



UNIVERSITÉ PARIS-SUD 11

UNIVERSITA' degli studi di Firenze

ECOLE DOCTORALE:

SCUOLA DI DOTTORATO:

Sciences du Végétal

Scienze Agrarie e Ambientali

PhD Thesis

Emanuela Monetti

ROLE OF ION CHANNELS IN PROGRAMMED CELL DEATH INDUCED BY HYPEROSMOTIC STRESSES IN PLANT CELLS

PhD defense on November 17th 2014

Mazars Christian	Research director in CNRS, Toulouse	Reviewer
Baluska Frantisek	Professor at the at the University of Bonn	Reviewer
Dron Michel	Professor at université Paris-Sud	Examiner
Kawano Tomonori	Professor at university of Kitakyushu	Examiner
Mancuso Stefano	Professor at the University of Florence	Tutor
Bouteau François	Maître de conférences at the Université Paris Diderot	Co-Tutor

Rôle des canaux ionique dans la mort cellulaire induit par stress osmotique

Le travail de recherche décrit dans cette thèse concerne le rôle des canaux ioniques de la membrane plasmique en réponse à des stress salins et non salins ainsi qu'aux interactions possibles avec d'autres événements de signalisation conduisant à la mort cellulaire programmée (PCD). Dans le premier chapitre on décrit l'état de l'art des stress osmotiques en particulier des événements rapides impliqués dans la perception et transduction des stress hyper-osmotiques.

Le stress salin est connu pour avoir des effets délétères sur le développement et la croissance des plantes (Tester and Davenport, 2003). La salinité induit des stress oxydatif, ionique et osmotique (Zhu, 2001a) qui peuvent déclencher différentes voies de signalisation amenant à des processus de PCD chez les embryophytes (Huh *et al.*, 2002; Lin *et al.*, 2006; Shabala, 2009; Wang *et al.*, 2010); et les algues (Affenzeller *et al.*, 2009a). Cette PCD peut être considéré comme un mécanisme d'adaptation au stress salin (Huh *et al.*, 2002).

La sécheresse, qui consiste au moins en partie en un stress hyperosmotique, peut également induire de la PCD chez les plantes (Duan *et al.*, 2010). La PCD est un processus cellulaire actif qui facilite l'élimination des cellules endommagées ou non désirables. Elle est essentiel pour la différenciation cellulaire et l'homéostasie tissulaire. La PCD a été mise en évidence en réponse à différents types de stress abiotiques (Kadono *et al.*, 2010) (van Doorn *et al.*, 2011). Différents types de PCD ayant des caractéristiques morphologiques et physiologiques ont été décrites dans les plantes, ce qui a conduit à une classification détaillée de ces PCD (van Doorn, 2011; van Doorn *et al.*, 2011). Bien que la délimitation entre les différents types de PCD reste parfois difficile (van Doorn *et al.*, 2011), la fragmentation de l'ADN semble caractéristique de la PCD ainsi que l'activation de nucléases spécifiques, la condensation et le rétrécissement du cytoplasme, la libération de cytochrome c à partir des mitochondries, l'augmentation du niveau du calcium cytosolique ($[Ca^{2+}]_{cyt}$), la production d'espèces actives de l'oxygène (ROS), et une augmentation de l'activité d'enzymes de type caspase (Tsiatsiani *et al.*, 2011; van Doorn, 2011). Différents événements rapidement induits en réponses aux stressés ioniques et non-ionique sont aussi fréquemment reportés chez les plantes: l'augmentation du niveau du $[Ca^{2+}]_{cyt}$ (Donaldson *et al.*, 2004a; Kim *et al.*, 2007; Lin *et al.*, 2006; Parre *et al.*, 2007b;

Ranf *et al.*, 2008; Xiong *et al.*, 2002), la production de ROS (Lin *et al.*, 2006; Xiong *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2013; Zhu, 2001b), ou encore la régulation de protéine-kinases (Zhang *et al.*, 2013).

Lors de l'exposition à des conditions salines, le Na⁺ pénètre dans les cellules au travers de canaux cationiques non sélectifs (NSCCs; (Demidchik and Tester, 2002), dépolarisant la membrane plasmique (Chen *et al.*, 2007; Pandolfi *et al.*, 2010; Shabala and Cuin, 2008; Wegner *et al.*, 2011). En revanche, le mannitol ou le sorbitol à des concentrations isotoniques induisent une hyperpolarisation rapide de la membrane (Li and Delrot, 1987; Shabala, 2000; Shabala and Lew, 2002; Zingarelli *et al.*, 1999). La dégradation de l'ADN, par les endonucléases libérées des mitochondries s'observe dans les cellules traitées avec du NaCl mais pas dans les cellules traitées avec le sorbitol (Affenzeller *et al.*, 2009b). La libération de ces endonucléases est possible grâce à l'ouverture des pores de transition (PTP) induisant également la dépolarisation mitochondrial (Huh *et al.*, 2002; Lin *et al.*, 2006). Ainsi, différents événements et voies de transduction du signal semblent impliqués dans la réponse à traitements ioniques et non ioniques (Donaldson *et al.*, 2004b; Parre *et al.*, 2007a).

