavy, M., Bracha-Drori, K., Sternberg, H., and Yalovsky, S.** (2002). A cell-specific, prenylation-independent mechanism regulates targeting of type II RACs. *Plant Cell* **14**, 2431-2450.
- Leduc, D.L., AbdelSamie, M., Montes-Bayon, M., Wu, C.P., Reisinger, S.J., and Terry, N.** (2006). Overexpressing both ATP sulfurylase and selenocysteine methyltransferase enhances selenium phytoremediation traits in Indian mustard. *Environmental Pollution* **144**, 70-76.
- LeDuc, D.L., Tarun, A.S., Montes-Bayon, M., Meija, J., Malit, M.F., Wu, C.P., AbdelSamie, M., Chiang, C.Y., Tagmount, A., deSouza, M., Neuhierl, B., Bock, A., Caruso, J., and Terry, N.** (2004). Overexpression of selenocysteine methyltransferase in Arabidopsis and Indian mustard increases selenium tolerance and accumulation. *Plant Physiol* **135**, 377-383.
- Lee, K., Bae, D.W., Kim, S.H., Han, H.J., Liu, X., Park, H.C., Lim, C.O., Lee, S.Y., and Chung, W.S.** (2010). Comparative proteomic analysis of the short-term responses of rice roots and leaves to cadmium. *Journal of Plant Physiology* **167**, 161-168.
- Lee, S., and Kang, B.S.** (2005). Expression of Arabidopsis phytochelatin synthase 2 is too low to complement an AtPCS1-defective Cad1-3 mutant. *Mol Cells* **19**, 81-87.
- Lemly, A.D.** (2004). Aquatic selenium pollution is a global environmental safety issue. *Ecotoxicol Environ Saf* **59**, 44-56.
- Lemly, A.D., and Ohlendorf, H.M.** (2002). Regulatory implications of using constructed wetlands to treat selenium-laden wastewater. *Ecotoxicol Environ Saf* **52**, 46-56.
- Li, H.F., McGrath, S.P., and Zhao, F.J.** (2008). Selenium uptake, translocation and speciation in wheat supplied with selenate or selenite. *New Phytologist* **178**, 92-102.
- Li, N., Gao, Z., Luo, D., Tang, X., Chen, D., and Hu, Y.** (2007). Selenium level in the environment and the population of Zhoukoudian area, Beijing, China. *Sci Total Environ* **381**, 105-111.
- Lin, Y.F., and Aarts, M.G.** (2012). The molecular mechanism of zinc and cadmium stress response in plants. *Cell Mol Life Sci* **69**, 3187-3206.
- Liu, J., Liu, Y., Habeebu, S.S., and Klaassen, C.D.** (1998). Susceptibility of MT-null mice to chronic CdCl₂-induced nephrotoxicity indicates that renal injury is not mediated by the CdMT complex. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* **46**, 197-203.
- Lombi, E., and Susini, J.** (2009). Synchrotron-based techniques for plant and soil science: opportunities, challenges and future perspectives. *Plant and Soil* **320**, 1-35.
- Low, S.C., and Berry, M.J.** (1996). Knowing when not to stop: Selenocysteine incorporation in eukaryotes. *Trends Biochem Sci* **21**, 203-208.
- Luthra, M.G., Ajani, J.A., Izzo, J., Ensor, J., Wu, T.T., Rashid, A., Zhang, L., Phan, A., Fukami, N., and Luthra, R.** (2007). Decreased expression of gene cluster at chromosome 1q21 defines molecular subgroups of chemoradiotherapy response in esophageal cancers. *Clin Cancer Res* **13**, 912-919.
- Maru, D.M., Luthra, R., Correa, A.M., White-Cross, J., Anandasabapathy, S., Krishnan, S., Guha, S., Komaki, R., Swisher, S.G., Ajani, J.A., Hofstetter, W.L., and Rashid, A.** (2009). Frequent loss of heterozygosity of chromosome 1q in esophageal adenocarcinoma: loss of chromosome 1q21.3 is associated with shorter overall survival. *Cancer* **115**, 1576-1585.
- Maruyama-Nakashita, A., Nakamura, Y., Tohge, T., Saito, K., and Takahashi, H.** (2006). Arabidopsis SLIM1 is a central transcriptional regulator of plant sulfur response and metabolism. *Plant Cell* **18**, 3235-3251.
- Maruyama-Nakashita, A., Nakamura, Y., Watanabe-Takahashi, A., Inoue, E., Yamaya, T., and Takahashi, H.** (2005). Identification of a novel cis-acting element conferring sulfur deficiency response in Arabidopsis roots. *Plant J* **42**, 305-314.

- Mattow, J., Demuth, I., Haeselbarth, G., Jungblut, P.R., and Klose, J.** (2006). Selenium-binding protein 2, the major hepatic target for acetaminophen, shows sex differences in protein abundance. *Electrophoresis* **27**, 1683-1691.
- Mendoza-Cozatl, D.G., Butko, E., Springer, F., Torpey, J.W., Komives, E.A., Kehr, J., and Schroeder, J.I.** (2008). Identification of high levels of phytochelatins, glutathione and cadmium in the phloem sap of *Brassica napus*. A role for thiol-peptides in the long-distance transport of cadmium and the effect of cadmium on iron translocation. *Plant J* **54**, 249-259.
