

CRIBLE DE MUTANTS DE LA MORT CELLULAIRE PROGRAMMÉE CHEZ
ARABIDOPSIS THALIANA

Par

Abdelmadjid DJOUMAD

Thèse présentée au département de Biologie en vue
de l'obtention du grade de docteur ès sciences (Ph.D.)

FACULTÉ DES SCIENCES
UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE

Sherbrooke, Québec, Canada, Février 2010



Library and Archives
Canada

Published Heritage
Branch

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Bibliothèque et
Archives Canada

Direction du
Patrimoine de l'édition

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file *Votre référence*
ISBN: 978-0-494-64208-5
Our file *Notre référence*
ISBN: 978-0-494-64208-5

NOTICE:

The author has granted a non-exclusive license allowing Library and Archives Canada to reproduce, publish, archive, preserve, conserve, communicate to the public by telecommunication or on the Internet, loan, distribute and sell theses worldwide, for commercial or non-commercial purposes, in microform, paper, electronic and/or any other formats.

The author retains copyright ownership and moral rights in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms may have been removed from this thesis.

While these forms may be included in the document page count, their removal does not represent any loss of content from the thesis.

AVIS:

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque et Archives Canada de reproduire, publier, archiver, sauvegarder, conserver, transmettre au public par télécommunication ou par l'Internet, prêter, distribuer et vendre des thèses partout dans le monde, à des fins commerciales ou autres, sur support microforme, papier, électronique et/ou autres formats.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

Conformément à la loi canadienne sur la protection de la vie privée, quelques formulaires secondaires ont été enlevés de cette thèse.

Bien que ces formulaires aient inclus dans la pagination, il n'y aura aucun contenu manquant.


Canada

Le 5 février 2010

*le jury a accepté la thèse de Monsieur Abdelmadjid Djoumad
dans sa version finale.*

Membres du jury

Professeur Nathalie Beaudoin
Directrice de recherche
Département de biologie

Professeur Luc Gaudreau
Membre
Département de biologie

Professeure Louise Brisson
Membre externe
Département de biologie, Université de Laval

Professeure Carole Beaulieu
Présidente rapporteure
Département de biologie

SOMMAIRE

Dans le but d'apporter notre contribution à une connaissance plus large de la mort cellulaire programmée (MCP) végétale, ce projet de doctorat avait pour objectif d'identifier des gènes régulés par les UV-C et potentiellement impliqués dans la mise en place de la MCP chez *Arabidopsis thaliana*. La première approche expérimentale développée a consisté à mettre au point un outil permettant l'identification de facteurs régulant la MCP. Ceci a été réalisé à travers la mise au point d'un crible de mutants d'*A. thaliana* transformés avec le gène de la luciférase sous contrôle du promoteur du gène *AtBI-1*, impliqué dans la MCP. Parmi les plantes transformées, la lignée 4MD03 a été sélectionnée sur la base du niveau d'expression du gène de la luciférase. Des mutations ponctuelles et aléatoires à l'EMS (ethylméthane sulfonate) ont été générées par la suite afin d'isoler des mutants dérégulés dans des voies de signalisation menant à la MCP. Parallèlement à la mise au point du crible, l'analyse fonctionnelle de la région promotrice du gène *AtBI-1* a été initiée à travers une série de délétions, afin d'identifier des éléments essentiels pour la régulation de l'expression de ce gène dans des conditions de MCP. Ces délétions fusionnées au gène rapporteur GUS ont été introduites dans *A. thaliana* et ont permis d'identifier la région responsable de la régulation du promoteur. Enfin, une collection de mutants d'*A. thaliana* contenant le gène de la luciférase, sans promoteur, a été criblée en utilisant les UV-C comme inducteur de MCP. Ce crible a permis d'identifier la lignée TL-72H qui présente une insertion dans la région 5'UTR du gène *Trx fl*, un gène codant pour une thioredoxine chloroplastique. Ce gène est fortement réprimé suite au traitement aux UV-C et son expression dans le mutant TL-72H est fortement réduite par la présence de l'insertion. Les différentes expériences réalisées ont permis de montrer que le gène *Trx fl* a un impact sur le niveau de mortalité des plantules en réponse aux UV-C. La perte précoce d'expression de ce gène dans le mutant entraîne une MCP plus importante suite à un traitement aux UV-C. De plus, la protéine Trx fl est capable d'atténuer la mort induite par le facteur pro-apoptotique Bax dans la levure. Enfin, le mutant TL-72H se révèle plus sensible au méthyl viologen, un herbicide qui induit la MCP à travers la production de ROS au niveau des chloroplastes. Tous ces résultats suggèrent pour la

première fois que *Trx fl* pourrait être impliqué dans la MCP chez les plantes à travers un possible contrôle de la production de ROS par les chloroplastes.

REMERCIEMENTS

Je tiens d'abord à remercier ma directrice de thèse, la Dre Nathalie Beaudoin pour m'avoir encadré tout au long ce doctorat. Merci pour ton accueil, ton soutien et ta confiance malgré les nombreuses difficultés rencontrées en chemin.

Je voudrais également remercier mes conseillers, la Dre Carole Beaulieu et le Dr Luc Gaudreau pour leurs conseils et pour l'évaluation de ce travail. Je remercie également la Dre Louise Brisson d'avoir accepté d'être l'évaluatrice externe de mon jury de thèse.

Je souhaite remercier tous les membres passés et actuels du laboratoire pour leur soutien et leur bonne humeur. Un merci particulier aux nombreux stagiaires qui ont participé à ce projet. Je n'oublie pas les membres du laboratoire du Dr Kamal Bouarab, pour leur disponibilité et leur soutien. Je remercie plus particulièrement Kamal pour son amitié, ses nombreuses idées et son aide dans les moments difficiles. Merci également à Mohamed, pour sa disponibilité et son aide au cours de la rédaction de ce manuscrit.

Je voudrais remercier chaleureusement ma famille que j'ai « abandonnée » en France pour vivre l'aventure du Québec. Je pense plus particulièrement à ma Mère qui m'a encouragée à poursuivre, malgré la distance, et pour son réconfort. Je remercie tendrement ma femme Hui, qui m'a accompagné tout au long de ce doctorat. Merci pour ta patience et ton soutien indéfectible en dépit des trop nombreuses difficultés rencontrées en cours de route. Un gros merci également à ma fille Sara, pour sa joie de vivre et son énergie.

Pour terminer, je souhaite rendre hommage à mon défunt Père, disparu au cours de ce doctorat. Je te dédie, Papa, ce modeste travail. Malgré les difficultés, j'ai été jusqu'au bout afin que ta confiance et ta fierté soient justifiées. Merci, pour ton amour, et tes sacrifices. Cet accomplissement, c'est, avant tout, à toi que je le dois.

TABLE DES MATIÈRES

SOMMAIRE.....	ii
REMERCIEMENTS.....	iv
LISTE DES ABRÉVIATIONS	x
LISTE DES TABLEAUX	xv
LISTE DES FIGURES	xvi
LISTE DES FIGURES	xvi
INTRODUCTION	1
A. LA MORT CELLULAIRE PROGRAMMÉE.....	1
A.1. Préambule	1
A.2. Description de l'apoptose animale.....	3
A.3. Mécanismes fondamentaux de l'apoptose	6
A.3.1. Les caspases.....	6
A.3.1.1. La voie intrinsèque.....	9
A.3.1.2. La voie extrinsèque.....	9
A.3.2. Les membres de la famille Bcl-2	12
A.4. Un autre type de MCP : la mort de type autophagique.....	14
A.5. La mort cellulaire programmée chez les végétaux	17
A.5.1. La MCP au cours du développement.....	18
A.5.2. La MCP au cours de la réponse hypersensible	22
A.5.3. La MCP en réponse à des stress abiotiques (UV-C).....	26
A.5.4. Mécanismes communs entre la MCP végétale et l'apoptose.....	30
A.5.4.1. Les activités de type « caspase-like »	31
A.5.4.2. Le clivage de la poly (ADP-ribose) polymérase.....	34
A.5.4.3. Le relâchement du cytochrome <i>c</i>	35
A.5.4.4. Expression de facteurs animaux anti et pro-apoptotiques	36
A.5.4.5. Les homologues de gènes animaux identifiés chez les plantes	39
A.5.4.5.1. Le gène <i>AtBI-1</i>	40
A.5.4.5.2. Le gène <i>AtDAD-1</i>	48

A.5.5.	Cdf-1, ou l'équivalent de Bax chez les plantes ?.....	50
A.5.6.	Les mutants connus de la MCP.....	51
B.	LES THIORÉDOXINES (TRX)	54
B.1.	Rôle général des Trxs	54
B.2.	Les Trxs végétales	55
B.3.	Trxs animales et apoptose.....	58
C.	OBJECTIFS DE RECHERCHE.....	60
	CHAPITRE 1.....	62
	MATÉRIELS ET MÉTHODES	62
1.1.	MATÉRIEL BIOLOGIQUE ET CONDITIONS DE CULTURE	62
1.1.1.	Milieux de culture.....	62
1.1.2.	Matériel végétal	62
1.1.3.	Microorganismes	63
1.2.	PLASMIDES ET CONSTRUCTIONS	64
1.2.1.	Clonage du promoteur du gène <i>AtBI-1</i>	65
1.2.2.	Les délétions du promoteur du gène <i>AtBI-1</i>	67
1.2.2.1.	Clonage du promoteur	67
1.2.2.2.	Clonage des fragments <i>BglII_A-BspHI</i> et <i>BglII_B-BspHI</i>	68
1.2.2.3.	Clonage du fragment <i>EcoRI-BspHI</i>	68
1.2.2.4.	Clonage du fragment <i>HindIII-BspHI</i>	68
1.2.3.	Sur-expression du gène <i>Trx fl</i>	68
1.2.3.1.	Sur-expression dans les plantes	68
1.2.3.2.	Sur-expression dans la levure	69
1.3.	TRANSFORMATION DES LEVURES	69
1.4.	ESSAI DE FONCTIONNALITÉ DANS LA LEVURE	70
1.5.	TRANSFORMATION DES PLANTES ET SÉLECTION.....	70
1.6.	ANALYSE DE SÉGRÉGATION ET SÉLECTION DES HOMOZYGOTES.....	71
1.7.	DETERMINATION DU NOMBRE D'INSERTION	71
1.8.	INDUCTION DE LA MCP PAR LES UV-C	71

1.9.	MISE EN ÉVIDENCE DE LA MCP	72
1.9.1.	Coloration au bleu d'Evans.....	72
1.9.2.	Dosage au bleu d'Evans.....	72
1.9.3.	Dosage de la chlorophylle.....	72
1.9.4.	Fragmentation de l'ADN génomique	73
1.9.4.1.	Extraction de l'ADN génomique	73
1.9.4.2.	Préparation de la sonde	74
1.9.4.3.	Buvar dage de type Southern.....	74
1.9.4.4.	Quantification des dépôts au phosphoimager	74
1.9.5.	Analyse phénotypique (dégradation de la chlorophylle)	75
1.9.6.	Essais de germination sur méthyl viologen	75
1.9.7.	Microscopie à fluorescence	76
1.10.	ANALYSES TRANSCRIPTIONNELLES	76
1.10.1.	Extraction d'ARN totaux.....	76
1.10.1.1.	Méthode utilisée pour les RT-PCR.....	76
1.10.1.2.	Méthode utilisée pour les buvardages de type Northern.....	77
1.10.2.	RT-PCR	77
1.10.3.	Buvar dages de type Northern	78
1.11.	LE CRIBLE DE MUTANTS.....	79
1.11.1.	Principe du crible de mutants basé sur le promoteur du gène <i>AtBI-1</i>	79
1.11.2.	La collection de mutants contenant la luciférase sans promoteur	80
1.12.	DÉTECTION DE LA LUMINESCENCE	81
1.13.	QUANTIFICATION DE LA LUMINESCENCE.....	81
1.14.	CONFIRMATION DES LIGNÉES D'INTÉRÊT.....	81
1.15.	IDENTIFICATION DES JONCTIONS DE L'ADN-T	82
1.15.1.	Inverse PCR.....	82
1.15.2.	TAIL-PCR	83
1.15.3.	Séquençage et identification des sites d'insertion	87
1.16.	Détection histo chimique GUS	87

CHAPITRE 2.....	88
RÉSULTATS.....	88
2.1. MISE AU POINT D'UN CRIBLE DE MUTANT DE LA MCP BASÉ SUR LE PROMOTEUR DU GÈNE <i>ATBI-1</i> ET ANALYSE FONCTIONNELLE DE SON PROMOTEUR.....	88
2.1.1. Mise au point du crible de mutants de la MCP.....	88
2.1.1.1. Induction de la MCP.....	88
2.1.1.1.1. Mise au point des conditions d'induction aux UV-C.....	88
2.1.1.1.2. Fragmentation de l'ADN internucléosomal.....	89
2.1.1.1.3. Observation des plantes traitées aux UV-C.....	90
2.1.1.2. Sélection et clonage du promoteur du gène <i>AtBI-1</i>	92
2.1.1.2.1. Le gène <i>AtBI-1</i>	92
2.1.1.2.2. Analyse de l'expression du gène <i>AtBI-1</i>	92
2.1.1.3. Sélection du promoteur, clonage et transformation végétale.....	94
2.1.1.4. Sélection et analyse des lignées transgéniques.....	94
2.1.2. Étude fonctionnelle du promoteur du gène <i>AtBI-1</i>	100
2.1.2.1. Délétions du promoteur.....	100
2.1.2.2. Sélection et analyse des lignées transformées.....	101
2.1.2.2.1. Sélection des lignées.....	101
2.1.2.2.2. Analyse histochimique GUS.....	101
2.2. IMPLICATION DU GÈNE <i>TRX F1</i> DANS LA MCP.....	104
2.2.1. Criblage de la collection.....	104
2.2.2. Identification des mutants.....	107
2.2.3. La lignée TL-72H.....	108
2.2.3.1. Localisation de l'insertion.....	108
2.2.3.2. Vérification du nombre d'insertion.....	109
2.2.3.3. Analyse d'expression du gène <i>Trx fl</i>	111
2.2.4. Mutation du gène <i>Trx fl</i> et niveau de mortalité des plantes.....	112
2.2.5. Implication du gène <i>Trx fl</i> dans la MCP.....	118

2.2.6.	Implication du gène <i>Trx f1</i> dans le stress oxydatif	122
2.2.7.	Conclusion	123
CHAPITRE 3		125
DISCUSSION ET PERSPECTIVES		125
3.1.	MISE AU POINT DU CRIBLE DE MUTANT ET ANALYSE FONCTIONNELLE DE LA RÉGION PROMOTRICE DU GÈNE <i>ATBI-1</i>	126
3.2.	IMPLICATION DU GÈNE <i>TRX FI</i> DANS LA MCP	130
ANNEXES		137
BIBLIOGRAPHIE		139

LISTE DES ABRÉVIATIONS

acd	«accelerated cell death»
ADN	acide désoxyribonucléique
ADNc	acide désoxyribonucléique complémentaire
ADN-T	acide désoxyribonucléique transféré
Ala	alanine
Arg	arginine
ARN	acide ribonucléique
ARNm	acide ribonucléique messenger
AS	acide salicylique
ASK1	«Apoptosis Signal-regulating Kinase 1»
APAF-1	«Apoptotic Protease Activating Factor-1»
At	<i>Arabidopsis thaliana</i>
AtBI-1	« <i>A. thaliana</i> Bax inhibitor-1»
AtDAD-1	« <i>A. thaliana</i> Defender against Apoptotic Death-1»
AtMC8	<i>A. thaliana</i> métacaspase 8
Atg	«Autophagy related genes»
Avr	avirulence
BAG	«Bcl-2-Associated Athanogene»
BAR	phosphinothricine acétyltransférase
Bax	«Bcl-2 associated X»
Bcl-2	«B-cell lymphoma-2»
Bcl-xL	«B-cell lymphoma-x Long»
BD	«BAG Domain»
BH	«Bcl-2 homology domain»
BTH	benzothiodiazole
°C	degré Celsius
Ca ²⁺	ion calcium

CaMV	virus de la mosaïque du chou-fleur
CB5	cytochrome b5
CCD	«Charged Coupled Device»
Cdf-1	«Cell growth defect factor-1»
CMV	virus de la mosaïque du concombre
CPM	coup par minute
CTAB	bromure de hexadécyltriméthylammonium
Cys	cystéine
Cyt <i>c</i>	cytochrome <i>c</i>
DAB	diaminobenzidine
dCTP	désoxyribo-cytosine triphosphate
DEPC	diethyl pyrocarbonate
DISC	«death-inducing signaling complex»
DNase	désoxyribonucléase
dNTP	désoxyribo-nucleotide triphosphate
DO	densité optique
EDTA	acide éthylène diamine tétraacétique
EMS	ethylméthane sulfonate
FAH	«Fatty Acid Hydroxylase»
FDA	diacétate de fluorescéine
Fdx	ferrédoxine
FTR	ferrédoxine-thiorédoxine réductase
GAL10	gène galactose 10
GFP	«Green Fluorescent Protein»
Gln	glutamine
GLTP	«GlycoLipid Transfer Protein»
Gly	glycine
Grx	glutarédoxine
GSH	glutathione

GUS	β -glucuronidase
h	heure
H ₂ O ₂	peroxyde d'hydrogène
IAP	«Inhibitor of Apoptosis Protein»
IP	iodure de propidium
I-PCR	«Inverse-PCR»
IRE1- α	«Inositol Requiring Enzyme 1- α »
kb	kilobase
kDa	kilo Dalton
kJ/m ²	kilo Joules par mètre carré
L	litre
LB	milieu Luria-Bertani
LB	bordure gauche de l'ADN-T
lsd	«lesion simulating disease»
M	molaire, mole par litre
MAPK	«Mitogen-Activated Protein Kinase»
MAPKKK	MAPK kinase kinase
MCP	mort cellulaire programmée
MCS	site de clonage multiple
MES	morpholino éthane sulfaté
Met	méthionine
MetSO	méthionine sulfoxyde
MOPS	acide 3-(N-morpholino) propane sulfonique
MV	méthyl viologen
μ Ci	microCurie
mg	milligramme
μ g	microgramme
μ l	microlitre
ml	millilitre

mM	millimolaire
μ M	micromolaire
min	minute
MS	milieu Murashige et Skoog
MSR	méthionine sulfoxyde réductase
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NF- κ B	«Nuclear Factor-kappa B»
ng	nanogramme
nm	nanomètre
NO	oxyde nitrique
NPR	NADPH-dépendante cytochrome P450 Réductase
NPTII	néomycine phospho transferase II
NTR	NADPH-thiorédoxine réductase
NTRC	NADPH-thiorédoxine réductase chloroplastique
O_2^-	ion superoxyde
1O_2	oxygène singulet
\cdot OH	radical hydroxyle
PARP	poly ADP-ribose polymérase
pb	paire de bases
PCR	réaction de polymérisation en chaîne
PDI	protein disulfide isomerase
pmole	picomole
PMSF	phenylméthylsulfonyl fluoride
PR	«Pathogenesis Related»
Prx	péroxyredoxines
RB	bordure droite de l'ADN-T
Rcd-1	«Radical induced cell death-1»
RE	réticulum endoplasmique
RH	réaction hypersensible

RLU	«Relative Light Unit»
RNase	ribonucléase
ROS	espèces réactives de l'oxygène
rpm	rotation par minute
RT	transcription inverse
SIMP	«Soluble Inter-membrane Mitochondrial Proteins»
SDS	dodécyl sulfate de sodium
sec	seconde
TAE	tris acétate-EDTA
TAIL-PCR	«Thermal Asymmetric Interlaced-PCR»
TE	tris-EDTA
TPI	triose phosphate isomérase
Tris	tri-(hydroxyméthyl)-aminométhane
Trx	thiorédoxine
TUNEL	«Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick End Labelling»
UPR	«Unfolded Protein Response»
UTR	région non traduite
UV-C	ultraviolet-c
VPE	«Vacuolar Processing Enzyme»
v/v	volume/volume
X-Gluc	acide 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronide
X-IAP	«X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein»
YNB	«Yeast Nitrogen Base»

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Liste des microorganismes utilisés.	63
Tableau 2. Liste des vecteurs utilisés pour les différentes constructions.	64
Tableau 3. Liste des amorces utilisées pour la PCR.	66
Tableau 4. Conditions utilisées pour les PCR.	78
Tableau 5. Conditions utilisées pour la I-PCR.	83
Tableau 6. Conditions utilisées pour la 1 ^{ère} ronde de TAIL-PCR.	85
Tableau 7. Conditions utilisées pour la 2 ^{ème} ronde de TAIL-PCR.	86
Tableau 8. Conditions utilisées pour la 3 ^{ème} ronde de TAIL-PCR.	86
Tableau 9. Identification du site d'insertion dans les 10 lignées après séquençage des jonctions.	108
Tableau 10. Composition du tampon d'extraction d'ADN.	137
Tableau 11. Composition du tampon de préhybridation et d'hybridation pour les buvardages de type Southern.	137
Tableau 12. Composition des solutions et conditions de lavage pour les buvardages de type Southern.	137
Tableau 13. Composition du tampon d'extraction d'ARN.	138
Tableau 14. Composition du tampon de préhybridation et d'hybridation pour les buvardages de type Northern.	138
Tableau 15. Composition des solutions et conditions de lavage pour les buvardages de type Northern.	138

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Caractéristiques morphologiques de la nécrose et de l'apoptose	5
Figure 2. Mode d'activation des caspases	8
Figure 3. Schéma descriptif des voies extrinsèques et intrinsèques de l'apoptose.....	11
Figure 4. Représentation schématique des membres de la famille Bcl-2	13
Figure 5. Caractéristiques morphologiques de la mort de type autophagique.....	15
Figure 6. Observation de la sénescence chez la plante <i>A. thaliana</i>	20
Figure 7. Réponse hypersensible en réponse à différents agents pathogènes.....	23
Figure 8. Modèle hypothétique représentant les voies de signalisation impliquées dans la mise en place de la MCP chez les plantes suite à une exposition aux UV-C	30
Figure 9. Phénotype d'une feuille d' <i>A. thaliana</i> suite à l'expression du gène <i>Bax</i>	39
Figure 10. Structure prédite des protéines BI-1 humaines et végétales dans la membrane du RE	44
Figure 11. Modèle hypothétique du fonctionnement de la protéine BI-1 au cours de la MCP végétale	47
Figure 12. Structure des protéines BAG chez <i>A. thaliana</i>	50
Figure 13. Phénotype du mutant <i>lsd1</i> après traitement au BTH.....	52
Figure 14. Phénotype du mutant <i>acd11</i>	54
Figure 15. Fonctionnement des systèmes FTR et NTR chez les plantes.....	56
Figure 16. Fonctions cellulaires des Trxs animales.....	60
Figure 17. Carte de restriction de la région promotrice du gène <i>AtBI-1</i>	67
Figure 18. Représentation schématique du modèle expérimental	79
Figure 19. Carte du vecteur pTluc.	80
Figure 20. Schéma descriptif de la technique I-PCR.....	82
Figure 21. Schéma descriptif de la technique TAIL-PCR.....	84
Figure 22. Observation de la fragmentation de l'ADN sur des plantules d' <i>A. thaliana</i> traitées aux UV-C.....	89
Figure 23. Phénotype des plantules d' <i>A. thaliana</i> traitées aux UV-C	91
Figure 24. Expression du gène <i>AtBI-1</i> chez <i>A. thaliana</i> en réponse aux UV-C	93

Figure 25. Luminescence émise par les 5 lignées transformées.....	95
Figure 26. Expression du gène <i>Luc</i> dans la lignée 3PL20D	96
Figure 27. Luminescence émise par la lignée 3PL20D	97
Figure 28. Détection de la luminescence émise par la lignée 3PL20D avec la caméra.....	98
Figure 29. Détermination du nombre d'insertion dans la lignée 4PL20D par buvardage de type Southern	99
Figure 30. Représentation schématique des différentes délétions réalisées dans la région promotrice du gène <i>AtBI-1</i>	100
Figure 31. Analyse histochimique GUS réalisée sur les lignées transformées.....	102
Figure 32. Principe du crible.....	105
Figure 33. Crible de la collection d'insertion ADN-T. Exemple avec la lignée TL-72	106
Figure 34. Confirmation de la luminescence observée avec la lignée TL-72.....	107
Figure 35. Localisation de l'insertion ADN-T dans la lignée TL-72	109
Figure 36. Détermination du nombre d'insertion présentes dans la lignée TL-72H par buvardage de type Southern.....	110
Figure 37. Analyse de l'expression du gène <i>Trx f1</i> par RT-PCR semi-quantitative	111
Figure 38. Détection de la mort cellulaire après coloration au bleu d'Evans.....	112
Figure 39. Quantification de la mortalité dans les plantes.....	113
Figure 40. Comparaison de la perte de chlorophylle entre la lignée TL-72H et le type sauvage	114
Figure 41. Observation de la dégradation de la chlorophylle en réponse aux UV-C	115
Figure 42. Détection de la mortalité dans les racines par microscopie à fluorescence.....	117
Figure 43. Analyse des profils de fragmentation de l'ADN dans la lignée TL-72H et Col-0	119
Figure 44. Expression de la protéine <i>Trx f1</i> dans la levure en présence de Bax	121
Figure 45. Analyse de la sensibilité de la lignée TL-72H au méthyl viologen.....	123

INTRODUCTION

A. LA MORT CELLULAIRE PROGRAMMÉE

A.1. Préambule

La mort cellulaire programmée (MCP) représente un concept paradoxal. En effet, malgré le fait que ce mécanisme, une fois déclenché, entraîne la mort des cellules, il se révèle en réalité indispensable au maintien de la vie. La complexité de tout organisme vivant, en particulier celle touchant aux organismes pluricellulaires, ainsi que sa conservation sont en effet hautement dépendantes de la capacité des cellules à déclencher et contrôler leur propre mort.

Toutes les cellules composant les organismes multicellulaires possèdent un programme de suicide cellulaire permettant à celles-ci de s'auto-éliminer pour favoriser la survie de l'organisme (Kimchi, 2007). Ce programme de mort cellulaire est un processus actif dont l'activité est contrôlée génétiquement, au cours duquel des cellules devenues inutiles, dysfonctionnelles ou potentiellement dangereuses pour l'organisme sont éliminées spécifiquement. L'originalité de ce mécanisme de mort repose sur le fait que la cellule n'est pas éliminée par un intervenant extérieur mais bien par elle-même. La décision de se « suicider » pour le bien de la « communauté », en l'occurrence ici l'organisme, est alors prise à la suite de différents signaux perçus par la cellule, lui indiquant de se « sacrifier ». L'exécution (au sens propre comme figuré) va alors nécessiter la régulation de l'expression d'un certain nombre de gènes ainsi que la traduction et l'activation/répression de certaines protéines qui vont intervenir dans la cascade de signalisation menant à la mort.

La MCP est donc essentielle au maintien de l'homéostasie cellulaire et intervient naturellement à toutes les étapes de la vie et du développement de l'organisme mais aussi en réponse à des facteurs extérieurs appelés communément stress biotiques et abiotiques. En réponse à ces stress et en fonction du degré d'atteinte de la cellule touchée, le déclenchement de la MCP par la cellule va conduire à sa propre élimination. Ainsi, des cellules infectées par

des agents pathogènes ou endommagées par des stress génotoxiques vont se sacrifier pour la survie de l'organisme dans son entier. Ce phénomène, qui s'apparente donc à un suicide cellulaire, a été naturellement très étudié chez les animaux où il est dans les faits souvent assimilé à l'apoptose. Cette dernière représente en réalité un type de MCP parmi d'autres même si c'est la forme la plus rencontrée.

Certaines maladies et non des moindres comme le cancer, où certaines cellules deviennent « immortelles » et prolifèrent de manière anarchique à la suite de mutations, peuvent être la conséquence d'une dérégulation de ce programme de mort. Dans ce cas de figure, les cellules tumorales ont subi des mutations génétiques entraînant, entre autres, leur incapacité à mettre en place la mort cellulaire. A l'inverse, des maladies neurodégénératives comme les maladies de Parkinson ou d'Alzheimer, présentent une apoptose cellulaire précoce (Thompson, 1995; Duke *et al.*, 1996; Behl, 2000).

En ce qui concerne le règne végétal, la MCP a également un rôle prépondérant notamment lors d'évènements majeurs tels que l'embryogénèse, la sénescence, la formation des vaisseaux conducteurs du xylème (Greenberg, 1996) ou encore lors de la réponse hypersensible (RH). Cette dernière apparaît dans certains cas particuliers d'interaction avec des agents pathogènes et représente en fait un mécanisme original de défense de la plante au cours duquel les cellules infectées vont organiser leur propre suicide pour limiter la propagation de l'infection (Greenberg, 1997).

Dans les faits, l'étude et la compréhension de la MCP chez les plantes n'ont pas suscité autant d'intérêt que l'étude de l'apoptose. Pourtant, depuis quelques années, un regain d'intérêt est apparu, étroitement lié à des intérêts d'ordre agronomique et économique visant à améliorer la résistance contre les agents pathogènes ou alors mieux contrôler la sénescence au cours de l'entreposage des récoltes ou du transport des marchandises.

De plus nombreuses publications scientifiques ont laissé croire à des avancées sur le sujet. Malgré cela, les connaissances demeurent en réalité assez incomplètes. La connaissance de l'apoptose et les outils mis en place dans ce but ont souvent servi de base de travail pour essayer de décrypter les mécanismes régissant la MCP végétale. En effet, certains mécanismes s'apparentent à l'apoptose animale mais les végétaux paraissent tout de même présenter des caractéristiques bien distinctes. Le fait de retrouver des mécanismes communs entre les deux règnes peut s'expliquer par la possibilité d'avoir partagé originellement un ancêtre commun. Maintenant, il est clair que végétaux et animaux ont évolué séparément, ce qui suggère la mise en place de mécanismes différents quant au contrôle et à l'exécution de la MCP.

Bien qu'il existe plusieurs types de MCP chez les animaux et les plantes, il serait long d'en décrire toutes les formes connues. Dans le cadre des travaux effectués au cours de ce doctorat, les UV-C ont été utilisés afin d'induire la MCP chez *Arabidopsis thaliana*. Dans ce contexte, la MCP mise en place par les UV-C s'apparente, par certains aspects, à une mort de type apoptotique. Elle présente en effet certaines des caractéristiques typiques de l'apoptose comme la condensation du noyau et la fragmentation de l'ADN (Danon et Gallois, 1998) ou encore des activités dites « caspase-like » (Danon *et al.*, 2004). Pour cette raison, une description générale de l'apoptose sera faite au cours de cette introduction avant de décrire les connaissances actuelles concernant la MCP chez les plantes ainsi que les points communs entre les deux. Enfin, ces travaux de doctorat nous ayant amené à évaluer l'implication éventuelle de la thiorédoxine de type f1 dans la MCP, un résumé des connaissances actuelles concernant les thiorédoxines sera également présenté.

A.2. Description de l'apoptose animale

L'apoptose représente un type particulier de MCP, basé à l'origine sur des critères morphologiques (Kerr *et al.*, 1972). Depuis, ce phénomène a été largement étudié tant au niveau génétique et biochimique et décrit à maintes reprises chez les animaux. A l'origine, ce terme était utilisé pour faire la distinction entre les cellules qui mourraient par nécrose, et

celles qui mourraient en présentant certaines caractéristiques morphologiques dont la plus visible est la formation de corps apoptotiques, sortes de protubérances qui se forment à la surface de la cellule. Cette mort cellulaire a été observée pour la première fois sur des tissus vivants, en microscopie électronique (Kerr *et al.*, 1972). Il est intéressant de noter que l'étymologie du terme « apoptose » a une origine très ancienne. En effet, il provient d'un mot grec qui désignait la chute programmée des feuilles en automne (*apo* - au loin et *ptosis* - chute).

L'apoptose chez les animaux s'exprime par des modifications morphologiques caractéristiques comme la condensation de la cellule, du noyau et de la chromatine, la rupture puis la fragmentation du noyau et du cytoplasme, résultant en la formation de corps apoptotiques composés des éléments cellulaires, de cytoplasme et de matériel nucléaire (Kerr, 2002). Ces bourgeonnements de la cellule seront par la suite relâchés puis éliminés par les cellules avoisinantes ou les macrophages environnants sans aucune réaction inflammatoire (Budihardjo *et al.*, 1999; Savill et Fadok, 2000).

Depuis ces premières observations morphologiques, d'autres modifications ont pu être mises en évidence comme les dommages occasionnés à la mitochondrie ou la fragmentation de l'ADN internucléosomal. Ces fragments d'ADN, multiples de 180 pb, correspondent en fait à la longueur de l'ADN enroulé autour des octamères d'histones et qui forment un nucléosome (Wyllie, 1980; Wyllie *et al.*, 1984). Cette fragmentation est le résultat de l'activation d'endonucléases comme CAD/DFF40 (Samejima *et al.*, 2001); NUC 18 (Mittler et Lam, 1996), la DNase I (Mittler et Lam, 1996) et la DNase II (Ferri et Kroemer, 2000), activées par des caspases et qui dégradent ainsi l'ADN entre les nucléosomes, au cours de l'apoptose, l'ADN associé aux histones dans les nucléosomes étant protégé de l'action des nucléases (Gaido et Cidlowski, 1991; Walker et Sikorska, 1997; Counis et Torriglia, 2000). Cette étape représente un des événements les plus marquants et préfigure le point de non retour.

Le phénomène d'apoptose représente donc un démantèlement en règle de la cellule, organisé et contrôlé de manière active. Les corps apoptotiques sont ensuite phagocytés (Figure 1). La

redistribution de la phosphatidylsérine, notamment son extériorisation sur le feuillet externe de la membrane plasmique au cours de l'apoptose représente le signal permettant la reconnaissance par les macrophages (Fadok *et al.*, 1992, 2000). Ce suicide cellulaire, à l'instar des autres formes de MCP, contraste fortement avec la nécrose (Figure 1), où la mort de la cellule, non contrôlée, souvent accidentelle, entraîne une rupture de la membrane cytoplasmique et une dégradation aléatoire de l'ADN (Proskuryakov *et al.*, 2002). La cellule se vide alors de son contenu cellulaire dans le milieu environnant, provoquant des dommages pour les tissus avoisinants (Bicknell et Cohen, 1995; Dong *et al.*, 1997) et déclenchant alors une réaction inflammatoire.

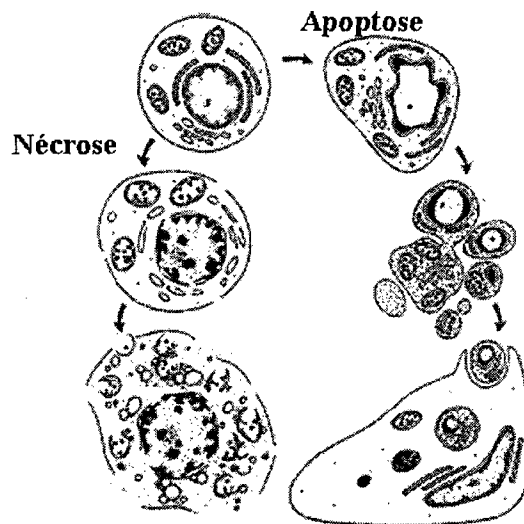


Figure 1. Caractéristiques morphologiques de la nécrose et de l'apoptose. Tiré de Kerr *et al.*, 1995. La nécrose est caractérisée par un gonflement de la cellule, suivie d'une rupture de la membrane cytoplasmique. Le relâchement du contenu cellulaire dans le milieu environnant entraîne l'apparition d'une réaction inflammatoire. La mort par apoptose est caractérisée par la condensation de la cellule et la formation de corps apoptotiques, phagocytés par les macrophages (pas de réaction inflammatoire).

Le phénomène d'apoptose représente donc la forme de MCP qui est prédominante au niveau des cellules animales. Sans être exhaustif, il est important de rappeler qu'il existe également d'autres types de MCP (Okada et Mak, 2004) qui peuvent être mises en place par les cellules selon les circonstances, notamment la MCP de type autophagique, retrouvée aussi bien chez les animaux, les plantes ou la levure. D'ailleurs, depuis quelques années, suite à la meilleure compréhension des mécanismes inhérents à la mort cellulaire chez les animaux, celle-ci a été classée en 3 grands groupes (Loskshin et Zakeri, 2004): l'apoptose ou type I, la mort cellulaire de type autophagique ou type II et la nécrose, affiliée au type III.

A.3. Mécanismes fondamentaux de l'apoptose

Plusieurs effecteurs de l'apoptose ont été identifiés au niveau moléculaire et les principaux ont été classés dans 2 grandes familles : les caspases et les protéines membres de la famille Bcl-2.

A.3.1. Les caspases

Les caspases (cysteiny-l-aspartate-cleaving-proteases) sont des protéines qui possèdent un résidu cystéine au niveau de leur site catalytique conservé. Ces protéinases présentent toutes un domaine peptidique conservé de 5 acides aminés au niveau du site actif de type QACXG (Gln-Ala-Cys-X-Gly), ou X correspond à R (Arg), Q ou G (Earnshaw *et al.*, 1999). Elles présentent une activité protéinase et leurs cibles sont clivées après un résidu aspartate (Alnemri *et al.*, 1996; Ho et Hawkins, 2005). Quinze gènes codant pour des caspases ont été identifiés et clonés chez les animaux. Parmi celles-ci, on distingue les caspases initiatrices et les caspases effectrices.

Les caspases initiatrices (caspases 2, 8, 9, et 10) sont actives sous forme de monomère et ont un rôle déterminant au cours de la phase d'induction ou phase précoce de l'apoptose. Elles sont en effet chargées d'initier et de transmettre le signal de mort par l'activation d'autres caspases.

Les caspases effectrices (caspases 3, 6 et 7) forment des hétérodimères et ont pour fonction de cliver des protéines comme certaines protéines du cytosquelette ou encore la PARP (poly ADP-ribose polymérase), qui est impliquée dans la réparation de l'ADN. L'intégrité de ces substrats étant essentielle à la survie de la cellule (Degterev *et al.*, 2003), leur dégradation contribue au démantèlement cellulaire.

En ce qui concerne la PARP, il est important de mentionner que son clivage est utilisé afin de mettre en évidence l'apoptose. La PARP est une protéine présente en abondance dans le noyau des cellules animales et végétales. Cette enzyme nucléaire est activée par les cassures de l'ADN. Elle catalyse le transfert d'ADP-ribose à différentes protéines nucléaires (D'Amours *et al.*, 2001). La fonction de la PARP concerne essentiellement la réparation de l'ADN, mais elle intervient aussi dans la réplication et le maintien de l'intégrité du génome après des dommages causés à l'ADN. Au cours de l'apoptose, la PARP (113 kDa) est dégradée pour former deux fragments de 24 et 89 kDa. Chez les animaux, ce clivage est effectué par la caspase-3 et représente un des événements caractéristiques de l'apoptose animale.

Les caspases sont présentes dans la cellule sous forme zymogène ou procaspase (précurseur inactif), c'est-à-dire avec une activité enzymatique intrinsèque restreinte (Alnemri *et al.*, 1996) et sont donc régulées au niveau post-traductionnel, par clivage (Figure 2). Lorsqu'elles sont activées, elles se présentent sous la forme d'un hétéro-tétramère composé de deux sous-unités identiques d'environ 20 kDa (prodomaine) en N-terminal, associées à deux autres sous-unités également identiques d'environ 10 kDa qui constituent le domaine caspase proprement dit. Les sous-unités de 20 et 10 kDa sont libérées par "trans-clivage"; ces protéolyses successives aboutissent à des réactions auto-catalytiques, c'est-à-dire qui s'amplifient de façon exponentielle (Shi, 2002; Cho et Choi, 2002). Cette réaction auto-catalytique est initiée par l'interaction d'une procaspase avec des récepteurs spécifiques chargés de transmettre le signal de mort. Les caspases responsables de ces premières réactions en chaîne sont dites initiatrices. Leur inhibition peut empêcher le signal proapoptotique de se propager. Lorsque le processus protéolytique s'amplifie, les caspases

effectrices sont à leur tour activées. L'activation des caspases entraîne ainsi l'activation d'autres caspases par clivages successifs, l'ensemble formant une cascade protéolytique conduisant à l'apoptose.