Dans le deuxième chapitre en utilisant des cellules en culture de tabac cv. BY2, nous avons comparé les événements précoces induits par des stress hyperosmotiques ioniques et non-ioniques et leurs liens avec la régulation des canaux ioniques ainsi que leurs rôles dans le développement de la PCD. L'activité des canaux ioniques a été mesurée en utilisant la technique du voltage imposée à une électrode (dSEVC). Cette technique a été initialement développée sur des cellules animales a été développée par notre équipe sur différents types de cellules végétales (Bouteau *et al.*, 1996; Forestier *et al.*, 1998; Jeannette *et al.*, 1999; Kurkdjian *et al.*, 2000). Elle permet de suivre les variations de la différence de potentiel transmembranaire et l'activité des canaux ioniques de la membrane plasmique sur des cellules vivantes en conservant leur paroi cellulaire. Par rapport à la technique du patch-clamp plus classiquement utilisée qui impose la préparation de protoplastes, le dSEVC permet d'étudier l'activité des canaux ioniques en réponse à des stimuli environnementaux dans un contexte le plus physiologique possible.

En réponse à un traitement par du NaCl, le niveau de mort cellulaire est dépendant du temps et de la dose. Environ la moitié de la population est morte après 4 h en présence de 200 mM de NaCl. Afin de vérifier si cette mort cellulaire est due à un processus actif nécessitant l'expression de gènes et le métabolisme cellulaire, les cellules de tabac BY2

ont été prétraitées, avant l'exposition au NaCl, avec de l'actinomycine D (AD), un inhibiteur de la synthèse de l'ARN, ou de la cycloheximide (Chx), un inhibiteur de la synthèse des protéines. Ces pré-traitements ont permis de réduire de façon significative le niveau de mort cellulaire induite par le NaCl. Ces résultats suggèrent donc que cette mort cellulaire nécessite un métabolisme cellulaire actif, à savoir la transcription du gène et de la synthèse *de novo* de protéines. Le même type de résultats, à savoir une mort des cellules dépendante du temps et de la dose, ont été observés en utilisant des concentrations iso-osmotiques de sorbitol. Ceci nous suggère que les stress hyperosmotiques non-ioniques et ioniques peuvent induire une PCD dans les cellules végétales comme précédemment observé dans différents modèles animaux (Galvez *et al.*, 2003; Murata *et al.*, 2002; Niswander and Dokas, 2007). Nous avons ensuite vérifié si certains événements précoces détectée classiquement au cours des réactions de stress et hyperosmotiques PCD chez les plantes, pourraient être impliqués dans cette mort cellulaire, à savoir la production de ROS, l'augmentation de Ca^{2+} cytosolique, des variations de flux ionique ou une dépolarisation de la membrane mitochondriale.

La première réponse observée après une exposition des cellules de BY2 au NaCl est une production immédiate de ROS. Un pré-traitement par du Tiron (un piègeur de $O_2^{\cdot-}$) ne permet pas de réduire de façon significative cette rproduction de ROS induite par le NaCl. Par contre un pré-traitement par du DABCO (un piègeur de 1O_2) réduit le niveau de ROS généré. La formation de 1O_2 est susceptible de se produire lors de l'exposition à de fortes intensités lumineuses (Krieger-Liszkay, 2005), mais il est également possible que différents enzymes dont des peroxydases (POXs) puissent générer de l' 1O_2 de façon extracellulaire comme reporté pour des cellules animales (Rkanofsky, 2000; Stief, 2003; Tarr and Valenzeno, 2003) et végétales (Guo *et al.*, 2009; Kadono *et al.*, 2006). Les cellules que nous utilisons n'étant pas photosynthétiques, nous avons testé un inhibiteur de POXs le SHAM (Hossain *et al.*, 2013; Kawano *et al.*, 1998). Nos résultats suggèrent que la production rapide et transitoire d' 1O_2 en réponse aux stress ioniques ou non-ionique pourraient être dues à de tels enzymes.