- Meuwly, P., Thibault, P., and Rauser, W.E.** (1993). gamma-Glutamylcysteinylglutamic acid--a new homologue of glutathione in maize seedlings exposed to cadmium. *FEBS Lett* **336**, 472-476.
- Meyer, A., and Verbruggen, N.** (2012). The use of the model species *Arabidopsis hallieri* towards phytoextraction of cadmium polluted soils. *New Biotechnology* **30**, 9-14.
- Mills, R.F., Krijger, G.C., Baccarini, P.J., Hall, J.L., and Williams, L.E.** (2003). Functional expression of AtHMA4, a P1B-type ATPase of the Zn/Co/Cd/Pb subclass. *Plant J* **35**, 164-176.
- Missana, T., Alonso, U., and Garcia-Gutierrez, M.** (2009). Experimental study and modelling of selenite sorption onto illite and smectite clays. *J Colloid Interface Sci* **334**, 132-138.
- Miyadate, H., Adachi, S., Hiraizumi, A., Tezuka, K., Nakazawa, N., Kawamoto, T., Katou, K., Kodama, I., Sakurai, K., Takahashi, H., Satoh-Nagasawa, N., Watanabe, A., Fujimura, T., and Akagi, H.** (2011). OsHMA3, a P1B-type of ATPase affects root-to-shoot cadmium translocation in rice by mediating efflux into vacuoles. *New Phytologist* **189**, 190-199.
- Molins, H., Michelet, L., Lanquar, V., Agorio, A., Giraudat, J., Roach, T., Krieger-Liszkay, A., and Thomine, S.** (2013). Mutants impaired in vacuolar metal mobilization identify chloroplasts as a target for cadmium hypersensitivity in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Environ* **36**, 804-817.
- Morel, M., Crouzet, J., Gravot, A., Auroy, P., Leonhardt, N., Vavasseur, A., and Richaud, P.** (2009). AtHMA3, a P1B-ATPase allowing Cd/Zn/Co/Pb vacuolar storage in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **149**, 894-904.
- Moulis, J.M.** (2010). Cellular mechanisms of cadmium toxicity related to the homeostasis of essential metals. *Biometals* **23**, 877-896.
- Navarro-Alarcon, M., and Cabrera-Vique, C.** (2008). Selenium in food and the human body: a review. *Sci Total Environ* **400**, 115-141.
- Neuhierl, B., and Bock, A.** (1996). On the mechanism of selenium tolerance in selenium-accumulating plants - Purification and characterization of a specific selenocysteine methyltransferase from cultured cells of *Astragalus bisculatus*. *European Journal of Biochemistry* **239**, 235-238.
- Neuhierl, B., Thanbichler, M., Lottspeich, F., and Bock, A.** (1999). A family of S-methylmethionine-dependent thiol/selenol methyltransferases - Role in selenium tolerance and evolutionary relation. *J Biol Chem* **274**, 5407-5414.
- Ng, B.H., and Anderson, J.W.** (1978). Synthesis of Selenocysteine by Cysteine Synthases from Selenium Accumulator and Non-Accumulator Plants. *Phytochemistry* **17**, 2069-2074.
- Nielson, K.B., Atkin, C.L., and Winge, D.R.** (1985). Distinct metal-binding configurations in metallothionein. *J Biol Chem* **260**, 5342-5350.
- Niesen, F.H., Berglund, H., and Vedadi, M.** (2007). The use of differential scanning fluorimetry to detect ligand interactions that promote protein stability. *Nat Protoc* **2**, 2212-2221.
- Noctor, G., Mhamdi, A., Chaouch, S., Han, Y., Neukermans, J., Marquez-Garcia, B., Queval, G., and Foyer, C.H.** (2012). Glutathione in plants: an integrated overview. *Plant Cell Environ* **35**, 454-484.
- Novoselov, S.V., Rao, M., Onoshko, N.V., Zhi, H.J., Kryukov, G.V., Xiang, Y.B., Weeks, D.P., Hatfield, D.L., and Gladyshev, V.N.** (2002). Selenoproteins and selenocysteine insertion system in the model plant cell system, *Chlamydomonas reinhardtii*. *EMBO J* **21**, 3681-3693.
- Ogawa, S., Yoshidomi, T., and Yoshimura, E.** (2011). Cadmium(II)-stimulated enzyme activation of *Arabidopsis thaliana* phytochelatin synthase 1. *J Inorg Biochem* **105**, 111-117.
- Ohlendorf, H.M.** (1989). Bioaccumulation and effects of Selenium in wildlife.

- Ohno, M., Uraji, M., Shimoishi, Y., Mori, I.C., Nakamura, Y., and Murata, Y.** (2012). Mechanisms of the selenium tolerance of the *Arabidopsis thaliana* knockout mutant of sulfate transporter SULTR1;2. *Biosci Biotechnol Biochem* **76**, 993-998.
- Oomen, R.J., Wu, J., Lelievre, F., Blanchet, S., Richaud, P., Barbier-Brygoo, H., Aarts, M.G., and Thomine, S.** (2009). Functional characterization of NRAMP3 and NRAMP4 from the metal hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *New Phytologist* **181**, 637-650.