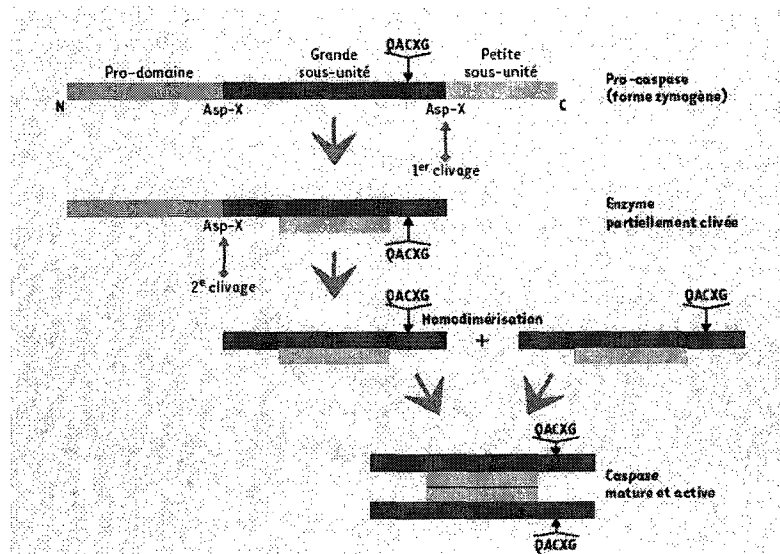


Figure 2. Mode d'activation des caspases. Dans leur forme inactive (zymogène), ces enzymes sont constituées d'un prodomaine, d'une grande sous-unité (portant le site catalytique) et d'une petite sous-unité. Leur clivage en deux étapes successives, libérant d'abord la petite sous-unité puis la grande, conduit à la formation de la forme active de l'enzyme: deux hétérodimères composés chacun de l'association des deux sous-unités, et comprenant donc deux sites catalytiques. Tiré de Couzinet *et al.*, 2002.

Il existe deux voies principales d'activation des caspases. Une voie intrinsèque qui passe par une activation des caspases suite à la libération du cytochrome *c* (cyt *c*) au niveau de la mitochondrie et une voie extrinsèque activée par des récepteurs membranaires spécialisés (Rupinder *et al.*, 2007).

A.3.1.1. La voie intrinsèque

La voie intrinsèque ou mitochondriale (Figure 3) conduisant à l'apoptose, implique l'activation de protéines pro-apoptotiques. Celles-ci peuvent être activées par différents signaux comme par exemple des dommages à l'ADN causés par des stress génotoxiques comme les UV-C (Kulms et Schwarz, 2000) ou ceux causés par des agents chimiques comme la camptothécine (Kaufmann *et al.*, 1998; Schmitt *et al.*, 1998). La mitochondrie représente l'élément central de cette régulation. En effet, à ce niveau, le relâchement des SIMP (« Soluble Inter-membrane Mitochondrial Proteins ») dont le *cyt c* (Jin et El-Deiry, 2005; Mohamad *et al.*, 2005) dans le cytosol préfigure la première étape conduisant à l'activation des caspases. Une fois dans le cytosol, le *cyt c* interagit avec une protéine appelée APAF-1 (« Appoptotic Protease Activating Factor-1») pour former un complexe, l'apoptosome (Adrain et Martin, 2001, 2006). APAF-1 est composée de trois domaines distincts dont un présente une forte homologie de séquence avec le prodomaine de plusieurs caspases comme les caspases 1, 2 et 9. Ce domaine appelé CARD (« Caspase Recruitment Factor ») peut se lier à des caspases présentant un domaine similaire. A ce niveau, APAF-1 interagit avec la procaspase 9 (Shiozaki *et al.*, 2002). Le recrutement de la procaspase 9 et son clivage a lieu uniquement si le *cyt c* se lie à APAF-1 en présence d'ATP. L'hydrolyse d'ATP en ADP induit donc la formation d'un complexe multimérique capable alors de recruter la procaspase 9. Après protéolyse au sein de l'apoptosome, la caspase 9 active est relâchée et va pouvoir activer d'autres caspases comme la caspase 3, 6 et 7, ce qui va initier le programme de mort cellulaire (Saelens *et al.*, 2004).

A.3.1.2. La voie extrinsèque

L'autre voie d'induction de l'apoptose, qui conduit également à l'activation des caspases, après stimulation, est initiée par des récepteurs membranaires, en présence de leur ligand (Figure 3). Ces « récepteurs de mort » font partie d'une famille de protéines transmembranaires qui elle-même appartient à la super-famille des récepteurs TNFR (« Tumor Necrosis Factor Receptor ») (Beere, 2004). Un des plus importants est le récepteur

transmembranaire Fas, capable de lier une protéine appelée FasL (Fas Ligand) produite par les lymphocytes (Kaufmann *et al.*, 2002). La liaison de FasL au récepteur Fas induit son oligomérisation et le recrutement de molécules adaptatrices désignées sous le terme FADD (« Fas Associating protein with Death Domain »). Ces protéines vont alors recruter à leur tour la procaspase 8 (Muzio *et al.*, 1996, Boldin *et al.*, 1996) ou 10 (Fernandes-Alnemri *et al.*, 1996) en interagissant avec leur domaine N-terminal pour former le complexe DISC (death-inducing signaling complex). La procaspase, une fois clivée, va être libérée dans le cytosol afin d'initier la cascade de protéolyse menant à la mort cellulaire (Hirata *et al.*, 1998).

Il est important de mentionner que les deux voies peuvent être interconnectées (Figure 3). En effet, le facteur pro-apoptotique Bid peut être clivé par la caspase 8 suite à son activation au niveau du complexe DISC. Une fois clivée, la protéine Bid (tBid) peut alors interagir avec une autre protéine pro-apoptotique, Bax (voir partie 1.3.2), qui va pouvoir alors s'intégrer à la membrane mitochondriale et entraîner la libération du *cyt c* (Luo *et al.*, 1998).

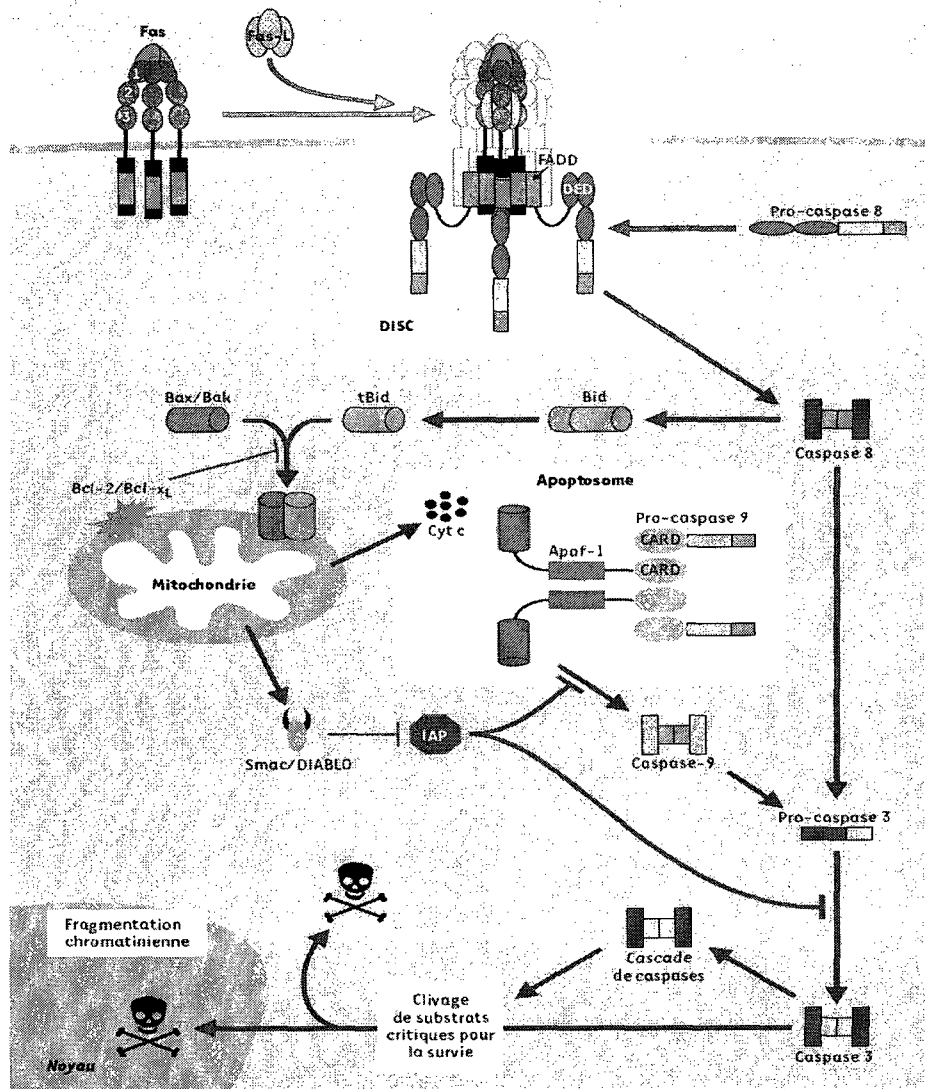


Figure 3. Schéma descriptif des voies extrinsèques et intrinsèques de l'apoptose. La voie extrinsèque, initiée par l'oligomérisation de Fas permet le recrutement de FADD et de la procaspase 8. Le complexe DISC ainsi formé entraîne le clivage de la procaspase 8 qui va alors cliver un certain nombre de caspases effectrices comme la caspase 3. La voie intrinsèque quant à elle peut être déclenchée directement, suite à l'activation de facteurs pro-apoptotiques comme Bax, ou par clivage de la molécule Bid par la caspase 8. Ceci perturbe la perméabilité de la membrane mitochondriale, conduisant au relâchement des SIMP dans le cytosol (cyt c, Smac/DIABLO...). L'interaction du cyt c avec APAF-1 conduit au recrutement de la procaspase 9 pour former l'apoptosome. Ce dernier est à l'origine de l'activation de la caspase 9, qui active à son tour la caspase 3. La protéine Smac/DIABLO inactive les IAP («Inhibitor of Apoptosis Protein») tel que X-IAP (voir partie 1.5.2.5.1) qui ont pour rôle d'inhiber l'apoptose. Adapté de Couzinet *et al.*, 2002.

A.3.2. Les membres de la famille Bcl-2

La protéine Bcl-2 (B-cell lymphoma 2) a tout d'abord été identifiée comme proto-oncogène (Tsujimoto *et al.*, 1985; Reed *et al.*, 1987; White, 1996). Par la suite, il a été montré que cette protéine était capable d'inhiber l'apoptose suite à différentes inductions et dans la plupart des types cellulaires (Yang et Korsmeyer, 1996), suggérant que Bcl-2 pourrait être le chef d'orchestre de la survie cellulaire. Suite à cette découverte, d'autres protéines de la même famille ont été identifiées. Actuellement, 25 gènes codant pour des protéines membres de la famille Bcl-2 ont été identifiés. Certaines de ces protéines peuvent avoir un rôle activateur ou pro-apoptotique comme les protéines Bax (Bcl-2-associated protein X) (Oltvai *et al.*, 1993), Bad (Bcl-xL/Bcl-2 associated death promoter) (Yang *et al.*, 1995), Bid (Bcl-2 interacting domain) (Wang *et al.*, 1996a) et Bak (Bcl-2 antagonist killer) (Kiefer *et al.*, 1995). À l'inverse, d'autres protéines de cette famille ont pour rôle d'inhiber l'apoptose et sont donc anti-apoptotiques comme les protéines Bcl-2 et Bcl-xL (B-cell lymphoma-x Long) (Boise *et al.*, 1993; Boise et Thompson, 1997, Yan et Shi, 2005). Cette famille est essentiellement associée avec la voie intrinsèque conduisant à l'apoptose. Des expériences de mutagenèse ainsi que des analyses de séquences effectuées sur ces différentes protéines ont montré que quatre régions conservées (Figure 4), essentielles à leur activité, appelées BH1, BH2, BH3 et BH4 (Bcl-2 homology domain) peuvent être présentes (Kelekar et Thompson, 1998). Certains domaines comme BH3 sont importants pour la dimérisation des protéines tandis que d'autres comme BH1 et BH2 sont essentiels pour l'hétérodimérisation (Yin *et al.*, 1994). Ces régions sont donc nécessaires pour la régulation de l'apoptose et les interactions protéine-protéine. La présence ou l'absence de certaines de ces régions au sein de la séquence protéique confère à la molécule la propriété d'être "pro" ou "anti"-apoptotique (Kelekar et Thompson, 1998; Tsujimoto et Shimizu, 2000).

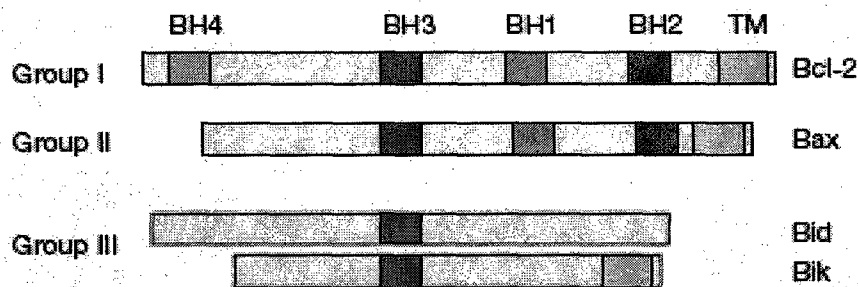


Figure 4. Représentation schématique des membres de la famille Bcl-2. BH, homologie de domaine avec Bcl-2; TM, domaine transmembranaire. Tiré de Hengartner, 2000.

Certaines de ces protéines comme Bax et Bak vont former des homodimères, qui vont pouvoir agir en formant des canaux ioniques, ouvrant ainsi des pores situés dans les membranes mitochondriales (Degli-Esposti et Dive, 2003), ce qui a pour effet de modifier leur perméabilité et permettre la libération du *cyt c* (Jurgensmeier *et al.*, 1998; Borner, 2003), de l'espace inter-mitochondrial vers le cytoplasme de la cellule. Ceci est accompagné par une forte production de ROS (espèces réactives de l'oxygène) qui interviennent dans la signalisation cellulaire au cours de l'apoptose (Green et Reed, 1998). Le *cyt c* est en effet normalement séquestré dans l'espace inter-membranaire de la mitochondrie sous forme d'holocytochrome *c*. A l'inverse, la protéine Bcl-2, localisée dans la membrane de la mitochondrie va empêcher la dimérisation de la protéine Bax et ainsi inhiber l'apoptose (Kluck *et al.*, 1997). A ce niveau, les protéines de la famille Bcl-2 ont un grand rôle de régulation et participent donc à un mécanisme de contrôle essentiel dans la régulation de l'apoptose.

Il existe donc des interactions entre les membres de cette famille, notamment les interactions entre les facteurs pro-apoptotiques comme Bax et Bak avec les facteurs anti-apoptotiques comme Bcl-2 et Bcl-xL (Zha *et al.*, 1996; Simonen *et al.*, 1997). L'expression de Bcl-xL conduit souvent à la séquestration de la protéine Bax de façon à favoriser la survie cellulaire. A l'inverse, la protéine Bad peut former des hétérodimères avec la protéine Bcl-2 afin

d'inhiber son action en l'empêchant de se lier à la protéine Bax pour réprimer l'apoptose. Au final, la vie de la cellule reflète un équilibre entre d'une part, les signaux anti-apoptotiques permettant la survie cellulaire et d'autre part, les signaux pro-apoptotiques régulant positivement l'apoptose (Sedlak *et al.*, 1995). Il semble même que les cellules soient en situation de survie, laquelle est possible si les cellules perçoivent de l'organisme auquel elles appartiennent, certains signaux comme des hormones ou des facteurs de croissance qui, en favorisant l'expression de gènes anti-apoptotiques, inhibent leur entrée en apoptose.

A.4. Un autre type de MCP : la mort de type autophagique

La mort de type autophagique, également appelée MCP de type lysosomal, s'apparente en fait à une autodigestion cellulaire (Figure 5). Ce phénomène particulier est indépendant des caspases (Shimizu *et al.*, 2004) et se caractérise au stade final par une condensation de la chromatine et des bourgeonnements de la membrane plasmique, différents des corps apoptotiques retrouvés au niveau de l'apoptose (Schwartz *et al.*, 1993; Bursch *et al.*, 2000; Okada et Mak, 2004). Ces bourgeonnements font suite à la formation des autophagosomes qui sont en fait des vacuoles autophagiques (Figure 5) se formant dans le cytoplasme, à l'intérieur même de la cellule (Mizushima *et al.*, 2002). Ces éléments sont capables de séquestrer la totalité ou une partie des constituants cellulaires incluant les organelles puis vont fusionner avec les lysosomes pour former des autolysosomes. Ces derniers ont pour rôle de dégrader le contenu emprisonné à l'aide d'enzymes hydrolytiques présentes dans les lysosomes (Tsujimoto et Shimizu, 2005).

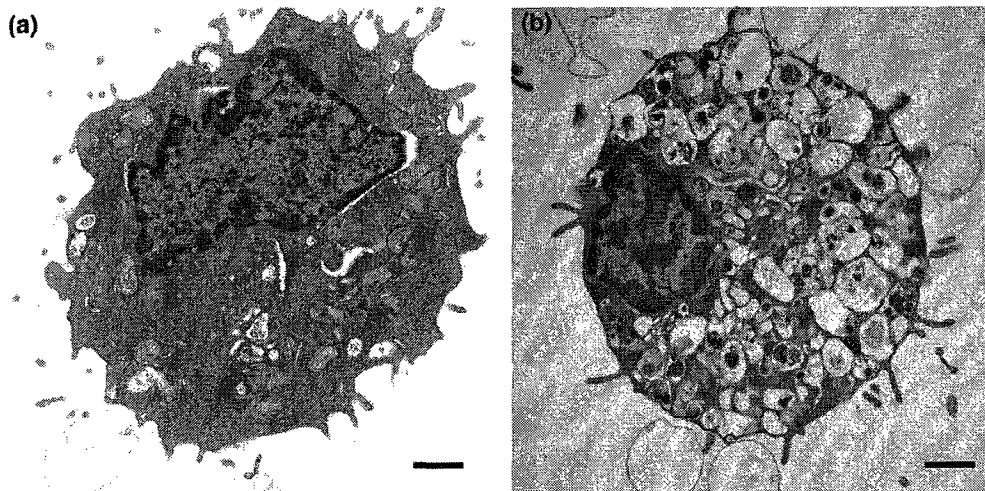


Figure 5. Caractéristiques morphologiques de la mort de type autophagique. a) cellule normale; b) mort de type autophagique. La mort de type autophagique est caractérisée par la formation de nombreuses vésicules (autophagosomes) dans le cytosol qui séquestrent le contenu cellulaire. Les autophagosomes fusionnent ensuite avec les lysosomes pour dégrader leur contenu. Tiré de Edinger et Thompson, 2004.

Au niveau basal, l'autophagie est un mécanisme catabolique qui va pouvoir au minimum permettre, à l'instar du protéasome, la dégradation de protéines, mais également de lipides et même d'organites comme les mitochondries (Kim et Klionsky, 2000; Klionsky et Emr, 2000; Shintani et Klionsky, 2004). L'autophagie représente donc un mécanisme de recyclage de nutriments, suite par exemple à une déficience en acides aminés, afin d'empêcher la mort et de favoriser la survie cellulaire (Klionsky, 2005). Ce processus est présent dans toutes les cellules eucaryotes et apparaît relativement bien conservé à travers l'évolution. Il est régulé par un certain nombre de gènes nommés *Atg* («*Autophagy related genes*») retrouvés également chez les plantes et chez la levure (Tsujiimoto et Shimizu, 2005) notamment les gènes *Atg5* et *Atg6* dont le « silencing » inhibe la formation de l'autophagosome (Shimizu *et al.*, 2004).

Différentes études réalisées montrent que ce mécanisme peut se transformer en processus de MCP (Bursch, 2001; Codogno et Meijer, 2005; Kroemer et Levine, 2008) et représenter une alternative à l'apoptose notamment dans le cas où celle-ci serait déficiente (Shimizu *et al.*, 2004). Ceci a été montré par l'utilisation d'agents cytotoxiques comme la staurosporine (inhibiteur de protéines kinases) sur des fibroblastes d'embryons de souris n'exprimant plus les gènes *Bax* et *Bak* (Shimizu *et al.*, 2004; Tsujimoto et Shimizu, 2005). De même, la sur-expression des gènes *Bcl-2* et *Bcl-xL* dans les fibroblastes de type sauvage inhibe la mise en place de l'apoptose suite au traitement mais au contraire induit la mise en place de la MCP de type autophagique, ce qui implique un éventuel contrôle par les membres de la famille Bcl-2 (Shimizu *et al.*, 2004; Levine *et al.*, 2008). Comme pour le mécanisme d'autophagie, nécessaire à la survie cellulaire, la mort de type autophagique requiert les mêmes gènes, notamment *Atg5* et *Atg6* (Shimizu *et al.*, 2004; Pyo *et al.*, 2005). Ces derniers sont fortement exprimés lorsque l'autophagie conduit à la mort de la cellule tandis que le «silencing» de ces gènes l'inhibe (Shimizu *et al.*, 2004).

Des liens au niveau moléculaire entre l'apoptose et la mort de type autophagique commencent à être mis en évidence. Ainsi, la protéine *Atg5* est capable d'interagir avec FADD pour mettre en place la mort de type autophagique (Pyo *et al.*, 2005). La protéine *Atg6*, quant à elle, identifiée initialement chez la levure (Liang *et al.*, 1999) et qui correspond en fait à la protéine animale Beclin 1, possède un domaine BH3 et peut interagir avec certains facteurs anti-apoptotiques de la famille Bcl-2, tels que *Bcl-2* et *Bcl-xL* (Oberstein *et al.*, 2007; Maiuri *et al.*, 2007; Boya et Kroemer, 2009), mais le rôle précis de cette interaction reste encore à déterminer (Boya et Kroemer, 2009). De plus, l'autophagie, comme l'apoptose, peuvent être induits par les mêmes stress et peuvent donc conduire à la mort de la cellule en coordination (Shintani et Klionsky, 2004). Notons que la mort de type autophagique est marquée par sa lenteur contrairement à l'apoptose dont l'ensemble du processus peut se dérouler en quelques heures.

A.5. La mort cellulaire programmée chez les végétaux

Chez les plantes, la MCP intervient à chaque étape de leur développement, au niveau de l'organogénèse (Fukuda, 2000) et de la morphogénèse (Gunarwadana *et al.*, 2004), et représente également un mécanisme impliqué dans les réponses aux stress biotiques (Curtis et Wolpert, 2004) et abiotiques (McCabe et Leaver, 2000).

La MCP végétale est encore loin d'être aussi bien caractérisée que l'apoptose animale. Différentes études menées chez les plantes ont montré certaines similitudes avec l'apoptose, suggérant que ce mécanisme pourrait avoir été transmis par un ancêtre commun, notamment si on fait référence au relâchement du *cyt c* au niveau de la mitochondrie, laquelle aurait selon la théorie, une éventuelle origine endosymbiotique (Blackstone et Green, 1999). En plus du relâchement du *cyt c*, observé à quelques reprises (Vacca *et al.*, 2006), d'autres travaux ont permis également de mettre en évidence certaines caractéristiques typiques de l'apoptose. La condensation de la chromatine ainsi que la fragmentation du noyau et de l'ADN internucléosomal sont également des éléments retrouvés à la fois chez les animaux et les plantes. Certaines études ont également montré l'activation de protéines dites « caspase-like » mais aucune véritable caspase n'a été identifiée. D'ailleurs, ces caractéristiques sont maintenant utilisées comme marqueurs de la MCP de type apoptotique chez les plantes.

Pourtant, malgré ces observations, il est légitime de penser que les plantes ont pu développer, au cours de leur évolution, des mécanismes régissant la MCP qui puissent leur être propres. En effet, à quelques exceptions près, qui seront présentées plus loin dans l'introduction, la grande majorité des régulateurs qui ont été identifiés au cours de l'apoptose animale tels que les membres de la famille Bcl-2 ou les caspases, n'ont jamais été retrouvés au cours de la MCP chez les plantes. De plus, les cellules végétales possèdent des caractéristiques qui leur sont propres comme la présence de la paroi, d'une large vacuole qui occupe la majorité du cytoplasme ou des chloroplastes, siège de la photosynthèse.

Comme pour les animaux, la mort de type apoptotique n'est pas le seul type de MCP qui opère chez les plantes. En effet, la présence d'une MCP de type autophagique a également été mise en évidence et se retrouve également régulée par les gènes *Atg* (Rose *et al.*, 2006; Reape *et al.*, 2008).

A.5.1. La MCP au cours du développement

Comme pour le règne animal, la MCP chez les plantes se produit de façon naturelle, tout au long de la vie de la plante et revêt une importance tout aussi majeure. Elle peut intervenir à de nombreuses étapes de leur développement (Pennell et Lamb, 1997), comme pendant l'embryogénèse (Filonova *et al.*, 2008), la sénescence (Lim *et al.*, 2007) ou encore la formation des vaisseaux conducteurs du xylème (Mittler et Lam, 1995; Fukuda, 1996, 1997, 2000; Yu *et al.*, 2002; Turner *et al.*, 2007).

Elle est donc nécessaire au bon fonctionnement et à la survie des plantes (Lam, 2004). Elle permet également d'éliminer des cellules qui étaient requises temporairement, à un temps donné, mais qui ont perdu leur utilité au niveau de l'organisme, comme par exemple les cellules de la coiffe au niveau racinaire (Wang *et al.*, 1996b), les cellules de l'aleurone dans les graines (Dominguez *et al.*, 2004), les cotylédons après la germination de la graine (Delorme *et al.*, 2000) ou encore les cellules du suspenseur au niveau embryonnaire (Lombardi *et al.*, 2007; Filonova *et al.*, 2008).

Parmi les étapes développementales dans lesquelles la MCP a un rôle primordial, on peut en distinguer une, qui est particulièrement caractéristique: la MCP qui a lieu au cours du processus de sénescence.

La sénescence, est un phénomène particulièrement important au cours du développement de la plante. Ce processus complexe qui a lieu naturellement chez les végétaux est génétiquement programmé (Coupe *et al.*, 2004). Il implique la transcription nouvelle d'un certain nombre de gènes et la traduction de protéines (Nooden *et al.*, 1997). Il représente en

fait une étape ultime du développement qui va voir mourir de façon lente, massive et programmée certains organes comme les feuilles (Figure 6) au profit d'autres parties de la plante en développement comme les graines ou les fruits (Pennell et Lamb, 1997). La sénescence permet en fait d'organiser une redistribution de nutriments, généralement à partir des feuilles âgées, vers d'autres parties de la plante comme les graines, les feuilles plus jeunes en formation ou bien les tubercules (Quirino *et al.*, 2000). En plus de remobiliser des nutriments au profit de certains organes, la sénescence représente également un moyen de réduire ou limiter les dépenses d'énergie. Elle est dépendante de facteurs endogènes à la plante comme l'âge de l'organe, des tissus affectés ou de la plante entière mais peut aussi être influencée par des facteurs externes à la plante comme les stress biotiques (infection par un agent pathogène) ou abiotiques (déficience en nutriments, UV-B, ozone, températures extrêmes) (Lim *et al.*, 2007; Love *et al.*, 2008). D'ailleurs, un certain nombre de gènes exprimés au cours de la sénescence sont également impliqués en réponse à ces stress (Lim *et al.*, 2007).

Les symptômes de la sénescence sont aisément observables, notamment au niveau foliaire lorsque les feuilles finissent par jaunir en raison de la perte de chlorophylle, pour finalement se détacher par abscission. Mais dans certains cas, la sénescence peut être plus dramatique et atteindre l'organisme dans son entier, ceci au profit des graines (Figure 6). La désorganisation des composantes cellulaires dans les tissus en sénescence entraîne une dégradation de macromolécules comme les protéines (Otegui *et al.*, 2005), les lipides membranaires (Thompson *et al.*, 1998) ou les acides nucléiques (Taylor *et al.*, 1993) menant à une mobilisation de nutriments qui seront ainsi recyclés dans les parties de la plante qui en ont besoin. Ce démantèlement cellulaire n'est pas anarchique mais ordonné. Ainsi, au niveau intracellulaire, les premiers éléments touchés sont les chloroplastes, qui passent d'une fonction anabolique à une fonction catabolique, tandis que le noyau et les mitochondries, requis respectivement pour l'expression génique et la production d'énergie sont dégradés dans les étapes ultimes de la sénescence (Lim *et al.*, 2007). Les cellules des tissus sénescents vont alors mourir par MCP pour permettre la récupération des nutriments.

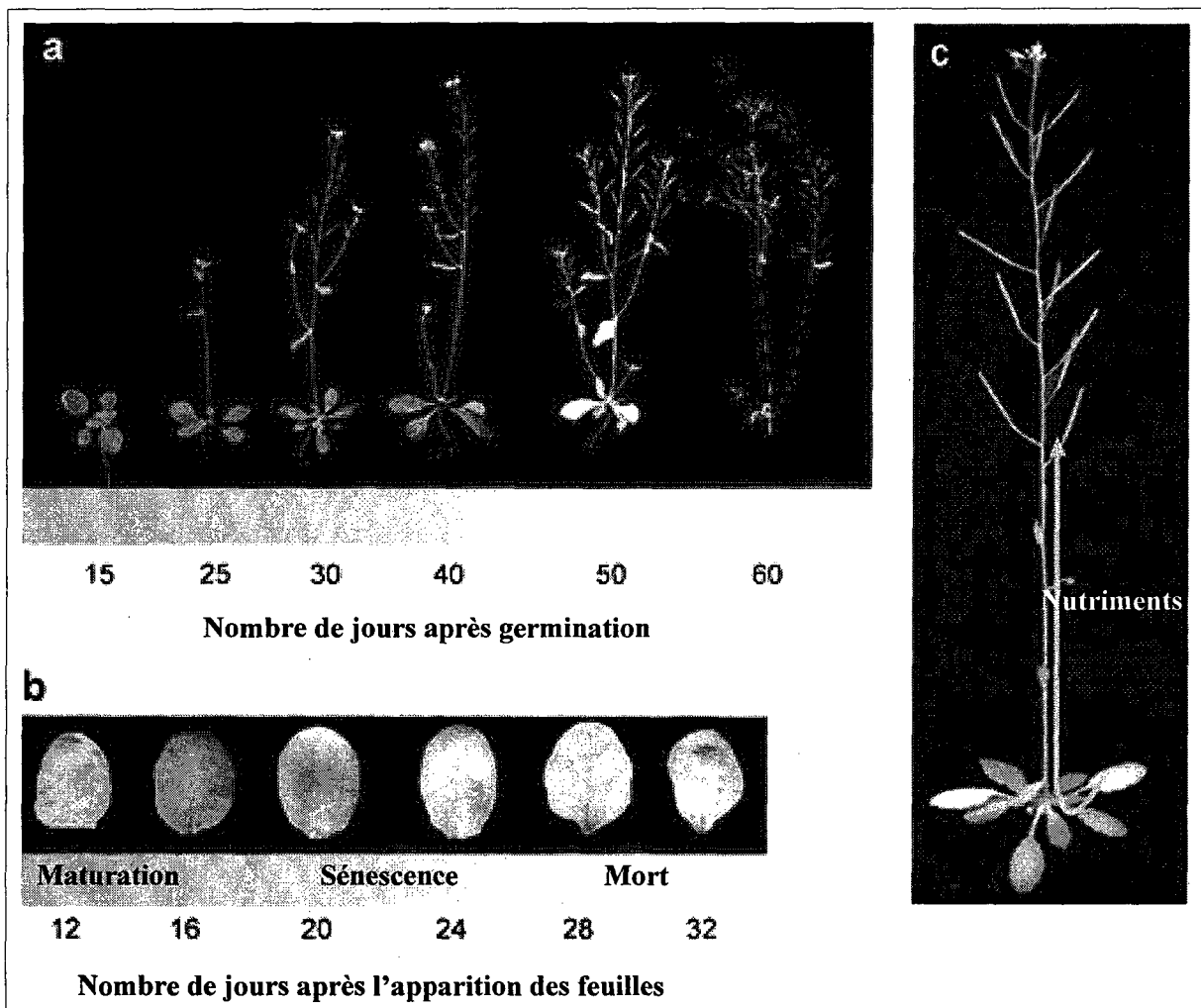


Figure 6. Observation de la sénescence chez la plante *A. thaliana*. a) Sénescence au niveau de la plante entière; b) Sénescence au niveau foliaire; c) Au cours de la sénescence, les nutriments (azote, phosphore, etc.) sont redirigés vers les autres parties de la plante en développement comme les graines. Adapté de Lim *et al.*, 2007.

Comme indiqué précédemment, le processus de sénescence nécessite une activité transcriptionnelle. C'est le cas des gènes *SAGs* (*Senescence Associated Gene*), qui ont été identifiés chez plusieurs espèces végétales dont *A. thaliana* et qui sont fortement impliqués dans le processus de sénescence. Certains gènes codent pour des facteurs de transcription, des protéines impliquées dans l'autophagie ou dans le métabolisme des lipides. D'autres

gènes, comme par exemple *SAG12*, codent pour des protéases et présentent une homologie de séquence avec des gènes codant pour des cystéines protéases (Drake *et al.*, 1996; Greenberg, 1996). Leur rôle précis n'a pas été clairement mis en évidence mais ils pourraient à l'instar des caspases dans l'apoptose animale intervenir dans une cascade conduisant à la MCP.

Les hormones végétales, importantes au cours du développement, jouent également un rôle dans le contrôle du processus de sénescence et éventuellement de la MCP qui lui est associée. Ainsi, au cours de la sénescence, les cytokinines et l'éthylène ont des rôles antagonistes. L'éthylène (Orzaez et Granell, 1997a) favorise le processus de sénescence alors que les cytokinines vont au contraire l'inhiber (Gan et Amasino, 1995; Ori *et al.*, 1999). Les gènes intervenant dans la synthèse de l'éthylène vont voir leur expression augmentée (Van der Graaff *et al.*, 2006) tandis que ceux intervenant dans la synthèse des cytokinines vont être réprimés (Buchanan-Wollaston *et al.*, 2005). D'autre part, l'acide jasmonique ainsi que son dérivé le méthyl jasmonate sont des hormones intervenant notamment dans la défense contre certains agents pathogènes et qui favorisent également le processus de sénescence des feuilles (He *et al.*, 2002). L'acide salicylique (AS) qui est une autre hormone intervenant dans la réponse contre certains agents pathogènes, serait également impliqué dans la sénescence en permettant l'activation de certains gènes *SAGs* comme par exemple *SAG12* afin de la mettre en place (Morris *et al.*, 2000).

La sénescence est un processus de dégénérescence relativement lent dans sa durée. Il est encore difficile de savoir si la MCP est enclenchée dès le départ ou si elle intervient plus tardivement dans le processus de sénescence. Les spécialistes de la question s'opposent encore à ce sujet (Reape et McCabe, 2008). De même, la mort de type autophagique ou du moins l'autophagie semble intervenir dans le processus de sénescence. Toutefois, certains aspects caractéristiques de la MCP de type apoptotique sont retrouvés pendant le processus de sénescence comme la condensation du cytoplasme et de la chromatine, la fragmentation de l'ADN (Yen et Yang, 1998; Simeonova *et al.*, 2000; Cao *et al.*, 2003; Coupe *et al.*, 2004) et le décollement de la membrane plasmique (Swidzinski *et al.*, 2002). Il est donc possible

que les deux types de mort interviennent en même temps à un moment donné du processus de sénescence.

A.5.2. La MCP au cours de la réponse hypersensible

Les plantes, comme tout organisme vivant, sont en permanence menacées par des agents pathogènes (champignons, bactéries, nématodes, virus, etc.) et ont dû développer au cours de leur évolution des moyens de défense pour y faire face. Par contre, à la différence des animaux, elles ne possèdent pas de cellules spécialisées dans leur défense ou de système immunitaire acquis, c'est-à-dire capable de s'adapter (Jones et Dangl, 2006). Au contraire, chaque cellule de la plante peut prendre part à la défense à travers ce qu'on appelle le système immunitaire inné (Dangl et Jones, 2001; Chisholm *et al.*, 2006). Ainsi, dans certains cas, les plantes hôtes peuvent reconnaître l'agent pathogène qui tente de l'infecter et activer des défenses afin d'en limiter la propagation au seul site d'infection (Greenberg, 1997).

Parmi les différents mécanismes de défense qui peuvent être mis en place par les plantes, la réponse hypersensible (RH) représente la forme la plus spectaculaire mais aussi la plus extrême (Heath, 2000; Lam *et al.*, 2001; Greenberg et Yao, 2004). Elle fait intervenir une MCP (Greenberg, 1997) au niveau de la zone d'infection qui est coordonnée avec la mise en place de réponses de défense. La RH est ainsi caractérisée par une mort rapide et localisée des cellules entourant le site d'infection (Figure 7), suite à une interaction avec certains agents pathogènes qualifiés d'avirulents (Heath, 2000; Dangl et Jones, 2001). Ce phénomène est considéré comme une MCP depuis l'analyse de mutants d'*A. thaliana* appelés « lesion mimic » qui présentent des symptômes typiques d'une RH mais sans la présence d'un agent pathogène (Mittler et Rizhsky, 2000). De plus, des activités protéolytiques « caspase-like », ont été détectées dans des plantes au cours de la RH (Del Pozo et Lam, 1998). La RH est nécessaire dans le cas des agents pathogènes biotrophes. En effet, ces derniers se développent à partir de tissus vivants et la plante va donc mettre en place la MCP au niveau des tissus infectés pour tenter d'endiguer leur propagation (Mittler *et al.*, 1997; Nürnberger, 1999; Lam, 2004).

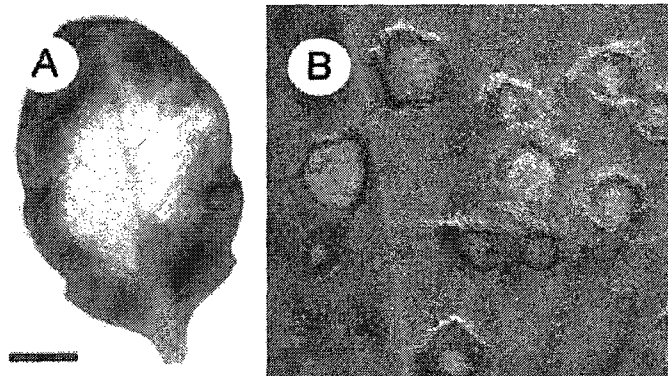


Figure 7. Réponse hypersensible en réponse à différents agents pathogènes. A) RH observée chez *A. thaliana*, 24 h après infiltration avec la bactérie *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000. **B)** RH induite par le virus de la mosaïque du tabac (TMV) chez *Nicotiana tabacum* cv. Samsun, 72 h après inoculation. Tiré de Mur *et al.*, 2008.

La mise en place de la défense passe préalablement par une reconnaissance de l'agent pathogène. De façon générale, celle-ci se fait à travers la perception d'éliciteurs, lesquels peuvent être généraux ou spécifiques à un agent pathogène (Jones et Dangl, 2006; Chisholm *et al.*, 2006). Les éliciteurs généraux (oligosaccharides, peptides, glycoprotéines, etc.), produits par l'agent pathogène ou bien par la plante suite par exemple à la dégradation de la paroi végétale, sont reconnus par des récepteurs membranaires (Jones et Dangl, 2006) et entraînent la mise en place d'une première ligne de défense dite basale (Bent et Mackey, 2007). Celle-ci implique la production de composés requis pour le renforcement de la paroi végétale comme la callose, la lignine ou d'autres composés phénoliques (Soylu, 2006; Hardham *et al.*, 2007). Elle implique également l'accumulation de phytoalexines, qui ont des fonctions antimicrobiennes, au niveau du site d'infection (De Wit, 1997; Hahlbrock *et al.*, 2003) ou de protéines PR («Pathogenesis Related») dont certaines vont avoir des fonctions antimicrobiennes ou vont pouvoir dégrader la paroi de champignons (Van Loon et Van Strien, 1999; Van Loon *et al.*, 2006). Ces mesures ne sont pas toujours suffisantes pour contrer l'agent pathogène et dans certains cas, les plantes sont capables de reconnaître des éliciteurs spécifiques à un agent pathogène, ce qui va conduire à la mise en place de la RH (Jones et Dangl, 2006). Les éliciteurs spécifiques sont de nature variée (Ellis *et al.*,

2000; Martin *et al.*, 2003). Leur reconnaissance par la plante a lieu au cours d'une réaction dite d'incompatibilité et fait appel à une interaction qualifiée de « gène-pour-gène » (Gomez-Gomez, 2004). Ces éliciteurs spécifiques sont produit par des gènes dit d'avirulence ou *avr* et correspondent pour la plupart d'entre eux à des facteurs de virulence (Ridout *et al.*, 2006; Abramovitch *et al.*, 2006). La reconnaissance par la plante de la protéine *avr* produite par l'agent pathogène ne peut se faire que si celle-ci possède un gène de résistance *R*. Cette reconnaissance représente le point de départ qui va aboutir à la mise en place de la RH. Si la plante hôte ne possède pas de gène *R*, elle est dite sensible et l'agent pathogène peut alors proliférer. Il faut mentionner que certains agents pathogènes comme la bactérie *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 sont capables d'inhiber la MCP associée à la RH au cours de l'interaction « gène-pour-gène » en sécrétant un autre effecteur, AvrPtoB (Abramovitch *et al.*, 2003).