Par ailleurs, dans le cas des deux types de traitement, par le NaCl ou le sorbitol, nous avons observés une augmentation rapide et transitoire du $[Ca^{2+}]_{cyt}$ chez les cellules BY2 comme précédemment décrit dans différents modèles végétaux (Donaldson *et al.*, 2004b; Knight *et al.*, 1997). Ces varaitions de $[Ca^{2+}]_{cyt}$ peuvent être inhibées par des inhibiteurs de canaux calciques de la membrane plasmique, le La^{3+} et le Gd^{3+} , mais pas par le

dantrolène ou l'U73122, deux inhibiteurs de canaux calciques des membranes internes, connus pour être efficace dans notre modèle (Meimoun *et al.*, 2009; Rona, 2009). Ceci suggère que l'augmentation du $[Ca^{2+}]_{cyt}$ en réponse aux stress hypermotiques est bien due à un influx au travers la membrane plasmique. Bien que rapide, ces influx de Ca^{2+} se produisent après la génération d' 1O_2 . Un prétraitement par du DABCO permet de réduire fortement ces influx, ce qui suggère qu'ils sont dépendants de la génération de 1O_2 . La réduction par le SHAM de ces influx de Ca^{2+} confirme l'hypothèse selon laquelle ces influx de Ca^{2+} sont dépendants de la production d' 1O_2 par le sorbitol et le NaCl et souligne le rôle de 1O_2 comme molécule de signalisation (Fischer *et al.*, 2013).

La perturbation de l'homéostasie du Ca^{2+} dans les cellules végétales, ainsi que dans des cellules animales, a été décrite comme une condition préalable pour la PCD (Davis and Distelhorst, 2006; Grant *et al.*, 2000; Lecourieux *et al.*, 2006). Il n'a cependant pas été possible de vérifier ceci pour nos cellules BY2, l'inhibition de l'influx de calcium par le La^{3+} n'empêchant pas le développement de la mort cellulaire.

Par contre des prétraitements avec du Tiron ou du DPI (inhibiteur de la NADPH oxydase) ont permis de réduire cette mort cellulaire induite par le NaCl et le sorbitol. Nous avons effectivement pu enregistrer une production retardée de ROS inhibable par cette même pharmacologie. Cela indique que la production retardée d'anion superoxyde pourrait jouer un rôle central dans la mort cellulaire.

Concernant la régulation des courants ioniques, nous avons observé dans le cas du stress salin une forte dépolarisation liée à l'influx de Na^+ au travers de canaux cationiques aspécifiques (NSCC). Ces canaux NSCC sont connus pour être responsables de l'influx de Na^+ au niveau racinaire (Demidchik and Maathuis, 2007). Par contre, dans le cas de stress non-salin, nous avons observé une hyperpolarisation des cellules liées à la diminution d'un courant anionique présent en situation contrôle dans les cellules dans leur milieu de cultures (Reboutier *et al.*, 2007)

En résumé, nous avons pu montrer que les réponses cellulaires précoces, telle que l'augmentation du calcium cytosolique classiquement impliqués lors de la PCD, ne semblaient pas être impliquées dans la mort cellulaire induite par les stress hyperosmotiques chez les cellules en culture de tabac. Dans les cas de stress salin chez ces cellules, un influx précoce de sodium à travers des canaux cationiques non spécifiques participe au développement de la PCD en entraînant la production de $O_2^{\bullet-}$ par des NADPH oxydases mais aussi un dysfonctionnement mitochondrial. Dans le cas de

stress hyperosmotique non-ionique, nous avons observé une diminution rapide de l'intensité des courants anioniques, le seul évènement impliqué dans le développement de la PCD parmi ceux enregistrés étant la production retardée de ROS. La figure 1 résume les principaux résultats obtenus dans le deuxième chapitre.

