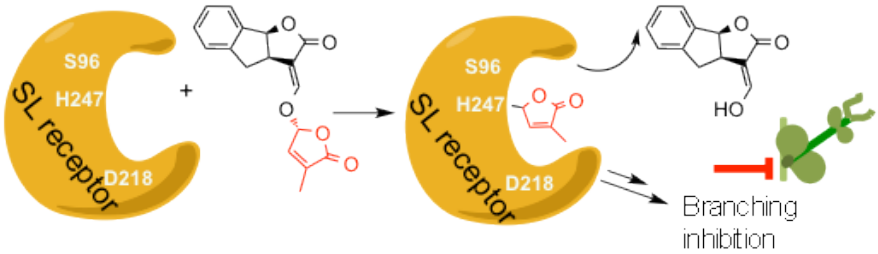
Sujet de Master 2

Carine van Heijenoort
Institut de Chimie des Substances Naturelles (ICSN) – UPR2301
1 avenue de la terrasse, 91190 Gif-sur-Yvette.
Département de chimie et biologie structurales et analytiques
Groupe RMN, Chimie et Biologie Structurales
carine.van-heijenoort@cnrs.fr

Analyse structurale du mécanisme de l'interaction de mimes de strigolactones non hydrolysables avec leur récepteur PsD14/RMS3.

Contexte – Les strigolactones (SL) forment une famille de petites molécules dérivées des caroténoïdes qui constituent la dernière classe d'hormones identifiée chez les plantes contrôlant leur architecture aérienne et racinaire et qui sont aussi connues pour leur fonction dans la rhizosphère lors des interactions symbiotiques et parasitaires[1,2]. Les SL sont donc des molécules clefs, incontournables dans le cadre du développement de l'agroécologie et dans le changement de modèle d'agriculture. L'étude des SL (voie de biosynthèse, voie de signalisation, mode d'action) a des répercussions potentielles non seulement sur le rendement des espèces cultivées mais aussi sur la nutrition des plantes (principalement phosphate), le stress hydrique ou la tolérance aux plantes parasites. La caractérisation du récepteur des SL reste un enjeu majeur même si des progrès importants ont été effectués sur la compréhension de la réception et sur la voie de signalisation[3].
Le groupe de François-Didier Boyer à l'ICSN étudie ces molécules depuis plusieurs années et a mis en évidence leur récepteur dans le pois avec un mode d'action original pour une hormone végétale[4]. Ce récepteur est une α/β-hydrolase (D14) ayant conservée une activité enzymatique. Les SL comprennent un système tricyclique lié à un buténolide. Dans le mécanisme de perception des SL, la liaison au récepteur D14 génère une réaction enzymatique, qui conduit au clivage de la SL et à la formation d'une liaison covalente du fragment buténolide avec l'histidine du site catalytique, responsable d'une inhibition de la ramification.



Ce projet se situe dans la continuité de différentes études menées depuis 2016, que ce soit toujours sur le récepteur PsD14 ou aussi sur le récepteur SL de plantes parasites[4,5]. L'objectif est de comprendre comment une classe de mimes de SL qui n'est pas clivée par PsD14 est capable d'interagir avec la protéine pour permettre d'obtenir une activité biologique, avec comme pour les SL, une inhibition de la croissance des bourgeons axillaires. Jusqu'à présent aucun récepteur de SL n'a été étudié par RMN. Cette technique est particulièrement bien adaptée pour comprendre plus précisément, au niveau atomique, les mécanismes de perception des strigolactones qui ne sont pas encore clairement élucidés. Elle permettra non seulement de déterminer les acides aminés impliqués dans la reconnaissance du récepteur, mais aussi de caractériser la dynamique et les éventuels changements de conformation survenant lors de l'interaction avec les ligands. Ce projet s'inscrit dans un contexte de Sciences des Plantes et bénéficie d'une étroite interaction entre le CNRS-ICSN (Carine van Heijenoort, François-Didier Boyer, Gif sur Yvette) et l'INRAE-Institut Jean-Pierre Bourgin (Catherine Rameau, Alexandre de Saint Germain, Versailles) fédérant des biologistes des plantes, biologistes structuraux, biochimistes et chimistes organiciens.

Travail de recherche – Actuellement, nous maitrisons au laboratoire les conditions d'expression de PsD14/RMS3 en quantité compatible avec une étude RMN et nous avons déjà pu enregistrer des spectres STD montrant l'interaction entre un mime non clivable et PsD14 et obtenir des spectres 2D de PsD14 seule.