Suite à la reconnaissance de l'agent pathogène, la mise en place de cette mort cellulaire est très rapide, de l'ordre de quelques heures (Huckelhoven, 2007). Elle a pour effet de générer une sorte de barrière physique composée de cellules mortes et de limiter la disponibilité en nutriments pour l'agent pathogène en raison de la rapide déshydratation qui accompagne la mort cellulaire. Phénotypiquement, cette mort localisée prend l'aspect d'une nécrose autour du site d'infection. Ceci empêche donc l'agent pathogène de croître et d'infecter l'ensemble de la plante (Lam *et al.*, 2001; Lam, 2004).

Pendant la mise en place de la MCP au cours de la RH, les plasmodesmes restent ouverts et fonctionnels, permettant d'émettre l'hypothèse que ces derniers pourraient permettre le passage de signaux aux cellules avoisinantes (Reape et McCabe, 2008) afin de mettre en place une résistance systémique, c'est-à-dire étendue à l'ensemble de la plante (Durrant et Dong, 2004; Greenberg et Yao, 2004).

A l'inverse, des études suggèrent que la MCP mise en place au site d'infection pourrait être induite par l'agent pathogène lui-même. Cette hypothèse, de plus en plus évidente, a été émise suite à l'observation de certaines des caractéristiques de la MCP de type apoptotique

comme la condensation de la chromatine (Yao *et al.*, 2001), la fragmentation de l'ADN (Navarre et Wolpert, 1999; Tada *et al.*, 2001) ou une altération de la mitochondrie (Coffeen et Wolpert, 2004), ceci suite à l'infection par des agents pathogènes nécrotrophes. Ceci laisse penser que certains agents pathogènes nécrotrophes, comme les champignons *Botrytis cinerea* (Govrin et Levine, 2000; Dickman *et al.*, 2001), *Sclerotinia sclerotiorum* (Dickman *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2008) ou *Cochliobolus victoriae* (Navarre et Wolpert, 1999; Curtis et Wolpert, 2004; Tada *et al.*, 2005) dont la croissance nécessite la mort des cellules infectées pourraient en fait détourner ce mécanisme de MCP à leur profit (Coffeen et Wolpert, 2004; Tada *et al.*, 2005) sachant qu'il est dans l'intérêt de leur plante hôte que ses cellules restent en vie. Ainsi, *C. victoriae* produit une toxine, la victorine, qui induit la mise en place de la MCP de type réaction hypersensible chez sa plante hôte, l'avoine (*Avena Sativa*). Cette mort peut être inhibée par l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques de caspases (Coffeen et Wolpert, 2004). De même, l'expression de protéines anti-apoptotiques humaines comme Bcl-2 ou Bcl-xL dans le tabac entraîne une résistance accrue des plantes aux champignons nécrotrophes (Dickman *et al.*, 2001).

Les cascades de signalisation menant à la mise en place de la RH font intervenir l'AS, certaines MAPKs («Mitogen-Activated Protein Kinase») comme SIPK, Ntf4 et WIPK chez le tabac, le NO (Oxyde nitrique) ou encore les ROS comme le H₂O₂ (peroxyde d'hydrogène) ou le O₂⁻ (ion superoxyde) (Hoeberichts et Woltering, 2003; Wendehenne *et al.*, 2002, 2004; Lam, 2004; Liu *et al.*, 2007).

La MCP mise en place au cours de la RH est dépendante de la lumière (Rusterucci *et al.*, 2001; Brodersen *et al.*, 2002; Zeier *et al.*, 2004; Chandra-Shekara *et al.*, 2006). Ceci implique un rôle possible des chloroplastes et donc des ROS, générés au cours de la photosynthèse. En effet, les ROS, produits notamment au niveau de la mitochondrie, sont impliqués aussi bien dans l'apoptose animale (Simon *et al.*, 2000) que dans la MCP chez les plantes (Desikan *et al.*, 1998; Lamb et Dixon, 1997; Mittler, 2002; Van Breusegem et Dat, 2006; Gao *et al.*, 2008), notamment au cours de la RH (Levine *et al.*, 1994) mais aussi pendant la sénescence décrite précédemment (Zapata *et al.*, 2005) ou en réponse aux UV-C (Danon *et al.*, 2004). Le

H₂O₂, par exemple, est utilisé dans de nombreuses études pour induire la MCP (Desikan *et al.*, 1998; De Pinto *et al.*, 2006). Les plantes comme les animaux produisent continuellement des ROS au cours des réactions métaboliques. Pour contrer leurs effets dommageables, notamment au niveau de l'ADN et des protéines, les cellules possèdent toute une gamme d'enzymes à fonctions anti oxydantes comme les peroxydases. Un excès non contrôlé de ROS au niveau de la cellule peut entraîner un stress oxydatif et conduire à la mise en place de la MCP (Apel et Hirt, 2004). Au niveau de la RH, le H₂O₂ joue un rôle important dans la signalisation, la production de phytoalexines ou le renforcement de la paroi. La suspicion de plus en plus évidente d'un rôle des chloroplastes au cours de la RH et dans la MCP en général (voir partie 1.5.1.3) est appuyé par une étude qui montre une forte accumulation de ROS dans les chloroplastes au cours de la RH (Liu *et al.*, 2007). De plus, il semble exister une voie de biosynthèse de l'AS au niveau des chloroplastes (Wildermuth *et al.*, 2002). Or, l'AS participe à la MCP chez les plantes en favorisant la production de H₂O₂ (Brodersen *et al.*, 2005). A l'inverse, le H₂O₂ peut activer des enzymes impliquées dans la biosynthèse de l'AS (Leon *et al.*, 1995), lequel va, à son tour, favoriser la production de ROS. Toutes ces corrélations vont dans le sens d'un rôle important des chloroplastes au cours de la RH mais également au cours d'autres évènements de MCP (voir partie 1.5.1.3).

Comme dans le cas de la sénescence, certaines des caractéristiques de la MCP de type apoptotique peuvent être retrouvées au cours de la RH comme la condensation du cytoplasme et du noyau, la fragmentation de l'ADN ou le relâchement du cyt *c* mitochondrial (Pennell et Lamb, 1997; Mittler *et al.*, 1997; Sun *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 2004).

A.5.3. La MCP en réponse à des stress abiotiques (UV-C)

Comme décrit précédemment, la MCP peut être mise en place au cours du développement mais également suite à des stress abiotiques. Les mécanismes d'activation du programme de mort cellulaire peuvent être induits par divers stress abiotiques qui vont perturber le fonctionnement normal de la cellule. Ainsi, le froid (Koukalova *et al.*, 1997), la chaleur (Li et Dickman, 2004; Vacca *et al.*, 2006), le mannose (Stein et Hansen, 1999), les sels (Katsuhara

et Kawasaki, 1996; Huh *et al.*, 2002), le H₂O₂ (Kawai-Yamada *et al.*, 2004) ou bien les stress génotoxiques induits par les UV-C (Danon et Gallois, 1998; Danon *et al.*, 2004) sont capable d'induire une réponse de type MCP chez les plantes. Les réponses au stress abiotiques sont particulièrement étudiées chez les plantes car, à l'instar des agents pathogènes, ils occasionnent des pertes au niveau des cultures. Dans cette partie dédiée au stress abiotiques, seule la MCP mise en place à la suite d'un stress causé par les UV-C sera abordée. Ces derniers ont été utilisés au cours des différents travaux décrits dans cette thèse afin d'induire la MCP chez les plantes.

Les UV sont des agents génotoxiques dans le sens où ils causent des dommages à l'ADN. Les radiations UV se subdivisent en UV-C (environ 280 nm), UV-B (280-320 nm) et UV-A (320-390 nm). Les UV-C sont utilisés depuis longtemps pour induire l'apoptose dans les cellules animales (Kulms et Schwarz, 2000, 2002). L'exposition aux UV-C occasionne des dommages au niveau physiologique, la formation de radicaux libres au niveau de l'ADN et génère des dimères de pyrimidine, en particulier de thymine. Normalement, la formation des dimères de pyrimidine conduit à la mise en place de systèmes de réparation et à l'excision/correction de l'anomalie. Les plantes sont donc capables de réparer l'ADN endommagé. Maintenant, selon le degré d'exposition aux radiations UV-C et dépendamment de l'état cellulaire, les dommages causés peuvent devenir trop importants pour la cellule qui va alors déclencher son programme de mort cellulaire.

Des études réalisées sur des plantes d'*A. thaliana* ont montré qu'un traitement aux UV-C pouvait induire la mise en place d'une MCP (Danon et Gallois, 1998). La fragmentation internucléosomale de l'ADN caractéristique de l'apoptose animale, a également été observée suite à des irradiations aux UV-C allant de 10 à 50 kJ/m² (Danon et Gallois, 1998). Celle-ci s'accroît au cours du temps, excluant ainsi toute cassure directe de l'ADN par les rayonnements UV-C mais allant plutôt dans le sens d'une activation d'endonucléases. Cette fragmentation a également été détectée *in situ* par la technique du TUNEL («Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick End Labelling») seulement 2 heures après une irradiation de protoplastes d'*A. thaliana*. Au cours de la MCP mise en place à la suite

d'un stress causé par les UV-C, d'autres événements caractéristiques de l'apoptose animale sont observés comme la condensation du noyau (Danon et Gallois, 1998) et la détection d'activité de type « caspase-like ». En effet, la MCP initiée par les UV-C peut être inhibée par l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques des caspases-1 et -3 tandis que l'utilisation de substrats de la caspase-3 met en évidence l'implication d'une activité dite « caspase-like », corrélée avec l'apparition de la fragmentation de l'ADN (Danon *et al.*, 2004).

En 2008, He *et al.*, ont montré pour la première fois que le gène *AtMC8* codant pour la métacaspase-8, était impliqué dans la MCP induite par les UV-C. L'expression de ce gène est fortement augmentée en réponse au stress oxydatif causé par les UV-C, le H₂O₂ ou par le méthyl viologen (MV), un herbicide favorisant la production de ROS au niveau des chloroplastes et capable d'induire une MCP de type apoptotique chez les plantes (Chen et Dickman, 2004). *AtMC8* est membre d'une famille de neuf protéines soupçonnées d'avoir des fonctions équivalentes aux caspases chez les plantes ou du moins d'être impliquées dans la MCP (voir partie 1.5.3.1.). *AtMC8* est sous contrôle du gène *Rcd-1* («*Radical induced cell death-1*») dont le knock-out inhibe l'expression et rend la plante insensible aux ROS produits par les chloroplastes (He *et al.*, 2008). Ceci suggère que le stress oxydatif produit au niveau des chloroplastes par les UV-C induit l'expression du gène *AtMC8*. Enfin, des protoplastes produits à partir de plantes d'*A. thaliana* qui expriment le gène *AtMC8* de façon constitutive présentent une MCP plus importante suite à une irradiation aux UV-C (He *et al.*, 2008). A l'inverse, des protoplastes issus de lignées d'*A. thaliana* knock-out pour ce même gène présentent une forte diminution de la MCP après traitement aux UV-C ou au H₂O₂ (He *et al.*, 2008).

D'autres expériences ont montré que des protoplastes d'*A. thaliana*, exprimant de façon transitoire le gène *p35*, limite la fragmentation de l'ADN et la mort cellulaire causées par les UV-C (Danon *et al.*, 2004). Le gène *p35* code pour une protéine anti-apoptotique du baculovirus qui permet d'inhiber spécifiquement les caspases des cellules infectées par le virus en bloquant leur site actif, empêchant ainsi leur mort par apoptose afin de permettre au virus de se multiplier (Bump *et al.*, 1995). De même, la sur-expression du gène *AtBI-1* (*Bax*

inhibitor-1) et *AtDAD-1* (*Defender against apoptotic death-1*) (voir partie 1.5.3.5.) dans des protoplastes d'*A. thaliana* permet de réduire fortement la mort induite par les UV-C (Danon *et al.*, 2004).

La MCP induite par les UV-C est dépendante de la lumière (Danon *et al.*, 2004), ce qui suggère, à l'instar de la RH, un rôle des chloroplastes dans la mise en place de la mort. De plus, l'expression du gène *AtMC8*, impliqué dans la MCP induite par les UV-C et qui semble induit par les ROS générés dans les chloroplastes, est également dépendante de la lumière (He *et al.*, 2008). En effet, suite à un traitement aux UV-C, les ROS sont générés très rapidement au niveau des chloroplastes et des mitochondries de protoplastes d'*A. thaliana* maintenus en lumière continue (Figure 8) (Gao *et al.*, 2008). L'utilisation d'inhibiteurs de la chaîne de transport des électrons comme le DCMU (3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-diméthylurea) réduit fortement la production de ROS ce qui a pour conséquence de réduire la MCP au niveau des protoplastes (Gao *et al.*, 2008). Enfin, mentionnons que des plantules d'*A. thaliana* traitées aux UV-C présentent une forte accumulation d'AS (Nawrath *et al.*, 2002). Comme pour la RH, ces corrélations laissent supposer un rôle des chloroplastes et de l'AS, qui serait possiblement synthétisé dans la mise en place de la MCP induite par les UV-C.

Tous ces résultats mettent donc en avant l'importance des ROS, au niveau des mitochondries et des chloroplastes ainsi que l'intervention de protéases à activité « caspase-like ». De même, la MCP végétale induite par les UV-C est caractérisée par une fragmentation caractéristique de l'ADN. Ces résultats corrélés à d'autres études (Vacca *et al.*, 2006) ont permis d'établir un modèle hypothétique relatif à la mise en place de la MCP chez les plantes, en réponse aux UV-C (Figure 8).

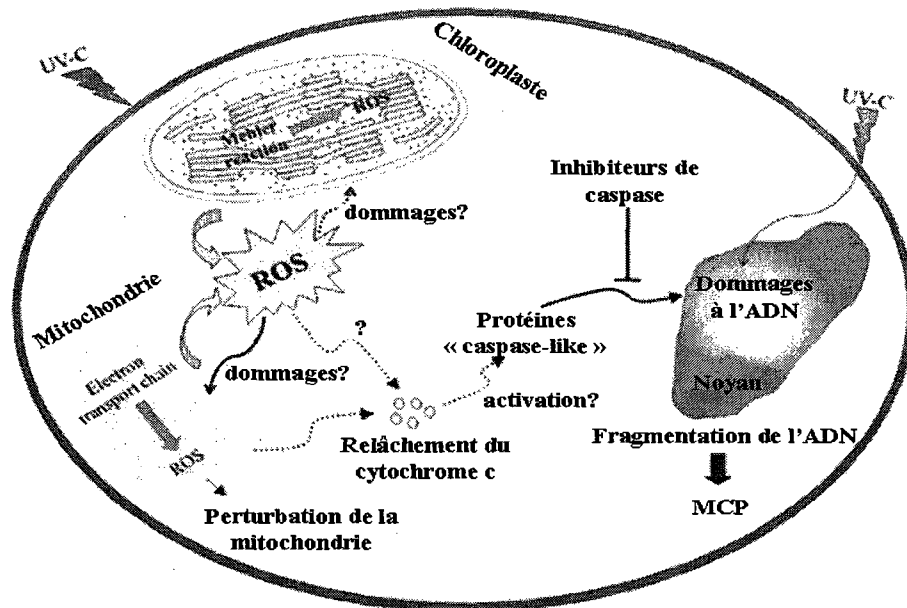


Figure 8. Modèle hypothétique représentant les voies de signalisation impliquées dans la mise en place de la MCP chez les plantes suite à une exposition aux UV-C. Après traitement aux UV-C, les ROS sont rapidement produits au niveau de la mitochondrie et des chloroplastes. La perturbation de la perméabilité membranaire de la mitochondrie pourrait entraîner le relâchement du cyt *c*, qui a été montré avec d'autres inducteurs de MCP et l'activation de protéase à activité « caspase-like » afin de mettre en place la MCP. Les dommages à l'ADN peuvent également déclencher la MCP. Adapté de Gao *et al.*, 2008.

A.5.4. Mécanismes communs entre la MCP végétale et l'apoptose

Malgré le manque de connaissances sur les mécanismes impliqués dans la MCP chez les végétaux, certaines évidences suggèrent que des gènes ayant des fonctions similaires à ceux trouvés chez les animaux pourraient également être présents chez les plantes. Ceci est montré d'une part par l'accumulation d'indicateurs fournis par l'utilisation d'inhibiteurs ou de substrats spécifiques des caspases mais aussi par l'expression fonctionnelle dans les plantes de certains gènes animaux impliqués dans l'apoptose. D'autre part, le clonage de certains gènes présentant des homologies de séquence et de fonction avec des gènes animaux comme

AtBI-1 et *AtDAD-1* et intervenant à différents niveaux dans la MCP ouvre des voies intéressantes pour la compréhension de ces mécanismes.

A.5.4.1. Les activités de type « caspase-like »

L'observation de certaines des caractéristiques de l'apoptose au cours de la MCP végétale laissait supposer une certaine conservation des mécanismes régissant l'exécution du programme de mort. Des études menées directement chez les plantes ont pu mettre en évidence l'intervention d'activités « caspase-like » au cours de la MCP et donc la présence éventuelle de protéines ayant des fonctions potentiellement similaires à celles des caspases (Lam et del Pozo, 2000; Woltering *et al.*, 2002; Danon *et al.*, 2004; Chichkova *et al.*, 2004; Sanmartin *et al.*, 2005). La présence d'activité dite « caspase-like » a été montrée indirectement par l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques des caspases animales ou des substrats de caspases sur des cellules isolées et des tissus végétaux.

Par exemple, la co-infiltration dans du tabac d'inhibiteurs spécifiques des caspases tels que Ac-DEVD-CHO (Acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-aldehyde), spécifique de la caspase-3 ou Ac-YVAD-CMK (Acetyl-Tyr-Val-Ala-Asp-chloromethylketone), spécifique de la caspase-1 avec l'agent pathogène biotrophe *P. syringae* permet d'inhiber la RH mise en place par la plante (Lam et del Pozo, 2000). De plus, des marqueurs moléculaires spécifiques de la mort cellulaire au cours de la RH comme les gènes *hsr203J* et *hin1* qui sont induits très tôt durant les interactions de type incompatible ne sont pas exprimés en présence d'inhibiteurs spécifiques des caspases (Lam et del Pozo, 2000). L'utilisation de ces inhibiteurs de caspases a montré également l'implication d'activités protéolytiques de type caspase sur des suspensions cellulaires de tomate traitées à la camptothécine (De Jong *et al.*, 2000), des protoplastes de tabac traités à la ménadione (Sun *et al.*, 1999) ou des protoplastes d'*A. thaliana* traités aux UV-C (Danon *et al.*, 2004). Ces inhibiteurs sont capables d'empêcher la fragmentation de l'ADN et d'inhiber la mort des cellules tandis que des inhibiteurs de protéases à spectres d'action différents en sont incapables (Lam et del Pozo, 2000).

L'utilisation de substrats des caspases comme la PARP a également confirmé l'implication d'activités protéolytiques de type caspase. Par exemple, des activités de type caspase-3 ont pu être détectées dans des suspensions cellulaires de tabac, au cours de la MCP induite par un choc thermique (Tian *et al.*, 2000). L'activité de type caspase-3 a été étudiée indirectement par l'utilisation d'un peptide de synthèse dont la séquence (GDEVDGIDEV) correspond au site de clivage de la PARP humaine (DEVD-G). Pour rappel, la PARP est clivée par la caspase-3 au cours de l'apoptose animale. Les auteurs ont ainsi remarqué que l'activité de type caspase-3 augmentait régulièrement suite à l'induction de la MCP par le choc thermique. L'utilisation du peptide de synthèse inhibe partiellement le clivage de la PARP endogène tandis que l'utilisation d'un peptide modifié (GDEVAGIDEV), où le résidu aspartate est remplacé par une alanine, n'a aucune incidence sur le clivage de la PARP endogène. Ces résultats indiquent donc clairement l'activation d'une protéase de type caspase-3 pendant la MCP induite par le choc thermique. De même, le clivage de la PARP endogène est empêché suite à l'utilisation d'un inhibiteur de la caspase-3 dans des protoplastes de tabac traités à la ménadione (Sun *et al.*, 1999) ou l'orge (Korthout *et al.*, 2000). D'ailleurs, la comparaison des séquences entre la PARP humaine avec celle de la plante *A. thaliana* a permis de montrer que cette dernière possède également un site de reconnaissance ressemblant à celui de la caspase 3 (Woltering *et al.*, 2002).

Enfin, comme mentionné dans la partie 1.5.1.3., l'utilisation de la protéine p35 du baculovirus, qui inhibe naturellement et spécifiquement les caspases, permet également d'inhiber partiellement la MCP chez les plantes suite à une exposition aux UV-C (Danon *et al.*, 2004) mais aussi au cours de la RH (Del Pozo et Lam, 2003).

Les enzymes protéolytiques responsables des activités « caspase-like » sont vraisemblablement localisées dans la vacuole (Bonneau *et al.*, 2008). En effet, la rupture de la vacuole représente un des faits marquant de la MCP chez les plantes (Jones, 2001; Hatsugai *et al.*, 2006).

Jusqu'à présent, ces méthodes indirectes ont montré la présence d'activités « caspases-like » dans la plupart des cas de MCP (Watanabe et Lam., 2004; Sanmartin *et al.*, 2005). Pourtant, l'analyse du génome d'espèces séquencées comme *A. thaliana* n'a révélé aucun homologue des caspases chez les plantes (Uren *et al.*, 2000). L'analyse s'est donc tournée vers des protéases différentes structurellement mais ayant des fonctions similaires. Parmi ces protéases dites « caspases-like » (Lam et del Pozo, 2000), les métacaspases, absentes des cellules animales, ont fait longtemps figure de favori (Uren *et al.*, 2000; Woltering *et al.*, 2002; Sanmartin *et al.*, 2005).

Actuellement, neuf métacaspases ont été identifiées dans le génome d'*A. thaliana*. Celles-ci sont également retrouvées chez les champignons et les protozoaires et semblent présenter un domaine protéolytique et une structure tertiaire comparable à ceux des caspases animales. Elles ont été classées en deux groupes, selon qu'elles présentent (type I) ou non (type II), dans leur partie N-terminale, un domaine en doigt de zinc et une région riche en proline (Belengui *et al.*, 2007). Chez *A. thaliana*, on compte trois métacaspases de type I et six de type II (Watanabe et Lam, 2004).

La première démonstration du rôle de la métacaspase YCA1, présente chez la levure *S. cerevisiae*, dans la mort induite par un traitement avec le H₂O₂ (Madeo *et al.*, 2002) laissait supposer que les métacaspases avaient réellement une fonction similaire aux caspases animales. En effet, le knock-out du gène codant pour la seule métacaspase présente chez la levure pouvait inhiber la mort induite par le H₂O₂ (Madeo *et al.*, 2002).

Récemment, le potentiel « caspase-like » de métacaspases recombinantes d'*A. thaliana* a été vérifié. D'abord, celles-ci exercent leur activité protéolytique après une arginine plutôt qu'après l'acide aspartique comme dans le cas des caspases animales (Vercammen *et al.*, 2004; Watanabe et Lam, 2005; Bozhkov *et al.*, 2005). La sur-expression de certaines de ces métacaspases chez *A. thaliana* n'entraîne aucun phénotype de mort (Vercammen *et al.*, 2006; He *et al.*, 2008). Ensuite, l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques de caspases n'a eu aucun effet sur l'activité enzymatique des métacaspases étudiées (Bonneau *et al.*, 2008). Enfin, elles sont

incapables de cliver des substrats de caspase (Bonneau *et al.*, 2008). Les métacaspases ne sont donc pas responsables des activités « caspase-like » décrites précédemment.

Malgré ces résultats, les métacaspases, ou certaines d'entre elles, tout au moins, sont tout de même impliquées dans la MCP. Ainsi, l'expression dans la levure *S. cerevisiae* des métacaspases AtMCP1 et AtMCP2, présentes chez la plante *A. thaliana*, entraîne la mise en place d'une MCP qui présente les caractéristiques de l'apoptose (Watanabe et Lam, 2005). On a vu également que la métacaspase-8 d'*A. thaliana* était impliquée dans la MCP mise en place suite à une exposition aux UV-C (voir partie 1.5.1.3). D'autres études ont également montré l'implication de certaines métacaspases dans la MCP chez les plantes (Hoeberichts *et al.*, 2003; Suarez *et al.*, 2004; Van Baarlen *et al.*, 2007; Richie *et al.*, 2007).

La recherche des protéines responsables des activités « caspase-like » se tourne donc vers d'autres protéases végétales. Parmi celles-ci, la VPE («Vacuolar Processing Enzyme») qui est une cystéine protéase, ou encore la saspase qui appartient à une famille de sérine protéases, interviennent toutes deux dans la MCP chez les plantes (Sanmartin *et al.*, 2005; Bonneau *et al.*, 2008; Williams et Dickman, 2008). Récemment, il a été montré que la VPE (Hatsugai *et al.*, 2004; Kuroyanagi *et al.*, 2005; Nakaune *et al.*, 2005) et la saspase (Coffeen et Wolpert, 2004) peuvent cliver des substrats de caspases mais aussi être inhibées par certains inhibiteurs de caspases. Les expérimentations se poursuivent donc pour identifier les protéines responsables des activités « caspase-like » chez les plantes.

A.5.4.2. Le clivage de la poly (ADP-ribose) polymérase

Comme cela a été décrit précédemment, le clivage de la PARP a lieu au cours de l'apoptose. Chez les végétaux, il a également été montré, dans certains cas, que le clivage de la PARP pouvait se produire au cours de la MCP (Sun *et al.*, 1999; Tian *et al.*, 2000; Thomas et Franklin-Tong, 2004). Celui-ci a par exemple été observé dans des cellules de tabac dont la MCP a été induite par un choc thermique (Tian *et al.*, 2000). Le fragment de 89 kDa, obtenu après clivage et détecté en utilisant un anticorps dirigé contre la PARP animale, est observé

quatre heures après traitement à la chaleur, tandis que la fragmentation de l'ADN apparaît 20 heures après le traitement à la chaleur. D'autre part, quand les cellules sont traitées préalablement au choc thermique avec du 3-aminobenzamide ou du nicotinamide, qui sont des inhibiteurs spécifiques de la PARP, la MCP est réduite de façon significative, comme le montre l'inhibition de la fragmentation de l'ADN, vérifiée par le test TUNEL. La quantité de noyaux marqués positivement est réduite de façon significative suggérant une répression de la MCP par ces inhibiteurs. Ceci a également été montré par l'absence d'échelle de fragmentation sur gel d'agarose à la suite du traitement par ces inhibiteurs. Ces résultats suggèrent donc que, comme dans l'apoptose, l'activation puis le clivage de la PARP peuvent également intervenir dans la MCP végétale.

A.5.4.3. Le relâchement du cytochrome *c*

On a vu précédemment que la mitochondrie et notamment le *cyt c* avaient un rôle central dans la cascade de signalisation menant à l'activation des caspases au cours de l'apoptose animale. Comme chez les animaux, la mitochondrie joue d'abord un rôle essentiel en tant que pourvoyeur de ROS au cours de la MCP végétale (Yao *et al.*, 2004). La présence d'activités « caspase-like » chez les plantes suggère également la possibilité d'un mécanisme d'activation similaire, passant éventuellement par un relâchement dans le cytoplasme du *cyt c* par la mitochondrie.

Afin de vérifier cette hypothèse, une première étude a été menée sur des cotylédons de concombre ayant subi un choc thermique afin d'induire la MCP (Balk *et al.*, 1999). L'analyse subséquente, de type Western, a révélé que la mitochondrie commençait à relâcher le *cyt c* dans le cytoplasme au cours des 10 premières minutes suivant le traitement à la chaleur. Après trois heures, celui-ci n'était plus détectable au niveau de la mitochondrie. La sortie du *cyt c* se fait très tôt et préalablement à l'apparition de la fragmentation de l'ADN.

A la suite de cette première étude, le relâchement du *cyt c* a pu être observé à quelques reprises au cours de la MCP. Par exemple, celui-ci se produit dans des cellules de maïs suite

à une induction au D-mannose (Stein et Hansen, 1999), dans des protoplastes de tabac traités à la ménadione (Sun *et al.*, 1999), dans des cellules d'*A. thaliana* ayant subi un choc thermique (Balk *et al.*, 2003) ou traitées avec la harpine, un éliciteur produit par *P. syringae* (Krause et Durner, 2004) ou encore dans des cellules de tabac à la suite d'un choc thermique (Vacca *et al.*, 2006). Dans ce dernier cas, le relâchement du cyt *c* dans le cytoplasme est accompagné d'une production de ROS par la mitochondrie. Les ROS paraissent même requis pour le relâchement du cyt *c*, mais il semble également en dépendre, de même que l'activation subséquente de protéases à activité « caspase-like » (Vacca *et al.*, 2006). Comme dans le cas de l'apoptose chez les animaux, le relâchement du cyt *c* chez les végétaux est un mécanisme précoce au cours de la MCP. Ce mécanisme présent chez les végétaux comme chez les animaux suggère que la voie de signalisation faisant intervenir le cyt *c* est conservée au cours de l'évolution. En dépit de ces différentes observations, aucune preuve concrète d'un rôle central du cyt *c* dans la MCP végétale n'a été apportée jusqu'à présent, notamment à travers l'activation directe de protéases de type « caspase-like ».

A.5.4.4. Expression de facteurs animaux anti et pro-apoptotiques

L'expression de protéines anti-apoptotiques, présentes naturellement chez les animaux tels que Bcl-2 ou Bcl-xL a permis de montrer qu'ils étaient également capables d'inhiber la MCP dans les plantes. Par exemple, l'expression constitutive du gène Bcl-xL dans des plants de tabac a permis d'inhiber la MCP mise en place suite à une exposition aux UV-B ou au MV mais aussi suite à la RH découlant d'une infection avec le TMV (Mitsuhara *et al.*, 1999). Cette suppression de la MCP varie en fonction de la quantité de protéine Bcl-xL exprimée dans le tabac. L'expression de Bcl-2 ou Bcl-xL dans des plantes de tabac leur confère également une plus grande résistance contre plusieurs agents pathogènes nécrotrophes comme *S. sclerotiorum* et *B. cinerea* (Dickman *et al.*, 2001) mais aussi contre plusieurs stress abiotiques comme le stress hydrique, la chaleur, le froid, la ménadione ou le H₂O₂ (Awada *et al.*, 2003; Li et Dickman, 2004). Au contraire, le type sauvage, non transformé, présente certaines des caractéristiques de la MCP comme la fragmentation de l'ADN en réponse à ces différents stress (Li et Dickman, 2004). De la même façon, l'expression du gène Bcl-xL dans

des plantes de tomates les rend plus résistantes à une souche particulière du CMV (virus de la mosaïque du concombre) à laquelle ils sont habituellement très sensibles (Xu *et al.*, 2004). Cette résistance est également corrélée au niveau d'expression du gène *Bcl-xL* (Xu *et al.*, 2004).

Il est important de mentionner que ces protéines anti-apoptotiques se retrouvent localisées dans les mitochondries des plantes transformées, comme dans le cas des cellules animales mais aussi, au niveau de la membrane des chloroplastes (Chen et Dickman, 2004). Afin d'évaluer si la localisation chloroplastique pouvait avoir une signification biologique, les auteurs de cette étude ont utilisé différents herbicides ciblant spécifiquement les chloroplastes dont le MV, qui induit la mort des cellules par MCP en favorisant l'accumulation de ROS dont le H₂O₂. Les plantes de type sauvage, non transformées avec les gènes anti-apoptotiques, se révèlent extrêmement sensibles aux herbicides utilisés. Ces derniers entraînent la mise en place d'une mort, dépendante de la lumière, et qui présentent les caractéristiques d'une MCP, alors que les plantes transformées avec les gènes anti-apoptotiques *Bcl-2* ou *Bcl-xL* se révèlent résistantes aux herbicides, lesquels n'entraînent ni l'accumulation de ROS, ni la fragmentation de l'ADN (Chen et Dickman, 2004). Il a déjà été montré au cours de précédentes études que l'expression des gènes *Bcl-2* et *Bcl-xL* permettait aux cellules animales d'être plus tolérantes au stress oxydatif (Hockenbery *et al.*, 1993). De même, leur expression dans la levure rendait celles-ci résistantes à des taux normalement létaux de H₂O₂ (Chen *et al.*, 2003). Ces résultats, tout en montrant la fonctionnalité chez les plantes de protéines impliquées dans l'apoptose, mettent en lumière une fois encore l'éventuelle implication des chloroplastes au cours de la MCP végétale.

À l'opposé, l'expression transitoire du facteur pro-apoptotique Bax dans des feuilles de tabac induit une mort rapide et localisée au point d'introduction, ceci alors que la plante ne possède, à priori, aucun équivalent des caspases ou des membres de la famille Bcl-2 (Lacomme et Santa Cruz, 1999). C'est le cas également lorsque la protéine Bax est exprimée chez la levure *S. cerevisiae*, laquelle ne possède pas non plus ni caspases, ni membre de la famille Bcl-2 (Zha *et al.*, 1996). Elle s'accompagne des caractéristiques de l'apoptose comme

la condensation de la chromatine, la fragmentation de l'ADN, le relâchement du *cyt c* et l'externalisation de la phosphatidylserine à la surface de la membrane cytoplasmique (Zha *et al.*, 1996; Ligr *et al.*, 1998). Cette MCP peut être inhibée par la co-expression de facteurs anti-apoptotiques (Greenhalf *et al.*, 1996; Tao *et al.*, 1997; Xu et Reed, 1998). De même, l'expression de la protéine Bax sous contrôle d'un promoteur inductible chez la plante *A. thaliana* entraîne la mort de cette dernière (Figure 9) qui présente les caractéristiques habituelles de la MCP notamment la fragmentation de l'ADN et une destruction de la membrane plasmique (Kawai-Yamada *et al.*, 2001). Ces études *in planta* ont montré que l'expression de Bax par les plantes induisait une MCP similaire à la réponse hypersensible (Lacomme et Santa Cruz, 1999; Kawai-Yamada *et al.*, 2001). Une fusion avec la GFP («Green Fluorescent Protein») a révélé que la protéine Bax était localisée au niveau de la mitochondrie de la cellule végétale à l'instar des cellules animales (Lacomme et Cruz, 1999; Kawai-Yamada *et al.*, 2001; Baek *et al.*, 2004). De même, Bax cible spécifiquement la mitochondrie lorsqu'elle est exprimée dans la levure (Zha *et al.*, 1996) et entraîne, comme chez les animaux, le relâchement du *cyt c* (Manon *et al.*, 1997) et la production de ROS (Madeo *et al.*, 1999). L'expression de la protéine Bax chez *A. thaliana* semble agir également en perturbant la membrane mitochondriale et favorise l'accumulation de ROS générés par la mitochondrie (Baek *et al.*, 2004). L'utilisation du NAC (N-acétyl-L-cystéine) qui est un puissant antioxydant empêche la production de ROS et permet d'inhiber partiellement la mort, indiquant qu'ils pourraient jouer le rôle de second messenger afin de permettre la mise en place de la mort (Baek *et al.*, 2004). Il est important de mentionner qu'aucune étude ne fait mention d'une sortie du *cyt c*.

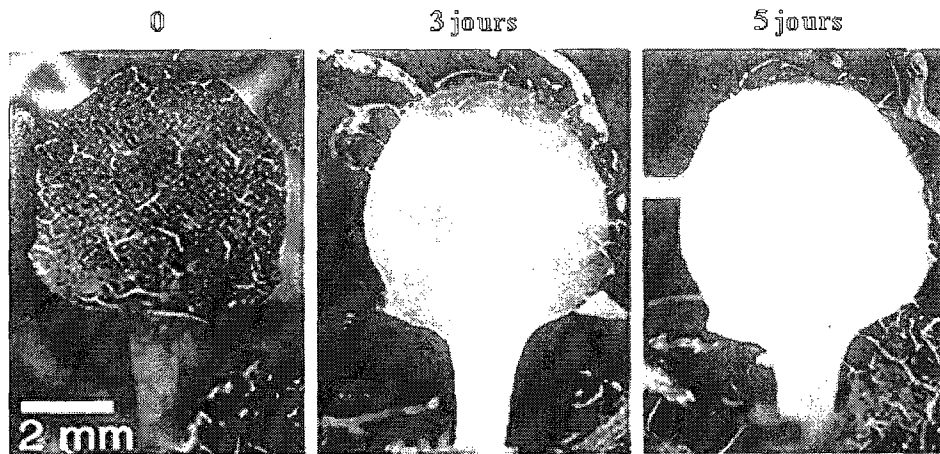


Figure 9. Phénotype d'une feuille d'*A. thaliana* suite à l'expression du gène *Bax*. Tiré de Kawai-Yamada *et al.*, 2001.

Mentionnons enfin que la capacité de la protéine Bax à induire la MCP chez la levure a été utilisée afin d'identifier le rôle d'autres gènes, cette fois impliqués dans la survie chez les plantes comme *Bax inhibitor-1* (Kawai-Yamada *et al.*, 2001; Huckelhoven *et al.*, 2003).

A.5.4.5. Les homologues de gènes animaux identifiés chez les plantes

Jusqu'à présent, aucun homologue de gènes animaux impliqués de façon directe dans l'apoptose comme ceux codant pour les caspases ou les protéines de la famille Bcl-2 n'ont pu être identifiés chez les plantes, probablement en raison de faibles homologies de séquences existant entre ce type de gènes. Par contre, d'autres gènes intervenant à des niveaux divers de l'apoptose animale ont été retrouvés chez les végétaux. C'est le cas, entre autres, des gènes *AtBI-1* (Kawai-Yamada *et al.*, 1999; Sanchez *et al.*, 2000) et *AtDAD-1* (Gallois *et al.*, 1997). Leurs rôles ne sont pas clairement identifiés au sein des mécanismes régissant la MCP végétale mais leur présence comme dans les cellules animales préfigure une certaine conservation des mécanismes dans les deux règnes.

A.5.4.5.1. Le gène *AtBI-1*

A l'origine, la découverte du gène *BI-1* et de sa capacité à réprimer l'apoptose induite par Bax a été faite chez l'Homme, à la suite d'un crible qui consistait à transformer la levure *S. cerevisiae* exprimant le gène *Bax* sous contrôle d'un promoteur inductible, avec une banque d'ADNc humains afin d'identifier d'éventuelles protéines anti-apoptotiques (Xu et Reed, 1998). Le gène identifié, *BI-1*, présentait alors la capacité de réprimer la mort induite par Bax dans la levure. La capacité de la protéine BI-1 à inhiber l'apoptose avait également été confirmée dans des cellules de fibroblastes humains suite à l'expression transitoire de Bax, mais également en réponse à divers inducteurs de l'apoptose comme l'étoposide (inhibiteur de la topoisomérase II) ou la staurosporine (Xu et Reed, 1998). La protéine BI-1 n'interagit pas directement avec Bax mais est capable d'interagir *in vivo* avec les protéines Bcl-2 et Bcl-xL via leur domaine BH4 (Xu et Reed, 1998).

Chez les plantes, le gène *BI-1* a été isolé et identifié pour la première fois par deux équipes à partir d'*A. thaliana* (*AtBI-1*) et du riz *Oryza sativa* (*OsBI-1*) (Kawai-Yamada *et al.*, 1999; Sanchez *et al.*, 2000) et présente une forte homologie de séquence et de structure avec la protéine animale (Figure 10). Par la suite, un certain nombre d'homologues du gène *BI-1* ont été clonés chez d'autres espèces végétales comme le colza et le tabac (Bolduc *et al.*, 2003), la tomate (Chae *et al.*, 2003), l'orge (Huckelhoven *et al.*, 2003) ou encore le piment (Isbat *et al.*, 2009). Comme son homologue animal, le gène *AtBI-1* a la capacité de réprimer la mort induite par le gène *Bax* dans des levures l'exprimant sous contrôle d'un promoteur inductible (Kawai-Yamada *et al.*, 1999; Sanchez *et al.*, 2000), mais aussi la MCP mise en place chez les levures en réponse au stress oxydatif et à la chaleur (Chae *et al.*, 2003).

À la suite de la découverte de ce régulateur négatif de la MCP, la fonction du gène a été analysée *in planta* en utilisant le gène *Bax* comme inducteur. En effet, l'expression du gène *Bax* chez *A. thaliana* entraîne la mort des plantes, laquelle présente les caractéristiques habituelles de la MCP. Lorsque ces plantes sur-expriment le gène *AtBI-1*, la mise en place de la MCP par Bax se retrouve inhibée, malgré le fait que *Bax* ne soit pas présent naturellement

chez les végétaux (Kawai-Yamada *et al.*, 2001). Dans les cellules animales comme végétales, Bax entraîne une accumulation importante de ROS mais celle-ci n'est pas affectée par la co-expression du gène *AtBI-1*, suggérant que celui-ci réprime l'effet de Bax en aval de la production de ROS (Kawai-Yamada *et al.*, 2004). Ces résultats viennent soutenir l'idée que le gène *AtBI-1* fonctionne comme un inhibiteur de la mort cellulaire induite par le gène *Bax* et vient confirmer la théorie selon laquelle certains mécanismes de la MCP ont été conservés à travers l'évolution.