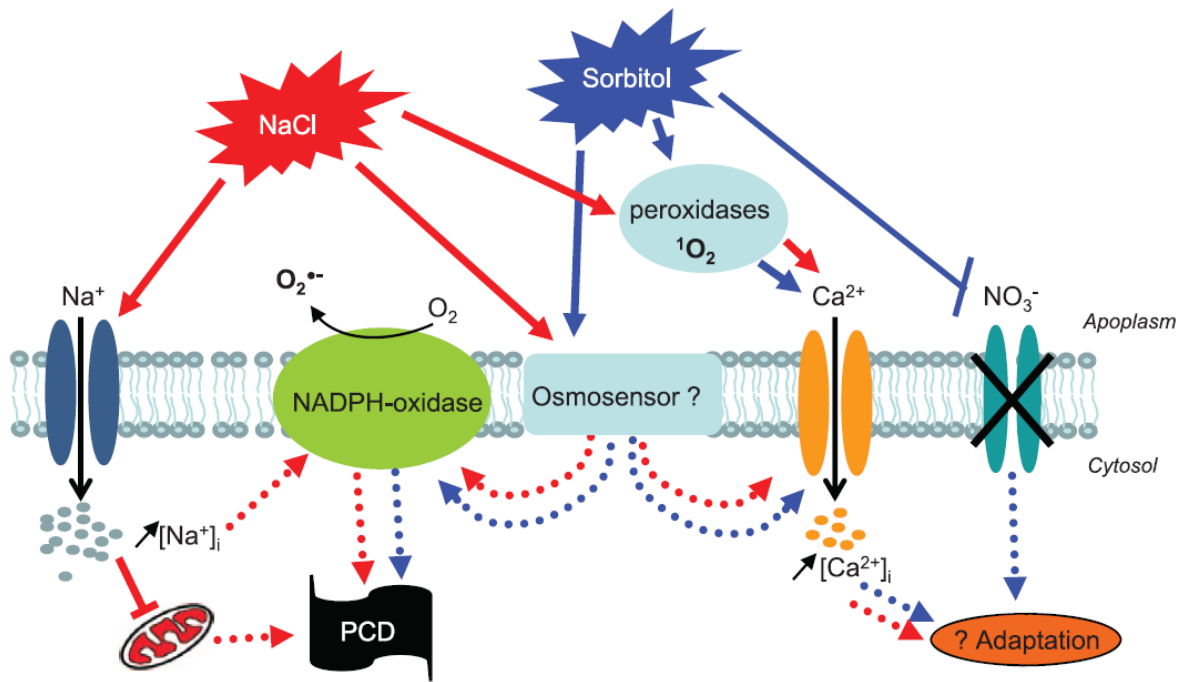


Figure1: Voies possibles induites par stress salin et non salin conduisant à la mort cellulaire de cellules de tabac

Afin de poursuivre l'étude du rôle des canaux anioniques lors du stress hyperosmotique non salin, nous avons utilisé des cellules d'*Arabidopsis thaliana* nous permettant de travailler avec le mutant de canal anionique *slac1*. Nous avons constaté que l'activation retardée des canaux SLAC1 participait au développement de la PCD induite par un stress hyperosmotique non salin. Cependant suite à l'addition de sorbitol la première réponse observée est une réduction des courants anioniques entraînant une hyperpolarisation des cellules d'*A. thaliana*, comme chez les cellules de tabac. Cette réduction précoce de l'activité des canaux anioniques pourrait participer à la signalisation ou l'ajustement osmotique permettant l'adaptation et la survie cellulaire, tandis que des évènements retardés, à savoir la production d'anions superoxyde par les NADPH-oxydases et

l'activation des canaux anioniques pourraient participer au développement de la PCD d'une partie de la population cellulaire. Comme pour le tabac BY2 les réponses précoces, aussi bien que le calcium cytosolique et la production de ROS, ne semblaient pas être impliquées dans la mort cellulaire. La production d'oxygène singulet et l'influx de Ca^{2+} pourraient être liés à des processus de signalisation permettant aux cellules de s'adapter et survivre aux conditions hyperosmotiques.

Ces données rappellent ce qui est a été décrit chez certaines cellules animales pour lesquelles une augmentation du volume cellulaire (RVI, Regulatory volume increase) se produit en réponse au stress hyperosmotique (Burg *et al.*, 2007). Ce RVI est associée à la régulation des systèmes de transport d'ions et participe à l'ajustement osmotique et est suivi d'une réduction du volume au niveau control. Chez certaines cellules animales le RVI peut être cependant être suivi par une très (trop) forte diminution du volume conduisant à l'apoptose (AVD, Apoptosis volume decrease). Ces processus impliquent notamment des courants anioniques (Maeno *et al.*, 2000). De la même façon, dans notre modèle une trop forte augmentation des courants anioniques pourraient expliquer l'enclenchement du processus de PCD (Figure 2). Une étude plus approfondie sera nécessaire pour décrire précisément la limite de stabilité des cellules, et ce qui contrôle la limite entre l'ajustement osmotique et l'induction de la PCD dans les cellules végétales soumises à des conditions hyper-osmotiques.