- Pal, R., and Rai, J.P.** (2010). Phytochelatins: peptides involved in heavy metal detoxification. *Appl Biochem Biotechnol* **160**, 945-963.
- Palencia, A., Cobos, E.S., Mateo, P.L., Martinez, J.C., and Luque, I.** (2004). Thermodynamic dissection of the binding energetics of proline-rich peptides to the Abl-SH3 domain: implications for rational ligand design. *J Mol Biol* **336**, 527-537.
- Palencia, A., Camara-Artigas, A., Pisabarro, M.T., Martinez, J.C., and Luque, I.** (2010). Role of interfacial water molecules in proline-rich ligand recognition by the Src homology 3 domain of Abl. *J Biol Chem* **285**, 2823-2833.
- Park, J., Song, W.Y., Ko, D., Eom, Y., Hansen, T.H., Schiller, M., Lee, T.G., Martinoia, E., and Lee, Y.** (2012). The phytochelatin transporters AtABCC1 and AtABCC2 mediate tolerance to cadmium and mercury. *Plant J* **69**, 278-288.
- Perfus-Barbeoch, L., Leonhardt, N., Vavasseur, A., and Forestier, C.** (2002). Heavy metal toxicity: cadmium permeates through calcium channels and disturbs the plant water status. *Plant J.* **32**, 539-548.
- Persans, M.W., and Salt, D.E.** (2000). Possible molecular mechanisms involved in nickel, zinc and selenium hyperaccumulation in plants. *Biotechnology & Genetic Engineering Reviews*, Vol 17 **17**, 389-413.
- Pickles, L.M., Roe, S.M., Hemingway, E.J., Stifani, S., and Pearl, L.H.** (2002). Crystal structure of the C-terminal WD40 repeat domain of the human Groucho/TLE1 transcriptional corepressor. *Structure* **10**, 751-761.
- Pilon-Smits, E.A., Quinn, C.F., Tapken, W., Malagoli, M., and Schiavon, M.** (2009). Physiological functions of beneficial elements. *Current Opinion in Plant Biology* **12**, 267-274.
- Pilon-Smits, E.A., Hwang, S., Mel Lytle, C., Zhu, Y., Tai, J.C., Bravo, R.C., Chen, Y., Leustek, T., and Terry, N.** (1999). Overexpression of ATP sulfurylase in indian mustard leads to increased selenate uptake, reduction, and tolerance. *Plant Physiol* **119**, 123-132.
- Pohl, N.M., Tong, C., Fang, W., Bi, X., Li, T., and Yang, W.** (2009). Transcriptional regulation and biological functions of selenium-binding protein 1 in colorectal cancer in vitro and in nude mouse xenografts. *PLoS One* **4**, e7774.
- Pons, T., Gomez, R., Chinea, G., and Valencia, A.** (2003). Beta-propellers: associated functions and their role in human diseases. *Curr Med Chem* **10**, 505-524.
- Porat, A., Sagiv, Y., and Elazar, Z.** (2000). A 56-kDa selenium-binding protein participates in intra-Golgi protein transport. *J Biol Chem* **275**, 14457-14465.
- Proux, O., Nassif, V., Prat, A., Ulrich, O., Lahera, E., Biquard, X., Menthonnex, J.J., and Hazemann, J.L.** (2006). Feedback system of a liquid-nitrogen-cooled double-crystal monochromator: design and performances. *Journal of Synchrotron Radiation* **13**, 59-68.
- Proux, O., Biquard, X., Lahera, E., Menthonnex, J.J., Prat, A., Ulrich, O., Soldo, Y., Trevisson, P., Kapoujyan, G., Perroux, G., Taunier, P., Grand, D., Jeantet, P., Deleglise, M., Roux, J.P., and Hazemann, J.L.** (2005). FAME: A new beamline for X-ray absorption investigations of very-diluted systems of environmental, material and biological interests. *Physica Scripta* **T115**, 970-973.
- Quinn, C.F., Galeas, M.L., Freeman, J.L., and Pilon-Smits, E.A.** (2007). Selenium: deterrence, toxicity, and adaptation. *Integr Environ Assess Manag* **3**, 460-462.
- Ramos, J., Clemente, M.R., Naya, L., Loscos, J., Perez-Rontome, C., Sato, S., Tabata, S., and Becana, M.** (2007). Phytochelatin synthases of the model legume *Lotus japonicus*. A small multigene family with differential response to cadmium and alternatively spliced variants. *Plant Physiol* **143**, 1110-1118.

- Rauci, R., Colonna, G., Guerriero, E., Capone, F., Accardo, M., Castello, G., and Costantini, S.** (2011). Structural and functional studies of the human selenium binding protein-1 and its involvement in hepatocellular carcinoma. *Biochim Biophys Acta* **1814**, 513-522.
- Rauser, W.E.** (1995). Phytochelatins and related peptides. Structure, biosynthesis, and function. *Plant Physiol* **109**, 1141-1149.
- Ravel, B., and Newville, M.** (2005). ATHENA, ARTEMIS, HEPHAESTUS: data analysis for X-ray absorption spectroscopy using IFEFFIT. *Journal of Synchrotron Radiation* **12**, 537-541.