La sur-expression du gène *AtBI-1* permet également d'inhiber la MCP induite par le H₂O₂ ou l'AS dans des cellules de tabac (Kawai-Yamada *et al.*, 2004) et la mort mise en place à la suite d'une exposition aux UV-C dans des protoplastes d'*A. thaliana* (Danon *et al.*, 2004). De même, la sur-expression de *BI-1* dans le tabac inhibe la MCP induite par la chaleur et le froid (Watanabe et Lam, 2006) et augmente la tolérance aux stress hydriques et aux fortes salinités (Isbat *et al.*, 2009). De façon générale, la sur-expression du gène *BI-1* accroît la tolérance à l'égard de nombreux stress abiotiques, susceptibles d'entraîner une mise en place de la MCP.

A l'inverse, des cellules de tabac qui sous-expriment le gène endogène *NtBI-1* à l'aide d'un ARNm anti-sens présentent une mise en place précoce de la MCP suite à une privation en source de carbone (Bolduc et Brisson, 2002) tandis que des mutants d'insertion d'*A. thaliana* qui expriment peu ou pas du tout le gène *AtBI-1* sont plus sensibles à la chaleur (Watanabe et Lam, 2006). *BI-1* apparaît donc comme un intervenant de la MCP, sa particularité étant qu'il est présent à la fois chez les animaux et chez les plantes.

Le rôle du gène *AtBI-1* a également été évalué dans la MCP mise en place au cours de la RH. La sur-expression de ce gène est en effet capable de réprimer la mort mise en place dans des cellules de riz suite à l'utilisation d'un éliciteur produit par le champignon nécrotrophe *Magnaporthe grisea* (Matsumura *et al.*, 2003). A l'inverse, des mutants d'insertion d'*A. thaliana* pour le gène *AtBI-1* (knock-out) présentent une MCP plus rapide lorsqu'ils sont infiltrés avec la fumonisine B1, une toxine produite par le champignon nécrotrophe *Fusarium moniliforme* et qui est capable seule d'induire la MCP chez les plantes (Stone *et al.*, 2000;

Asai *et al.*, 2000). A l'opposé, le champignon biotrophe *Blumeria graminis* f.sp. *hordei*, qui est responsable du mildiou chez l'orge (*Hordeum vulgare*), se retrouve favorisé dans son développement lorsque le gène *BI-1* est sur-exprimé chez la plante hôte (Huckelhoven *et al.*, 2003). Dans ce cas précis, la sur-expression du gène *BI-1*, qui inhibe la mise en place de la MCP, avantage le champignon *B. graminis* car celui-ci a besoin de tissus vivants pour pouvoir se développer, à l'inverse des champignons nécrotrophes.

Paradoxalement, une étude menée chez les animaux a montré que l'expression du gène *AtBI-1* d'*A. thaliana* dans des cellules de fibrosarcome humain était capables d'induire l'apoptose (Yu *et al.*, 2002). Les auteurs, anticipant par avance l'idée que la protéine AtBI-1 pourrait prévenir la mort induite par Bax n'ont en fait observé aucune protection quand les deux gènes sont co-transfectés. De plus, la seule transfection du gène *AtBI-1* est suffisante pour induire l'apoptose. Cette mort peut être réprimée par co-transfection du gène *AtBI-1* avec le gène *BI-1*, *Bcl-2* ou *X-IAP* («X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein»), qui est capable d'inhiber les caspases (Deveraux *et al.*, 1997), suggérant ainsi que le gène *AtBI-1* pourrait induire l'apoptose via une voie de signalisation dépendante des caspases (Yu *et al.*, 2002). Ces observations surprenantes ont amené les auteurs à émettre l'hypothèse que l'action pro-apoptotique de la protéine AtBI-1 dans les cellules de fibrosarcome humain pourrait s'expliquer par le fait qu'elle pourrait interagir avec la protéine BI-1 endogène ou une de ses cibles, empêchant alors son bon fonctionnement, ce qui conduirait à la mise en place de la mort cellulaire. Ces résultats ont par la suite été contredit au cours d'une nouvelle étude décrivant le clonage et la caractérisation de deux homologues de *BI-1* chez le colza (*BnBI-1*) et le tabac (*NtBI-1*) et qui montrait entre autres que ces derniers étaient capables de réprimer la mort mise en place par Bax dans des cellules embryonnaires humaines (Bolduc *et al.*, 2003). Toutefois, les auteurs de l'article ne remettent pas en cause la précédente étude et suggèrent même que BI-1 pourrait induire la MCP.

Des analyses d'immunolocalisation et de fusion avec la GFP ont montré que BI-1 était majoritairement localisé au niveau du RE des cellules végétales et animales (Xu et Reed, 1998; Kawai-Yamada *et al.*, 2001; Bolduc *et al.*, 2003). Elle fait environ 25 kDa et sa

structure prédite est constituée de 7 domaines transmembranaires (Figure 10) (Watanabe et Lam, 2004, 2009). En 2008, Watanabe et Lam ont montré que la protéine AtBI-1 était un important régulateur de la MCP occasionnée par les stress au niveau du RE. Ce dernier est essentiel à la cellule car il est responsable de la synthèse des protéines et des modifications post-traductionnelles comme la N-glycosylation. Lorsque ce processus devient non-fonctionnel (accumulation de protéines immatures), cela occasionne un stress au niveau du RE qui est pris en charge par des mécanismes cellulaires d'adaptation au stress appelés UPR («Unfolded Protein Response») chargés de «relancer la machine». En cas d'échec, la cellule va déclencher la MCP (Boyce et Yuan, 2006). Notons que chez les animaux, BI-1 est capable d'interagir avec IRE1- α («Inositol Requiring Enzyme 1- α »), un détecteur de stress qui contrôle les UPR (Lisbona *et al.*, 2009). Ainsi, le traitement de plantes d'*A. thaliana* avec la tunicamycine, qui inhibe spécifiquement la N-glycosylation des protéines, induisant ainsi des dysfonctionnements au niveau du RE par l'accumulation de protéines immatures (Patil et Walter, 2001; Chae *et al.*, 2004), entraîne la mise en place d'une MCP, laquelle est caractérisée par une forte production de ROS, la condensation de la chromatine et la fragmentation de l'ADN. Maintenant, lorsque les plantes sur-expriment le gène *AtBI-1*, elles deviennent plus résistantes au stress occasionnés au niveau du RE et limitent l'accumulation de ROS tandis que des mutants exprimant peu ou pas le gène *AtBI-1* présentent une hypersensibilité à la tunicamycine, une accumulation accrue de ROS au niveau du RE ainsi qu'une MCP plus importante (Watanabe et Lam, 2008). Il a été montré chez les animaux que BI-1 régulait l'accumulation de ROS au niveau du RE à travers son interaction avec la protéine NPR (NADPH-dépendante cytochrome P450 Réductase) et le cytochrome P450 2E1 (Kim *et al.*, 2009). Ces résultats viennent confirmer des résultats similaires obtenus dans des cellules de souris qui montrent que BI-1 réprime spécifiquement une voie de l'apoptose partant du RE (Chae *et al.*, 2004). Dans ce dernier cas, des cellules de souris qui n'expriment plus le gène *BI-1* présentent une apoptose plus marquée quand elles sont traitées avec des agents ciblant spécifiquement le RE comme la tunicamycine ou la thapsigargine qui inhibent spécifiquement des pompes à ions Ca^{2+} , ce qui a pour effet d'induire la MCP (Berridge *et al.*, 2000). La sur-expression du gène *BI-1* dans les cellules de souris va au contraire inhiber

l'apoptose normalement mise en place à la suite de ces stress. Par contre, ces cellules qui n'expriment plus le gène *BI-1* ne sont pas plus sensibles à certains agents ciblant plus spécifiquement les voies extrinsèques et intrinsèques de l'apoptose (Chae *et al.*, 2004) alors que la sur-expression du gène *BI-1* est capable de les réprimer.

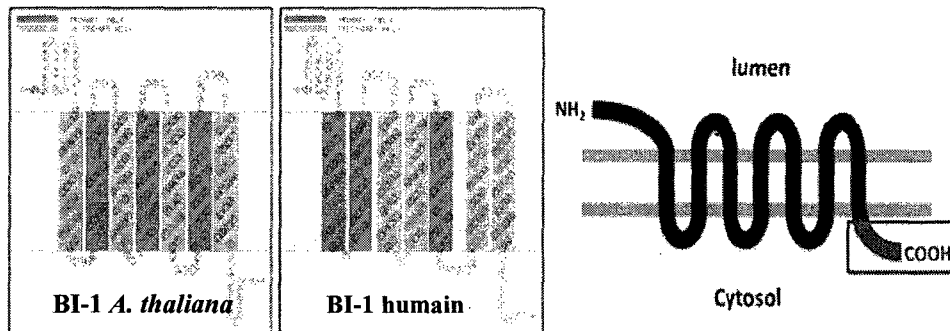


Figure 10. Structure prédite des protéines BI-1 humaines et végétales dans la membrane du RE. Tiré de Watanabe et Lam, 2009.

Le fait que la protéine *BI-1* animale et ses homologues végétaux soient localisés dans le RE soulève la question sur la façon dont celle-ci est capable d'inhiber la mort induite par la protéine *Bax* dont la localisation est cytosolique à l'état inactif puis mitochondriale une fois activée. Le mode d'action de *BI-1* est encore méconnu mais il semble que le RE et la mitochondrie « communiquent » via certains signaux pendant l'apoptose (Rizzuto *et al.*, 1998; Hacki *et al.*, 2000) et que les stress au niveau du RE puissent entraîner l'activation de *Bax* et sa translocation au niveau de la mitochondrie afin de mettre en place l'apoptose chez les animaux (Scorrano *et al.*, 2003). Des études récentes ont montré que *BI-1* pouvait réguler la quantité de Ca^{2+} libérée par le RE chez les animaux (Chae *et al.*, 2004; Xu *et al.*, 2008) et les plantes (Ihara-Ohori *et al.*, 2007). La sur-expression de *BI-1* induirait une diminution de la quantité de Ca^{2+} disponible dans le RE (Chae *et al.*, 2004; Westphalen *et al.*, 2005) et une diminution du Ca^{2+} relâché par le RE suite à un traitement avec la thapsigargine (Kim *et al.*, 2008). Or, le Ca^{2+} joue en effet un rôle important dans la signalisation cellulaire et son

implication dans l'apoptose (Lam *et al.*, 1994; Pinton *et al.*, 2001; Orrenius *et al.*, 2003; Giorgi *et al.*, 2008) et dans la MCP végétale (Lecourieux *et al.*, 2002; Bolduc *et al.*, 2007; Errakhi *et al.*, 2008) a déjà été mise en évidence. La protéine AtBI-1 se révèle également incapable de réprimer la mort induite par la protéine Bax dans des souches de levure mutées pour les gènes *Pmr1* (Antebi et Fink, 1992) et *Spfl* (Cronin *et al.*, 2002) qui codent pour des pompes à Ca^{2+} (Ihara-Ohori *et al.*, 2007). BI-1 apparaît donc comme un régulateur des pompes à Ca^{2+} au niveau du RE. D'après une étude récente, cette régulation apparaît être dépendante du pH (Kim *et al.*, 2008) et, fait nouveau, la sur-expression de la protéine BI-1 serait même capable, en conditions de pH acide, de promouvoir la MCP et d'amplifier celle induite par Bax dans des cellules humaines de fibrosarcome (Kim *et al.*, 2008). L'acidification du cytosol a lieu au cours de l'apoptose (Matsuyama et Reed, 2000). La sur-expression de BI-1 en conditions de pH acide amplifie la translocation de Bax du cytosol à la mitochondrie ainsi que le relâchement du cyt *c* dans le cytosol (Kim *et al.*, 2008). Ces résultats pourraient donc expliquer ceux obtenus par Yue *et al.* (2002) et faire de BI-1 une protéine unique qui pourrait promouvoir ou inhiber la MCP selon les conditions.

Des séries de délétion ainsi que la substitution d'acides aminés dans la région C-terminale de la protéine BI-1 qui est localisée du côté cytoplasmique du RE (Bolduc *et al.*, 2003) a montré que cette extrémité est importante pour sa fonction au cours de la MCP chez les plantes (Kawai-Yamada *et al.*, 2004). La délétion de la partie C-terminale, sur une région de 14 acides aminés, entraîne l'incapacité de la protéine BI-1 à inhiber la mort induite par Bax dans la levure et les plantes (Chae *et al.*, 2003; Kawai-Yamada *et al.*, 2004) ou celle induite par le H_2O_2 et l'AS (Kawai-Yamada *et al.*, 2004). Des fusions de la partie C-terminale avec la GFP montrent que la non-fonctionnalité de la protéine tronquée n'est pas liée à une absence de localisation au niveau du RE (Kawai-Yamada *et al.*, 2004). La partie C-terminale de la protéine AtBI-1, essentielle à sa fonction dans la MCP peut interagir avec la protéine CaM (calmoduline) dans la levure et les plantes (Ihara-Ohori *et al.*, 2007). Or, la CaM peut s'associer avec les ions Ca^{2+} , pour former un complexe qui va aller interagir avec d'autres protéines comme par exemple des enzymes impliquées dans le stress oxydatif (Yang et Poovaiah, 2002), des protéines impliquées dans la défense et la mise en place de la RH (Kim

et al., 2002) ou pour réguler le niveau d'AS au cours des interactions plante-pathogène (Du *et al.*, 2009).

La présence du gène *AtBI-1* n'est pas indispensable à la croissance et au développement des plantes en conditions normales puisque l'absence du gène n'entraîne aucun phénotype particulier (Watanabe et Lam, 2006). Il semble en fait jouer un rôle essentiellement dans la survie cellulaire notamment dans des conditions de stress pouvant conduire à la MCP. De façon générale, l'expression du gène *AtBI-1* et des ses homologues végétaux est induite au cours de la sénescence (Bolduc *et al.*, 2003), en réponse à des hormones comme l'AS (Kawai-Yamada *et al.*, 2004) ou les cytokinines (Bolduc *et al.*, 2007) et en réponse aux nombreux stress biotiques (Sanchez *et al.*, 2000; Huckelhoven *et al.*, 2003; Matsumura *et al.*, 2003; Eichmann *et al.*, 2004) et abiotiques (Kawai-Yamada *et al.*, 2004; Watanabe et Lam, 2006; Isbat *et al.*, 2009) discutés précédemment et qui peuvent aboutir à la mise en place de la MCP. L'induction de ce gène au cours des situations de stress viserait donc possiblement à assurer une protection basale contre la MCP induite par la plupart de ces stress afin de la contrôler. À la lumière de ces différents résultats, le modèle suivant a été proposé pour expliquer le fonctionnement de BI au cours de la MCP (Figure 11).

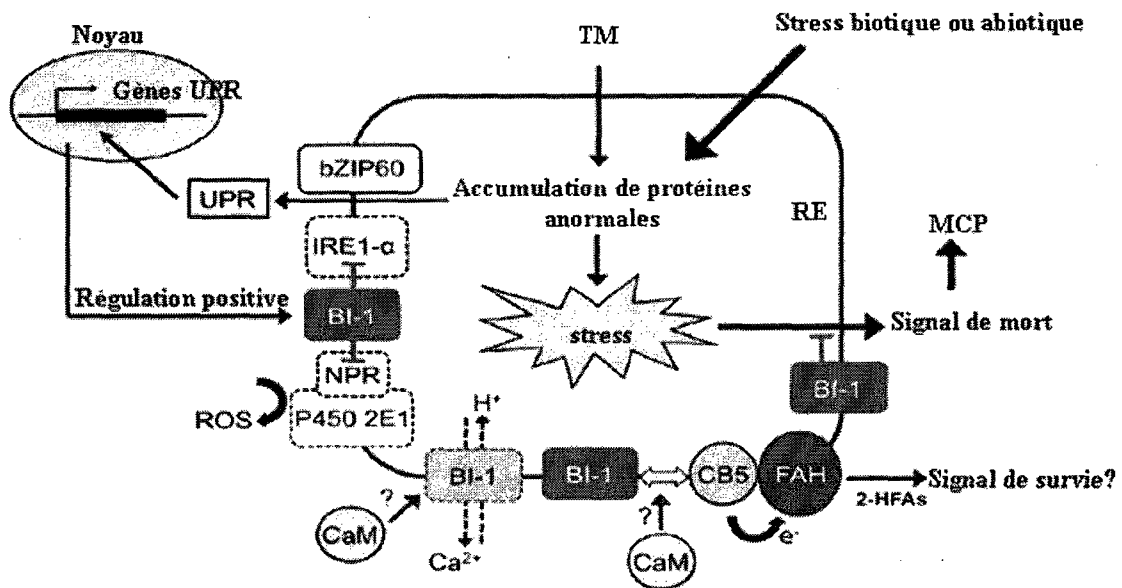


Figure 11. Modèle hypothétique du fonctionnement de la protéine BI-1 au cours de la MCP végétale. À la suite d'un stress induit, par exemple, par une dose non létale de tunicamycine, les gènes UPR vont être exprimés pour rétablir l'homéostasie au niveau du RE. Au même moment, l'expression de *BI-1* pourrait également être induite par certains facteurs de transcription comme bZIP60 présents dans le RE et connus pour être impliqués dans les réponses au stress (Iwata *et al.*, 2008) afin de favoriser la survie cellulaire. Inversement, BI-1 pourrait contrôler l'activité des gènes UPR via son interaction avec IRE1- α . La CaM pourrait également interagir avec BI-1 afin de moduler son activité, liée au contrôle du Ca^{2+} , ou à son interaction avec le complexe protéique formé par CB5 (cytochrome b5) et FAH («Fatty Acid Hydroxylase»), qui interviennent dans la modification des lipides (Nagano *et al.*, 2009). La protéine BI-1 pourrait également limiter l'accumulation de ROS au niveau du RE via les protéines NPR et P450 2E1. À travers ces mécanismes, BI-1 tenterait de limiter le stress subi au niveau du RE mais également de contenir la MCP. Dans le cas où le stress subi serait trop important, la cellule mettrait alors en place la MCP afin de protéger l'organisme. Adapté de Watanabe et Lam, 2009.

A.5.4.5.2. Le gène *AtDAD-1*

Le gène *AtDAD-1* a été isolé à la suite d'un crible réalisé sur une banque d'ADNc d'*A. thaliana* (Gallois *et al.*, 1997). La séquence protéique déduite de la séquence nucléotidique présente une homologie relative de 49% avec la protéine DAD-1 (defender against apoptotic death-1) de hamster. Celle-ci a été identifiée au cours de recherches réalisées sur des lignées cellulaires mutantes de hamster (tsBN7) sensibles aux changements de température (Nakashima *et al.*, 1993). Contrairement aux cellules du type sauvage, les cellules tsBN7 entrent en apoptose lorsqu'elles sont transférées à une température de 39,5 °C. Cette sensibilité est due à la présence d'une mutation dans le gène *DAD-1*. La transfection des cellules tsBN7 avec le gène *AtDAD-1* d'*A. thaliana* les empêche d'entrer en apoptose, ce qui indique que la protéine *AtDAD-1* est capable de restaurer l'activité qui avait été perdue. Ces résultats montrent que la protéine *AtDAD-1* fonctionne de façon similaire à la protéine DAD-1 du hamster. Malgré la faible homologie de séquence avec la protéine de hamster, la protéine *AtDAD-1* est capable de se substituer à la protéine animale et de supprimer l'apoptose dans la lignée tsBN7. De plus, l'expression transitoire du gène *AtDAD-1* dans des protoplastes de tabac inhibe la fragmentation de l'ADN et la MCP suite à un traitement aux UV-C (Danon *et al.*, 2004). Ces différents résultats indiquent que la fonction « anti-MCP » de cette protéine est conservée entre les règnes animaux et végétaux.

D'autres homologues de *DAD-1* ont également été isolés par la suite, notamment à partir du riz (Tanaka *et al.*, 1997), du pois (Orzaez et Granell, 1997b) ou encore du glaïeul (Yamada *et al.*, 2004). Comme pour le gène isolé à partir d'*A. thaliana*, l'expression de la protéine DAD-1 issue du riz dans la lignée cellulaire mutante tsBN7 de hamster complémente la protéine endogène et empêche l'entrée en apoptose (Tanaka *et al.*, 1997). Dans le cas des gènes isolés à partir du pois et du glaïeul, il est intéressant de remarquer que les transcrits du gène *DAD-1* diminuent de façon importante pendant la sénescence des pétales, ceci préalablement à la MCP (Orzaez et Granell, 1997b; Yamada *et al.*, 2004).

La protéine AtDAD-1 ainsi que son homologue animale sont localisés dans la membrane du RE (Makishima *et al.*, 1997; Danon *et al.*, 2004). C'est une sous-unité servant d'ancrage au complexe oligosaccharyl transférase qui est impliqué dans la glycosylation (Kelleher et Gilmore, 1997). DAD-1 n'est donc pas, à priori, directement impliqué dans la MCP mais pourrait l'atténuer tout comme la protéine AtBI-1 en limitant les stress subits au niveau du RE.

Mentionnons, pour conclure cette partie, que les gènes *AtBI-1* et *AtDAD-1* ne sont pas les seuls homologues de gènes animaux à avoir été identifiés chez les plantes. On citera par exemple, la famille des protéines BAG («Bcl-2-Associated Athanogene») identifiée récemment chez *A. thaliana* (Doukhanina *et al.*, 2006). Chez les animaux, les protéines BAG, au nombre de six, interviennent dans différents processus biologiques dont l'apoptose au cours de laquelle elles sont capables d'interagir avec la protéine Bcl-2 afin de favoriser, en synergie, la survie cellulaire (Takayama *et al.*, 1995; Kabbage et Dickman, 2008). Chez la plante *A. thaliana*, les sept protéines AtBAG qui composent cette famille ont été découvertes récemment (Figure 12) et partagent une très faible homologie de séquence avec les protéines BAG animales. Par contre, à l'instar des protéines BAG animales, elles possèdent un domaine BD («BAG Domain») conservé en C-terminal et retrouvé uniquement dans cette famille (Doukhanina *et al.*, 2006). Le rôle de ces protéines a commencé à être évalué chez les plantes. Ainsi, AtBAG4 est, par exemple, capable de promouvoir la survie cellulaire. En effet, des plantes d'*A. thaliana* sur-exprimant ce gène présentent une plus grande résistance en réponse aux UV-B, tandis que son expression dans des plantes de tabac rendent celles-ci plus tolérantes à différents stress pouvant entraîner la MCP comme le H₂O₂, le MV, le froid ou encore les stress salins (Doukhanina *et al.*, 2006). Un autre membre de la famille, AtBAG6, est paradoxalement capable d'induire la MCP lorsqu'il est sur-exprimé chez les plantes ou la levure (Kang *et al.*, 2006). Comme AtBI-1, la protéine AtBAG6 est induite en réponse à l'AS, au H₂O₂ et suite à un choc thermique et peut également interagir avec la calmoduline (Kang *et al.*, 2006).

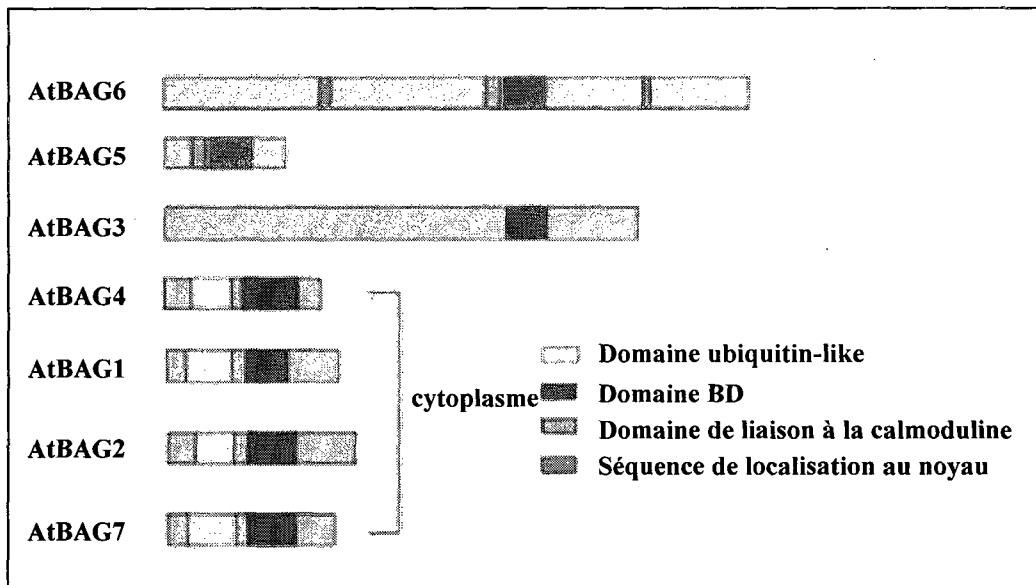


Figure 12. Structure des protéines BAG chez *A. thaliana*. Tiré de Doukhanina *et al.*, 2006.

A.5.5. Cdf-1, ou l'équivalent de Bax chez les plantes ?

Le gène *Cdf-1* (*cell growth defect factor-1*) a été isolé à partir d'une banque d'ADNc d'*A. thaliana*, à la suite d'un crible effectué dans la levure *S. cerevisiae* exprimant le gène *AtBI-1* sous contrôle du promoteur inductible *GAL1* (Kawai-Yamada *et al.*, 2005). A l'instar de *Bax*, le gène *Cdf-1* est capable d'induire la MCP lorsqu'il est exprimé dans la levure. Cette mort peut alors être inhibée par la co-expression du gène *AtBI-1*.

Dans la levure, la protéine Cdf-1 induit une forte production de ROS et se retrouve localisée au niveau de la mitochondrie. Celle-ci présente des changements morphologiques et une diminution de son potentiel membranaire semblables à ceux observés lorsque la protéine Bax est présente (Kawai-Yamada *et al.*, 2005).

Ces résultats laissent supposer que le gène *Cdf-1* fonctionnerait d'une manière similaire à celle de Bax dans la levure, suggérant que ce gène pourrait avoir des fonctions équivalente chez les plantes. Pour le moment, aucune étude n'est venue confirmer cette hypothèse.

A.5.6. Les mutants connus de la MCP

Différents mutants de la MCP présentant un dysfonctionnement dans l'exécution du programme de mort, ont été identifiés, notamment chez la plante *A. thaliana*. La majorité de ces cas présente un phénotype qui s'apparente à une réponse de type hypersensible (Dangl *et al.*, 1996; Greenberg, 1997). Parmi ces mutants, les cas les plus intéressants sont représentés par les mutants appelés « lesion mimic » (Mittler et Rizhsky, 2000). Ces mutants présentent un phénotype particulier marqué par l'apparition spontanée de lésions foliaires typiques de la RH. La formation de ces lésions n'est pas causée par une mort de type nécrose liée à la mutation ou au produit d'un transgène mais résulte bien de l'activation d'un programme de mort cellulaire. Dans la plupart des cas, l'activation de cette mort cellulaire s'accompagne par une induction des mécanismes de défense de la plante. Les mutants « lesion mimic » ont été isolés à partir de plusieurs espèces et en particulier *A. thaliana*. Ils ont été classés en deux groupes, les mutants *lsd* («lesion simulating disease») et les mutants *acd* («accelerated cell death») (Mittler et Rizhsky, 2000).

Dans tous les cas, ces mutants présentent un phénotype associé à une réponse de type RH. La différence notable entre ces deux groupes tient à l'ampleur que peut prendre la lésion observée. Dans le cas des mutants *lsd*, les lésions sont souvent de taille limitée et ne conduisent pas à la mort du tissu végétal tandis que dans le cas des mutants *acd*, les lésions qui se forment spontanément ou à la suite d'une interaction avec un agent pathogène peuvent s'étendre sans aucune limite à l'ensemble de la plante, conduisant à sa mort.

Parmi les mutants *lsd*, le mutant *lsd1* d'*A. thaliana* présente une mutation récessive au niveau du gène *lsd1*. Ce dernier code pour une protéine en doigt de zinc et agit comme un facteur de transcription qui régule négativement la mort cellulaire de type hypersensible (Dietrich *et al.*,

1997; Aviv *et al.*, 2002; Rusterucci *et al.*, 2001). Chez les animaux, ce type de facteurs de transcription intervient dans le contrôle de l'activité des caspases en réponse à différents stress environnementaux (Uren *et al.*, 2000; Mühlenbock *et al.*, 2007, 2008). Les lésions qui apparaissent spontanément s'étendent rapidement à l'ensemble de la feuille à la suite d'une interaction avec un agent pathogène avirulent. Par contre, le mutant *lsd1* est plus résistant aux agents pathogènes virulents, suggérant également un rôle du gène *lsd1* dans la régulation négative de la défense basale. La formation des lésions peut également être induite après exposition à une forte lumière (Dietrich *et al.*, 1997). A la lumière, elle est induite à une longueur d'onde de 680 nm et non 700 nm, ce qui implique un rôle du photosystème II (Mateo *et al.*, 2004). De plus, la MCP qui est mise en place dans ce mutant est dépendante de la production de ROS, notamment l' O_2^- (Jabs *et al.*, 1996; Senda et Ogawa, 2004). L'utilisation d'AS ou d'analogues comme le benzothiodiazole (BTH) induit la production de ROS et exacerbe le phénotype de MCP observé (Figure 13) (Dietrich *et al.*, 1994, 1997; Kliebenstein *et al.*, 1999; Rusterucci *et al.*, 2001). La fonction précise de la protéine *lsd1* n'est pas encore clairement établie mais elle intervient possiblement dans le contrôle et la régulation de la production de ROS au cours de la mort cellulaire (Dietrich *et al.*, 1997; Epple *et al.*, 2003; Mühlenbock *et al.*, 2007).

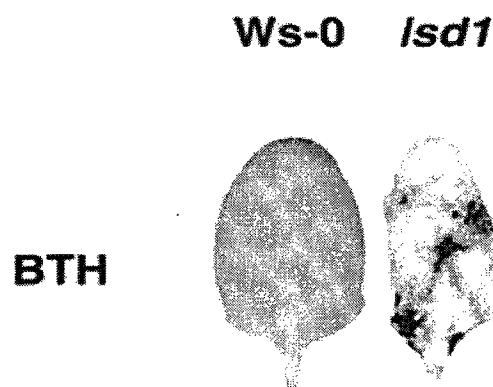


Figure 13. Phénotype du mutant *lsd1* après traitement au BTH. Ws-0, écotype Wassilewskija. Adapté de Rusterucci *et al.*, 2001.

Parmi les mutants *acd*, le mutant *acd11* d'*A. thaliana* dont la mutation est récessive présente toutes les caractéristiques de la MCP de type réponse hypersensible (Brodersen *et al.*, 2002). Comme dans le cas de la RH, la mise en place de la MCP ainsi que l'activation des réponses de défense sont dépendantes de l'AS (Brodersen *et al.*, 2005) et nécessitent la présence de la lumière (Brodersen *et al.*, 2002). De plus, une forte production de ROS se produit au début des symptômes. L'utilisation du diphenylene iodonium (DPI) qui inhibe la NADPH oxydase et donc la production de ROS et de NO (Delledonne *et al.*, 1998) contribue à réduire fortement l'apparition des lésions foliaires.

Le phénotype du mutant *acd11* est en fait lié à la mutation d'un gène codant pour une protéine cytosolique qui présente une certaine homologie de séquence avec la GLTP animale («GlycoLipid Transfer Protein») qui catalyse le transfert de glycosphingolipides entre les membranes (Brown *et al.*, 1990; Lin *et al.*, 2000). Le rôle biologique de cette protéine n'a pas encore été clairement établi (Airenne *et al.*, 2006). La sur-expression de la GLTP dans le mutant *acd11* est capable de compléter partiellement le gène muté (Petersen *et al.*, 2008). Le phénotype de ce mutant (Figure 14) paraît en tout cas résulter de l'activation de voies de signalisation dépendantes de l'AS conduisant à la MCP et l'activation des mécanismes de défense plutôt que de la perte de fonction du gène *acd11*. Un certain nombre de protéines interagissant avec *acd11* ont été identifiées (Petersen *et al.*, 2009) et apparaissent associées aux membranes, mais leur fonction reste méconnue. La protéine *acd11* ne semble donc pas intervenir directement dans la MCP mais son absence entraîne l'activation de voies de signalisation menant à la MCP.

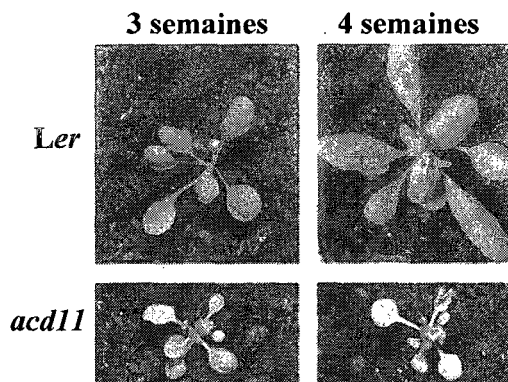


Figure 14. Phénotype du mutant *acd11*. *Ler*, *Landsberg erecta*. Adapté de Petersen *et al.*, 2008.

B. LES THIORÉDOXINES (TRX)

Les travaux de recherche effectués au cours de ce doctorat nous ont amené à évaluer l'implication du gène codant pour la protéine chloroplastique thiorédoxine (Trx) f1 d'*A. thaliana*, dans la MCP mise en place à la suite d'une exposition aux UV-C. Voici donc un descriptif succinct des Trxs et de leurs fonctions chez les plantes.

B.1. Rôle général des Trxs

Les Trxs sont des petites protéines de faible poids moléculaire (12-14 kDa) impliquées dans de nombreux processus biologiques (Schürmann et Buchanan, 2008). Elles sont présentes chez tous les organismes vivants (Buchanan et Balmer, 2005) et ont la particularité de présenter un site catalytique relativement bien conservé WCGPC (Trp-Cys-Gly-Pro-Cys), qui contient deux cystéines responsables de leur activité oxydoréductase (Holmgren, 1985, 1989; Martin, 1995). Les Trxs catalysent en effet, à travers ces deux cystéines, la réduction, par deux réactions successives de transfert d'électron, de ponts disulfures (S-S ou forme oxydée) en groupement thiol (S-H ou forme réduite) d'un certain nombre de protéines, modulant ainsi leur activité (Chivers et Raines, 1997; Gelhaye *et al.*, 2005). Les ponts disulfures sont

présents dans de nombreuses protéines et interviennent dans leur repliement (ponts intramoléculaires) mais aussi lorsqu'elles s'associent pour former des complexes protéiques (ponts intermoléculaires). Au niveau des protéines, les ponts disulfures sont formés essentiellement dans le RE suite à l'oxydation des groupements thiols par les protéines PDI (protein disulfide isomerase) (Hwang *et al.*, 1992; Meyer *et al.*, 2008). Le système Trx représente donc, avec le système Grx (glutarédoxine), l'un des deux systèmes de réduction des ponts disulfures (Meyer *et al.*, 2008).

B.2. Les Trxs végétales

Chez les plantes, les Trxs sont impliquées dans des processus tels que la germination des graines et le développement des plantules (Wong *et al.*, 2002; Marx *et al.*, 2003; Alkhalfioui *et al.*, 2007) ainsi que la défense contre les agents pathogènes (Laloi *et al.*, 2004; Rivas *et al.*, 2004; Sweat et Wolpert, 2007; Tada *et al.*, 2008). Contrairement aux Trxs animales, leurs fonctions dans les plantes ne sont pas encore clairement établies, notamment en ce qui à trait à la protection contre le stress oxydatif. Au départ, elles ont été identifiées en tant que régulateurs d'enzymes impliquées dans le cycle de Calvin mais leur éventail de fonction s'est ensuite considérablement élargi. Elles sont codées par le génome nucléaire et sont retrouvées au niveau du cytosol (type h), du RE (type h), des mitochondries (type h et o), des chloroplastes (types f, m, x et y), du noyau (type h) et même à l'extérieur des cellules (type h) (Schürmann et Jacquot, 2000; Gelhaye *et al.*, 2005; Juarez-Diaz, 2006; Meyer *et al.*, 2008; Jacquot *et al.*, 2009). Contrairement à l'homme, qui n'en possède que deux, le système Trx est beaucoup plus complexe chez les plantes. Il existe en effet pas moins de 20 types de Trx identifiés chez *A. thaliana* (Meyer *et al.*, 2002, 2005) et ce recensement ne prend en compte que les Trxs dites « classiques ». En effet, récemment, l'analyse du génome d'*A. thaliana* a permis de dénombrer au total 49 gènes codant pour des Trxs (Chibani *et al.*, 2009; Jacquot *et al.*, 2009).

La protéine Trx f1, identifiée au cours du crible de mutant de la MCP réalisé suite à une exposition aux UV-C, est localisée principalement dans les chloroplastes, où son activité est

dépendante de la lumière, à l'instar des autres Trxs chloroplastiques (Clancey et Gilbert, 1987). Celles-ci sont réduites par le système FTR (ferrédoxine-thiorédoxine réductase) qui leur transfère des électrons à partir d'une enzyme, la ferrédoxine (Fdx), elle-même réduite dans la chaîne de transfert d'électrons de la membrane des thylakoides, au cours de la photosynthèse (Figure 15) (Dai *et al.*, 2004). En dehors des chloroplastes, c'est le système NTR (NADPH-thiorédoxine réductase) qui assure la réduction des Trxs à partir du NADPH (Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate) (Laloi *et al.*, 2001; Reichheld *et al.*, 2005). Un système équivalent au NTR, le NTRC (NADPH-thiorédoxine réductase chloroplastique) a été découvert récemment dans les chloroplastes (Serrato *et al.*, 2004; Perez-Ruiz *et al.*, 2006) et peut également participer à la réduction des Trxs chloroplastiques (Jacquot *et al.*, 2009).

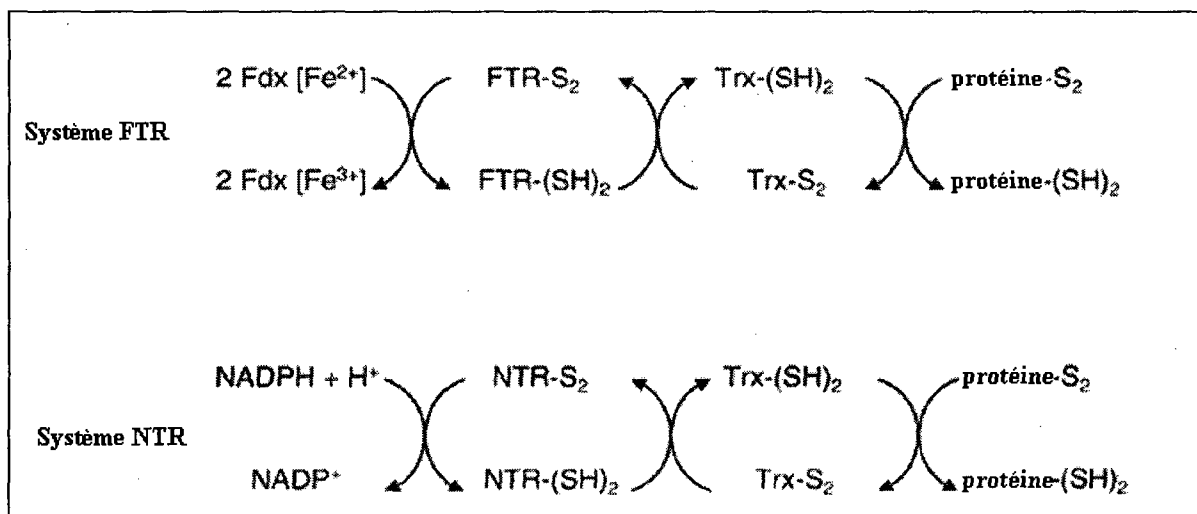


Figure 15. Fonctionnement des systèmes FTR et NTR chez les plantes. Dans le système FTR, localisé dans les chloroplastes, le flux d'électrons est initié par la Fdx, réduite à la lumière au cours de la photosynthèse. La Fdx réduit ensuite la FTR qui peut à son tour réduire les Trxs présentes dans les chloroplastes. Dans le système NTR, localisé dans le cytosol et les mitochondries, la NTR transfère des électrons aux Trxs à partir du NADPH. Une fois réduites, les Trxs peuvent réduire des protéines cibles pour réguler leur activité. Adapté de Montrichard *et al.*, 2009.