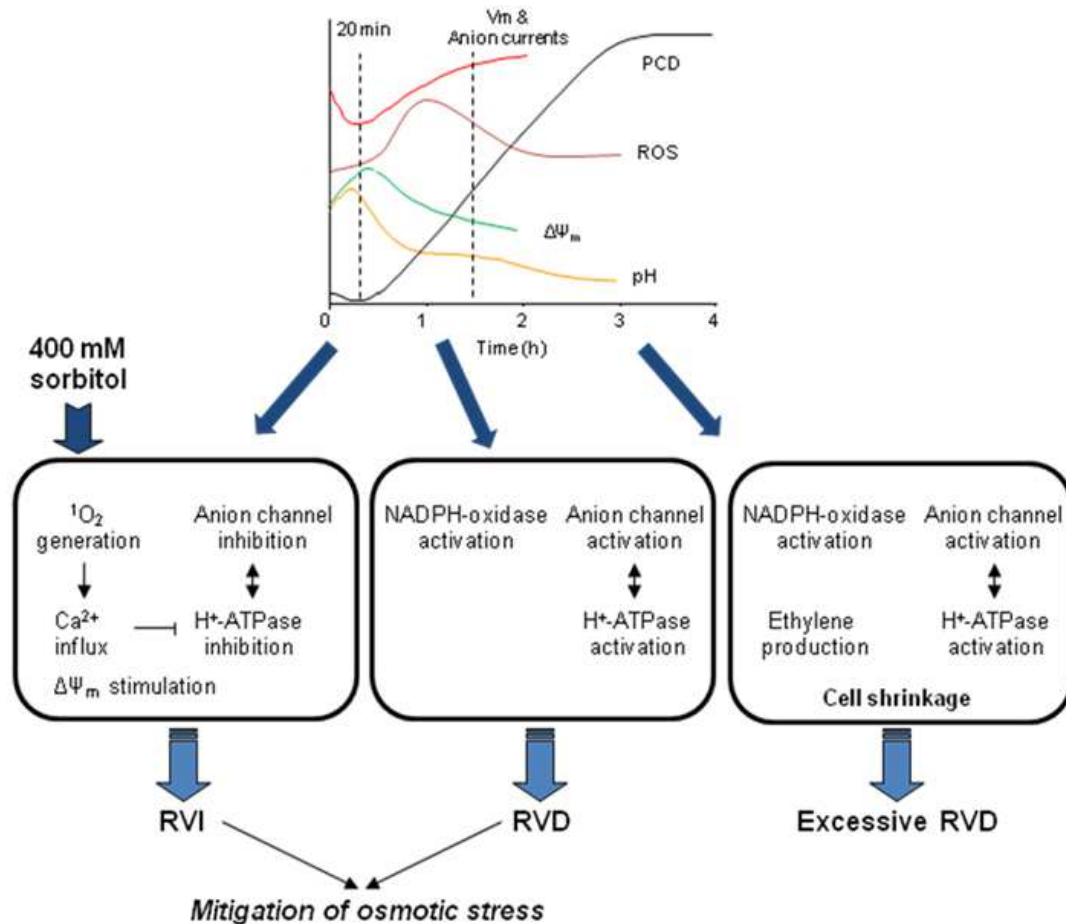


Figure 2 : Cinétiques et séquence d'événements impliqués dans les réponses induites par stress non-salin .

Dans une troisième partie nous avons étudié le rôle potentiel des petits peptides appartenant à la famille des peptides de type FARP (FMRFamide related peptide) décrite chez les métazoaires. Ces peptides peuvent participer chez les métazoaires à de nombreux processus physiologiques dont la régulation des stress hyperosmotiques. Nous avons pu montrer que la plante modèle *A. thaliana* possède des gènes susceptibles de coder de tels peptides. En utilisant des peptides synthétiques, nous avons montré que ces peptides pourraient participer aux réponses induites lors de stress hyperosmotique chez les plantes, notamment la régulation des flux d'ions, la production de ROS mais aussi les processus de PCD. Ce travail illustre la complexité et l'importance de la régulation des canaux ioniques dans les voies de signalisation et les processus conduisant à la PCD.

Nous avons également recherché le rôle possible de ces peptides dans la régulation de l'ouverture stomatique, mécanisme important de la résistance à la sécheresse, cette ouverture étant notamment contrôlée par la génération de ROS et l'activité du canal SLAC1 (Negi *et al.*, 2008; Sirichandra *et al.*, 2009). Il s'est avéré que ces peptides induisaient l'ouverture des stomates, résultat contre-intuitif puisqu'un tel effet conduirait à renforcer les pertes d'eau via les stomates. Cependant le rôle de ces peptides pourrait faire partie d'un mécanisme sophistiqué impliqué dans la régulation de l'ouverture stomatique en cas de stress hydrique modéré. Comme cela a été récemment rapporté pour un métabolite le 1,3-diaminopropane acétylé (DAP) qui ont contrecarré la stomates induite par l'acide abscissique-canonique de fermeture en cas de stress modéré permettant l'entrée de CO₂ et donc la photosynthèse, mais pas sur le stress sévère (Jammes *et al.*, 2014). De tels régulateurs permettraient aux plantes de s'adapter de façon optimale aux stress osmotiques.

En résumé ce travail met en exergue le rôle crucial et la complexité des régulations des flux d'ions en réponses aux stress hyper-osmotiques en particulier lors de l'induction des processus de PCD.