Le projet de master portera sur les questions suivantes :
- Optimisation de la production de la protéine PsD14/RMS3 marquée $^{13}C/^{15}N/D$ pour effectuer sa caractérisation structurale par RMN
- Attribution des résonances de la protéine PsD14/RMS3, afin en particulier de pouvoir caractériser le site actif (triade catalytique Ser96, His247, Asp218), et amorcer l'étude des interactions.
- Etude de l'interaction entre PsD14/RMS3 avec les ligands biologiquement actifs et non clivés par la protéine
- Comparaison de l'interaction entre PsD14/RMS3 et SL avec celle entre PsD14/RMS3 et les mimes non clivables.

A l'issue de ce stage de M2, un travail de thèse pourra être proposé pour étudier les mécanismes d'interaction et le mode d'action des SL et autres molécules bioactives avec d'autres récepteurs découverts dans les plantes parasites de type *Orobanche* et *Phelipanche* qui deviennent un problème important dans le bassin méditerranéen et plus particulièrement en France du fait du réchauffement climatique.

Environnement scientifique – Le stage se déroulera au sein du groupe de RMN, Biologie et Chimie Structurales de l'Institut de Chimie des Substances Naturelles (ICSN) à Gif-sur-Yvette et à l'Institut Jean-Pierre Bourgin (IJPB) à Versailles dans l'équipe « contrôle de la ramification ». Ces laboratoires possèdent tout l'équipement pour la production, la purification et la caractérisation des protéines recombinantes. La production de PsD14/RMS3 recombinante se fera à l'INRAE-IJPB et sera encadré par Alexandre de Saint Germain (Chargé de Recherche INRAE) qui possède le savoir faire sur cette protéine et a déjà effectué les essais préliminaires. Les études RMN seront encadrées par Nelly Morellet et Carine van Heijenoort à l'ICSN. L'ICSN dispose d'un parc de spectromètres RMN exceptionnel, avec 4 spectromètres 600, 700, 800 et 950 MHz équipés pour les études en biologie structurale. La plateforme fait partie des infrastructures nationales en biologie et santé FRISBI et IBISA. Le 950MHz fait partie de la plateforme nationale "IR (Infrastructure de Recherche) RMN", ouverte à 30% du temps pour la communauté française, apportant ainsi de nombreuses opportunités d'échanges avec la communauté RMN et plus généralement des biologistes et des chimistes. Par ailleurs, l'ICSN est impliqué dans de nombreux réseaux au sein du grand campus Paris-Saclay, avec en particulier de nombreux contacts avec les biologistes, les structuralistes et les chimistes de la région Parisienne.

Profil recherché – Le candidat, biochimiste, biologiste, chimiste ou physicien, doit être fortement intéressé par la compréhension des mécanismes moléculaires du vivant à l'interface biologie/chimie/physique, et motivé pour apprendre et mettre en œuvre des techniques très variées (biochimiques, physiques et biophysiques). Le projet impliquera des manipulations en laboratoire de biologie moléculaire et biochimie, le lancement d'expériences sur les spectromètres de RMN et l'utilisation d'outils informatiques pour l'analyse des données.

1 Gomez-Roldan, V., Fermas, S., Brewer, P. B., Puech-Pages, V., Dun, E. A., Pillot, J.-P., Letisse, F., Matusova, R., Danoun, S., Portais, J.-C., Bouwmeester, H., Bécard, G., Beveridge, C. A., Rameau, C. & Rochange, S. F. Strigolactone inhibition of shoot branching. *Nature* **455**, 189-194, doi:10.1038/nature07271 (2008).

2 Lopez-Obando, M., Ligerot, Y., Bonhomme, S., Boyer, F. D. & Rameau, C. Strigolactone biosynthesis and signaling in plant development. *Development* **142**, 3615-3619, doi:10.1242/dev.120006 (2015).

3 Waters, M. T., Gutjahr, C., Bennett, T. & Nelson, D. C. Strigolactone Signaling and Evolution. *Annu. Rev. Plant Biol.* **68**, 291-322, doi:10.1146/annurev-arplant-042916-040925 (2017).

4 de Saint Germain, A., Clavé, G., Badet-Denisot, M.-A., Pillot, J.-P., Cornu, D., Le Caer, J.-P., Burger, M., Pelissier, F., Retailleau, P., Turnbull, C., Bonhomme, S., Chory, J., Rameau, C. & Boyer, F.-D. An

histidine covalent receptor and butenolide complex mediates strigolactone perception. *Nat. Chem. Biol.* **12**, 787-794, doi:10.1038/nchembio.2147 (2016).
de Saint Germain, A., Jacobs, A., Brun, G., Pouvreau, J.-B., Braem, L., Cornu, D., Clavé, G., Baudu, E., Steinmetz, V., Servajean, V., Wicke, S., Gevaert, K., Simier, P., Goormachtig, S., Delavault, P. & Boyer, F.-D. A *Phelipanche ramosa* KAI2 Protein Perceives enzymatically Strigolactones and Isothiocyanates. *bioRxiv*, doi:10.1101/2020.06.09.136473 (2020).