Chez *A. thaliana*, on distingue quatre types de Trx dans les chloroplastes : les types f (2), m (4), x (1) et y (2). Les types f et m sont connus depuis longtemps (Jacquot *et al.*, 1997; Ruelland et Miginiac-Maslow, 1999) alors que les types x (Mestres-Ortega et Meyer, 1999) et y (Lemaire *et al.*, 2003) ont été découverts plus récemment et ne sont pas encore bien caractérisés. Dans les chloroplastes, les Trxs f et m régulent notamment des enzymes impliquées dans le cycle de Calvin (Schürmann et Jacquot, 2000; Schürmann et Buchanan, 2008) comme la fructose-1,6-bisphosphatase, mais des expériences de chromatographie d'affinité et de protéomique ont montré que la liste de protéines potentiellement régulées par ces Trxs va bien au-delà de celles impliquées dans la photosynthèse (Montrichard *et al.*, 2009) et peut concerner aussi bien des protéases ou des facteurs de transcription (Balmer *et al.*, 2002), des protéines de réponse aux stress, notamment oxydatifs, comme les peroxyredoxines (Prx) qui sont des peroxydases dévolues à la réduction du H₂O₂ (Motohashi *et al.*, 2001; Balmer *et al.*, 2002; Navrot *et al.*, 2006), ou des protéines présentes dans la membrane chloroplastique et impliquées dans la translocation d'autres protéines ainsi que dans le métabolisme de la chlorophylle (Bartsh *et al.*, 2008). De façon générale, les Trxs possèdent un nombre considérable de cibles potentielles (Arner et Holmgren, 2000).

Récemment, des études ont montré que les Trxs chloroplastiques f et m pouvaient également être retrouvées dans les plastides de tissus ou organes non photosynthétiques (De Dios Barajas-Lopez *et al.*, 2007; Traverso *et al.*, 2008). Elles peuvent ainsi être exprimées et localisées dans des organes comme les racines, notamment au niveau des tissus vasculaires (Trxs f et m) et des zones de divisions cellulaires (Trx f), suggérant un rôle dans la prolifération cellulaire et confortant l'hypothèse d'autres rôles en dehors de la photosynthèse (De Dios Barajas-Lopez *et al.*, 2007). Afin d'évaluer ces rôles, des essais de complémentation ont été réalisés dans la levure *S. cerevisiae*. Cette dernière possède deux Trxs dont le knock-out entraîne, entre autres conséquences, une hypersensibilité au H₂O₂, due à l'impossibilité de réduire la Prx ainsi qu'une capacité très faible à utiliser la méthionine sulfoxyde (MetSO) comme source de méthionine (Met) (Müller, 1991). Les MetSOs résultent en fait de l'oxydation des résidus Met au niveau des protéines par les ROS. Les MetSOs sont normalement réduites par l'enzyme MSR (méthionine sulfoxyde réductase), elle-même

réduite par les Trxs dans la levure (Moskovitz *et al.*, 1997). Cette enzyme intervient donc dans la réparation des dommages occasionnés par les ROS. Chez les plantes, à l'instar des Trxs f et m, l'enzyme MSR est localisée dans les plastides et notamment dans les chloroplastes, importantes source de ROS (Romero *et al.*, 2004). L'expression des Trxs f et m du pois *Pisum sativum* dans le mutant de levure EMY63 (Müller, 1991) dépourvu de ses deux Trxs a permis de montrer qu'elles étaient capables de compléter partiellement l'absence des Trxs endogènes en présence d'H₂O₂ et de MetSO. Ceci laisse supposer une possible interaction des Trxs f et m avec MSR dans la levure et une implication possible dans la détoxification du H₂O₂ (Traverso *et al.*, 2008). Ces expériences de complémentation suggèrent donc l'intervention des Trxs f dans la protection contre le stress oxydatif chez les plantes.

Le système Trx chez les plantes apparaît donc très complexe. Le nombre important de Trxs au sein d'un même organe, comme les chloroplastes, et plus généralement dans les plantes ainsi que la quantité de fonctions avérées et supposées suggèrent qu'en plus d'une éventuelle redondance de fonction, chaque type puisse avoir des fonctions qui leur soient spécifiques.

B.3. Trxs animales et apoptose

Chez les animaux, le système Trx est composé de deux membres, Trx-1 et Trx-2 respectivement localisés dans le cytosol (Holmgren, 1985) et la mitochondrie (Tanaka *et al.*, 2002) et qui sont essentielles à la survie (Matsui *et al.*, 1996; Nonn *et al.*, 2003). Elles participent à la régulation redox de la cellule et concourent principalement à la protection contre le stress oxydatif. Elles ont en effet un rôle très important dans la détoxification des ROS. Elles peuvent agir directement sur certaines formes réactives de l'O₂ comme l'oxygène singulet (¹O₂) ou le radical hydroxyle (\cdot OH) (Das et Das, 2000), mais aussi réguler des enzymes impliquées dans l'élimination du H₂O₂ comme les Prx (Rhee *et al.*, 2005) ou dans la réparation des dommages causés par les ROS comme la MSR (Stadtman *et al.*, 2002), protégeant ainsi les cellules de l'apoptose (Figure 16). Les Trxs sont en effet partie prenante dans le mécanisme d'apoptose. L'inactivation de l'une ou l'autre des Trxs entraîne un

déséquilibre du statut redox de la cellule, ce qui induit l'entrée en apoptose (Nonn *et al.*, 2003; Tonissen et Trapani, 2009). De plus, elles interviennent directement dans le mécanisme d'apoptose, non seulement à travers la détoxification des ROS mais également en interagissant directement avec certains facteurs impliqués dans la mort cellulaire (Tonissen et Trapani, 2009). Elles peuvent ainsi inactiver directement ASK1 («Apoptosis Signal-Regulating Kinase 1»), une MAPKKK (MAPK kinase kinase) qui est présente à la fois dans le cytosol et la mitochondrie et qui régule positivement l'apoptose (Saitoh *et al.*, 1998; Liu et Min, 2002; Zhang *et al.*, 2004; Masutani *et al.*, 2005). ASK1 active en effet certaines voies de MAPKs impliquées dans l'activation de facteurs pro-apoptotiques tel que Bax (Tonissen et Trapani, 2009). Ces kinases phosphorylent et activent également le facteur de transcription p53, qui régule l'expression de gènes pro-apoptotiques (Ueno *et al.*, 1999). De même, Trx-1 régule certains facteurs de transcription tels que NF- κ B («Nuclear Factor-kappa B») en réduisant un résidu cystéine important pour la liaison à l'ADN. NF- κ B contrôle, entre autres gènes, l'expression de gènes anti-apoptotiques appartenant à la famille Bcl-2 (Shishodia et Aggarwal, 2002; Masutani *et al.*, 2005). Trx-1 pourrait ainsi moduler l'apoptose à travers la régulation de la capacité de liaison à l'ADN de NF- κ B. Enfin, Trx-1 est également capable de modifier directement la procaspase 3 par S-nitrosylation (ajout d'un groupement NO sur un résidu cystéine) afin d'inhiber l'apoptose (Mitchell *et al.*, 2007; Mannick, 2007).

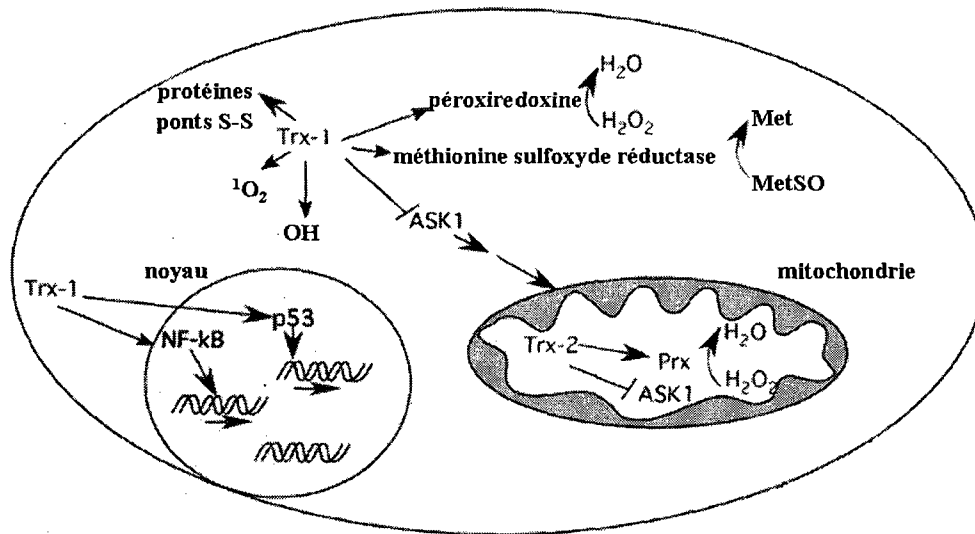


Figure 16. Fonctions cellulaires des Trxs animales. Les Trxs participent à la protection contre les ROS, de façon directe ou par activation de protéines impliquées dans la détoxification (Prxs) et la réparation des dommages (MSR). Les Trxs inhibent également l'apoptose à travers l'inactivation de la protéine ASK1 et la régulation de certains facteurs de transcription comme NF-κB et p53. Adapté de Tonissen et Trapani, 2008.

Au niveau de l'apoptose et de sa prévention, les Trxs animales ont donc clairement un rôle protecteur ou anti-apoptotique, à travers le contrôle des ROS mais aussi en interagissant directement avec des facteurs dévolus à sa mise en place ou son inhibition (Figure 16).

C. OBJECTIFS DE RECHERCHE

Depuis longtemps, l'étude la MCP s'est essentiellement focalisée sur le modèle animal, pour des raisons qui ont été exposées précédemment. Cependant, un effort est réalisé depuis quelques années afin de déterminer les éléments impliqués dans la MCP végétale. En effet, la connaissance des mécanismes régissant la MCP est encore très limitée, malgré une certaine conservation des mécanismes entre animaux et végétaux. Jusqu'à maintenant, très peu d'homologues de gènes animaux ont été identifiés chez les plantes. Parmi les rares

homologues, le gène *BI-1*, qui a la capacité de réprimer la MCP, est particulièrement étudié et représente un outil intéressant afin de décrypter les mécanismes de contrôle de la mort. Partant de ces constats, ce doctorat avait donc pour objectif général d'apporter notre contribution à la compréhension des mécanismes impliqués dans le contrôle de la MCP chez les plantes. Plus particulièrement, le but était d'identifier de nouveaux gènes impliqués dans sa régulation. Le fait que la MCP soit accompagnée d'une forte régulation transcriptionnelle nous a amené à envisager une approche génétique. De là, ont découlé les objectifs spécifiques suivants :

1- Mettre au point un crible de mutant basé sur l'utilisation du gène de la luciférase sous contrôle du promoteur du gène *AtBI-1*, directement impliqué et régulé au cours de la MCP. L'élaboration de ce crible a pour objectif d'établir un système nous permettant d'identifier des mutants affectés dans des voies de signalisation menant à la régulation du promoteur. La mise en place du crible nécessite au préalable de mettre en place les conditions d'induction de la MCP à travers l'utilisation des UV-C.

2- Effectuer l'analyse fonctionnelle du promoteur du gène *AtBI-1*, à travers une série de délétions, afin d'identifier des régulateurs transcriptionnels. Cet objectif découle du fait que le gène *AtBI-1* est régulé au cours de la MCP induite par différents stress, dont les UV-C.

3- Caractériser le gène *Trx fl* ainsi que son rôle potentiel au cours de la MCP. Le gène *Trx fl*, qui code pour une thioredoxine chloroplastique, a été identifié au cours du crible effectif d'une collection de mutants d'*A. thaliana* contenant le gène de la luciférase sans promoteur.

CHAPITRE 1

MATÉRIELS ET MÉTHODES

1.1. MATÉRIEL BIOLOGIQUE ET CONDITIONS DE CULTURE

1.1.1. Milieux de culture

Pour la culture des plantes *in vitro*, les graines d'*Arabidopsis thaliana* sont semées aseptiquement sur un milieu de culture solide Murashige et Skoog (MS) à pH 5,7 (Murashige et Skoog, 1962) contenant du saccharose (1%) et de l'agar (0,8%).

Les bactéries *Escherichia coli* et *Agrobacterium tumefaciens* sont cultivées dans du milieu Luria-Bertani (LB) liquide à pH 7,0 (10 g/L NaCl, 10 g/L tryptone, 5 g/L extrait de levure). Pour les cultures en boîte de pétri, de l'agar est ajouté (20 g/L).

La levure *Saccharomyces cerevisiae* est cultivée dans du milieu YNB («Yeast Nitrogen Base») liquide (7 g/L) contenant du glucose (2%) comme source de carbone et un mélange d'acides aminés (0,7 g/L) dépourvu de leucine qui est l'acide aminé de sélection pour le plasmide «Yep51:Bax». Pour les cultures en milieu solide, de l'agar est ajouté (20 g/L).

1.1.2. Matériel végétal

La plante *A. thaliana*, d'écotype Columbia (Col-0) a été utilisée pour toutes les expériences. Les graines sont préalablement désinfectées (10% hypochlorite de sodium, 0,02% SDS) puis maintenues à l'obscurité pendant 2 à 4 jours à 4°C pour lever la dormance et synchroniser la germination.

Pour la culture *in vitro*, les plantes sont cultivées dans un cabinet de croissance (Sanyo, modèle MLR-350) en lumière continue, à une température contrôlée de 22°C.

Pour la culture en terre, les plantes sont mises à germer dans une chambre de croissance (Convicon, modèle MTR30) selon un cycle photopériodique jour/nuit de 16 h/8 h. Les températures diurnes et nocturnes sont respectivement de 22°C et 19°C.

1.1.3. Microorganismes

Les souches compétentes d'*Escherichia coli* HB101 et DH5 α ont été utilisées pour les transformations bactériennes (Tableau 1).

La souche d'*Agrobacterium tumefaciens* GV3101 a été utilisée pour la transformation génétique des plantes d'*A. thaliana* (Tableau 1).

La souche de levure *Saccharomyces cerevisiae* QX95001 (Tableau 1), dérivée de la souche BF264-15Dau (*MAT α ade1, his2, leu2-3, 112 trp1-1 α , ura3*) (Lew *et al.*, 1991), a été utilisée pour réaliser les essais d'expression du gène *Trx fl*. Elle nous a été fournie gracieusement par le laboratoire du Dre Louise Brisson (Université Laval, Québec, Canada).

Tableau 1. Liste des microorganismes utilisés.

Souche	Caractéristiques	Utilisation
<i>E.coli</i> (HB101)	Transformation par électroporation. Culture à 37°C.	Clonage.
<i>E. coli</i> (DH5 α)	Transformation chimique. Culture à 37°C.	Clonage.
<i>A. tumefaciens</i> (GV3101)	Transformation par électroporation. Culture à 28°C. Contient un gène de résistance à la rifampicine (50 μ g/ml) et à la gentamycine (25 μ g/ml)	Transformation génétique des plantes d' <i>A.thaliana</i> .
<i>S. cerevisiae</i> QX95001	Transformation chimique. Culture à 30°C. Transformée avec le plasmide Yep51: <i>Bax</i> contenant le gène <i>Bax</i> sous contrôle du promoteur inductible <i>GAL10</i> .	Expression du gène <i>Trx fl</i> en présence ou absence de la protéine Bax.

1.2. PLASMIDES ET CONSTRUCTIONS

Toutes les constructions génétiques ont été réalisées à partir de séquences amplifiées par PCR en utilisant la polymérase *Pfu* (Stratagène). Les produits d'amplification PCR ont été purifiés après électrophorèse en utilisant le kit « QIAquick Gel Extraction » (Quiagen), sous-clonés dans le plasmide «PCR-Blunt» (Invitrogen) (Tableau 2) en utilisant la T4 DNA ligase (Invitrogen), séquencés (Génome Québec, Université McGill, Montréal) puis clonés dans les vecteurs de transformation finaux (Tableau 2).

Tableau 2. Liste des vecteurs utilisés pour les différentes constructions.

Plasmide	Construction et utilisation	Caractéristiques
PCR-Blunt	Sous-clonage des produits PCR. Transformation de bactéries <i>E.coli</i> .	Contient le gène <i>NPTII</i> pour la résistance à la kanamycine (50 µg/ml).
pGreen 0229	Clonage du promoteur du gène <i>AtBI-1</i> en amont du gène de la luciférase. Transformation des plantes via <i>A. tumefaciens</i> .	Contient le gène <i>NPTII</i> pour la résistance à la kanamycine (50 µg/ml) et le gène <i>BAR</i> pour la résistance à l'herbicide Basta (10 µg/ml).
pCambia 1301	Clonage du promoteur du gène <i>AtBI-1</i> et des différentes délétions du promoteur en amont du gène <i>GUS</i> . Transformation des plantes via <i>A. tumefaciens</i> .	Contient le gène <i>hph</i> pour la résistance à l'hygromycine (50 µg/ml).
pBIN 19	Clonage du gène <i>Trx fl</i> sous contrôle du promoteur constitutif 35S CaMV. Transformation des plantes via <i>A. tumefaciens</i> .	Contient le gène <i>NPTII</i> pour la résistance à la kanamycine (50 µg/ml).
pYX112	Clonage du gène <i>Trx fl</i> sous contrôle du promoteur constitutif TPI. Transformation et expression dans la levure <i>S. cerevisiae</i> .	Contient le gène <i>Ap</i> pour la résistance à l'ampicilline (50 µg/ml).

1.2.1. Clonage du promoteur du gène *AtBI-1*

Le promoteur du gène *AtBI-1* a été isolé sur une région de 1010 pb en amont du gène. Ceci a été réalisé par PCR, à l'aide des amorces décrites dans le tableau 3, à partir d'ADN génomique extrait de plantules d'*A. thaliana*. Un site de restriction pour l'enzyme *Bam*HI a été ajouté dans l'amorce utilisée pour l'amplification en 5' pour permettre le clonage de la région promotrice. Après sous-clonage et séquençage, le promoteur a été digéré par les enzymes *Bam*HI et *Eco*RV pour laquelle un site de restriction est présent dans le plasmide «PCR-Blunt» (Tableau 2). Le promoteur a ensuite été inséré dans le vecteur de transformation de plante «pGreen 0229» (Tableau 2) en amont du gène codant pour la luciférase (*Photinus pyralis*, n° d'accèsion : M15077). Ce plasmide nous a été fourni gracieusement par le Dr Kamal Bouarab (Université de Sherbrooke, Québec, Canada). Pour l'insertion du promoteur du gène *AtBI-1* dans le plasmide «pGreen 0229», celui-ci a été digéré une première fois avec l'enzyme de *Nco*I (extrémité 3'). Après remplissage de ce site avec la klenow (USB) pour rendre l'extrémité franche, le plasmide a été digéré avec l'enzyme *Bam*HI, purifié sur gel puis ligaturé avec le promoteur du gène *AtBI-1*.

Tableau 3. Liste des amorces utilisées pour la PCR.

Nom	Séquence de l'amorce	Utilisation
PA_{tBI} 5'	5'-CGGGATCCCTCTACAGCCACAGAAGCAG-3'	Amplification et clonage du promoteur d' <i>AtBI-1</i> dans le vecteur pGreen 0229
PA_{tBI} 3'	5'-CATGCCATGGGCTTGACTTTGAGAATCGATTAATG-3'	
PA_{tBI} 5'	5'-CGGGATCCCTCTACAGCCACAGAAGCAG-3'	Amplification et clonage du promoteur d' <i>AtBI-1</i> dans le vecteur pCambia 1301
PA_{tBI}BspHI	5'-CTAGTCATGAGCTTGACTTTGAGAATCG-3'	
TrxClaI	5'-CCATCGATATGCCTCTTCTCTCCGCTTTC-3'	Amplification et clonage de l'ADNc correspondant au gène <i>Trx fl</i> dans le vecteur pBIN19
TrxBamHI	5'-CGGGATCCTCCGGAAGCAGCAGACC-3'	
TrxEcoRI	5'-CCGAATTCATGTGTAGCTTAGAAACCGTTAATG-3'	Amplification et clonage du gène <i>Trx fl</i> dans le vecteur pYX112
TrxBamHI2	5'-CGGGATCCTCATCCGGAAGCAGCAGACC-3'	
72H F	5'-CGACTACCGGAGGATTTGGTC-3'	Amplification de l'ADNc correspondant au gène <i>Trx fl</i> par RT-PCR
72H R	5'-TCATCCGGAAGCAGCAGAC-3'	
18S AT5'	5'-CGGCTACCACATCCAAGGAA-3'	Amplification de l'ADNc correspondant à l'ARN _r 18S par RT-PCR
18S AT3'	5'-TATTCAGAGCGTAGGCCTGC-3'	
UTR5'	5'-GGATGTAAAGTAAATTTAACTTTATG-3'	Amplification de la région 3'UTR du gène <i>AtBI-1</i> . Sonde pour les buvardages de type Northern
UTR3'	5'-GAGAACAAAAGTTTATGAAAAGAAGAAC-3'	
LB1	5'-GTGAAGTTTCTCATCTAAGCCCCATTGG-3'	Tail-PCR sur LB
LB2	5'-CAGACCAATCTGAAGATGAAATGGGTATCTGGG-3'	Tail-PCR ou I-PCR sur LB
LB3	5'-TTC TCC ATA TTG ACC ATC ATA CTC ATT GC-3'	Tail-PCR sur LB
LB4	5'-CACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCTGACG-3'	Utilisée avec LB2 pour I-PCR
RB2	5'-CACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCTGACG-3'	I-PCR sur RB
RB4	5'-TTTGTACCAGAGTCCTTTGATCGTG-3'	
AD1	5'-(A/T/C/G)TCA(G/C)T(A/T)T(A/T)T(G/C)G(A/T)GTT-3'	Amorce dégénéré 1 pour Tail-PCR
AD2	5'-(A/T/C/G)GTCGA(G/C)(A/T)GA(A/T/C/G)A(A/T)GA A-3'	Amorce dégénéré 2 pour Tail-PCR
AD3	5'-TG(A/T)G(A/T/C/G)AG(G/C)A(A/T/C/G)CA(G/C)AGA-3'	Amorce dégénéré 3 pour Tail-PCR
AD4	5'-AG(A/T)G(A/T/C/G)AG(A/T)A(A/T/C/G)CA(A/T)AGG-3'	Amorce dégénéré 4 pour Tail-PCR
AD5	5'-(G/C)TTG(A/T/C/G)TA(G/C)T(A/T/C/G)CT(A/T/C/G)TGC-3'	Amorce dégénéré 5 pour Tail-PCR
AD6	5'-(A/T)GT G(A/T/C/G)AG(A/T)A(A/T/C/G)CA(A/T/C/G)AGA-3'	Amorce dégénéré 6 pour Tail-PCR
M13 Reverse	5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'	Amorces universelles utilisées pour les PCR à partir du vecteur PCR-Blunt
M13 Forward	5'-GTAACACGACGGCCAG-3'	

1.2.2. Les délétions du promoteur du gène *AtBI-1*

Les délétions en 5' de la région promotrice du gène *AtBI-1* ont été effectuées en utilisant les sites de restriction déjà présents dans sa séquence. Au total, 4 délétions du promoteur ont été réalisées, à 110 pb (*BglIII_A*), 196 pb (*BglIII_B*), 466 pb (*EcoRI*) et 681 pb (*HindIII*) (Figure 17) de l'extrémité 5' donnant respectivement des fragments dont la taille est de 900 pb, 814 pb, 544 pb et 329 pb. Le promoteur «complet» ainsi que les différentes délétions obtenues ont été fusionnés au gène rapporteur *GUS* (n° d'accèsion: AF234297) qui code pour la β -D-glucuronidase. Celui-ci est présent dans le vecteur de transformation de plante «pCambia 1301» (<http://www.cambia.org>) (Tableau 2).

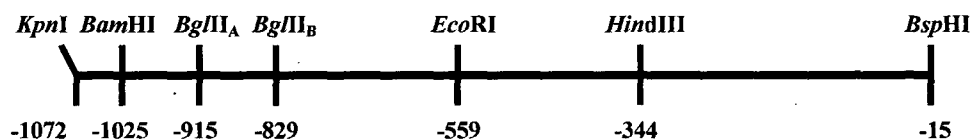


Figure 17. Carte de restriction de la région promotrice du gène *AtBI-1*. Les sites de restriction *BglIII_A*, *BglIII_B*, *EcoRI* et *HindIII* ont été utilisés pour générer les différents fragments de délétion. Les distances, prises à partir de l'ATG du gène *AtBI-1*, sont en pb.

1.2.2.1. Clonage du promoteur

La région promotrice du gène *AtBI-1* a été amplifiée par PCR (Tableau 3) à partir de la séquence clonée dans le plasmide «PCR-Blunt» (Tableau 2). Après sous-clonage dans le plasmide «PCR-Blunt», le promoteur a été digéré avec l'enzyme *KpnI* dont le site est présent dans le MCS du plasmide et l'enzyme *BspHI* dont le site de restriction a été ajouté dans l'amorce utilisée pour l'amplification en 3', pour être finalement cloné dans le vecteur «pCambia1301» (Tableau 2) préalablement digéré avec les enzymes *KpnI* et *NcoI* (site compatible avec celui de *BspHI*).

1.2.2.2. Clonage des fragments *BgIII_A-BspHI* et *BgIII_B-BspHI*

La région promotrice du gène *AtBI-1* a d'abord été amplifiée à partir de la séquence présente dans le plasmide «PCR-Blunt» (Tableau 2) à l'aide des amorces universelles M13 Reverse et Forward (Invitrogen) (Tableau 3). Des digestions ont alors été effectuées avec l'enzyme de restriction *BgIII* de manière à générer des fragments de digestion complète (*BgIII_B*) et partielle (*BgIII_A*). Après électrophorèse et purification des deux fragments, ces derniers ont été digérés avec l'enzyme *BspHI*. Les produits de digestion obtenus ont alors été clonés dans le vecteur «pCambia1301» (Tableau 2) préalablement digéré avec les enzymes *BamHI* (site compatible avec celui de *BgIII*) et *NcoI* (site compatible avec celui de *BspHI*).

1.2.2.3. Clonage du fragment *EcoRI-BspHI*

Le vecteur «pCambia1301» (Tableau 2) dans lequel la région promotrice du gène *AtBI-1* a été clonée (voir 1.2.2.1.) a été digéré avec l'enzyme *EcoRI* dont le site est également présent en amont du promoteur dans le site de clonage multiple (MCS). Le plasmide a ensuite été ligaturé pour être refermé sur lui-même.

1.2.2.4. Clonage du fragment *HindIII-BspHI*

La région promotrice du gène *AtBI-1* présente dans le plasmide «PCR-Blunt» (Tableau 2) a été digéré avec les enzymes *HindIII* et *BspHI*. Après électrophorèse et purification sur gel, le fragment obtenu a été cloné dans le vecteur «pCambia1301» (Tableau 2) préalablement digéré avec les enzymes *HindIII* et *NcoI* (site compatible avec celui de *BspHI*).

1.2.3. Sur-expression du gène *Trx fl*

1.2.3.1. Sur-expression dans les plantes

L'ADNc correspondant au gène *Trx fl* d'*A. thaliana* a été obtenu par RT-PCR en utilisant des amorces (Tableau 3) dans lesquelles ont été intégrés des sites de restriction correspondant aux enzymes *ClaI* et *BamHI* pour permettre le clonage. Après sous-clonage et séquençage,

l'ADNc a été digéré de façon séquentielle par les enzymes *ClaI* et *BamHI* puis purifié sur gel. L'ADNc a ensuite été inséré derrière le promoteur constitutif 35S CaMV (virus de la mosaïque du chou-fleur) dans le vecteur de transformation de plante «pBIN19» (Tableau 2) préalablement digéré avec les enzymes *ClaI* et *BamHI*. Ce plasmide nous a également été fourni par le Dr Kamal Bouarab (Université de Sherbrooke, Québec, Canada).

1.2.3.2. Sur-expression dans la levure

Pour les expériences de fonctionnalité dans la levure, l'ADNc correspondant au gène *Trx fl* a été amplifié par RT-PCR en utilisant des amorces (Tableau 3) auxquelles ont été ajoutés des sites de restriction correspondant aux enzymes *EcoRI* et *BamHI* afin de réaliser le clonage dans le vecteur «pYX112» (Tableau 2). Pour s'assurer d'avoir une protéine fonctionnelle, l'amorce utilisée pour l'amplification en 5' a été choisie de manière à ôter la séquence correspondant au peptide d'adressage aux chloroplastes. Comme pour la souche de levure utilisée, le plasmide «pYX112» nous a été fourni par le laboratoire du Dre Louise Brisson (Université Laval, Québec, Canada). Après sous-clonage dans le plasmide «PCR-Blunt» (Tableau 2) et séquençage, celui-ci a été digéré avec les enzymes *EcoRI* et *BamHI* puis purifié sur gel. Il a ensuite été cloné derrière le promoteur constitutif TPI (triose phosphate isomérase) présent dans le vecteur «pYX112», lequel a été préalablement digéré avec les enzymes *EcoRI* et *BamHI*.

1.3. TRANSFORMATION DES LEVURES

Pour transformer la souche de levure QX95001 (Tableau 1) qui contient le plasmide *Yep51:Bax* (Xu et Reed, 1998) avec la construction *pYX112:Trx fl*, une culture de 30 ml a été ensemencée dans du milieu YNB liquide contenant du glucose ainsi qu'un mélange d'acides aminés dépourvu de leucine et placée à 30°C en agitation pendant 24-48 h. Après avoir atteint une DO de 1 à 1,5, les levures sont centrifugées (2500 rpm, 5 min) et lavées 2 fois avec de l'eau stérile. Après le second lavage, les levures sont reprises dans une solution de TE 0,1 M, LiAc 0,1 M et incubées pendant 1 h à 30°C en agitation. Pour réaliser la transformation, 100 µl de culture sont alors mis en présence de 1 µg de plasmide, 10 µl

d'ADN de sperme de hareng (100 mg/ml) préalablement dénaturé et 700 µl d'un mélange constitué de PEG 4000 40%, TE 0,1 M et LiAc 0,1 M. Les levures sont alors incubées pendant 3 h à 30°C en agitation avant de subir un choc thermique pendant 15 mn à 42°C. Les levures sont alors centrifugées et reprises dans de l'eau stérile. Les levures sont alors étalées sur milieu sélectif contenant du glucose pour être sélectionnées en absence des acides aminés de sélection, en l'occurrence la leucine pour le plasmide Yep51:*Bax* et l'uracile pour le plasmide pYX112:*Trx fl*, puis incubées à 30°C pendant 3 jours.

1.4. ESSAI DE FONCTIONNALITÉ DANS LA LEVURE

Après transformation, les essais de fonctionnalité du gène *Trx fl* sont par la suite réalisés sur du milieu YNB contenant du glucose (2%) dans lequel le gène *Bax* n'est pas exprimé ou du galactose (2%) pour induire l'expression du gène *Bax*. Dans un premier temps, les levures contenant d'une part les vecteurs Yep51:*Bax* et pYX112:vide et d'autre part les vecteurs Yep51:*Bax* et pYX112:*Trx fl* sont incubées dans du milieu YNB liquide contenant du glucose et un mélange d'acides aminés dépourvu de leucine. Après 24 h, les cultures sont lavées avec de l'eau stérile et diluées de manière à avoir une D.O. de 1. Une série de dilutions successives est alors réalisée (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} et 10^{-5}) avec de l'eau stérile. Trois µl de chaque dilution sont ensuite prélevés et déposés sur 2 boîtes de pétri contenant du milieu YNB solide sans les 2 acides aminés de sélection (leucine et uracile). Chaque boîte de pétri contient respectivement du glucose et du galactose comme source de carbone. Les boîtes de pétri sont alors incubées à 30°C pendant 2 jours (glucose) et 4 jours (galactose).

1.5. TRANSFORMATION DES PLANTES ET SÉLECTION

La transformation des plantes d'*A. thaliana* a été réalisée en utilisant la technique du «floral dip» décrite par Clough et Bent (1998). Après environ 6 semaines, les graines sont récoltées et les plantes transformées (T1) sélectionnées en boîte de pétri sur du milieu de culture MS solide contenant l'antibiotique ou l'herbicide adéquat.

1.6. ANALYSE DE SÉGRÉGATION ET SÉLECTION DES HOMOZYGOTES

Après sélection, les lignées transformées (T1) sont transférées en terre. A la génération suivante (T2), les descendants obtenus par autofécondation sont à nouveau placés en boîte de pétri contenant du milieu MS avec l'antibiotique ou l'herbicide de sélection. Après deux semaines de culture, un comptage est effectué afin de déterminer, pour une même lignée, le nombre de plantules résistantes et de plantules sensibles à l'agent de sélection. Les lignées qui présentent un ratio de ségrégation 3:1, équivalent à $\frac{3}{4}$ de résistants ($\frac{1}{4}$ homozygotes et $\frac{1}{2}$ hétérozygotes) pour $\frac{1}{4}$ de sensibles ont été conservées, ces lignées correspondant à priori à une insertion simple dans le génome de la plante. Pour chaque lignée présentant une ségrégation de type 3:1, cinq plantules résistantes sont transférées en terre. Les graines issues de l'autofécondation (T3) sont alors mises à germer sur boîte de pétri contenant du milieu MS ainsi que l'antibiotique ou l'herbicide de sélection. Les lignées homozygotes qui présentent donc une résistance de 100% à l'agent sélectif, sont alors conservées.

1.7. DETERMINATION DU NOMBRE D'INSERTION

Afin de déterminer le nombre d'insertions présentes dans les lignées transformées, les lignées homozygotes qui ont été obtenues à partir de celles présentant un ratio de ségrégation 3:1 ont été analysées par buvardage de type Southern (voir 9.3.3.). L'ADN génomique est d'abord extrait à partir des plantes selon la méthode décrite à la section 9.3.1. puis digéré avec différentes enzymes de restriction dont les sites sont à la fois présents dans l'ADN-T et dans la séquence génomique d'*A. thaliana*. La sonde utilisée pour le Southern blot, marquée au ^{32}P , correspond à l'ADNc du gène de la luciférase présent dans les lignées transformées. Le nombre de bandes obtenu après révélation permet de déterminer le nombre d'insertions.

1.8. INDUCTION DE LA MCP PAR LES UV-C

Pour les traitements aux rayons UV-C, un appareil de type stratalinker (modèle 2400, Stratagène) constitué de cinq lampes UV-C a été utilisé. Les traitements ont été réalisés sur des plantules d'*A. thaliana* cultivées *in vitro* ou sur des feuilles prélevées à partir de plantes

cultivées en terre pendant 4-5 semaines (voir 1.9.4.). Des doses de rayonnements UV-C de 5, 10, 20, 30 et 50 kJ/m² ont été utilisées au cours des différentes expériences d'induction. Les pétris sont maintenus ouvertes pendant le traitement aux UV-C puis refermées et placées à l'incubateur en lumière continue.

1.9. MISE EN ÉVIDENCE DE LA MCP

1.9.1. Coloration au bleu d'Evans

Le bleu d'Evans (Sigma-Aldrich) a été utilisé pour détecter la mortalité au niveau de plantules d'*A. thaliana* cultivées *in vitro* pendant 4-5 jours selon une méthode dérivée de celle décrite par Watanabe et Lam, 2006. Les plantules sont prélevées avant et après traitement aux UV-C pour être immergées dans 1 ml de bleu d'Evans 1% pendant 15 mn. Les plantules sont ensuite rincées à plusieurs reprises avec de l'eau distillée pour être observées directement avec une loupe binoculaire (Nikon SM 2800) puis photographiées.

1.9.2. Dosage au bleu d'Evans

La quantification du bleu d'Evans fixé au niveau des cellules mortes s'est faite selon une méthode dérivée de celle décrite par Ishiga *et al.*, (2005). Les plantules entières sont immergées dans une solution constituée de méthanol 50%, SDS 1% à 50°C pendant 30 min. Le bleu d'Evans récupéré est ensuite dosé directement au spectrophotomètre (600 nm). Les analyses statistiques ont été réalisées dans le logiciel SAS 9.1 par test ANOVA à une voie avec le traitement aux UV-C comme facteur principal. Des comparaisons *à posteriori* ont été réalisées par test de Duncan.

1.9.3. Dosage de la chlorophylle

Pour évaluer la sensibilité aux UV-C, les plantules d'*A. thaliana* sont cultivées *in vitro* pendant 6 jours puis récoltées avant et après traitement aux UV-C pour évaluer la perte en chlorophylle après irradiation. Les plantules sont préalablement pesées puis incubées pendant 2 jours dans 5 ml d'acétone 80% (v/v) à l'obscurité (4°C). Le contenu en chlorophylle a et b

est alors déterminé à partir de 3 répétitions (30 plantules/répétition), par dosage au spectrophotomètre respectivement à 663 nm et 645 nm selon la méthode décrite par Ni *et al.*, 2009. Les analyses statistiques ont été réalisées dans le logiciel SAS 9.1 par test de Student.

1.9.4. Fragmentation de l'ADN génomique

1.9.4.1. Extraction de l'ADN génomique

L'ADN génomique a été isolé à partir de 0,5 g de matière fraîche provenant de plantules d'*A. thaliana* cultivées *in vitro* pendant 12 jours et récoltées avant et après traitement aux UV-C. L'extraction a été réalisée selon une méthode adaptée de celle décrite par Dean *et al.*, 1992. Les plantules ont d'abord été congelées et broyées dans l'azote liquide. La poudre obtenue a ensuite été transférée dans du tampon d'extraction préchauffé à 65°C (Tableau 10, annexes). Après incubation à 65°C, du chloroforme est ajouté. Après nouvelle incubation du mélange à 65°C, une centrifugation (3000 rpm, 4°C, 5 min) est effectuée et la phase aqueuse est précipitée avec 1 volume d'isopropanol. Après centrifugation (9000 rpm, 4°C, 10 min), le culot est repris dans du TE (10 mM Tris, pH 8,0, 1 mM EDTA). L'ARN présent dans la solution est alors précipité avec 1 volume d'acétate de lithium 4 M. Après centrifugation (5000 rpm, 4°C, 10 min), le surnageant est récupéré et l'ADN génomique précipité avec 2 volumes d'éthanol 100 %. Le culot obtenu après centrifugation (9000 rpm, 4°C, 10 min) est alors repris dans du TE. L'ADN génomique est alors purifié successivement avec 1 volume de phénol, de phénol/chloroforme 1:1 (v/v) et de chloroforme. A cette étape, l'ADN génomique contenu dans le surnageant est alors précipité avec 1/10 de volume d'acétate de sodium 3 M, pH 5,6 et 2 volumes d'éthanol 100%. Après centrifugation (9000 rpm, 4°C, 10 mn), le culot est repris dans du TE puis traité pendant une nuit avec de la RNase A (100 µg/ml). Le lendemain, l'ADN génomique est à nouveau purifié avec 1 volume de phénol/chloroforme 1:1 (v/v), précipité et le culot repris dans du TE.

1.9.4.2. Préparation de la sonde

La sonde utilisée pour détecter la fragmentation de l'ADN est réalisée à partir d'ADN génomique d'*A. thaliana* préalablement digéré avec l'enzyme *Mbo*I. Par la suite, le marquage radioactif est réalisé par « random priming » en utilisant le kit « Ready-To-Go DNA Labelling Beads » (GE Healthcare). La sonde est synthétisée pendant une nuit à 37°C à partir de 50 ng d'ADN, en présence de 50 µCi d' $\alpha^{32}\text{P}$ dCTP. La sonde marquée est ensuite purifiée en utilisant une colonne de séphadex G-50 (GE Healthcare) afin de séparer l'ADN marqué des dCTP radioactifs non incorporés, qui seront alors retenus dans la colonne. Après comptage de la sonde dans un compteur à scintillation (Beckman, modèle LS 6000SC), la sonde est ajoutée au tampon d'hybridation de manière à obtenir environ 1 million de cpm/ml de tampon.

1.9.4.3. Buvardage de type Southern

Pour observer la fragmentation de l'ADN internucléosomal, l'ADN génomique extrait selon la méthode décrite précédemment est séparé par électrophorèse sur gel d'agarose 2%. L'ADN génomique est alors transféré par capillarité sur une membrane Hybond N (Amersham) en utilisant du tampon SSC 20X. Après transfert, la membrane est d'abord préhybridée au moins 3 h à 65°C dans du tampon de préhybridation (Tableau 11, annexes). La sonde marquée au $\alpha^{32}\text{P}$ dCTP est alors dénaturée puis ajoutée au tampon d'hybridation (Tableau 11, annexes). Après hybridation pendant une nuit à 65°C, la membrane est lavée 2 fois dans des conditions croissantes de stringence (Tableau 12, annexes). La membrane est ensuite exposée sur un film autoradiographique ou analysée en utilisant un phosphoimager (Molecular imager FX de la compagnie Biorad) et le logiciel d'analyse Quantity One (Biorad).