Bibliographie

- Affenzeller MJ, Darehshouri A, Andosch A, Lutz C, Lutz-Meindl U.** 2009a. Salt stress-induced cell death in the unicellular green alga *Micrasterias denticulata*. *J Exp Bot* **60**, 939-954.
- Affenzeller MJ, Darehshouri A, Andosch A, Lütz C, Lütz-Meindl U.** 2009b. Salt stress-induced cell death in the unicellular green alga *Micrasterias denticulata*. *Journal of Experimental Botany* **60**, 939-954.
- Bouteau F, Bousquet U, Pennarun AM, Convert M, Dellis O, Cornel D, Rona JP.** 1996. Time dependent K⁺ currents through plasmalemma of laticifer protoplasts from *Hevea brasiliensis*. *Physiologia Plantarum* **98**, 97-104.
- Burg MB, Ferraris JD, Dmitrieva NI.** 2007. Cellular response to hyperosmotic stresses. *Physiological Reviews* **87**, 1441-1474.
- Chen Z, Cuin TA, Zhou M, Twomey A, Naidu BP, Shabala S.** 2007. Compatible solute accumulation and stress-mitigating effects in barley genotypes contrasting in their salt tolerance. *J Exp Bot* **58**, 4245-4255.
- Davis MC, Distelhorst CW.** 2006. Live free or die: an immature T cell decision encoded in distinct Bcl-2 sensitive and insensitive Ca²⁺ signals. *Cell Cycle* **5**, 1171-1174.
- Demidchik V, Maathuis FJ.** 2007. Physiological roles of nonselective cation channels in plants: from salt stress to signalling and development. *New Phytologist* **175**, 387-404.
- Demidchik V, Tester M.** 2002. Sodium fluxes through nonselective cation channels in the plasma membrane of protoplasts from *Arabidopsis* roots. *Plant Physiol* **128**, 379-387.
- Donaldson L, Ludidi N, Knight MR, Gehring C, Denby K.** 2004a. Salt and osmotic stress cause rapid increases in *Arabidopsis thaliana* cGMP levels. *FEBS Lett* **569**, 317-320.

- Donaldson L, Ludidi N, Knight MR, Gehring C, Denby K.** 2004b. Salt and osmotic stress cause rapid increases in *Arabidopsis thaliana* cGMP levels. *FEBS letters* **569**, 317-320.
- Duan Y, Zhang W, Li B, Wang Y, Li K, Sodmergen, Han C, Zhang Y, Li X.** 2010. An endoplasmic reticulum response pathway mediates programmed cell death of root tip induced by water stress in *Arabidopsis*. *New Phytol* **186**, 681-695.
- Fischer BB, Hideg É, Krieger-Liszkay A.** 2013. Production, detection, and signaling of singlet oxygen in photosynthetic organisms. *Antioxidants & redox signaling* **18**, 2145-2162.
- Forestier C, Bouteau F, Leonhardt N, Vavasseur A.** 1998. Pharmacological properties of slow anion currents in intact guard cells of *Arabidopsis*. Application of the discontinuous single-electrode voltage-clamp to different species. *Pflugers Arch* **436**, 920-927.
- Galvez AS, Ulloa JA, Chiong M, Criollo A, Eisner V, Barros LF, Lavandero S.** 2003. Aldose Reductase Induced by Hyperosmotic Stress Mediates Cardiomyocyte Apoptosis DIFFERENTIAL EFFECTS OF SORBITOL AND MANNITOL. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 38484-38494.
- Grant M, Brown I, Adams S, Knight M, Ainslie A, Mansfield J.** 2000. The RPM1 plant disease resistance gene facilitates a rapid and sustained increase in cytosolic calcium that is necessary for the oxidative burst and hypersensitive cell death. *The Plant Journal* **23**, 441-450.
- Guo W, Ye Z, Wang G, Zhao X, Yuan J, Du Y.** 2009. Measurement of oligochitosan–tobacco cell interaction by fluorometric method using europium complexes as fluorescence probes. *Talanta* **78**, 977-982.
- Hossain MS, Ye W, Hossain MA, Okuma E, Uraji M, Nakamura Y, Mori IC, Murata Y.** 2013. Glucosinolate degradation products, isothiocyanates, nitriles, and thiocyanates, induce stomatal closure accompanied by peroxidase-mediated reactive oxygen species production in *Arabidopsis thaliana*. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* **77**, 977-983.
- Huh GH, Damsz B, Matsumoto TK, Reddy MP, Rus AM, Ibeas JI, Narasimhan ML, Bressan RA, Hasegawa PM.** 2002. Salt causes ion disequilibrium-induced programmed cell death in yeast and plants. *Plant J* **29**, 649-659.
- Jammes F, Leonhardt N, Tran D, Bousserouel H, Véry AA, Renou JP, Vavasseur A, Kwak JM, Sentenac H, Bouteau F.** 2014. Acetylated 1, 3-diaminopropane antagonizes abscisic acid-mediated stomatal closing in *Arabidopsis* (97). *The Plant Journal*.
- Jeannette E, Rona JP, Bardat F, Cornel D, Sotta B, Miginiac E.** 1999. Induction of RAB18 gene expression and activation of K⁺ outward rectifying channels depend on an extracellular perception of ABA in *Arabidopsis thaliana* suspension cells. *Plant Journal* **18**, 13-22.
- Kadono T, Tran D, Errakhi R, Hiramatsu T, Meimoun P, Briand J, Iwaya-Inoue M, Kawano T, Bouteau F.** 2010. Increased anion channel activity is an unavoidable event in ozone-induced programmed cell death. *PLoS One* **5**, e13373.
- Kadono T, Yamaguchi Y, Furuichi T, Hirono M, Garrec JP, Kawano T.** 2006. Ozone-induced cell death mediated with oxidative and calcium signaling pathways in tobacco Bel-W3 and Bel-B cell suspension cultures. *Plant signaling & behavior* **1**, 312.
- Kawano T, Sahashi N, Takahashi K, Uozumi N, Muto S.** 1998. Salicylic acid induces extracellular superoxide generation followed by an increase in cytosolic calcium ion in tobacco suspension culture: the earliest events in salicylic acid signal transduction. *Plant and Cell Physiology* **39**, 721-730.
- Kim BG, Waadt R, Cheong YH, Pandey GK, Dominguez-Solis JR, Schultke S, Lee SC, Kudla J, Luan S.** 2007. The calcium sensor CBL10 mediates salt tolerance by regulating ion homeostasis in *Arabidopsis*. *Plant J* **52**, 473-484.
- Knight H, Trewavas AJ, Knight MR.** 1997. Calcium signalling in *Arabidopsis thaliana* responding to drought and salinity. *The Plant Journal* **12**, 1067-1078.
- Krieger-Liszkay A.** 2005. Singlet oxygen production in photosynthesis. *Journal of Experimental Botany* **56**, 337-346.
- Kurkdjian A, Bouteau F, Pennarun AM, Convert M, Cornel D, Rona JP, Bousquet U.** 2000. Ion currents involved in early Nod factor response in *Medicago sativa* root hairs: a discontinuous single-electrode voltage-clamp study. *Plant Journal* **22**, 9-17.