- Robbins, A.H., McRee, D.E., Williamson, M., Collett, S.A., Xuong, N.H., Furey, W.F., Wang, B.C., and Stout, C.D.** (1991). Refined crystal structure of Cd, Zn metallothionein at 2.0 Å resolution. *J Mol Biol* **221**, 1269-1293.
- Rodriguez-Celma, J., Rellan-Alvarez, R., Abadia, A., Abadia, J., and Lopez-Millan, A.F.** (2010). Changes induced by two levels of cadmium toxicity in the 2-DE protein profile of tomato roots. *J Proteomics* **73**, 1694-1706.
- Rotruck, J.T., Pope, A.L., Ganther, H.E., Swanson, A.B., Hafeman, D.G., and Hoekstra, W.G.** (1973). Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase. *Science* **179**, 588-590.
- Rulisek, L., and Vondrasek, J.** (1998). Coordination geometries of selected transition metal ions (Co²⁺, Ni²⁺, Cu²⁺, Zn²⁺, Cd²⁺, and Hg²⁺) in metalloproteins. *J Inorg Biochem* **71**, 115-127.
- Sabbagh, M., and Van Hoewyk, D.** (2012). Malformed Selenoproteins Are Removed by the Ubiquitin-Proteasome Pathway in *Stanleya pinnata*. *Plant and Cell Physiology* **53**, 555-564.
- Salt, D.E., Prince, R.C., and Pickering, I.J.** (2002). Chemical speciation of accumulated metals in plants: evidence from X-ray absorption spectroscopy. *Microchemical Journal* **71**, 255-259.
- Sarret, G., Smits, E.A.H.P., Michel, H.C., Isaure, M.P., Zhao, F.J., and Tappero, R.** (2013). Use of Synchrotron-Based Techniques to Elucidate Metal Uptake and Metabolism in Plants. *Advances in Agronomy* **119**, 1-82.
- Sarret, G., Avoscan, L., Carriere, M., Collins, R., Geoffroy, N., Carrot, F., Coves, J., and Gouget, B.** (2005). Chemical forms of selenium in the metal-resistant bacterium *Ralstonia metallidurans* CH34 exposed to selenite and selenate. *Appl Environ Microbiol* **71**, 2331-2337.
- Sarry, J.E., Kuhn, L., Ducruix, C., Lafaye, A., Junot, C., Hugouvieux, V., Jourdain, A., Bastien, O., Fievet, J.B., Vailhen, D., Amekraz, B., Moulin, C., Ezan, E., Garin, J., and Bourguignon, J.** (2006). The early responses of *Arabidopsis thaliana* cells to cadmium exposure explored by protein and metabolite profiling analyses. *Proteomics* **6**, 2180-2198.
- Sasaki, A., Yamaji, N., Yokosho, K., and Ma, J.F.** (2012). Nramp5 is a major transporter responsible for manganese and cadmium uptake in rice. *Plant Cell* **24**, 2155-2167.
- Satofuka, H., Fukui, T., Takagi, M., Atomi, H., and Imanaka, T.** (2001). Metal-binding properties of phytochelatin-related peptides. *J Inorg Biochem* **86**, 595-602.
- Sawada, K., and Iwata, M.** (2002). Isolation of blast fungal cerebroside-responsive genes in rice plants. *J. Gen. Plant Pathol* **68**, 128-133.
- Sawada, K., Tokuda, L., and Shinmyo, A.** (2003). Characterization of the Rice Blast Fungal Elicitor-Responsive Gene OsSBP Encoding a Homolog to the Mammalian Selenium-binding Proteins. *Plant Biotechnology* **20**, 177-181.
- Sawada, K., Hasegawa, M., Tokuda, L., Kameyama, J., Kodama, O., Kohchi, T., Yoshida, K., and Shinmyo, A.** (2004). Enhanced resistance to blast fungus and bacterial blight in transgenic rice constitutively expressing OsSBP, a rice homologue of mammalian selenium-binding proteins. *Biosci Biotechnol Biochem* **68**, 873-880.
- Scharff, E.I., Lucke, C., Fritzsche, G., Koepke, J., Hartleib, J., Dierl, S., and Ruterjans, H.** (2001). Crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of DFPase from *Loligo vulgaris*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **57**, 148-149.
- Schenk, P.M., Kazan, K., Wilson, I., Anderson, J.P., Richmond, T., Somerville, S.C., and Manners, J.M.** (2000). Coordinated plant defense responses in *Arabidopsis* revealed by microarray analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 11655-11660.

- Scortegagna, M., Martin, R.J., Kladney, R.D., Neumann, R.G., and Arbeit, J.M.** (2009). Hypoxia-inducible factor-1 α suppresses squamous carcinogenic progression and epithelial-mesenchymal transition. *Cancer Res* **69**, 2638-2646.
- Semane, B., Dupae, J., Cuypers, A., Noben, J.P., Tuomainen, M., Tervahauta, A., Karenlampi, S., Van Belleghem, F., Smeets, K., and Vangronsveld, J.** (2010). Leaf proteome responses of *Arabidopsis thaliana* exposed to mild cadmium stress. *Journal of Plant Physiology* **167**, 247-254.