1.9.4.4. Quantification des dépôts au phosphoimager

Pour l'analyse de la fragmentation de l'ADN par buvardage de type Southern, chaque dépôt d'ADN génomique a été quantifié sur gel avec un phosphoimager, à l'aide du logiciel

«Quantity one». Ceci est fait afin de s'assurer d'avoir des dépôts homogènes pour tous les échantillons. Pour la quantification, une « carré », de taille uniforme, est placée autour de chaque bande d'ADN. Ce volume qui englobe chaque dépôt d'ADN est identique pour tous les échantillons déposés. Le logiciel mesure ensuite l'intensité totale de tous les pixels dans un volume donné. Les données sont exprimées en CNT/mm² (coups/mm²).

1.9.5. Analyse phénotypique (dégradation de la chlorophylle)

Pour les analyses phénotypiques, les plantes ont été cultivées selon un cycle photopériodique jour/nuit de 12 h/12 h et un taux d'humidité maintenu à 60% le jour et 80% la nuit. Ces conditions de croissance favorisent la croissance foliaire. Après 4-5 semaines, les feuilles sont prélevées (6 feuilles par plante) puis déposées dans des grandes boîtes de pétri contenant du papier filtre (Whatman, Schleicher & Schuell n°1), imbibé avec de l'eau distillée afin de maintenir les feuilles en vie. Les feuilles sont ensuite photographiées puis traitées aux UV-C. Les boîtes de pétri sont alors refermées avec du parafilm pour empêcher l'évaporation puis placées dans une chambre de croissance (Sanyo, modèle MLR-350) en lumière continue, à une température contrôlée de 22°C. Les feuilles sont à nouveau photographiées 4 jours plus tard.

1.9.6. Essais de germination sur méthyl viologen

Le méthyl viologen (Sigma-Aldrich) est un herbicide qui cible les chloroplastes et induit une MCP chez les plantes à travers la production de ROS. Pour les traitements au méthyl viologen, l'herbicide est préalablement dissous dans de l'eau stérile, filtré puis mélangé au milieu de culture solide MS à une concentration finale de 0,2 µM. Les graines d'*A. thaliana* sont ensuite déposées sur le milieu puis placées à l'incubateur, en lumière continue pendant 10 jours. Les plantules sont ensuite photographiées.

1.9.7. Microscopie à fluorescence

Afin de visualiser la mortalité cellulaire au niveau racinaire suite à un traitement aux rayons UV-C, des photographies de racines prises sur des plantules cultivées *in vitro* et âgées de 5 jours ont été réalisées en utilisant un microscope à fluorescence AxioImager Z1 (Carl Zeiss). Les plantules sont d'abord incubées pendant 5 min dans une solution contenant de l'iodure de propidium (IP, 2.78 μ M) qui colore les noyaux des cellules mortes en rouge et du diacétate de fluorescéine (FDA, 50 μ M) qui colore les cellules vivantes en vert. Les racines sont ensuite rincées 3 fois et observées au microscope qui est muni d'un apotome permettant de réaliser des coupes optiques. L'image finale est reconstruite à l'aide du logiciel AxioVision LE V4.5.

1.10. ANALYSES TRANSCRIPTIONNELLES

1.10.1. Extraction d'ARN totaux

Les ARN totaux ont été isolés à partir de plantules d'*A. thaliana* récoltées après 12 jours de germination *in vitro*, avant et après traitement aux UV-C, en utilisant deux méthodes d'extraction différentes selon que l'ARN extrait était utilisé pour réaliser des RT-PCR ou des buvardages de type Northern.

1.10.1.1. Méthode utilisée pour les RT-PCR

Pour les RT-PCR, les ARN totaux ont été extraits à partir de 0,2 g de matière fraîche, préalablement congelée et broyée dans l'azote liquide, dans du Tri- Reagent (Sigma Aldrich) composé d'un mélange de phénol et de guanidium isothiocyanate. Après ajout de chloroforme, le mélange est centrifugé (12000 x g, 4°C, 10 min). Les ARN totaux sont alors précipités avec 1 volume d'isopropanol puis centrifugés (12000 x g, 4°C, 10 min). Le culot est alors lavé avec de l'éthanol 75% puis repris dans de l'eau DEPC. Les ARN sont alors traités à la DNase (Promega), purifiés avec 1 volume de phénol/chloroforme/isoamylalcool 25:24:1 (v/v/v) et repris dans de l'eau DEPC.

1.10.1.2. Méthode utilisée pour les buvardages de type Northern

Pour réaliser les buvardages de type Northern, les ARN totaux ont été extraits à partir de 0,5 g de matière fraîche. Les plantules d'*A. thaliana* ont d'abord été broyées dans l'azote liquide. La poudre est ensuite transférée dans un mélange préchauffé à 80°C contenant du tampon d'extraction (Tableau 13, annexes) et du phénol. Après ajout de chloroforme/isoamylalcool 24:1 (v/v) et centrifugation (15000 rpm, 4°C, 5 min), les ARN sont précipités avec 1 volume de LiCl 4 M. Le lendemain, l'ARN est centrifugé (15000 rpm, 4°C, 30 min) et le culot repris dans de l'eau DEPC. Après purification avec 1 volume de phénol/chloroforme/isoamylalcool 25:24:1 (v/v/v) et centrifugation, le surnageant est récupéré et l'ARN est précipité avec 1/10 de volume d'acétate de sodium 3 M, pH 5,6 et 2,5 volumes d'éthanol 100%. Le troisième jour, l'ARN est centrifugé (15000 rpm, 4°C, 20 min) et le culot lavé avec de l'éthanol 75%. Après centrifugation (15000 rpm, 4°C, 5 min), le culot est repris dans de l'eau DEPC.

1.10.2. RT-PCR

Après extraction (voir 10.1.1.), la réaction de synthèse de l'ADNc par transcription inverse (RT) est réalisée à partir de 2 µg d'ARN totaux en utilisant l'enzyme « AMV reverse transcriptase » (Promega). Les ARN totaux sont d'abord dénaturés pendant 5 min à 70°C en présence de 1 µg de poly(dT) (Promega). Après 5 min sur glace, la réaction (25 µl) est effectuée en ajoutant le mélange réactionnel : tampon pour la RT (1X), RNAsine 40U, dNTP 25 pmoles, RT (30U) pendant 90 mn à 42°C. Pour chaque réaction de PCR, 2 µl de la réaction de RT sont utilisés (Tableau 4).

Tableau 4. Conditions utilisées pour les PCR.

Conditions utilisées pour le gène <i>TRX fl</i>	
Cycle 1 (1X)	94°C, 4 min
Cycle 2 (22X)	94°C, 30 sec 63°C, 30 sec 72°C, 1 min
Cycle 3 (1X)	72°C, 10 min
Conditions utilisées pour le gène <i>AtBI-1</i>	
Cycle 1 (1X)	94°C, 4 min
Cycle 2 (30X)	94°C, 30 sec 57°C, 30 sec 72°C, 1 min
Cycle 3 (1X)	72°C, 10 min
Conditions utilisée pour le gène <i>Luc</i>	
Cycle 1 (1X)	94°C, 4 min
Cycle 2 (30X)	94°C, 30 sec 57°C, 30 sec 72°C, 1 min
Cycle 3 (1X)	72°C, 10 min
Conditions utilisées pour l'ARN_R <i>18S</i>	
Cycle 1 (1X)	94°C, 4 min
Cycle 2 (28X)	94°C, 30 sec 60°C, 30 sec 72°C, 1 min
Cycle 3 (1X)	72°C, 10 min

1.10.3. Buwardages de type Northern

Les ARN totaux (20 µg), extraits selon la méthode décrite précédemment (voir 10.1.2.) sont séparés par électrophorèse sur gel d'agarose 1,5% dans du tampon MOPS 1X (acide 3-(N-morpholino) propane sulfonique 0,2 M, acétate de sodium 3M, pH 5,6, EDTA 0,5 M, pH 8.0), en présence de formaldéhyde. Les ARN totaux sont ensuite transférés sur une membrane Hybond N (Amersham). Après fixation aux UV-C, les ARN sont hybridés avec la sonde d'intérêt marquée avec du $\alpha^{32}\text{P}$ dCTP selon le protocole décrit précédemment. La sonde correspond à la région 3' UTR du gène *AtBI-1* amplifiée par RT-PCR (Tableau 3). La membrane est d'abord préhybridée puis hybridée dans du tampon (Tableau 14, annexes)

contenant la sonde marquée. Après hybridation pendant une nuit à 65°C, la membrane est alors lavée à 4 reprises dans des conditions de stringence croissantes (Tableau 15, annexes). La membrane est ensuite révélée de la même manière que celle décrite pour les Southern blot.

1.11. LE CRIBLE DE MUTANTS

1.11.1. Principe du crible de mutants basé sur le promoteur du gène *AtBI-1*

Le principe du crible de mutants repose sur l'analyse de plantes d'*A. thaliana* transformées avec le gène de la luciférase sous contrôle du promoteur du gène *AtBI-1* (1.2.1), impliqué dans la MCP. Ce crible est en effet basé sur l'analyse des variations de l'activité transcriptionnelle du gène de la luciférase suite à une induction de la MCP. Préalablement au crible, les graines issues de la plante transformée ont subi des mutations à l'EMS dans leur génome dans le but d'isoler chez les descendants des mutants dérégulés dans des voies de signalisation menant à l'expression du gène rapporteur (Figure 18).

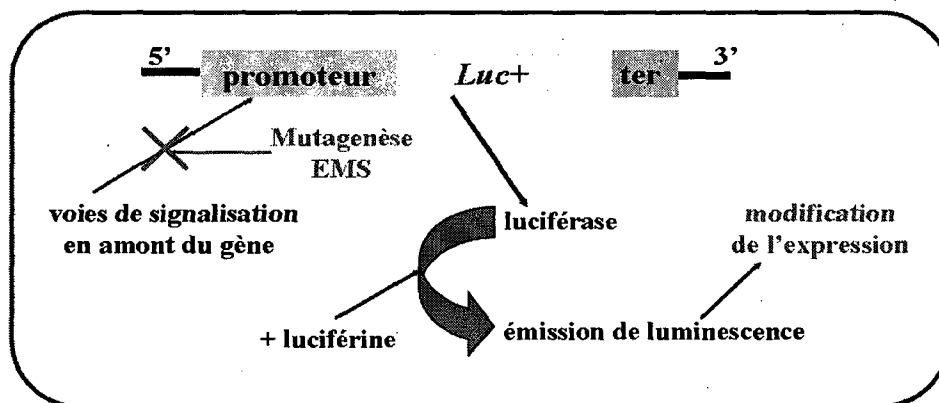


Figure 18. Représentation schématique du modèle expérimental. Après irradiation aux UV-C, les plantules transformées par la construction sont analysées à l'aide de la caméra CCD afin de détecter la luminescence émise. Dans le cas de mutations au niveau de voies de signalisation menant à l'expression du promoteur, la modification de son activité pourra être détectée par observation des variations de luminescence. *Luc*, luciférase; *ter*, terminateur.

1.11.2. La collection de mutants contenant la luciférase sans promoteur

Le crible de mutants d'*A. thaliana* a été réalisé à partir d'une collection d'insertion d'ADN-T (Alvarado *et al.*, 2004) qui nous a été fournie gracieusement par le laboratoire du Dr Laszlo Szabados (Institut de Biologie des plantes, Hongrie). Elle est constituée de 20261 lignées transgéniques transformées avec le vecteur pTluc (Figure 19) dont l'ADN-T contient le gène de la luciférase sans promoteur et le gène *hph* qui confère la résistance à l'hygromycine (50 µg/ml). Pour faciliter le crible de mutants, les graines issues de l'autofécondation des lignées transformées de génération T1 ont été rassemblées par groupe de 100 dans des quantités similaires.

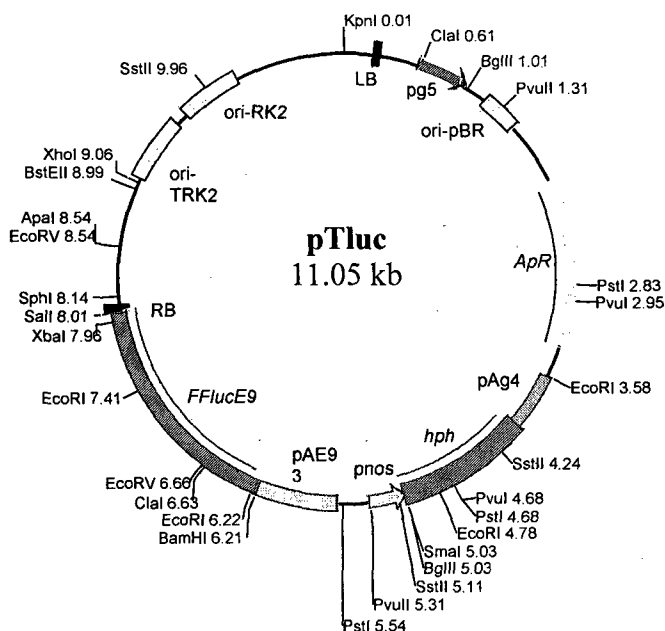


Figure 19. Carte du vecteur pTluc. pg5, promoteur du gène 5 de l'ADN-T; ori/pBR, origine de répliation du plasmide pBR322; ApR, gène de résistance à l'ampicilline; pAg4, séquence signal 3' poly(A⁺) du gène 4 de l'ADN-T; *hph*, gène de résistance à l'hygromycine; pnos, promoteur de la nopaline synthase; *FFlucE9*, gène de la luciférase; *pAE93*, région 3' polyA du gène E93. Tiré de Alvarado *et al.*, 2004.

1.12. DÉTECTION DE LA LUMINESCENCE

Pour le crible de mutants, un système d'imagerie constitué d'une caméra CCD (Charged Coupled Device, MicroMAX System, Roper Scientific) installé sur une chambre noire a été utilisé pour la détection de la bioluminescence émise par les plantules d'*A. thaliana* transformées avec le gène de la luciférase (génération T2). Les plantules sont d'abord mises en culture en boîte de pétri sur du milieu MS solide (environ 1000 graines par boîte de pétri) pendant 10 à 12 jours. La bioluminescence est ensuite détectée suite à l'ajout de D-luciférine (Gold BioTechnology). La luciférase catalyse une réaction de décarboxylation qui conduit à l'émission d'un photon autour de 560 nm. La luciférine (2 mM) est d'abord pulvérisée sur les plantules avant traitement aux UV-C. Celles-ci sont alors analysées avec la caméra avant d'être irradiées aux UV-C à une dose de 5 kJ/m². Les plantules sont ensuite replacées dans le cabinet de croissance pendant 24 h avant d'être analysées à nouveau. L'acquisition et l'analyse des images sont réalisées à l'aide du logiciel d'imagerie winview/32 (Roper Scientific).

1.13. QUANTIFICATION DE LA LUMINESCENCE

Un luminomètre a été utilisé (modèle Sirius, Berthold) pour la quantification de la bioluminescence émise par les plantules d'*A. thaliana* transformées avec le gène de la luciférase. Les plantules sont d'abord broyées dans l'azote liquide. L'extraction des protéines totales ainsi que la réaction enzymatique ont été réalisées à l'aide du kit « Luciferase Assay System » selon les recommandations de la compagnie Promega.

1.14. CONFIRMATION DES LIGNÉES D'INTÉRÊT

Au cours du crible, les lignées d'*A. thaliana* (génération T2) qui présentent une variation de luminescence suite au traitement aux UV-C sont ensuite repiquées en terre. A la génération suivante (T3), les graines issues de l'autofécondation des plantes repiquées sont mises en culture sur boîte de pétri puis analysées à la caméra avant et après induction pour confirmer les lignées d'intérêt qui répondent aux UV-C.

1.15. IDENTIFICATION DES JONCTIONS DE L'ADN-T

Une fois le crible de mutant d'*A. thaliana* effectué, l'ADN génomique a été extrait à partir de 0,5 g de matière fraîche provenant des lignées sélectionnées en réponse aux UV-C. L'extraction a été réalisée selon la méthode adaptée de celle décrite par Dean *et al.*, 1992 (voir section 9.3.1.).

Afin de localiser les sites d'insertion de l'ADN-T au niveau du génome des plantes transformées, 2 techniques de PCR ont été utilisées : la I-PCR (Inverse-PCR) et la TAIL-PCR (Thermal Asymmetric Interlaced-PCR).

1.15.1. Inverse PCR

La technique I-PCR (figure 20) utilisée a été adaptée de celle décrite dans Szabados *et al.*, 2002.

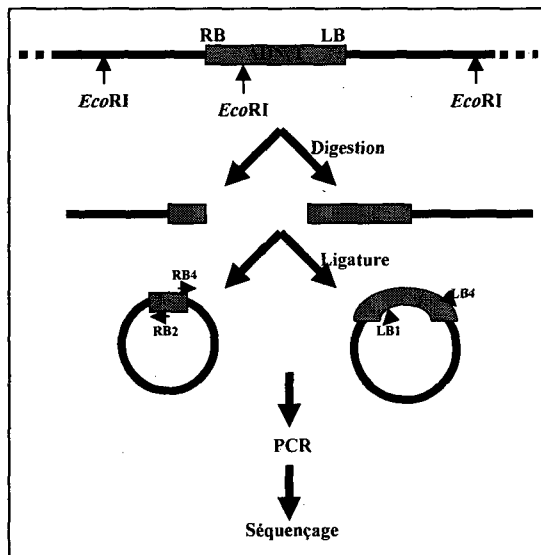


Figure 20. Schéma descriptif de la technique I-PCR. L'ADN génomique est digéré avec l'enzyme de restriction *EcoRI* puis ligaturé. Pour la PCR, les amorces RB2 et RB4 ont été utilisées pour l'amplification de la jonction de la bordure droite (RB) tandis que les amorces LB1 et LB4 ont été utilisées pour l'amplification de la jonction de la bordure gauche (LB).

L'ADN génomique (2 µg) est d'abord digéré avec l'enzyme de restriction *EcoRI* dont le site est présent à l'intérieur de l'ADN-T. L'ADN est alors précipité à avec 1/10 de volume d'acétate de sodium 3 M, pH 5,6 et 2 volumes d'éthanol 100% puis repris après centrifugation dans 38 µl d'eau stérile. La moitié de l'ADN est alors circularisé à l'aide de la T4 DNA ligase à 16°C pendant une nuit. Le lendemain, l'ADN est purifié avec 1 volume de phénol/chloroforme/isoamylalcool 25:24:1 (v/v/v), précipité à -20°C et repris finalement dans 10 µl d'eau stérile. La PCR est alors réalisée à partir de 1 µl du produit de ligature en utilisant les amorces décrites dans le tableau 3. Les conditions de PCR sont décrites dans le tableau 5.

Tableau 5. Conditions utilisées pour la I-PCR.

Cycle 1 (1X)	94°C, 4 min
Cycle 2 (35X)	94°C, 30 sec
	60°C, 30 sec
	72°C, 5 min
Cycle 3 (1X)	72°C, 10 min

Après avoir réalisé la PCR, une aliquote est déposée sur gel d'agarose 1,5% afin de vérifier la présence d'un produit d'amplification.

1.15.2. TAIL-PCR

La technique de TAIL-PCR (Figure 21) utilisée pour identifier les sites d'intégration de l'ADN-T dans le génome d'*A. thaliana* a été adaptée à partir de celle décrite dans le protocole rédigé par John McElver (Weigel et Glazebrook, 2002). La méthode consiste à réaliser 3 rondes de PCR successives en utilisant en combinaison des amorces spécifiques à l'ADN-T avec des amorces dégénérées qui vont pouvoir s'hybrider sur la séquence génomique d'*A. thaliana* (Tableau 3).

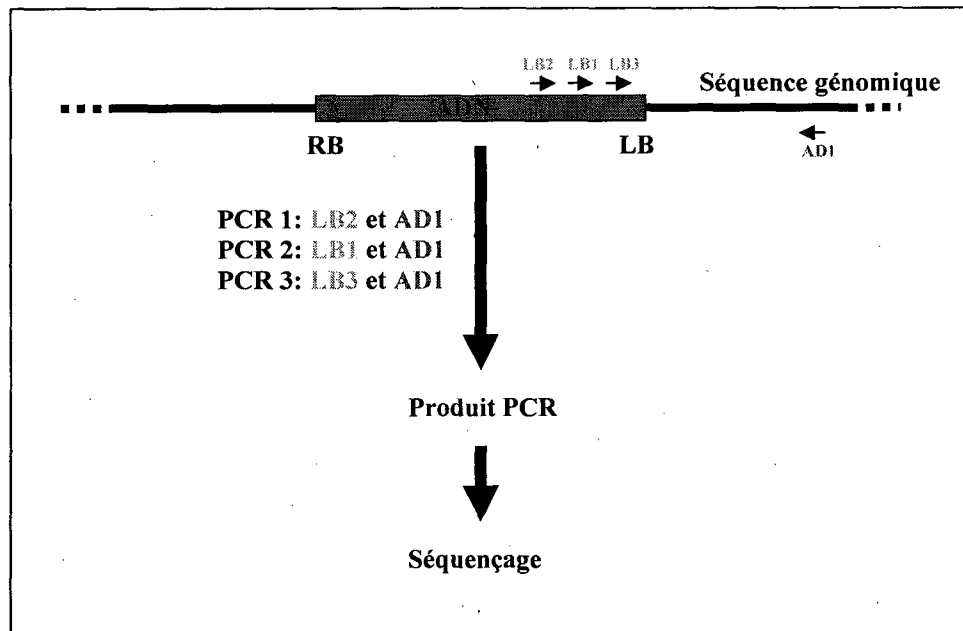


Figure 21. Schéma descriptif de la technique TAIL-PCR. Dans cet exemple, les amorces LB2, LB1 et LB3 spécifiques à la bordure gauche (LB) de l'ADN-T sont utilisées successivement dans les 3 rondes de PCR en combinaison avec l'amorce dégénérée AD1. Adapté de Radhamony *et al.*, 2005.

La 1^{ère} ronde de PCR est réalisée à partir de 20 ng d'ADN génomique. Pour cette amplification, l'amorce LB2 qui est la plus éloignée de la jonction est utilisée en combinaison avec chacune des amorces dégénérées (Tableau 3) selon les conditions du tableau 6.

Tableau 6. Conditions utilisées pour la 1^{ère} ronde de TAIL-PCR.

Cycle 1 (1X)	94°C, 4 min
Cycle 2 (5X)	94°C, 1 min
	65°C, 1 min
	72°C, 2.5 min
Cycle 3 (1X)	94°C, 1 min
	25°C, 3 min
	72°C, 2.5 min
Cycle 4 (15X)	94°C, 30 sec
	68°C, 1 min
	72°C, 2.5 min
	94°C, 30 sec
	68°C, 1 min
	72°C, 2.5 min
	94°C, 30 sec
45°C, 1 min	
72°C, 2.5 min	
Cycle 5 (1X)	72°C, 5 min

A la suite de la 1^{ère} ronde de PCR, les échantillons sont dilués 1:50 dans de l'eau stérile. Deux µl du produit dilué sont alors utilisés pour faire la seconde ronde de PCR. L'amorce LB1 est utilisée en combinaison avec chacune des amorces dégénérées (Tableau 3) selon les conditions du tableau 7. L'amorce LB1 va permettre un enrichissement de la séquence d'intérêt au détriment des produits d'amplification non spécifiques.

Tableau 7. Conditions utilisées pour la 2^{ème} ronde de TAIL-PCR.

Cycle 1 (1X)	94°C, 30 sec
Cycle 2 (15X)	94°C, 30 sec
	68°C, 1 min
	72°C, 2.5 min
	94°C, 30 sec
	68°C, 1 min
	72°C, 2.5 min
	94°C, 30 sec
	45°C, 1 min
	72°C, 2.5 min
Cycle 3 (1X)	72°C, 5 min

Après la 2^{ème} ronde de PCR, une aliquote est déposée sur gel d'agarose 1.5%. A ce stade, en fonction de la qualité de l'amplification, les produits PCR peuvent être directement utilisés pour le séquençage. Pour la 3^{ème} ronde de PCR, les échantillons sont à nouveau dilués 50X et 2 µl sont alors utilisées pour la troisième ronde de PCR (Tableau 8). L'amorce LB3 est alors utilisée en combinaison avec chacune des amorces dégénérées afin de favoriser de façon spécifique l'amplification du ou des fragments d'intérêt (Tableau 3).

Tableau 8. Conditions utilisées pour la 3^{ème} ronde de TAIL-PCR.

Cycle 1 (1X)	94°C, 1 min
Cycle 2 (25X)	94°C, 30 sec
	45°C, 1 min
	72°C, 5 min

1.15.3. Séquençage et identification des sites d'insertion

Les produits PCR obtenues par I-PCR et TAIL-PCR ont par la suite été séquencés (Génome Québec). L'identification des jonctions entre l'ADN-T et la séquence génomique d'*A. thaliana* a été réalisée par comparaison de séquence en utilisant les banques de donnée NCBI GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) et TAIR (<http://www.arabidopsis.org>).

1.16. Détection histochimique GUS

La détection de l'activité GUS au niveau des plantules d'*A. thaliana* transformées avec le promoteur complet et les différentes délétions du gène *AtBI-1* a été réalisée de façon classique en utilisant le substrat de la β -glucuronidase, le 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronide (X-GLUC) qui, après oxydation, va former un précipité bleu visualisable directement au niveau des tissus végétaux.

Les plantules non traitées et traitées aux UV-C sont tout d'abord incubées 45 min dans une solution de fixation (0,37% formaldéhyde, 10 mM MES, 300 mM mannitol) à température ambiante. Après rinçages, les plantules sont infiltrées sous vide pendant 5 min dans du tampon phosphate (50 mM) contenant le X-GLUC (0,5 mg/ml) puis incubées pendant 1 nuit à 37°C. Les plantules sont ensuite décolorées à plusieurs reprises dans l'éthanol 100% afin d'éliminer la chlorophylle avant d'être observées et photographiées à la loupe binoculaire.

CHAPITRE 2

RÉSULTATS

2.1. MISE AU POINT D'UN CRIBLE DE MUTANT DE LA MCP BASÉ SUR LE PROMOTEUR DU GÈNE *ATBI-1* ET ANALYSE FONCTIONNELLE DE SON PROMOTEUR

2.1.1. Mise au point du crible de mutants de la MCP

2.1.1.1. Induction de la MCP

Au début de ce projet, la première chose à faire consistait à trouver un inducteur de MCP adéquat pour réaliser le crible. Il existe en effet plusieurs moyens pour induire la MCP chez les végétaux. Le choix de l'inducteur était soumis à deux impératifs majeurs: celui-ci devait être suffisamment efficace pour induire une MCP rapide chez un organisme entier comme *A. thaliana*, sans être pour autant létal au niveau de la plante entière. La réalisation du crible impose en effet de pouvoir maintenir en vie les mutants sélectionnés sur la base de la luminescence observée pour pouvoir analyser les descendants. En se basant sur la littérature, les UV-C et la camptothécine, un alcaloïde qui inhibe la topoisomérase I, avaient été choisis pour induire la MCP. Après avoir réalisé quelques tests, les UV-C sont rapidement apparus comme une bonne alternative par leur facilité d'utilisation.

2.1.1.1.1. Mise au point des conditions d'induction aux UV-C

L'idée d'utiliser les UV-C comme inducteur reposait sur une étude qui avait montré que ces derniers, comme chez les animaux, étaient capable d'induire la MCP chez des plantes d'*A. thaliana*, ceci par observation de la fragmentation de l'ADN (Danon et Gallois, 1998). Cette étude représentait en fait la seule démonstration d'une induction de la MCP chez les plantes par les UV-C. Les résultats obtenus par cette équipe étaient intéressants mais devaient être vérifiés. Nous avons donc essayé de démontrer que les UV-C pouvaient effectivement induire une mise en place de la MCP chez *A. thaliana*.

2.1.1.1.2. Fragmentation de l'ADN internucléosomal

L'observation de la fragmentation a été réalisée par buvardage de type Southern. Différentes inductions ont été faites notamment pour des doses allant de 5 à 50 kJ/m². Les plantes ont été récoltées après 10-12 jours de germination puis l'ADN extrait entre les temps 0 (récolte suivant immédiatement l'induction) et 120 h soit 5 jours après l'induction. Le temps 0 sert de témoin afin de montrer que les UV-C n'ont pas d'effet direct sur la fragmentation observée (Figure 22).

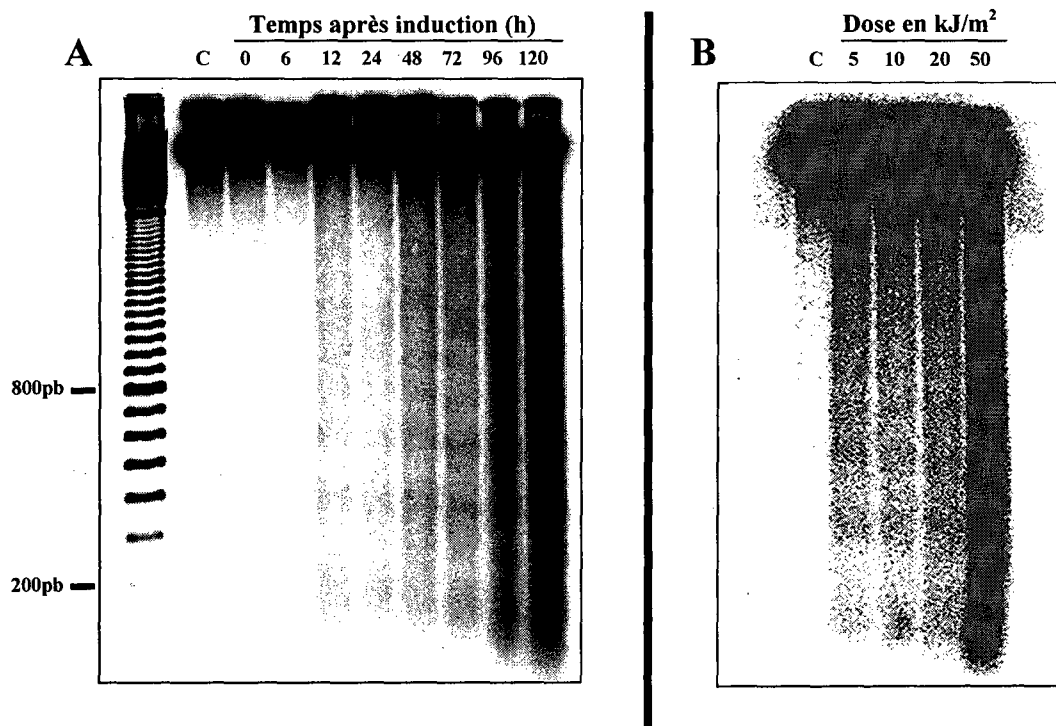


Figure 22. Observation de la fragmentation de l'ADN sur des plantules d'*A. thaliana* traitées aux UV-C. Après électrophorèse, l'ADN génomique a été hybridé avec la sonde marquée au ³²P (ADN génomique digéré avec *Mbo*I) puis analysé en utilisant un phosphoimager. A) fragmentation de l'ADN observée après irradiation aux UV-C à une dose de 50 kJ/m² de plantules âgées de 12 jours (C, témoin, non traité aux UV-C); B) fragmentation de l'ADN observée 48 h après traitement sur des plantules âgées de 12 jours, irradiées à des doses de 5, 10, 20 et 50 kJ/m². L, marqueur de taille.

La fragmentation de l'ADN a ainsi pu être montrée pour différentes doses d'UV-C testées, allant de 5 à 50 kJ/m² (Figure 22A et B). L'ADN du témoin, non traité aux UV-C, ne présente aucune fragmentation ou dégradation. À 50 kJ/m², l'observation de l'ADN extrait des plantes, immédiatement après irradiation (temps 0) permet également d'établir que les UV-C n'ont aucun effet direct sur une éventuelle fragmentation de l'ADN. Celle-ci apparaît 12 h après induction et augmente progressivement au cours du temps, indiquant une régulation du processus (Figure 22A). L'ADN finit ensuite par être dégradé majoritairement après 4 jours (96 h). Le marqueur de taille utilisé (100 pb DNA Ladder) au cours de la migration confirme que les fragments observés forment des multiples d'environ 180 pb.

Ces résultats appuient donc l'hypothèse que les UV-C sont capables d'induire une MCP chez les plantes. Ceci était jusqu'à présent le cas au niveau des cellules animales mais restait discutable en ce qui concerne les cellules végétales, si on se basait uniquement sur les résultats obtenus par Danon et Gallois, 1998.

2.1.1.1.3. Observation des plantes traitées aux UV-C

Après traitement des plantes d'*A. thaliana* aux UV-C, les symptômes accompagnant la mise en place de la MCP sont marqués par une dégradation de la chlorophylle. Celle-ci apparaît progressivement au cours du temps, et s'apparente, par son aspect, à un phénotype de sénescence (Figure 23).

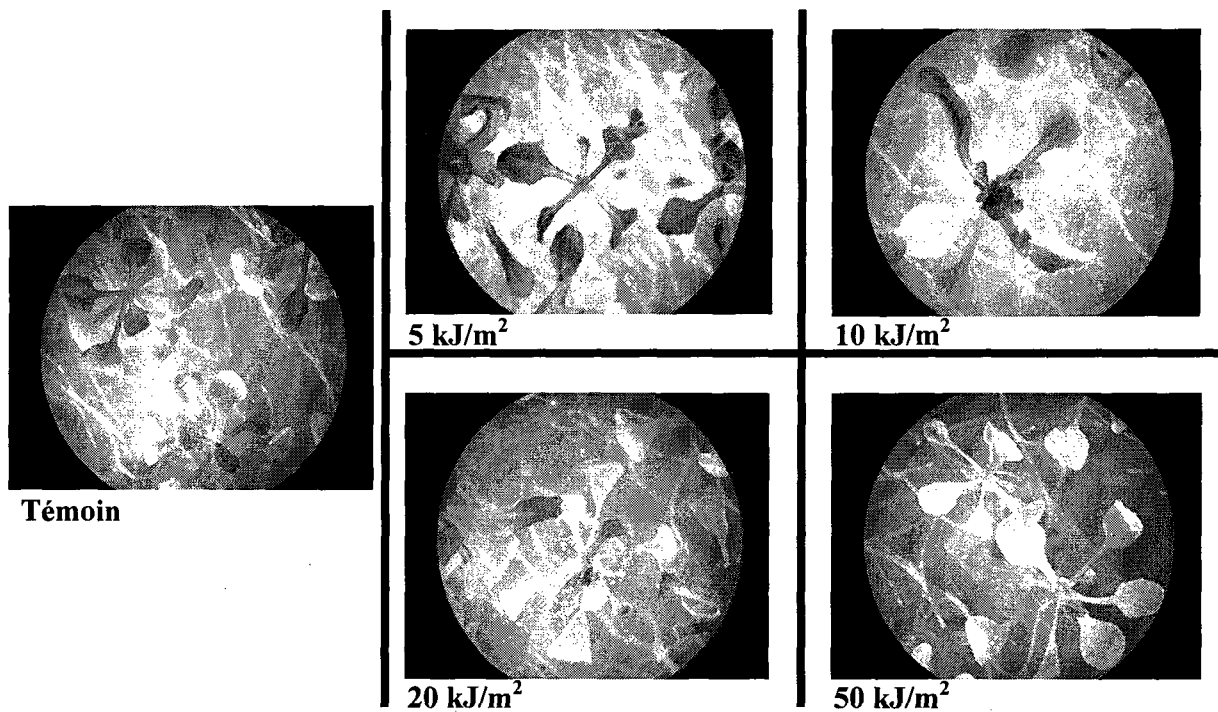


Figure 23. Phénotype des plantules d'*A. thaliana* traitées aux UV-C. Les plantules ont été irradiées à des doses allant de 5 à 50 kJ/m², puis photographiées après 5 jours.

Pour effectuer le crible de mutants, la dose utilisée pour le traitement aux UV-C devait être suffisante pour induire une MCP au niveau cellulaire tout en étant non létale pour la plante entière. Aux différentes doses testées, les observations réalisées montrent que les plantules survivent très bien et reprennent leur croissance entre 5 et 10 kJ/m², reprennent difficilement leur croissance à 20 kJ/m² et meurent majoritairement à 50 kJ/m². Suite aux différents tests, la dose minimale expérimentée qui était de 5 kJ/m² a donc été choisie pour induire la MCP au cours du crible. Celle-ci s'est en effet révélée suffisante pour induire une MCP, à travers l'observation de la fragmentation de l'ADN, sans pour autant toucher à l'intégrité de la plante.

2.1.1.2. Sélection et clonage du promoteur du gène *AtBI-1*

2.1.1.2.1. Le gène *AtBI-1*

L'efficacité du crible reposait sur deux nécessités, à savoir l'utilisation d'un promoteur fort et contrôlant un gène directement impliqué dans la régulation de la MCP chez les plantes. Contrairement à l'apoptose animale, très peu de gènes impliqués dans la régulation de la MCP chez les plantes avaient été identifiés. Après avoir analysé la littérature, le choix s'était donc naturellement porté sur le gène *AtBI-1* dont l'implication directe dans la MCP avait été démontrée à de nombreuses reprises. Il restait à analyser l'activité de ce gène suite à une induction aux UV-C.

2.1.1.2.2. Analyse de l'expression du gène *AtBI-1*

Dans des situations de stress pouvant aboutir à une mise en place de la MCP, l'expression du gène *AtBI-1* et de ses homologues chez les plantes se retrouve, la plupart du temps, induite (voir introduction). Ce gène est un inhibiteur de MCP et l'augmentation de son niveau dans les plantes aurait pour rôle d'atténuer ou de contrebalancer la MCP mise en place, afin de garantir un certain équilibre et d'éviter que « la machine ne s'emballe ».

Pour évaluer le comportement du gène *AtBI-1* dans les plantes d'*A. thaliana* suite à une induction de la MCP par les UV-C, des transferts de type Northern ont été réalisées en utilisant comme sonde de détection, la région 3' UTR du gène *AtBI-1* (Figure 24). La séquence correspondant au 3'UTR a été choisie car le génome d'*A. thaliana* possède trois gènes codant pour des membres de la famille *AtBI*, lesquels présentent entre eux une forte homologie de séquence.

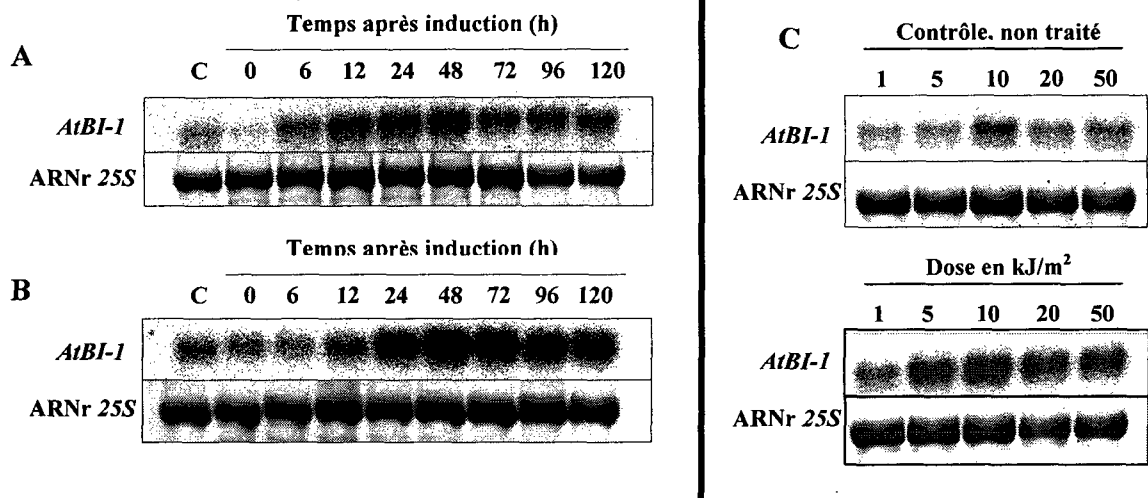


Figure 24. Expression du gène *AtBI-1* chez *A. thaliana* en réponse aux UV-C. Les profils d'expression du gène *AtBI-1* ont été analysés par transfert de type Northern à partir de 20 µg d'ARN totaux. A) Expression du gène *AtBI-1* après irradiation à 10 kJ/m²; B) Expression du gène *AtBI-1* à 50 kJ/m²; C) Analyse d'expression du gène *AtBI-1*, 48h après induction aux UV-C à des doses de 1, 5, 10, 20 et 50 kJ/m². C, témoin non traité. L'ARN 25S, coloré au bromure d'éthidium a été utilisé comme témoin approximatif des quantités déposées dans les puits.