- Lecourieux D, Ranjeva R, Pugin A.** 2006. Calcium in plant defence-signalling pathways. *New Phytologist* **171**, 249-269.
- Li ZS, Delrot S.** 1987. Osmotic dependence of the transmembrane potential difference of broadbean mesocarp cells. *Plant Physiol* **84**, 895-899.
- Lin J, Wang Y, Wang G.** 2006. Salt stress-induced programmed cell death in tobacco protoplasts is mediated by reactive oxygen species and mitochondrial permeability transition pore status. *J Plant Physiol* **163**, 731-739.
- Maeno E, Ishizaki Y, Kanaseki T, Hazama A, Okada Y.** 2000. Normotonic cell shrinkage because of disordered volume regulation is an early prerequisite to apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **97**, 9487-9492.
- Meimoun P, Tran D, Baz M, Errakhi R, Dauphin A, Lehner A, Briand J, Biligui B, Madiona K, Beaulieu C.** 2009. Two different signaling pathways for thaxtomin A-induced cell death in Arabidopsis and tobacco BY2. *Plant Signal Behav* **4**, 142-144.
- Murata T, Goshima F, Yamauchi Y, Koshizuka T, Takakuwa H, Nishiyama Y.** 2002. Herpes simplex virus type 2 US3 blocks apoptosis induced by sorbitol treatment. *Microbes and infection* **4**, 707-712.
- Negi J, Matsuda O, Nagasawa T, Oba Y, Takahashi H, Kawai-Yamada M, Uchimiya H, Hashimoto M, Iba K.** 2008. CO₂ regulator SLAC1 and its homologues are essential for anion homeostasis in plant cells. *Nature* **452**, 483-486.
- Niswander JM, Dokas LA.** 2007. Hyperosmotic stress-induced caspase-3 activation is mediated by p38 MAPK in the hippocampus. *Brain research* **1186**, 1-11.
- Pandolfi C, Pottosin I, Cuin T, Mancuso S, Shabala S.** 2010. Specificity of polyamine effects on NaCl-induced ion flux kinetics and salt stress amelioration in plants. *Plant Cell Physiol* **51**, 422-434.
- Parre E, Ghars MA, Leprince A-S, Thiery L, Lefebvre D, Bordenave M, Richard L, Mazars C, Abdelly C, Savouré A.** 2007a. Calcium signaling via phospholipase C is essential for proline accumulation upon ionic but not nonionic hyperosmotic stresses in Arabidopsis. *Plant physiology* **144**, 503-512.
- Parre E, Ghars MA, Leprince AS, Thiery L, Lefebvre D, Bordenave M, Richard L, Mazars C, Abdelly C, Savouré A.** 2007b. Calcium signaling via phospholipase C is essential for proline accumulation upon ionic but not nonionic hyperosmotic stresses in Arabidopsis. *Plant Physiol* **144**, 503-512.
- Ranf S, Wunnenberg P, Lee J, Becker D, Dunkel M, Hedrich R, Scheel D, Dietrich P.** 2008. Loss of the vacuolar cation channel, AtTPC1, does not impair Ca²⁺ signals induced by abiotic and biotic stresses. *Plant J* **53**, 287-299.
- Reboutier D, Frankart C, Briand J, Biligui B, Rona J-P, Haapalainen M, Barny M-A, Bouteau F.** 2007. Antagonistic action of harpin proteins: HrpWea from *Erwinia amylovora* suppresses HrpNea-induced cell death in Arabidopsis thaliana. *Journal of cell science* **120**, 3271-3278.
- Rkanofsky J.** 2000. [6] Assay for singlet-oxygen generation by peroxidases using 1270-nm chemiluminescence. *Methods in enzymology* **319**, 59-67.
- Rona J-P.** 2009. Intracellular Ca²⁺ stores could participate to abscisic acid-induced depolarization and stomatal closure in Arabidopsis thaliana. *Plant signaling & behavior* **4**, 830-835.
- Shabala S.** 2000. Ionic and osmotic components of salt stress specifically modulate net ion fluxes from bean leaf mesophyll. *Plant, cell & environment* **23**, 825-837.
- Shabala S.** 2009. Salinity and programmed cell death: unravelling mechanisms for ion specific signalling. *J Exp Bot* **60**, 709-712.
- Shabala S, Cuin TA.** 2008. Potassium transport and plant salt tolerance. *Physiol Plant* **133**, 651-669.
- Shabala SN, Lew RR.** 2002. Turgor regulation in osmotically stressed Arabidopsis epidermal root cells. Direct support for the role of inorganic ion uptake as revealed by concurrent flux and cell turgor measurements. *Plant physiology* **129**, 290-299.
- Sirichandra C, Gu D, Hu H-C, Davanture M, Lee S, Djaoui M, Valot B, Zivy M, Leung J, Merlot S.** 2009. Phosphorylation of the Arabidopsis AtrbohF NADPH oxidase by OST1 protein kinase. *FEBS letters* **583**, 2982-2986.
- Stief TW.** 2003. The physiology and pharmacology of singlet oxygen. *Medical hypotheses* **60**, 567-572.