- Shibagaki, N., Rose, A., McDermott, J.P., Fujiwara, T., Hayashi, H., Yoneyama, T., and Davies, J.P.** (2002). Selenate-resistant mutants of *Arabidopsis thaliana* identify Sultr1;2, a sulfate transporter required for efficient transport of sulfate into roots. *Plant J* **29**, 475-486.
- Silvers, A.L., Lin, L., Bass, A.J., Chen, G., Wang, Z., Thomas, D.G., Lin, J., Giordano, T.J., Orringer, M.B., Beer, D.G., and Chang, A.C.** (2010). Decreased selenium-binding protein 1 in esophageal adenocarcinoma results from posttranscriptional and epigenetic regulation and affects chemosensitivity. *Clin Cancer Res* **16**, 2009-2021.
- Sinclair, S.A., Sherson, S.M., Jarvis, R., Camakaris, J., and Cobbett, C.S.** (2007). The use of the zinc-fluorophore, Zinpyr-1, in the study of zinc homeostasis in *Arabidopsis* roots. *New Phytologist* **174**, 39-45.
- Smalle, J., and Vierstra, R.D.** (2004). The ubiquitin 26S proteasome proteolytic pathway. *Annual review of plant biology* **55**, 555-590.
- Smyth, D.R., Mrozkiwicz, M.K., McGrath, W.J., Listwan, P., and Kobe, B.** (2003). Crystal structures of fusion proteins with large-affinity tags. *Protein Sci* **12**, 1313-1322.
- Sobkowiak, R., and Deckert, J.** (2006). Proteins induced by cadmium in soybean cells. *Journal of Plant Physiology* **163**, 1203-1206.
- Solti, A., Gaspar, L., Meszaros, I., Szigeti, Z., Levai, L., and Sarvari, E.** (2008). Impact of iron supply on the kinetics of recovery of photosynthesis in Cd-stressed poplar (*Populus glauca*). *Ann Bot* **102**, 771-782.
- Song, W.Y., Martinoia, E., Lee, J., Kim, D., Kim, D.Y., Vogt, E., Shim, D., Choi, K.S., Hwang, I., and Lee, Y.** (2004). A novel family of cys-rich membrane proteins mediates cadmium resistance in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **135**, 1027-1039.
- Sors, T.G., Ellis, D.R., and Salt, D.E.** (2005). Selenium uptake, translocation, assimilation and metabolic fate in plants. *Photosynthesis Research* **86**, 373-389.
- Sors, T.G., Martin, C.P., and Salt, D.E.** (2009). Characterization of selenocysteine methyltransferases from *Astragalus* species with contrasting selenium accumulation capacity. *Plant J* **59**, 110-122.
- Spallholz, J.E.** (1994). On the nature of selenium toxicity and carcinostatic activity. *Free radical biology & medicine* **17**, 45-64.
- Stadtman, T.C.** (1990). Selenium Biochemistry. *Annual Review of Biochemistry* **59**, 111-127.
- Stadtman, T.C.** (1996). Selenocysteine. *Annual Review of Biochemistry* **65**, 83-100.
- Stammer, K., Edassery, S.L., Barua, A., Bitterman, P., Bahr, J.M., Hales, D.B., and Luborsky, J.L.** (2008). Selenium-Binding Protein 1 expression in ovaries and ovarian tumors in the laying hen, a spontaneous model of human ovarian cancer. *Gynecol Oncol* **109**, 115-121.
- Sutherland, D.E., and Stillman, M.J.** (2011). The "magic numbers" of metallothionein. *Metallomics* **3**, 444-463.
- Suzuki, N., Yamaguchi, Y., Koizumi, N., and Sano, H.** (2002). Functional characterization of a heavy metal binding protein Cdl19 from *Arabidopsis*. *Plant J* **32**, 165-173.
- Tainer, J.A., Roberts, V.A., and Getzoff, E.D.** (1991). Metal-binding sites in proteins. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2**, 582-591.
- Tainer, J.A., Roberts, V.A., and Getzoff, E.D.** (1992). Protein metal-binding sites. *Curr. Opin. Biotechnol.* **3**, 378-387.
- Takahashi, R., Ishimaru, Y., Nakanishi, H., and Nishizawa, N.K.** (2011a). Role of the iron transporter OsNRAMP1 in cadmium uptake and accumulation in rice. *Plant Signal Behav* **6**, 1813-1816.

- Takahashi, R., Ishimaru, Y., Senoura, T., Shimo, H., Ishikawa, S., Arao, T., Nakanishi, H., and Nishizawa, N.K. (2011b). The OsNRAMP1 iron transporter is involved in Cd accumulation in rice. *J Exp Bot* **62**, 4843-4850.
- Tamaoki, M., Freeman, J.L., and Pilon-Smits, E.A. (2008). Cooperative ethylene and jasmonic acid signaling regulates selenite resistance in Arabidopsis. *Plant Physiol* **146**, 1219-1230.
- Terry, N., Zayed, A.M., De Souza, M.P., and Tarun, A.S. (2000). Selenium in Higher Plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **51**, 401-432.
- Thomine, S., Wang, R., Ward, J.M., Crawford, N.M., and Schroeder, J.I. (2000). Cadmium and iron transport by members of a plant metal transporter family in Arabidopsis with homology to Nramp genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 4991-4996.