L'analyse des profils d'expression du gène *AtBI-1* a permis de constater que ce gène était fortement régulé suite à une induction de la MCP par les UV-C. Le niveau d'accumulation des ARNm augmente fortement entre 6 et 12 heures après traitement des plantules d'*A. thaliana* aux UV-C et semble atteindre un pic d'expression 48h après traitement (Figure 24A et B). Son niveau d'expression paraît ensuite diminuer légèrement mais se maintient tout de même à un niveau relativement élevé, au moins jusqu'à cinq jours (120 heures) après traitement aux UV-C (Figure 24A et B). De plus, il est possible que le niveau d'induction du gène *AtBI-1* par les UV-C soit corrélé à la dose administrée, tout du moins pour des doses

comprises entre 1 et 10 kJ/m² (Figure 24C). A partir de 10 kJ/m², l'expression du gène *AtBI-1*, observée 48 h après traitement aux UV-C, atteint un maximum, indépendamment de la dose utilisée (Figure 24C).

Ces analyses d'expression confirment donc que le gène *AtBI-1*, impliqué dans la MCP, est régulé positivement suite à un traitement aux UV-C chez *A. thaliana*. L'augmentation de son activité transcriptionnelle en réponse aux UV-C corrobore les différentes études qui ont montré que l'expression du gène *BI-1* était induite au cours de différents stress, notamment abiotiques, pouvant conduire à la mise en place de la MCP.

2.1.1.3. Sélection du promoteur, clonage et transformation végétale

Après avoir montré que le gène *AtBI-1* était régulé par les UV-C, sa région promotrice, a été isolée par PCR sur une région d'environ 1000 pb en amont du gène a été fusionnée avec le gène *Luc* codant pour la luciférase. Après transformation, les plantes ont été sélectionnées *in vitro* sur un milieu de germination sélectif contenant l'herbicide Basta. Le taux de transformation a été d'environ 2,2%, ce qui est conforme aux rendements habituellement observés.

2.1.1.4. Sélection et analyse des lignées transgéniques

Après sélection sur Basta, 100 plantes transformées (T1), nommées PL1 à PL100, ont été repiquées en terre afin d'obtenir la génération suivante. Des PCR ont également été réalisées sur de l'ADN génomique extrait à partir de feuilles prélevées sur une partie des plantes en terre et ont confirmé l'intégration de l'ADN-T (résultats non montrés). L'analyse des descendants (T2) sur Basta a permis d'isoler 43 lignées transformées qui présentaient une ségrégation de type 3:1 sur les 100 lignées sélectionnées au départ, et donc susceptibles de contenir une seule insertion.

Afin de s'assurer que le gène *Luc* était effectivement exprimé, des RT-PCR ont été réalisées sur les 43 lignées transformées (T2). Les résultats, non montrés ici, ont révélé que le gène

codant pour la luciférase était exprimé après induction par les UV-C mais plus faiblement que le gène *AtBI-1*. Étant donné qu'en moyenne, à la génération T2, les boîtes de pétri de type 3:1 comportent ¼ de plantes sensibles qui n'ont pas le gène codant pour la luciférase, il est en réalité difficile d'avoir une idée réelle du niveau d'expression de ce gène. Ces RT-PCR ont permis de retenir 5 lignées transformées parmi les 43 préalablement sélectionnées dont l'expression semblait, de façon générale, plus forte, à savoir les lignées 2PL20, 2PL7, 2PL35, 2PL66 et 2PL71 (T2). A la génération suivante (T3), une quantification de la luminescence émise par ces 5 lignées, sélectionnées à l'état homozygote, a été réalisée, au luminomètre, avant et après traitement par les UV-C (Figure 25).

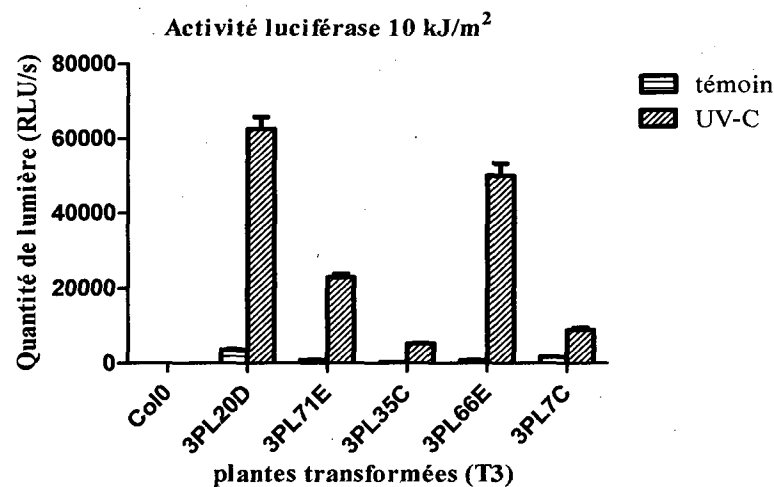


Figure 25. Luminescence émise par les 5 lignées transformées. Les quantifications ont été réalisées au luminomètre à partir de 10 µg de protéines totales extraites des lignées 3PL20D, 3PL71E, 3PL35C, 3PL66E et 3PL7C, avant irradiation (témoin) et 24 h après traitement aux UV-C à une dose de 10 kJ/m². Col-0, type sauvage non transformé. RLU, « Relative Light Unit ».

Les résultats obtenus montrent que, la luciférase produite est fonctionnelle puisqu'une activité enzymatique est détectée pour chacune des lignées transformées. L'activité de la

luciférase est différente d'une lignée à l'autre. Cette différence est possiblement attribuable au site d'insertion de l'ADN-T dans leur génome.

Parmi les 5 lignées analysées, la lignée 3PL20D montre la plus forte activité luciférase. Dans cette lignée, une cinétique d'expression a été réalisée par RT-PCR (figure 26) afin d'évaluer le comportement du gène *Luc* par rapport au gène *AtBI-1*, suite à un traitement par les UV-C.

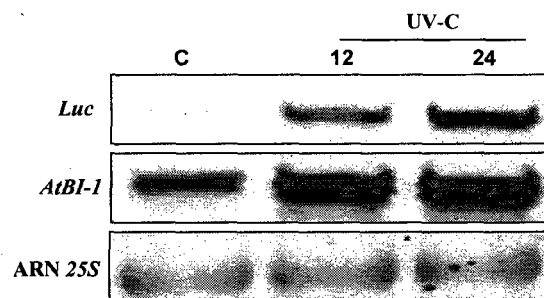


Figure 26. Expression du gène *Luc* dans la lignée 3PL20D. Les ARN totaux ont été extraits à partir de plantes irradiées à une dose de 10 kJ/m^2 . Les RT-PCR ont été réalisées 12 h et 24 h après traitement. C, témoin non traité. L'ARN 25S, coloré au bromure d'éthidium a été utilisé comme contrôle approximatif de chargement des puits.

Comme pour le gène *AtBI-1*, l'analyse transcriptionnelle montre une induction du gène *Luc* après traitement par les UV-C. Par contre, les ARNm correspondant au gène de la luciférase sont faiblement transcrits par rapport à ceux du gène *AtBI-1*. La région promotrice du gène *AtBI-1* sélectionnée apparaît tout de même suffisante pour maintenir la régulation par les UV-C.

La quantification de la luminescence émise dans la lignée 3PL20D, après traitement par les UV-C (Figure 27) montre également une augmentation croissante de l'activité luciférase, au cours du temps.

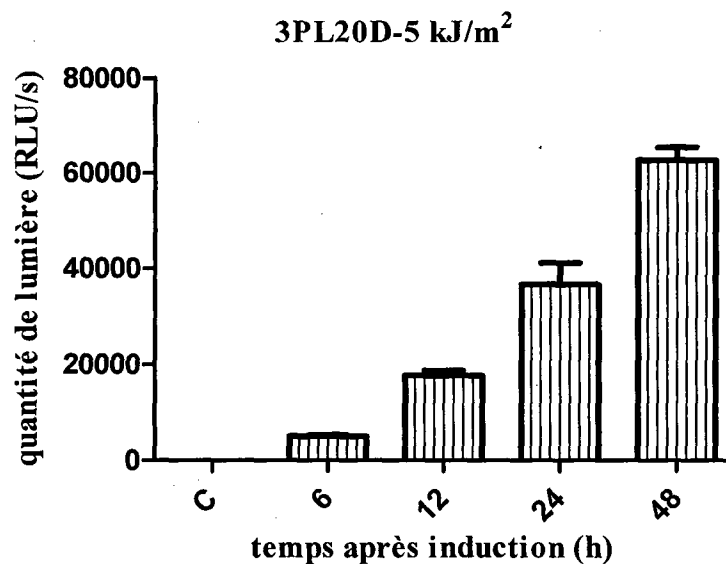


Figure 27. Luminescence émise par la lignée 3PL20D. Les mesures ont été réalisées au luminomètre à partir de 10 µg de protéines totales extraites de la lignée 3PL20D avant irradiation (c) et 6 h, 12 h, 24 h et 48 h après traitement aux UV-C à une dose de 5 kJ/m². RLU, « Relative Light Unit ».

D'après ces résultats, la région promotrice du gène *AtBI-1*, sélectionnée pour le crible est effectivement fonctionnelle. Sa régulation par les UV-C est maintenue dans les plantes transformées et la luciférase produite est fonctionnelle.

Au cours du crible de mutants, la détection de la luminescence émise est faite à l'aide d'une caméra. Des essais de détection ont donc été réalisés avec la lignée 3PL20D avant et après traitement par les UV-C (figure 28).

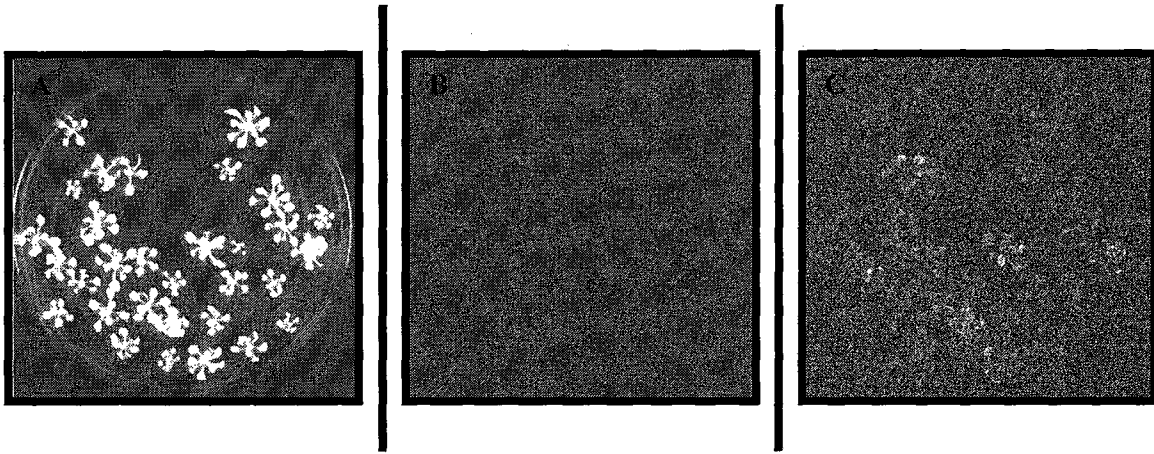


Figure 28. Détection de la luminescence émise par la lignée 3PL20D avec la caméra. A) fluorescence chlorophyllienne observée avec la caméra CCD; **B)** Analyse de la luminescence de la lignée 3PL20D avant traitement aux UV-C, après 10 min d'acquisition; **C)** Luminescence émise par la lignée 3PL20D, 24 h après irradiation à une dose de 5 kJ/m^2 (10 min d'acquisition).

Finalement, la lignée homozygote 3PL20D a été analysée par buvardage de type Southern afin de confirmer le nombre de copies de l'ADN-T inséré dans son génome. Après hybridation, l'analyse a permis de déterminer que la lignée 3PL20D présentait une seule bande pour chacune des deux digestions, correspondant à une insertion simple de la construction dans son génome (Figure 29).

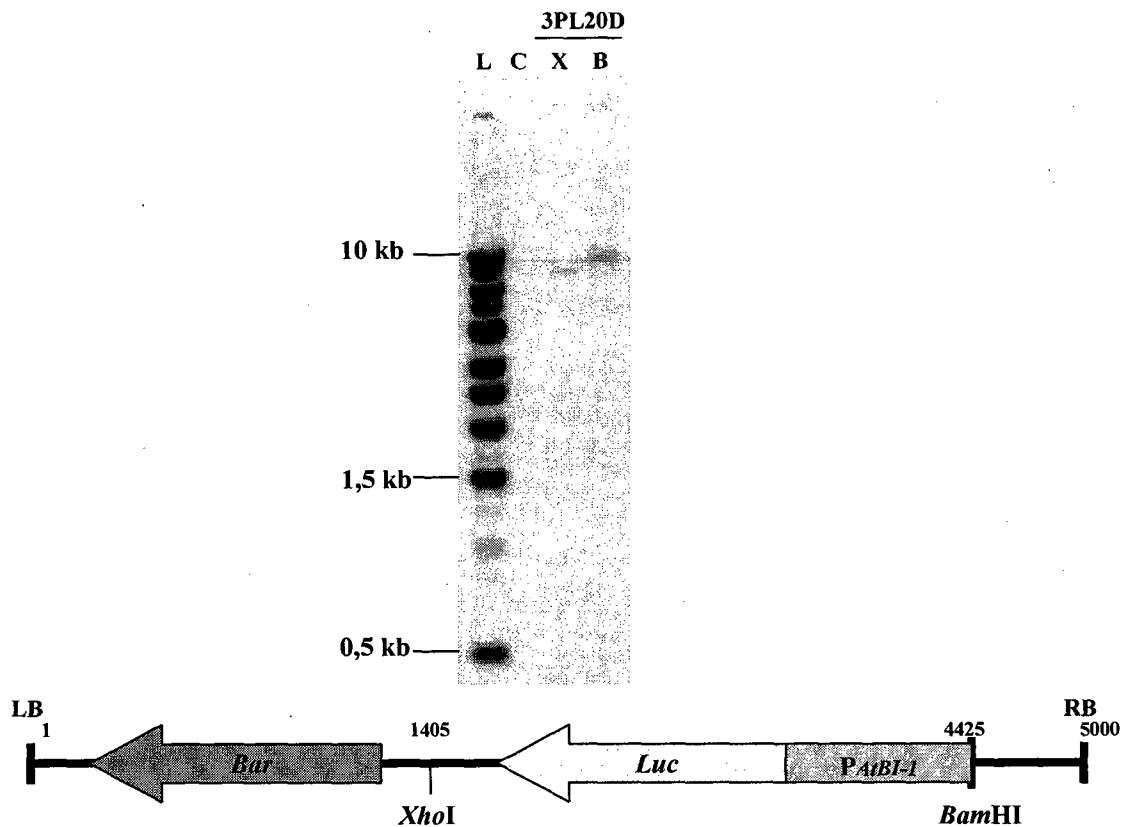


Figure 29. Détermination du nombre d'insertion dans la lignée 4PL20D par buvardage de type Southern. Après extraction, l'ADN génomique est digéré avec les enzymes de restriction *XhoI* et *BamHI* puis hybridé avec une sonde marquée au ^{32}P correspondant au gène *Luc*. X, *XhoI*; B, *BamHI*; C, Col-0; L, marqueur de taille (1 kb DNA ladder); *Bar*, gène de résistance à l'herbicide Basta; *Luc*, luciférase; *PAI-1*, promoteur du gène *AtBI-1*.

A ce stade, la mise au point du crible est terminée. Les conditions d'induction de la MCP par les UV-C ont été établies. De plus, la séquence promotrice du gène *AtBI-1* utilisée pour réaliser la construction régule effectivement le gène de la luciférase suite à une induction par les UV-C. Enfin, la lignée 3PL20D sélectionnée pour le crible présente une seule insertion de la construction et la luminescence émise après irradiation est détectable par la caméra.

2.1.2. Étude fonctionnelle du promoteur du gène *AtBI-1*

2.1.2.1. Délétions du promoteur

Le gène *AtBI-1* étant régulé au cours de la MCP induite par les UV-C, nous avons entrepris d'analyser de plus près sa région promotrice afin d'identifier des éléments susceptibles d'intervenir dans son contrôle. Pour y parvenir, des délétions en 5' ont été effectuées sur la région promotrice qui avait été choisie pour la mise au point du crible. Ces délétions ont été faites en utilisant les sites de restriction présents dans sa séquence. Les différentes délétions du promoteur ont donc été réalisées à -900 pb (*Bgl*II_A), -814 pb (*Bgl*II_B), -544 pb (*Eco*RI) et -329 pb (*Hind*III) du début de la région promotrice sélectionnée (Figure 30). Les quatre délétions ainsi que le promoteur ont ensuite été clonés en amont du gène rapporteur *GUS*. Des plantes d'*A. thaliana* ont alors été transformées séparément avec chacune des constructions réalisées.

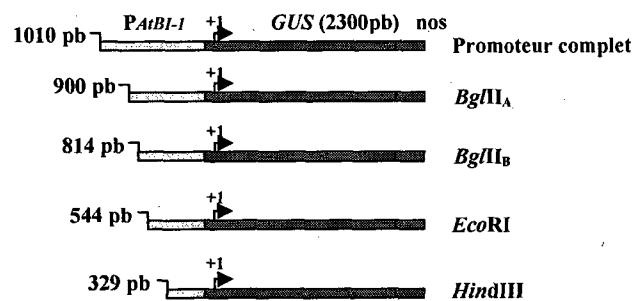


Figure 30. Représentation schématique des différentes délétions réalisées dans la région promotrice du gène *AtBI-1*. P*AtBI-1*, promoteur du gène *AtBI-1*; *GUS*, gène codant pour la β -glucuronidase; ter, terminateur.

2.1.2.2. Sélection et analyse des lignées transformées

2.1.2.2.1. Sélection des lignées

A la suite de la transformation, les graines obtenues (génération T1) ont été récoltées puis semées *in vitro* sur un milieu de germination sélectif contenant de l'hygromycine afin de sélectionner les plantes transformées. Pour chacune des 5 constructions, 20 plantes transformées (génération T1) ont été repiquées en terre. A la génération suivante (T2), seules les lignées qui présentaient une ségrégation de type 3:1 sur hygromycine, correspondant à priori à une seule insertion, ont été conservées pour les colorations histochimiques GUS.

2.1.2.2.2. Analyse histochimique GUS

Pour réaliser les colorations GUS, les lignées de ségrégation 3:1 ont été mises à germer sur hygromycine afin d'éliminer les plantes non transformées. Pour chaque construction, les lignées transformées ont subi un test de coloration GUS avant et après traitement aux UV-C. Un profil de coloration GUS a ensuite été établi (Figure 31). Pour chaque construction, le profil obtenu est représentatif d'au moins trois lignées indépendantes.

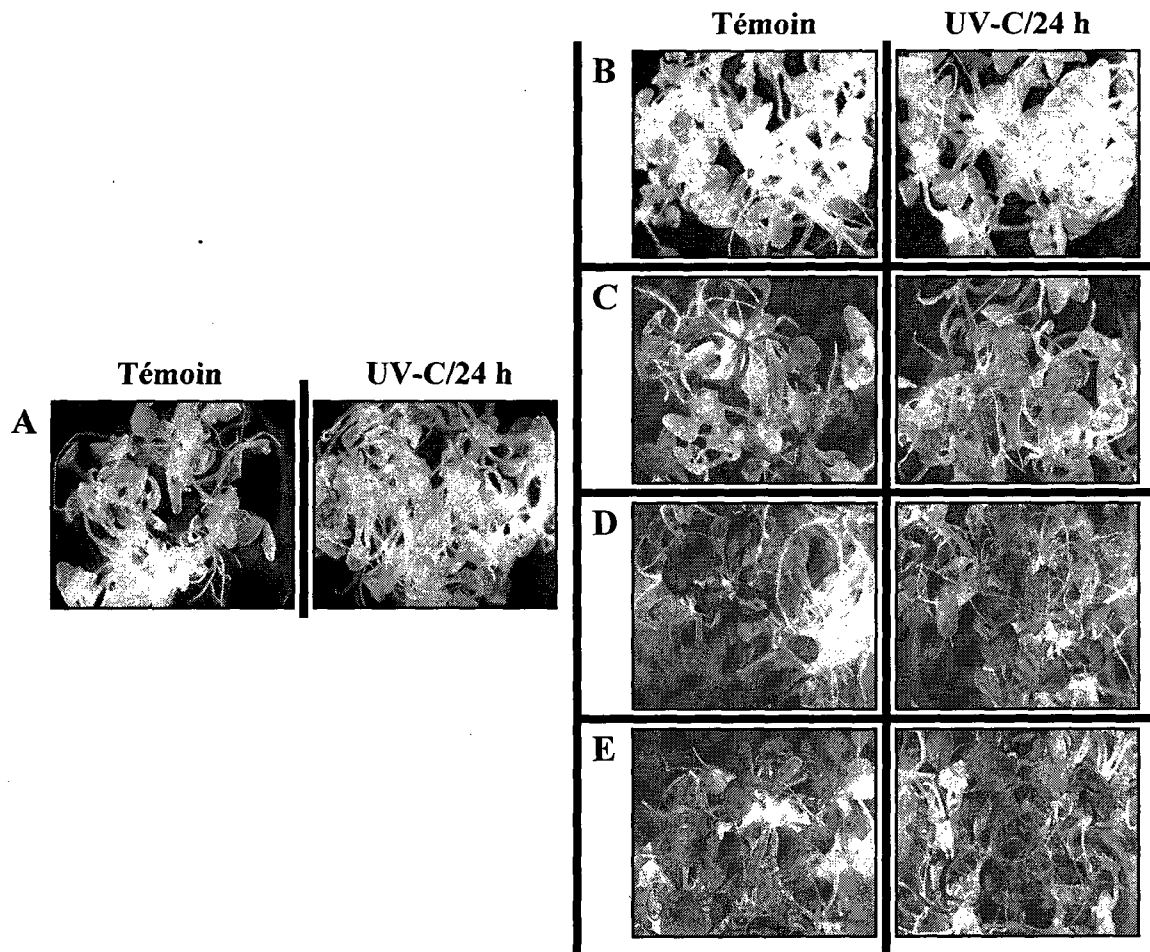


Figure 31. Analyse histochimique GUS réalisée sur les lignées transformées. Les plantules contenant les différentes constructions ont été analysées avant irradiation (Témoin) et 24 h après traitement aux UV-C à une dose de 10 kJ/m^2 . **A)** Promoteur «complet»; **B)** Délétion *BglII_A*; **C)** Délétion *BglII_B*; **D)** Délétion *EcoRI*; **E)** Délétion *HindIII*.

Pour l'ensemble des 5 constructions, le précipité bleu produit à la suite de l'hydrolyse du substrat X-Gluc apparaît localisé dans l'ensemble des tissus à l'exception des racines.

Dans le cas du promoteur non délété, le profil de coloration GUS obtenu (figure 31A), représentatif de 4 lignées indépendantes, montre une apparition de la coloration GUS 24 h

après traitement par les UV-C. Ceci concorde avec les résultats obtenus précédemment avec la luciférase, à savoir que la région promotrice sélectionnée pour la construction est effectivement régulée par les UV-C. Par contre, la coloration obtenue après irradiation apparaît faible. Lors de la mise au point du crible de mutants (Figure 26), le gène de la luciférase, sous contrôle du même promoteur, apparaissait déjà beaucoup moins exprimé par rapport au gène *AtBI-1*, suggérant que certains éléments du promoteur, fonctionnant vraisemblablement à distance, étaient absents de la séquence sélectionnée.

Au niveau de la délétion *BgIII_A*, le profil de coloration GUS observé (Figure 31B) est représentatif de 3 lignées indépendantes. Comme dans le cas du promoteur non délété (Figure 31A), on observe une apparition de la coloration bleue 24 h après traitement par les UV-C. La région du promoteur responsable de la régulation par les UV-C est donc toujours présente suite à cette première délétion.

Pour les lignées contenant la délétion *BgIII_B*, on peut observer que le profil de coloration est modifié. La coloration GUS est présente, cette fois ci, à la fois dans le témoin et suite au traitement par les UV-C (Figure 31C). La coloration ne varie pas suite à l'irradiation, ce qui indique une perte de régulation du promoteur par les UV-C. Ce résultat a été obtenu de façon similaire pour 5 lignées indépendantes.

Pour les deux dernières délétions, *EcoRI* et *HindIII*, on observe un profil de coloration similaire à celui obtenu pour la délétion *BgIII_B*. Les colorations observées (Figure 31D et E) sont représentatives de 6 (pour *EcoRI*) et 8 (pour *HindIII*) lignées indépendantes. Comme dans le cas de la délétion *BgIII_B*, la présence d'une coloration GUS avant traitement par les UV-C confirme la perte de régulation du promoteur par les UV-C. De plus, la coloration obtenue pour ces délétions apparaît identique avant et après traitement par les UV-C. Si on se base sur la coloration, le gène *GUS* montre a priori un niveau d'expression similaire à celui observé après la délétion *BgIII_B*.

D'après ces résultats, l'absence de la région promotrice comprise entre les sites de restriction *BgIII_A* et *BgIII_B*, entraîne une perte de la régulation par les UV-C. En effet, la coloration bleue, déjà présente avant irradiation ne varie pas après traitement par les UV-C. L'expression du gène *GUS* apparaît donc constitutive. Ces résultats suggèrent donc la présence d'une région dans le fragment de délétion *BgIII_B* qui pourrait réguler négativement l'expression du gène *AtBI-1* en absence d'induction par les UV-C. Le promoteur du gène *AtBI-1* serait donc, en dehors de toute induction, réprimé au niveau de cette région. Suite à un stress comme les UV-C, pouvant potentiellement entraîner la mise en place de la MCP, cette répression serait donc levée afin que le gène puisse être exprimé. Par contre, la coloration *GUS*, devrait être identique à ce qu'on observe après induction dans le promoteur complet. Elle apparaît, de fait, beaucoup plus intense lorsque l'élément régulateur est absent. Cette différence d'intensité peut s'expliquer par le fait que la protéine *GUS*, lorsqu'elle est exprimée dans des cellules végétales, possède une $\frac{1}{2}$ vie comprise entre 2 et 3 jours (Jefferson *et al.*, 1997). A partir de la délétion *BgIII_B*, l'expression constitutive du gène *GUS* entraîne possiblement une forte accumulation de la protéine dans les cellules ayant pour conséquence la coloration intense observée.

2.2. IMPLICATION DU GÈNE *TRX FI* DANS LA MCP

2.2.1. Criblage de la collection

Parallèlement au travail décrit dans la première partie de ce chapitre, un crible a été réalisé à partir de la collection d'insertion ADN-T, contenant le gène codant pour la luciférase sans promoteur, afin d'identifier des gènes régulés par les UV-C et potentiellement impliqués dans la MCP (pour la description, voir partie 1.11.2.). L'ADN-T étant intégré au hasard dans le génome des plantes transformées, le gène codant pour la luciférase, dépourvu de promoteur, peut être exprimé lorsqu'il est situé à proximité d'une région promotrice du génome d'*A. thaliana*. Dans l'optique d'identifier des gènes potentiellement impliqués dans la MCP, le crible a été effectué en se basant sur la détection des changements d'expression du gène codant pour la luciférase lorsque ce dernier est intégré à proximité d'une région

promotrice régulé par les UV-C (Figure 32), l'objectif étant de cribler cette collection d'insertion aléatoire dans des conditions d'induction de la MCP par les UV-C.

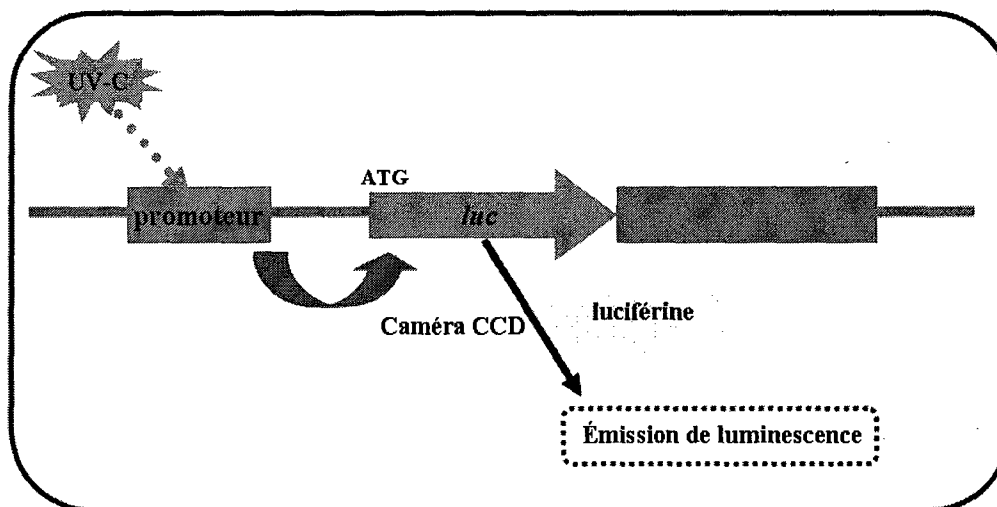


Figure 32. Principe du crible. Après traitement aux UV-C, la luminescence est détectée par la caméra dans le cas où le gène de la luciférase est intégré à proximité d'un promoteur régulé par les UV-C.

La collection de mutants a donc été criblée (crible primaire) avant et après traitement aux UV-C à une dose de 5 kJ/m^2 à l'aide de la caméra CCD afin de détecter les émissions de luminescence (génération T2). Cette approche a permis d'isoler 42 lignées sur un total de 100 pools analysées, soit environ 10 000 lignées indépendantes. Parmi ces lignées, qui présentent une induction ou une répression de la luminescence après un traitement aux UV-C, 15 lignées ont été sélectionnées parmi celles qui présentaient les variations de luminescence les plus importantes (Figure 33).

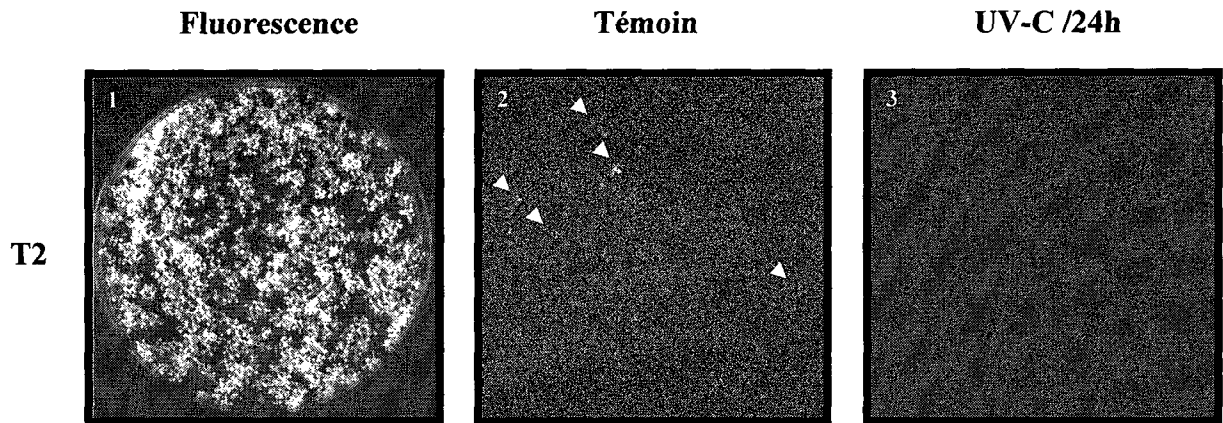


Figure 33. Crible de la collection d'insertion ADN-T. Exemple avec la lignée TL-72. A), fluorescence naturelle émise par la chlorophylle; **B),** luminescence observée avant traitement aux UV-C (témoin); **C),** luminescence observée 24 h après traitement aux UV-C à une dose de 5 kJ/m². L'expression de la luciférase est réprimée suite à un traitement par les UV-C.

Au cours du crible primaire, les lignées sélectionnées en fonction des variations de luminescence observées ont été systématiquement repiquées en terre pour obtenir la génération suivante (T3). Un crible secondaire a alors été effectué sur les descendants afin de sélectionner et confirmer les lignées positives du crible primaire (Figure 34).

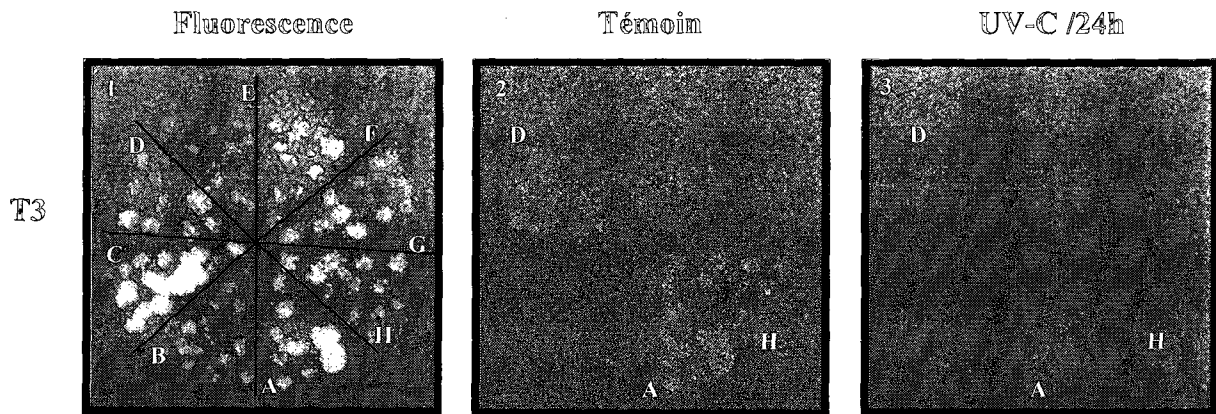


Figure 34. Confirmation de la luminescence observée avec la lignée TL-72. 1), fluorescence naturelle de la chlorophylle; 2), luminescence observée avant traitement aux UV-C (témoin); C et F), luminescence observée 24 h après traitement aux UV-C à une dose de 5 kJ/m^2 ; Les lignées qui présentaient une variation de luminescence (T2) après traitement aux UV-C sont à nouveau analysées à la génération suivante (T3). Dans la lignée TL-72H, les lignées A, D et H (2) sont également réprimées après traitement aux UV-C (3).

2.2.2. Identification des mutants

Afin de localiser les insertions ADN-T dans le génome des lignées sélectionnées, les techniques de TAIL-PCR et I-PCR ont été utilisées. Après séquençage des jonctions entre l'ADN-T et la séquence génomique, le site d'insertion a pu être identifié pour dix d'entre elles (Tableau 9). Le nombre d'insertion reste cependant théorique car il résulte des données issues du séquençage et non d'une analyse par transfert de Southern. Il est en effet possible que certaines jonctions n'aient pas pu être amplifiées par les deux techniques de PCR utilisées en raison de réarrangements ou de délétion au moment de la transformation.

Tableau 9. Identification du site d'insertion dans les 10 lignées après séquençage des jonctions.

Lignée	Nombre insertion	Localisation de l'insertion par séquençage	luminescence
TL-32I	1	promoteur du gène <i>At1g24150</i> (jonctions cellulaires)	Induction
TL-55A	1	promoteur du gène <i>At5g51560</i> (protéine kinase)	Induction
TL-56A	1	intergénique	Répression
TL-36J	2	intergéniques	Induction
TL-97A	2	promoteur des gènes <i>At2g29210</i> (épissage) et <i>At1g29920</i> (associé au PS II)	Répression
TL-91F	2	gène <i>At3g25950</i> (fonction inconnue) et région intergénique	Induction
TL-6H	2	gène <i>At1g63640</i> (kinesin) et promoteur du gène <i>At2g05520</i> (GRP-3)	Induction
TL-72H	1	5'UTR du gène <i>At3g02730</i> (<i>Trx fl</i>)	Répression
TL-2P	1	intergénique	Répression
TL-63C	2	gène <i>At1g29530</i> (fonction inconnue) et gène <i>At2g27360</i> (lipase)	Répression

Parmi ces lignées, seule la lignée TL-97A qui présente une répression de la luminescence (Tableau 9) à la caméra possède un phénotype particulier marqué par un gigantisme de la plante. Les autres lignées présentent un phénotype identique à celui du type sauvage, Col-0.

2.2.3. La lignée TL-72H

2.2.3.1. Localisation de l'insertion

Parmi les dix lignées identifiées (Tableau 9), cinq d'entre elles présentent au moins deux insertions ADN-T dans leur génome, rendant plus fastidieuse la caractérisation des gènes ainsi étiquetés. De même, la présence d'insertion ADN-T dans des régions intergéniques pour quatre lignées complique également une éventuelle caractérisation. Sur les trois lignées restantes, possédant à priori une seule insertion, le choix s'est porté sur la lignée TL-72 qui présente une répression de l'activité luciférase suite à un traitement aux UV-C. Dans ce mutant, l'insertion a été localisée dans le chromosome 3. La jonction est située plus exactement 43 nucléotides en amont de l'ATG, dans la région 5'UTR du gène *Trx fl* qui code pour une thioredoxine chloroplastique (Figure 35). L'intérêt pour cette lignée vient du fait que la thioredoxine identifiée en réponse aux UV-C appartient à une famille de protéines

impliquées dans de nombreux processus dont la protection contre le stress oxydatif, la défense contre les agents pathogènes ou l'apoptose chez les animaux (voir introduction, partie B).

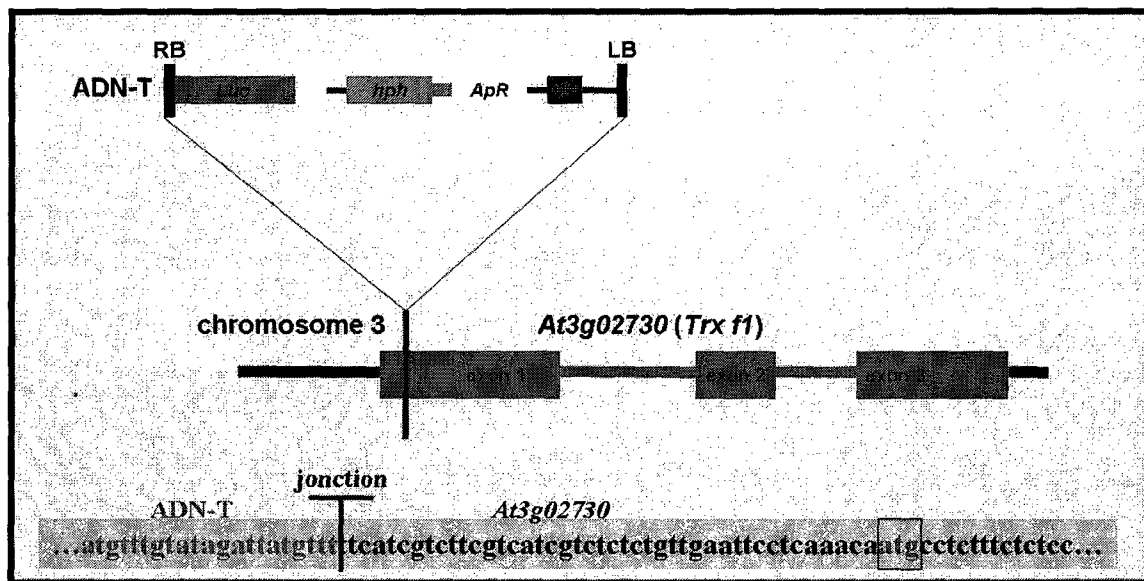


Figure 35. Localisation de l'insertion ADN-T dans la lignée TL-72. *Luc*, luciférase; *hph*, gène de résistance à l'hygromycine; *ApR*, gène de résistance à l'ampicilline; UTR, région non traduite.

A la suite d'un traitement aux UV-C, la lignée TL-72 présente une répression marquée de la luminescence émise et donc du gène codant pour la luciférase (Figure 34). L'analyse de ségrégation (T2) a montré que cette lignée était de type 3:1, signifiant qu'elle possédait vraisemblablement une seule insertion. A la génération suivante (T3), la lignée TL-72H (Figure 34), homozygote pour l'insertion, a été utilisée pour la suite des expériences.

2.2.3.2. Vérification du nombre d'insertion

La lignée TL-72H a été analysée par buvardage de type Southern afin de s'assurer qu'elle présentait effectivement une seule insertion (Figure 36). Après extraction, l'ADN génomique a été digéré avec les enzymes de restriction *Sall*, *EcoRI* et *EcoRV*, puis hybridé avec une

sonde marquée au ^{32}P correspondant au gène codant pour la luciférase. La digestion réalisée avec les enzymes de restriction *EcoRI* et *EcoRV* dont les sites sont présents dans le gène codant pour la luciférase, présente, après hybridation, deux bandes correspondant à la reconnaissance par la sonde des deux fragments issus de la digestion du gène *Luc*. Dans le cas de l'enzyme de restriction *SalI*, qui coupe une fois à l'intérieur de l'ADN-T, mais cette fois-ci en dehors du gène codant pour la luciférase, une seule bande est observée après hybridation avec la sonde. La présence de deux bandes pour les digestions *EcoRI* et *EcoRV* et d'une seule pour la digestion *SalI* confirme donc la présence d'une seule insertion dans la lignée TL-72H.