- Tarr M, Valenzeno DP.** 2003. Singlet oxygen: the relevance of extracellular production mechanisms to oxidative stress in vivo. *Photochemical & Photobiological Sciences* **2**, 355-361.
- Tester M, Davenport R.** 2003. Na⁺ tolerance and Na⁺ transport in higher plants. *Annals of Botany* **91**, 503-527.
- Tsiatsiani L, Van Breusegem F, Gallois P, Zavialov A, Lam E, Bozhkov PV.** 2011. Metacaspases. *Cell Death Differ* **18**, 1279-1288.
- van Doorn WG.** 2011. Classes of programmed cell death in plants, compared to those in animals. *J Exp Bot* **62**, 4749-4761.
- van Doorn WG, Beers EP, Dangl JL, Franklin-Tong VE, Gallois P, Hara-Nishimura I, Jones AM, Kawai-Yamada M, Lam E, Mundy J, Mur LA, Petersen M, Smertenko A, Taliansky M, Van Breusegem F, Wolpert T, Woltering E, Zhivotovsky B, Bozhkov PV.** 2011. Morphological classification of plant cell deaths. *Cell Death Differ* **18**, 1241-1246.
- Wang J, Li X, Liu Y, Zhao X.** 2010. Salt stress induces programmed cell death in *Thellungiella halophila* suspension-cultured cells. *J Plant Physiol* **167**, 1145-1151.
- Wegner LH, Stefano G, Shabala L, Rossi M, Mancuso S, Shabala S.** 2011. Sequential depolarization of root cortical and stelar cells induced by an acute salt shock - implications for Na(+) and K(+) transport into xylem vessels. *Plant Cell Environ* **34**, 859-869.
- Xiong L, Schumaker KS, Zhu JK.** 2002. Cell signaling during cold, drought, and salt stress. *Plant Cell* **14 Suppl**, S165-183.
- Zhang B, Liu K, Zheng Y, Wang Y, Wang J, Liao H.** 2013. Disruption of AtWINK8 Enhances Tolerance of Arabidopsis to Salt and Osmotic Stresses via Modulating Proline Content and Activities of Catalase and Peroxidase. *Int J Mol Sci* **14**, 7032-7047.
- Zhu JK.** 2001a. Cell signaling under salt, water and cold stresses. *Curr Opin Plant Biol* **4**, 401-406.
- Zhu JK.** 2001b. Plant salt tolerance. *Trends Plant Sci* **6**, 66-71.
- Zingarelli L, Teresa Marrè M, Massardi F, Lado P.** 1999. Effects of hyper-osmotic stress on K⁺ fluxes, H⁺ extrusion, transmembrane electric potential difference and comparison with the effects of fusicoccin. *Physiologia Plantarum* **106**, 287-295.