- Thomine, S., Lelievre, F., Debarbieux, E., Schroeder, J.I., and Barbier-Brygoo, H. (2003). AtNRAMP3, a multispecific vacuolar metal transporter involved in plant responses to iron deficiency. *Plant J* **34**, 685-695.
- Trepreau, J., de Rosny, E., Duboc, C., Sarret, G., Petit-Hartlein, I., Maillard, A.P., Imberty, A., Proux, O., and Coves, J. (2011). Spectroscopic characterization of the metal-binding sites in the periplasmic metal-sensor domain of CnrX from *Cupriavidus metallidurans* CH34. *Biochemistry* **50**, 9036-9045.
- Tuomainen, M.H., Nunan, N., Lehesranta, S.J., Tervahauta, A.I., Hassinen, V.H., Schat, H., Koistinen, K.M., Auriola, S., McNicol, J., and Karenlampi, S.O. (2006). Multivariate analysis of protein profiles of metal hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* accessions. *Proteomics* **6**, 3696-3706.
- Ueno, D., Koyama, E., Kono, I., Ando, T., Yano, M., and Ma, J.F. (2009). Identification of a novel major quantitative trait locus controlling distribution of Cd between roots and shoots in rice. *Plant Cell Physiol* **50**, 2223-2233.
- Ueno, D., Yamaji, N., Kono, I., Huang, C.F., Ando, T., Yano, M., and Ma, J.F. (2010). Gene limiting cadmium accumulation in rice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 16500-16505.
- Vaddadi, K.S., Soosai, E., and Vaddadi, G. (2003). Low blood selenium concentrations in schizophrenic patients on clozapine. *Br J Clin Pharmacol* **55**, 307-309.
- Van Hoewyk, D. (2013). A tale of two toxicities: malformed selenoproteins and oxidative stress both contribute to selenium stress in plants. *Ann Bot* **112**, 965-972.
- Van Hoewyk, D., Abdel-Ghany, S.E., Cohu, C.M., Herbert, S.K., Kugrens, P., Pilon, M., and Pilon-Smits, E.A.H. (2007). Chloroplast iron-sulfur cluster protein maturation requires the essential cysteine desulfurase CpnifS. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 5686-5691.
- Van Huysen, T., Terry, N., and Pilon-Smits, E.A. (2004). Exploring the selenium phytoremediation potential of transgenic Indian mustard overexpressing ATP sulfurylase or cystathionine-gamma-synthase. *Int J Phytoremediation* **6**, 111-118.
- Van Huysen, T., Abdel-Ghany, S., Hale, K.L., LeDuc, D., Terry, N., and Pilon-Smits, E.A. (2003). Overexpression of cystathionine-gamma-synthase enhances selenium volatilization in *Brassica juncea*. *Planta* **218**, 71-78.
- Vasak, M., Galdes, A., Hill, H.A., Kagi, J.H., Bremner, I., and Young, B.W. (1980). Investigation of the structure of metallothioneins by proton nuclear magnetic resonance spectroscopy. *BIOCHEMISTRY* **19**, 416-425.
- Vatamaniuk, O.K., Mari, S., Lu, Y.P., and Rea, P.A. (1999). AtPCS1, a phytochelatin synthase from Arabidopsis: isolation and in vitro reconstitution. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 7110-7115.
- Vatamaniuk, O.K., Mari, S., Lu, Y.P., and Rea, P.A. (2000). Mechanism of heavy metal ion activation of phytochelatin (PC) synthase: blocked thiols are sufficient for PC synthase-catalyzed transpeptidation of glutathione and related thiol peptides. *J Biol Chem* **275**, 31451-31459.
- Vauclare, P., Kopriva, S., Fell, D., Suter, M., Sticher, L., von Ballmoos, P., Krahenbuhl, U., den Camp, R.O., and Brunold, C. (2002). Flux control of sulphate assimilation in Arabidopsis thaliana: adenosine 5'-phosphosulphate reductase is more susceptible than ATP sulphurylase to negative control by thiols. *Plant J* **31**, 729-740.

- Verbruggen, N., Hermans, C., and Schat, H.** (2009a). Mechanisms to cope with arsenic or cadmium excess in plants. *Current Opinion in Plant Biology* **12**, 364-372.
- Verbruggen, N., Hermans, C., and Schat, H.** (2009b). Molecular mechanisms of metal hyperaccumulation in plants. *New Phytologist* **181**, 759-776.
- Verbruggen, N., Juraniec, M., Baliardini, C., and Meyer, C.L.** (2013). Tolerance to cadmium in plants: the special case of hyperaccumulators. *Biomaterials* **26**, 933-938.
- Verret, F., Gravot, A., Auroy, P., Preveral, S., Forestier, C., Vavasseur, A., and Richaud, P.** (2005). Heavy metal transport by AtHMA4 involves the N-terminal degenerated metal binding domain and the C-terminal His11 stretch. *FEBS Lett* **579**, 1515-1522.
- Verret, F., Gravot, A., Auroy, P., Leonhardt, N., David, P., Nussaume, L., Vavasseur, A., and Richaud, P.** (2004). Overexpression of AtHMA4 enhances root-to-shoot translocation of zinc and cadmium and plant metal tolerance. *FEBS Lett* **576**, 306-312.
- Vert, G., Grotz, N., Dedaldechamp, F., Gaymard, F., Guerinot, M.L., Briat, J.F., and Curie, C.** (2002). IRT1, an Arabidopsis transporter essential for iron uptake from the soil and for plant growth. *Plant Cell* **14**, 1223-1233.
- Vido, K., Spector, D., Lagniel, G., Lopez, S., Toledano, M.B., and Labarre, J.** (2001). A proteome analysis of the cadmium response in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **276**, 8469-8474.
- Villiers, F., Ducruix, C., Hugouvieux, V., Jarno, N., Ezan, E., Garin, J., Junot, C., and Bourguignon, J.** (2011). Investigating the plant response to cadmium exposure by proteomic and metabolomic approaches. *Proteomics* **11**, 1650-1663.
- Villiers, F., Jourdain, A., Bastien, O., Leonhardt, N., Fujioka, S., Tichtincky, G., Parcy, F., Bourguignon, J., and Hugouvieux, V.** (2012). Evidence for functional interaction between brassinosteroids and cadmium response in *Arabidopsis thaliana*. *J Exp Bot* **63**, 1185-1200.
- Wallenberg, M., Olm, E., Hebert, C., Bjornstedt, M., and Fernandes, A.P.** (2010). Selenium compounds are substrates for glutaredoxins: a novel pathway for selenium metabolism and a potential mechanism for selenium-mediated cytotoxicity. *Biochem J* **429**, 85-93.
- Welsh, D.K., Imaizumi, T., and Kay, S.A.** (2005). Real-time reporting of circadian-regulated gene expression by luciferase imaging in plants and mammalian cells. *Methods Enzymol* **393**, 269-288.
- White, P.J., Bowen, H.C., Marshall, B., and Broadley, M.R.** (2007). Extraordinarily high leaf selenium to sulfur ratios define 'Se-accumulator' plants. *Ann Bot* **100**, 111-118.
- White, P.J., Bowen, H.C., Parmaguru, P., Fritz, M., Spracklen, W.P., Spiiby, R.E., Meacham, M.C., Mead, A., Harriman, M., Trueman, L.J., Smith, B.M., Thomas, B., and Broadley, M.R.** (2004). Interactions between selenium and sulphur nutrition in *Arabidopsis thaliana*. *J Exp Bot* **55**, 1927-1937.
- Wong, C.K., Jarvis, R.S., Sherson, S.M., and Cobbett, C.S.** (2009). Functional analysis of the heavy metal binding domains of the Zn/Cd-transporting ATPase, HMA2, in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist* **181**, 79-88.
- Wu, L.** (2004). Review of 15 years of research on ecotoxicology and remediation of land contaminated by agricultural drainage sediment rich in selenium. *Ecotoxicol Environ Saf* **57**, 257-269.
- Xia, Y.J., Ma, Y.Y., He, X.J., Wang, H.J., Ye, Z.Y., and Tao, H.Q.** (2011). Suppression of selenium-binding protein 1 in gastric cancer is associated with poor survival. *Hum Pathol* **42**, 1620-1628.
- Xiao, Z., and Wedd, A.G.** (2010). The challenges of determining metal-protein affinities. *Nat Prod Rep* **27**, 768-789.
- Xu, Y., Feng, L., Jeffrey, P.D., Shi, Y., and Morel, F.M.** (2008). Structure and metal exchange in the cadmium carbonic anhydrase of marine diatoms. *Nature* **452**, 56-61.
- Yang, M., and Sytkowski, A.J.** (1998). Differential expression and androgen regulation of the human selenium-binding protein gene hSP56 in prostate cancer cells. *Cancer Res* **58**, 3150-3153.

- Yatusevich, R., Mugford, S.G., Matthewman, C., Gigolashvili, T., Frerigmann, H., Delaney, S., Koprivova, A., Flugge, U.I., and Kopriva, S.** (2010). Genes of primary sulfate assimilation are part of the glucosinolate biosynthetic network in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **62**, 1-11.
- Yoshimoto, N., Takahashi, H., Smith, F.W., Yamaya, T., and Saito, K.** (2002). Two distinct high-affinity sulfate transporters with different inducibilities mediate uptake of sulfate in *Arabidopsis* roots. *Plant Journal* **29**, 465-473.
- Zakharyan, R.A., Tsaprailis, G., Chowdhury, U.K., Hernandez, A., and Aposhian, H.V.** (2005). Interactions of sodium selenite, glutathione, arsenic species, and omega class human glutathione transferase. *Chem Res Toxicol* **18**, 1287-1295.
- Zayed, A., Lytle, C.M., and Terry, N.** (1998). Accumulation and volatilization of different chemical species of selenium by plants. *Planta* **206**, 284-292.
- Zhan, Y., Song, X., and Zhou, G.W.** (2001). Structural analysis of regulatory protein domains using GST-fusion proteins. *Gene* **281**, 1-9.
- Zhang, C., Xu, W., Pan, W., Wang, N., Li, G., Fan, X., Xu, X., Shen, S., and Das, U.N.** (2013a). Selenium-binding protein 1 may decrease gastric cellular proliferation and migration. *Int J Oncol* **42**, 1620-1629.
- Zhang, S., Li, F., Younes, M., Liu, H., Chen, C., and Yao, Q.** (2013b). Reduced selenium-binding protein 1 in breast cancer correlates with poor survival and resistance to the anti-proliferative effects of selenium. *PLoS One* **8**, e63702.
- Zhang, Y., and Gladyshev, V.N.** (2010). General trends in trace element utilization revealed by comparative genomic analyses of Co, Cu, Mo, Ni, and Se. *J Biol Chem* **285**, 3393-3405.
- Zhu-Salzman, K., Salzman, R.A., Ahn, J.E., and Koiwa, H.** (2004). Transcriptional regulation of sorghum defense determinants against a phloem-feeding aphid. *Plant Physiol* **134**, 420-431.
- Zhu, Y.G., Pilon-Smits, E.A., Zhao, F.J., Williams, P.N., and Meharg, A.A.** (2009). Selenium in higher plants: understanding mechanisms for biofortification and phytoremediation. *Trends in Plant Science* **14**, 436-442.
- Zimmermann, M., Xiao, Z., Cobbett, C.S., and Wedd, A.G.** (2009). Metal specificities of *Arabidopsis* zinc and copper transport proteins match the relative, but not the absolute, affinities of their N-terminal domains. *Chem Commun (Camb)*, 6364-6366.

Résumé

La protéine « Selenium Binding Protein » (SBP1), présente chez la plupart des êtres vivants, a un rôle qui n'est pas encore élucidé. Cette protéine possède dans sa structure primaire de nombreux sites potentiels de liaisons aux métaux. Chez *Arabidopsis thaliana*, la surexpression de SBP1 augmente la tolérance à deux composés toxiques pour la plante, le cadmium (Cd) et le sélénium (Se) qui sont présents dans les sols pollués. Pour mieux comprendre la fonction de SBP1 dans les mécanismes de détoxification, une démarche intégrée combinant deux approches complémentaires, *in vitro* et *in planta*, a été menée. La caractérisation biochimique de SBP1 a mis en évidence ses propriétés chélatrices vis-à-vis de différents ligands dont le Cd et le Se. Le Cd se lie à SBP1 avec un ratio molaire ligand/SBP1 de 3 et un K_D de $2,2 \times 10^{-7}$ M *via* principalement des acides aminés soufrés et potentiellement à moindre échelle des résidus histidines. Le Se, initialement sous forme SeO_3^{2-} , se lie à SBP1 de façon covalente, avec un ratio molaire ligand/SBP1 de 1, *via* les cystéines 21 et 22 pour former une liaison de type R-S-Se-S-R. Les analyses *in planta* de localisation subcellulaire ont montré que SBP1 était à la fois cytosolique et nucléaire. L'utilisation de lignées bioluminescentes a permis d'analyser la zone promotrice du gène *SBP1*. Le motif *cis* 'GAGAC' connu pour être impliqué dans la régulation de certains gènes en réponse à une carence en soufre (S) a été identifié comme élément *cis* majeur de la régulation de l'expression de SBP1 en réponse à différents stress, dont le Cd et le Se. Ce résultat démontre l'existence d'un lien entre la fonction de SBP1 et une demande en S de la cellule. La surexpression de *SBP1 in planta* perturbe le niveau d'accumulation du Se dans les parties aériennes, mais pas sa spéciation. L'ensemble de ces résultats semble indiquer que SBP1 est impliquée dans des mécanismes de détoxification *via* ses propriétés chélatrices et qu'elle joue également un rôle dans le métabolisme du S et du Se.

Abstract

The function of the protein "Selenium binding protein 1" (SBP1), present in almost all organisms, is not yet well established. This protein has numerous potential metal binding sites. In *Arabidopsis thaliana*, SBP1 overexpression increases tolerance to two toxic compounds for the plant, cadmium (Cd) and selenium (Se), which are often found as soil pollutants. For a better understanding of SBP1 function and its involvement in detoxification mechanisms, an integrated approach combining *in vitro* and *in planta* experiments, has been performed. Biochemical characterization of SBP1 has revealed its chelating properties to different ligands including Cd and Se. Cd is bound to SBP1 with a metal ion to protein molar ratio of 3 and a K_D of 2.2×10^{-7} M mainly *via* sulfur-containing amino acids and potentially histidine residues. Se from SeO_3^{2-} can covalently bound SBP1 with a ligand to protein molar ratio of 1. This binding occurs *via* cysteines 21 and 22 and forms a R-S-Se-S-R complex. *In planta* analyses have shown that SBP1 is cytosolic and nuclear. The use of bioluminescent lines allowed the identification of a GAGAC motif in the *SBP1* promoter region. This motif is a sulfur starvation responsive element and a major *cis* element involved in *SBP1* expression in response to stress, including Cd and Se. The result directly links SBP1 function to an enhanced sulfur demand of the cell. SBP1 overexpression in plants disturbs Se accumulation in shoots but not its speciation. All together these results strongly suggest that SBP1 could act as a detoxifying protein through its chelating properties and plays a role in S/Se metabolisms.