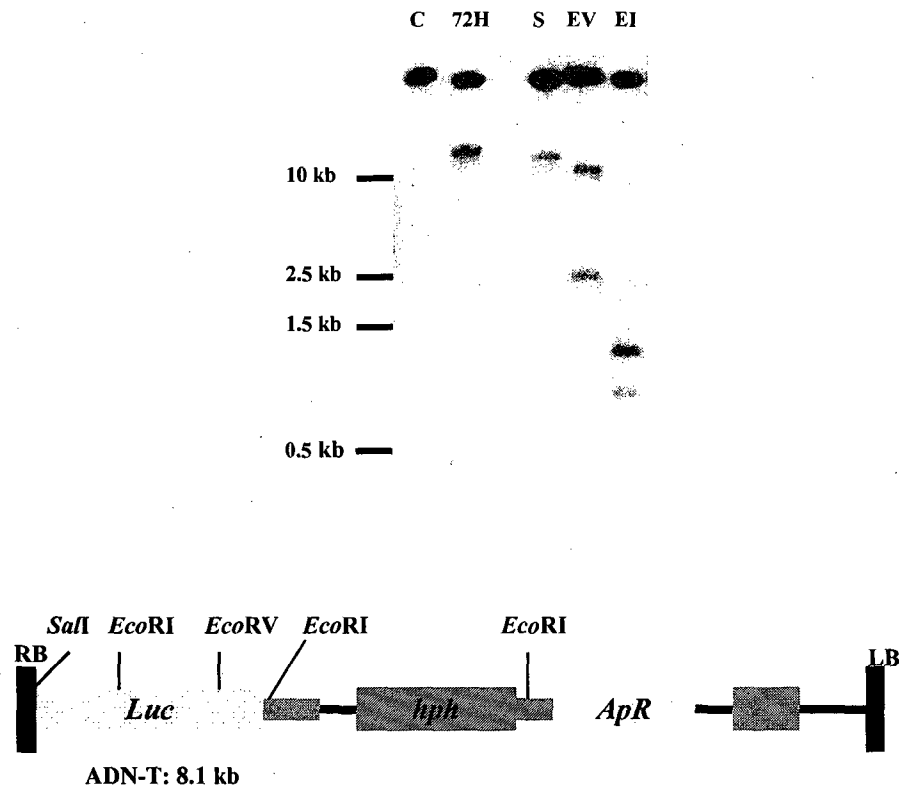


Figure 36. Détermination du nombre d'insertion présentes dans la lignée TL-72H par buvardage de type Southern. C, Col-0; 72H, lignée TL-72H non digérée; S, *SalI*; EV, *EcoRV*; EI, *EcoRI*; *Luc*, luciférase; *hph*, gène de résistance à l'hygromycine; *ApR*, gène de résistance à l'ampicilline.

2.2.3.3. Analyse d'expression du gène *Trx fl*

Le gène codant pour la luciférase étant réprimé suite à un traitement aux UV-C, l'expression du gène *Trx fl* a donc été analysée par RT-PCR semi-quantitative en utilisant comme témoin interne le gène codant pour l'ARN_R *18S* (Figure 37).

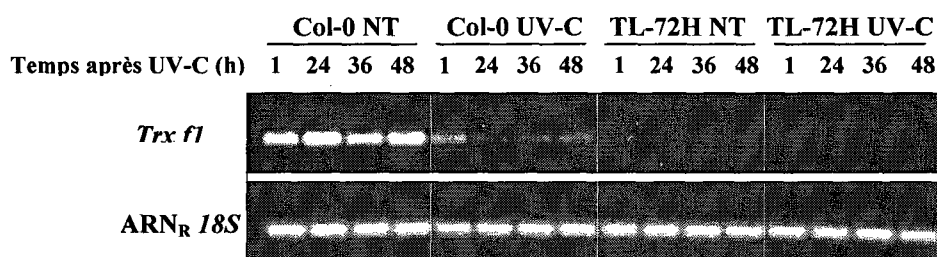


Figure 37. Analyse de l'expression du gène *Trx fl* par RT-PCR semi-quantitative. Les ARN totaux ont été extraits à partir de plantules non traitées aux UV-C (NT) et irradiées à une dose de 50 kJ/m². Les RT-PCR ont été réalisées après 1, 24, 36 et 48 h. L'ARN_R *18S* a été utilisé comme témoin interne. Pour les PCR, 22 cycles ont été réalisés pour *Trx fl* et 28 cycles pour l'ARN_R *18S*.

Comme pour le gène codant pour la luciférase, l'expression du gène *Trx fl* est réprimée suite au traitement par les UV-C dans le type sauvage (Col-0). Dans le mutant TL-72H, l'expression de *Trx fl* est fortement affectée, voir quasi nulle, en raison de la présence de l'insertion dans la région 5'UTR, par rapport au type sauvage (Figure 37). L'expression, presque nulle avant irradiation, devient indétectable après traitement aux UV-C. La lignée TL-72H, mutée pour le gène *Trx fl*, représente donc un excellent outil afin d'analyser le rôle éventuel de ce gène dans la MCP mise en place par un traitement aux UV-C.

2.2.4. Mutation du gène *Trx f1* et niveau de mortalité des plantes

Dans le but d'évaluer le rôle éventuel du gène *Trx f1* sur le niveau de mortalité de la lignée TL-72H par rapport au type sauvage suite à une irradiation aux UV-C, des colorations au bleu d'Evans ont été réalisées sur des plantules âgées de 5 jours (Figure 38).

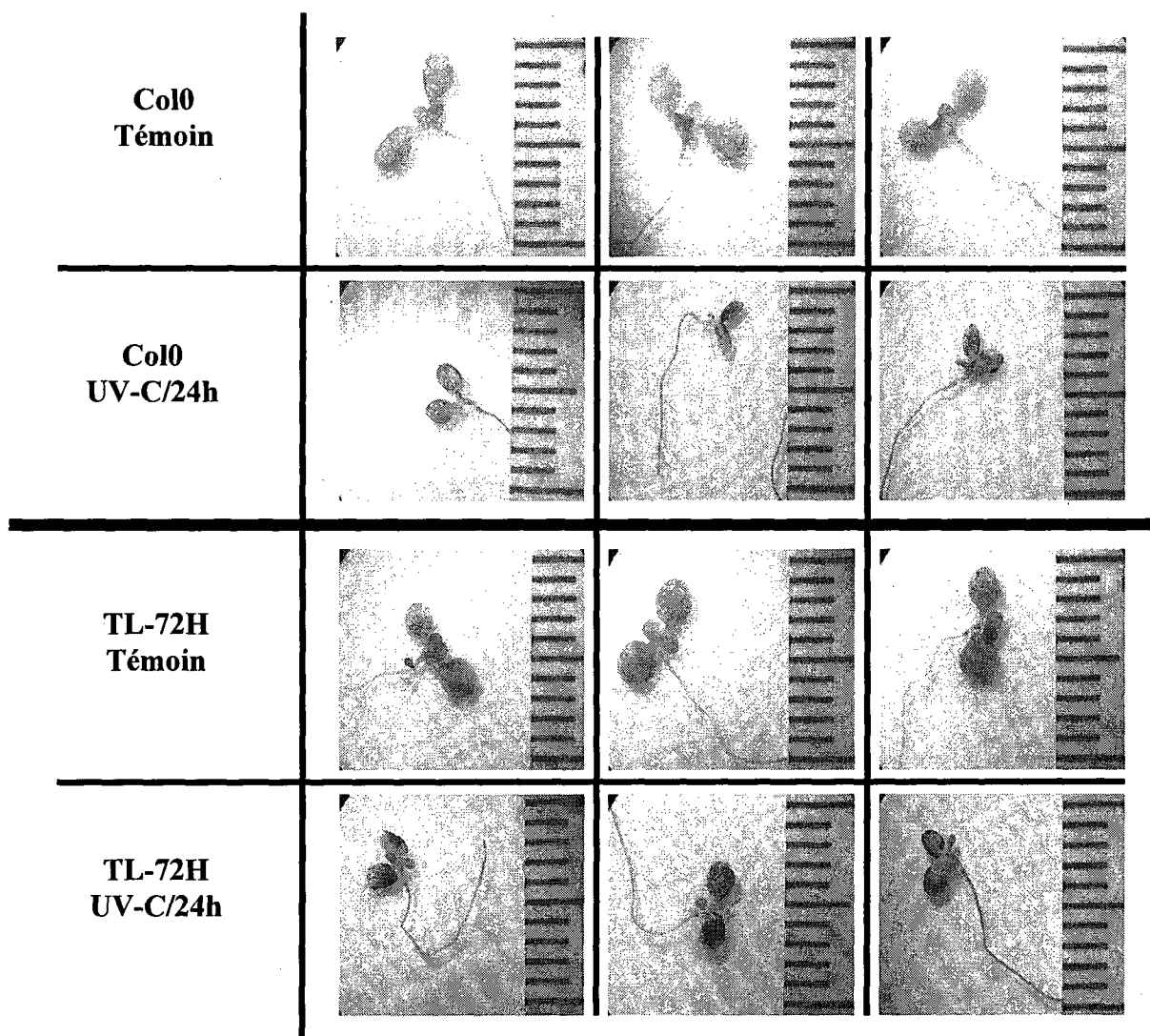


Figure 38. Détection de la mort cellulaire après coloration au bleu d'Evans. Les plantules âgées de 5 jours ont été colorées avant irradiation (témoin) et 24 h après traitement aux UV-C à une dose de 30 kJ/m².

De façon générale, malgré une certaine variabilité de réponse découlant du traitement, la lignée TL-72H a tendance à présenter une coloration bleue au niveau des cotylédons qui est plus importante que celle obtenue pour le type sauvage (Col-0) suite au traitement par les UV-C. La lignée TL-72H paraît affectée sur une plus grande étendue foliaire. Dans les deux lignées (Col-0 et TL-72H), les racines se retrouvent également colorées après irradiation. La coloration au bleu d'Evans se retrouve fixée sur l'ensemble de la racine et paraît uniforme. Il est donc difficile de conclure sur ce point. D'après ces résultats, la mortalité occasionnée par le traitement aux UV-C apparaît donc plus importante dans la lignée TL-72H, du moins au niveau des cotylédons. Afin de quantifier la mortalité observée, un dosage du bleu d'Evans fixé au niveau des cellules mortes a été effectué (Figure 39).

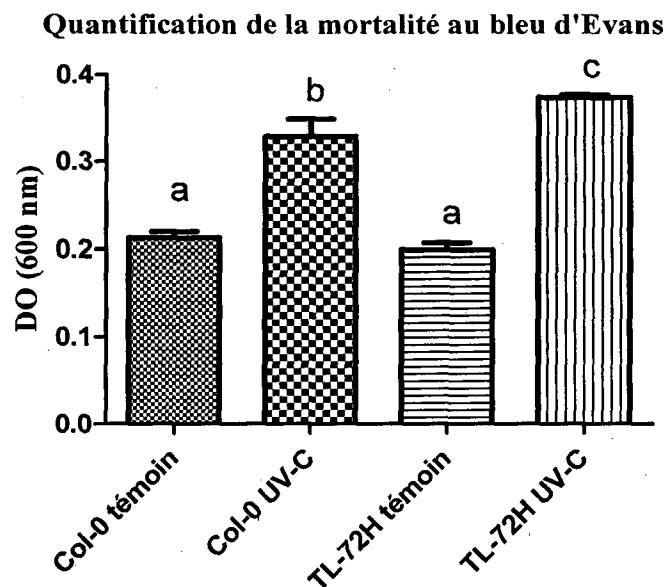


Figure 39. Quantification de la mortalité dans les plantes. Après coloration des plantules (cotylédons et racines) au bleu d'Evans, le colorant fixé aux cellules mortes a été solubilisé dans une solution de méthanol 50% et de SDS 1% puis dosé directement au spectrophotomètre à 600 nm. Les dosages ont été effectués avant irradiation (témoin) et 24 h après traitement aux UV-C à une dose de 30 kJ/m². Les données du graphique représentent les moyennes (± l'écart type) de trois expériences indépendantes (50 plantules/expérience).

Comme pour les observations faites sur les plantules (Figure 38), les dosages au bleu d'Evans ont permis de confirmer que la mortalité induite par les UV-C au niveau du mutant TL-72H était effectivement plus importante par rapport au type sauvage. La lignée TL-72H montre une plus grande sensibilité aux UV-C par rapport au type sauvage. Cette différence dans le degré de mortalité est statistiquement significative ($P < 0.0001$, ANOVA).

Afin de confirmer ces résultats, la mortalité des plantules a également été évaluée à travers la mesure de la perte de chlorophylle, qui est progressivement dégradée suite à traitement par les UV-C (Figure 40).

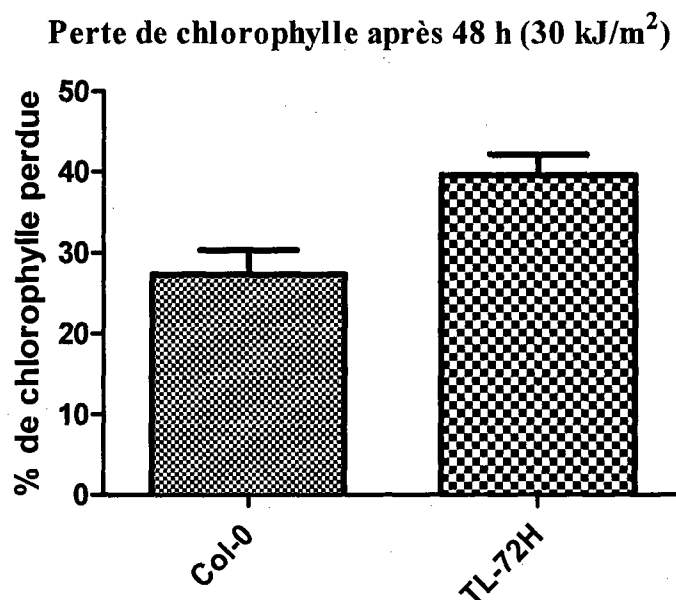


Figure 40. Comparaison de la perte de chlorophylle entre la lignée TL-72H et le type sauvage. La chlorophylle a été dosée avant irradiation et 48 h après traitement aux UV-C à une dose de 30 kJ/m^2 . Le pourcentage de perte de chlorophylle a ensuite été évalué à partir de la moyenne (\pm l'écart type) de 4 expériences indépendantes comprenant chacune 3 répétitions de 30 plantules/répétition.

La perte de chlorophylle, observable après un traitement aux UV-C est significativement plus importante ($P=0,0008$, test de Student) dans le cas de la lignée TL-72H, confirmant ainsi les résultats obtenus avec le bleu d'Evans. Ces résultats révèlent donc que la quasi-absence d'expression du gène *Trx fl* avant traitement aux UV-C dans la lignée TL-72H entraîne une mort qui paraît plus importante en comparaison du type sauvage. Ce résultat corrélé au fait que le gène *Trx fl* est réprimé suite au traitement aux UV-C, suggère que la répression de ce gène pourrait être requise pour la mise en place de la mort.

Phénotypiquement, l'irradiation aux UV-C entraîne une certaine variabilité de réponse au niveau des plantules d'une même boîte de pétri. Pour tenter d'obtenir un phénotype plus évident, les traitements aux UV-C ont été réalisés sur des feuilles isolées à partir des lignées TL-72H et Col-0 (Figure 41).

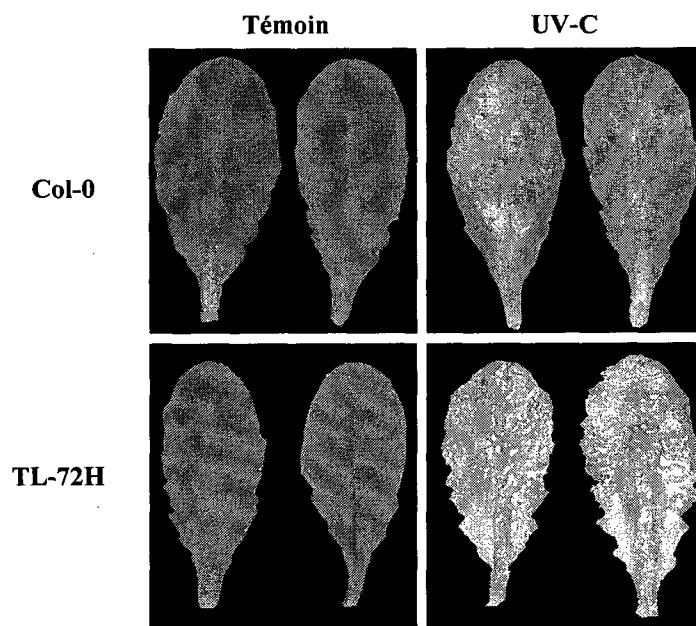


Figure 41. Observation de la dégradation de la chlorophylle en réponse aux UV-C. Les feuilles ont été photographiées avant irradiation (témoin) et 4 jours après traitement aux UV-C à une dose de 5 kJ/m^2 . Ces expériences ont été répétées 3 fois.

La dégradation de la chlorophylle, qui accompagne la mort induite par les UV-C est progressive au cours du temps. Quatre jours après traitement par les UV-C, la perte de chlorophylle au niveau des feuilles de la lignée TL-72H apparaît plus importante en comparaison du type sauvage. Ces résultats vont dans le même sens que ceux obtenus précédemment avec le bleu d'Evans et dénotent d'une sensibilité plus grande du mutant aux UV-C.

Par la suite, le niveau de mortalité dans les racines, suite à un traitement par les UV-C, a été analysé dans le mutant TL-72H. Deux études réalisées chez le pois avaient en effet montré que les Trxs du type f, normalement localisés dans les chloroplastes, étaient également retrouvées au niveau racinaire (De Dios Barajas-Lopez *et al.*, 2007; Traverso *et al.*, 2008). Partant de ce postulat, il était donc important d'évaluer la mortalité racinaire dans le mutant. Ceci a été fait par microscopie à fluorescence (Figure 42) en utilisant deux marqueurs fluorescents: le diacétate de fluorescéine (FDA) qui colore les cellules vivantes en vert et le iodure de propidium (IP) qui se fixe à l'ADN dans les cellules mortes.

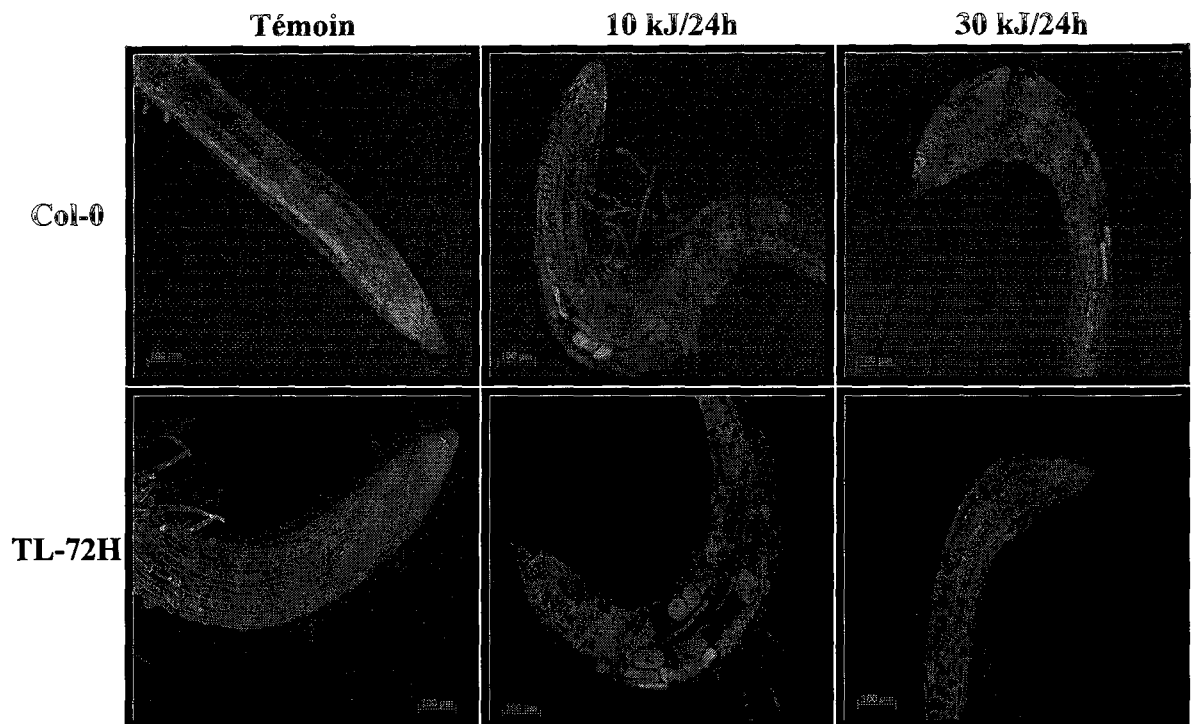


Figure 42. Détection de la mortalité dans les racines par microscopie à fluorescence. Les plantules âgées de 3 jours ont été analysées avant irradiation (témoin) et 24 h après traitement aux UV-C à des doses de 10 et 30 kJ/m². L'IP (rouge) et le FDA (vert) ont été utilisés pour marquer respectivement les noyaux des cellules mortes et les cellules vivantes. Ces expériences ont été répétées 3 fois.

Au niveau racinaire, les résultats obtenus en microscopie à fluorescence font apparaître des différences entre le mutant TL-72H et le type sauvage. À 10 et 30 kJ/m², la coloration rouge due à l'IP est plus importante dans les racines du mutant TL-72H, en comparaison du type sauvage (Col-0). La coloration verte, quant à elle, qui marque les cellules vivantes est plus importante au niveau du type sauvage. À 30 kJ/m², les racines du mutant paraissent même très affectées par l'irradiation. De la même manière que pour les observations réalisées au niveau foliaire, ces expériences de microscopie ont permis de mettre en évidence que la mortalité était visiblement plus importante dans les racines de la lignée TL-72H par rapport aux racines du type sauvage, ceci 24h après traitement aux UV-C.

Tous ces résultats montrent donc, pour la première fois, que le gène *Trx fl*, est non seulement réprimé par les UV-C mais qu'il a un impact sur le niveau de mortalité induit par les UV-C lorsqu'il est absent. En effet, la perte précoce d'expression de ce gène dans le mutant TL-72H par rapport au type sauvage entraîne une plus grande sensibilité aux UV-C. La différence de mortalité, bien que subtile, est visiblement plus importante dans le mutant. Elle n'est pas spontanée mais apparaît progressive au cours du temps. Elle est donc vraisemblablement régulée, ce qui laisse supposer une implication potentielle sur la MCP mise en place par les UV-C.

2.2.5. Implication du gène *Trx fl* dans la MCP

D'après les résultats précédents, la perte d'expression observée au niveau du gène *Trx fl* dans la lignée TL-72H entraîne une mortalité plus importante suite à un traitement par les UV-C. Afin d'évaluer si un lien existait entre cette mortalité accrue et la mise en place d'une MCP, les profils de fragmentation de l'ADN ont été analysés dans le mutant TL-72H et le type sauvage (Figure 43).

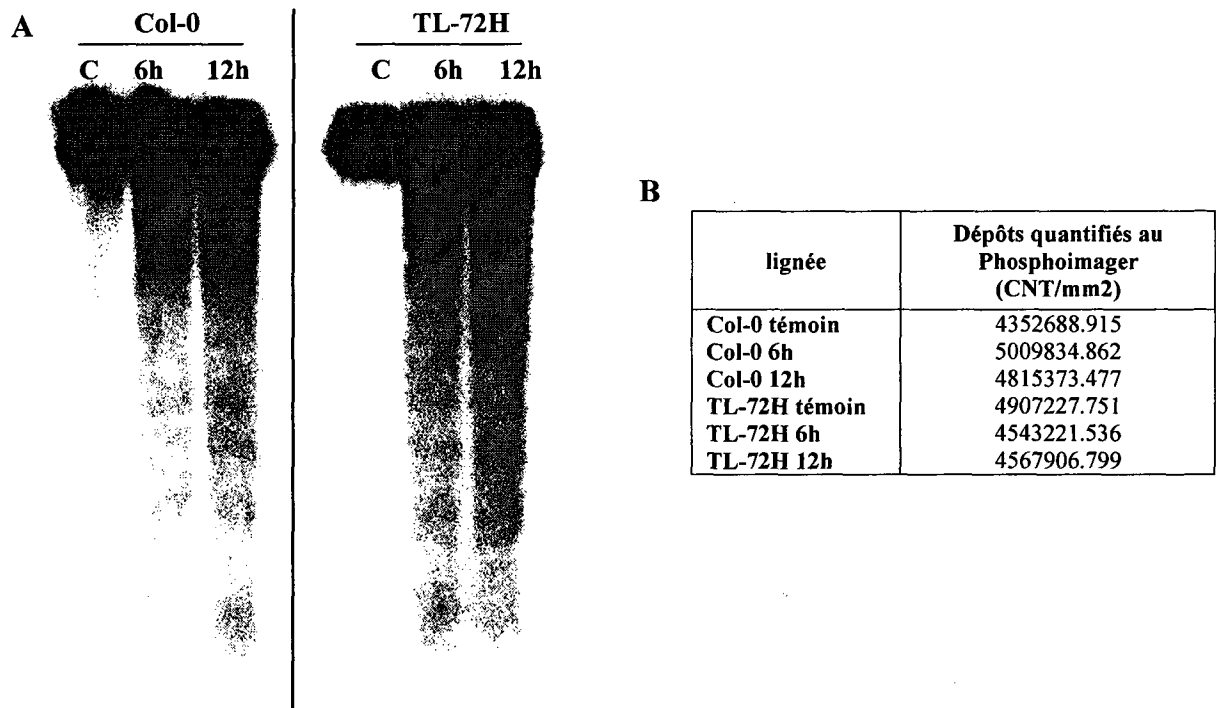


Figure 43. Analyse des profils de fragmentation de l'ADN dans la lignée TL-72H et Col-0. Après électrophorèse, l'ADN génomique (6 μ g) extrait du mutant TL-72H et du type sauvage (Col-0) a été hybridé avec la sonde marquée au ³²P (ADN génomique digéré avec *Mbo*I) puis analysé en utilisant un phosphoimager **A**) Fragmentation de l'ADN observée 6 et 12 h après irradiation aux UV-C à une dose de 30 kJ/m²; C, témoin, non traité. **B**) Quantification des dépôts faits au phosphoimager. L'expérience a été répétée 3 fois.

Avant de procéder au buvardage de type Southern, chaque dépôt d'ADN génomique a été quantifié au phosphoimager (voir partie 1.9.4.4.) à l'aide du logiciel «Quantity One». Les données exprimées en CNT/mm² (coups/mm²) permettent de confirmer que les dépôts sont homogènes (Figure 43B). Suite au buvardage de type Southern, les résultats obtenus 6 et 12 h après induction de la MCP par les UV-C à une dose de 30 kJ/m² montre que la fragmentation internucléosomale de l'ADN apparaît plus importante dans la lignée TL-72H par rapport au type sauvage, ceci pour des quantités similaires d'ADN (Figure 43A). Ceci suggère que la mortalité accrue observée chez le mutant est possiblement la conséquence d'une MCP. Cette

expérience, malgré la différence subtile renforce donc la tendance d'une mortalité plus importante suite au traitement par les UV-C dans la lignée TL-72H. L'absence d'expression du gène *Trx fl* dans la lignée TL-72H aurait donc possiblement un impact sur le processus de MCP induite par les UV-C. Étant donné que le gène *Trx fl* est régulé négativement par les UV-C et que l'absence d'expression dans le mutant TL-72H entraîne une mortalité plus importante, il est donc possible que la répression de ce gène soit nécessaire au cours de la mise en place de la MCP.

Afin d'évaluer si la sur-expression du gène *Trx fl* pouvait inhiber la mise en place de la MCP, la levure *Saccharomyces cerevisiae* a été utilisée pour exprimer la protéine de façon constitutive. Cette expérience avait pour objectif de déterminer si la protéine Trx fl était capable de réprimer la mort induite par la protéine pro-apoptotique Bax sous contrôle d'un promoteur inductible au galactose (Figure 44). Une construction a donc été réalisée afin d'exprimer le gène *Trx fl* dans la levure, en ôtant la séquence codant pour le peptide d'adressage dans les chloroplastes correspondant aux 57 premiers acides aminés, afin d'éviter toute interférence dans la fonction protéique.

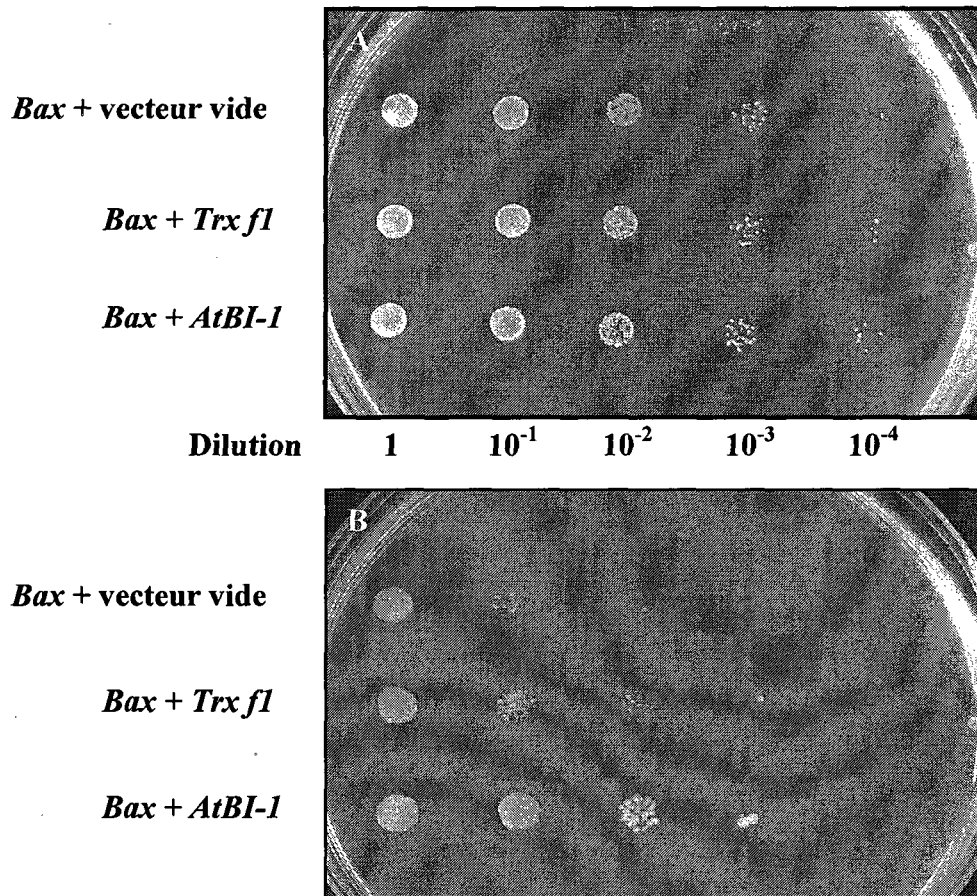


Figure 44. Expression de la protéine Trx fl dans la levure en présence de Bax. A) milieu glucose dans lequel le gène *Bax* n'est pas exprimé; **B)** milieu d'induction du gène *Bax* au galactose. Le gène *AtBI-1* a été utilisé comme contrôle expérimental. L'expérience a été répétée 4 fois.

Le gène *Bax* étant sous contrôle d'un promoteur inductible au galactose, il n'est pas exprimé sur milieu contenant du glucose et n'a donc aucun effet sur la viabilité des levures. De même, l'expression du gène *Trx fl* n'a aucun effet notable sur la viabilité ou la croissance des levures (Figure 44A). A l'opposé, sur milieu contenant du galactose, l'expression du gène *Bax*, seul, dans les levures entraîne une forte mortalité. Lorsque celui-ci est exprimé en présence du gène *Trx fl*, sa capacité à mettre en place la MCP se retrouve partiellement inhibée (Figure 44B). Ainsi, lorsque les deux protéines, Bax et Trx fl, sont exprimées en

même temps dans la levure, la protéine Trx f1 est capable de réduire significativement la mort induite par la protéine Bax, par rapport aux levures qui l'expriment exclusivement.

Des constructions ont également été réalisées afin de sur-exprimer le gène *Trx f1* dans *A. thaliana*. Les plantes ont été transformées avec succès et ont ensuite été sélectionnées à l'état homozygote. Toutefois, les quelques tests effectués (analyse phénotypique et dosage de chlorophylle) pour voir si la sur-expression de ce gène dans la plante pouvait éventuellement accroître la protection contre les UV-C et diminuer le degré de mortalité n'ont pas donné de résultats probants, les plantes se comportant comme le type sauvage.

Tous ces résultats mettent donc en avant l'implication potentielle du gène *Trx f1* dans la MCP mise en place à la suite d'un traitement aux UV-C. Le fait que la protéine Trx f1 soit localisée au niveau plastidial questionne sur la manière dont cette protéine agit pour inhiber la MCP. Une des voies possible d'action passe par le contrôle du stress oxydatif. La MCP mise en place par les UV-C ou par la protéine *Bax* s'accompagne d'une forte production de ROS. Ces derniers sont générés au niveau mitochondrial mais de plus en plus d'évidences mettent en avant un rôle des chloroplastes dans cette production. Il a été montré notamment que les UV-C entraînaient une forte production de ROS au niveau des chloroplastes (Gao *et al.*, 2008). Enfin, il a été montré que certaines thioredoxines dont les Trxs de type f pouvaient possiblement avoir un rôle dans la détoxification des ROS (Traverso *et al.*, 2008).

2.2.6. Implication du gène *Trx f1* dans le stress oxydatif

Dans le but d'affiner la compréhension du rôle de la protéine Trx f1 au cours de la MCP, des essais de germination ont été réalisés sur MV, un herbicide qui entraîne une forte production de ROS au niveau des chloroplastes et la mise en place d'une MCP. Cette expérience a été réalisée afin d'évaluer si l'absence du gène *Trx f1* dans la lignée TL-72H pouvait avoir un impact sur la protection contre les ROS au cours de la MCP (Figure 45).

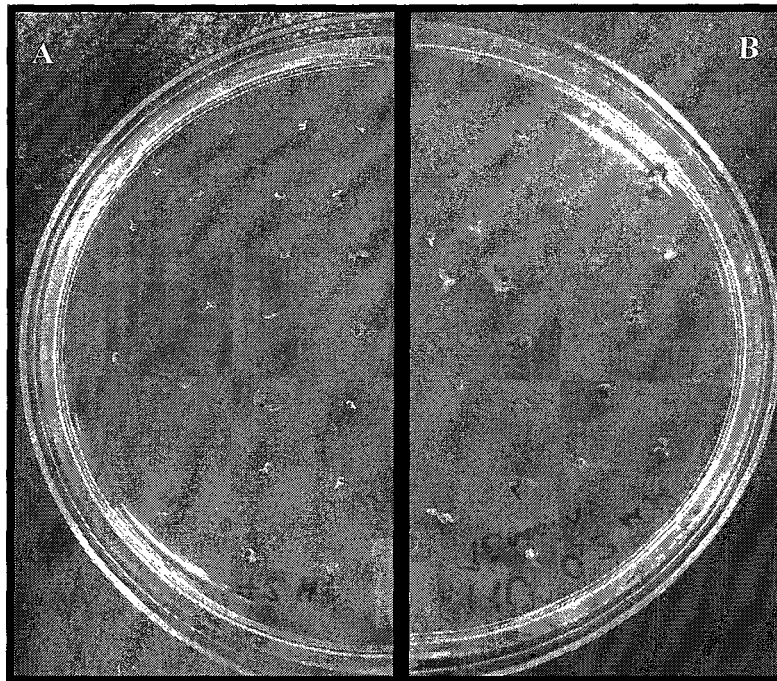


Figure 45. Analyse de la sensibilité de la lignée TL-72H au méthyl viologène. Les graines ont été semées sur du milieu de germination contenant 0,2 μ M de MV et photographiées 10 jours après. A) TL-72H; B) lignée Col-0. L'expérience a été répétée 2 fois.

Comme dans le cas des UV-C, la lignée TL-72H se révèle plus sensible au MV en comparaison du type sauvage (Col-0). Le MV induit la mise en place d'une MCP à travers la production de ROS au niveau chloroplastique. Le fait que la lignée TL-72H présente une mortalité plus importante en présence de MV (Figure 45), due à l'absence du gène *Trx f1* suggère que ce dernier pourrait intervenir dans la régulation de la production de ROS au cours de la MCP ou dans leur détoxification.

2.2.7. Conclusion

En conclusion, il apparaît que l'absence d'expression du gène *Trx f1* dans la lignée TL-72H entraîne une MCP plus importante en réponse aux UV-C par rapport au type sauvage. De plus, la protéine *Trx f1* est capable seule de limiter la mort induite par Bax dans la levure ce

qui renforce l'idée que ce gène est impliqué directement ou indirectement dans la mise en place de la MCP. La plus grande sensibilité du mutant TL-72H au MV suggère que l'action de la protéine Trx f1 pourrait se faire à travers la régulation des ROS générés au cours de la MCP.

CHAPITRE 3

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Dans le cadre de l'étude de la MCP chez les plantes, notre laboratoire s'est fixé comme objectif d'identifier de nouveaux régulateurs de la MCP chez les plantes. Pour y parvenir, nous avons choisi une approche génétique à travers la mise au point d'un crible de mutants de la MCP, basé sur le gène de la luciférase, sous contrôle d'un promoteur directement impliqué dans la MCP, ceci afin d'isoler puis identifier des régulateurs potentiels. Cette approche se justifie par le fait que la mise en place de la MCP chez les plantes est régulée au niveau transcriptionnel. Par le passé, des cribles génétiques traditionnels basés sur un phénotype facilement observable (ex : «lesion mimic») ont été réalisés mais peu de mutants de la MCP ont été identifiés jusqu'à présent. Le nouveau type de crible mis en place ici doit contribuer à isoler de nouveaux mutants, affectés dans des voies de signalisation menant à la MCP. La mise au point du crible est maintenant effective et contribuera à identifier de nouveaux régulateurs de la MCP. En parallèle, l'analyse fonctionnelle du promoteur du gène *AtBI-1* a permis d'identifier une courte région requise pour la régulation par les UV-C. La caractérisation de cette région ainsi que la connaissance des facteurs la régulant permettront de mieux comprendre l'importance de BI-1 dans la mise en place de la MCP.

Dans un deuxième temps, la réalisation d'un crible génétique de la collection de mutants d'insertion contenant le gène de la luciférase, cette fois-ci sans promoteur, a permis d'identifier le gène *Trx fl* qui, après caractérisation, se révèle potentiellement impliqué dans la MCP. Ce gène code pour une thioredoxine chloroplastique qui était jusqu'à présent connue pour son rôle dans la photosynthèse. À travers ces travaux de doctorat, nous montrons que l'expression de ce gène est réprimée par les UV-C. Néanmoins, la quasi-absence d'expression de *Trx fl* dans la lignée TL-72H entraîne la mise en place d'une MCP plus importante en réponse aux UV-C. En conditions de croissance normales, la faible expression du gène *Trx fl* chez le mutant s'avère non préjudiciable pour la plante et n'entraîne aucun phénotype visible, tout comme cela a été observé chez un mutant nul du gène *AtBI-1*

(Watanabe et Lam, 2006). Enfin, l'effet protecteur de Trx f1 contre Bax chez la levure ainsi que la plus grande sensibilité du mutant au stress oxydatif causé par le MV au niveau des chloroplastes (Chen et Dickman, 2004), renforcent l'idée que ce gène puisse être impliqué dans la protection contre la MCP en régulant le stress oxydatif généré au niveau des chloroplastes.

3.1. MISE AU POINT DU CRIBLE DE MUTANT ET ANALYSE FONCTIONNELLE DE LA RÉGION PROMOTRICE DU GÈNE *ATBI-1*

La mise au point du crible nécessitait de mettre en place une méthode efficace et surtout non létale d'induction de la MCP. Les UV-C se sont révélés être un bon inducteur de MCP au niveau de la plante entière, notamment à travers l'observation de la fragmentation de l'ADN, caractéristique de la MCP. La dose de 5 kJ/m², sélectionnée pour la réalisation du crible, induit effectivement une MCP et se révèle non létale pour la plante. L'avantage offert par l'utilisation des UV-C tient au fait qu'ils nous permettent d'irradier directement les plantules sur boîte de pétri, les mutants potentiels pouvant ensuite être prélevés puis repiqués en terre en vue d'obtenir une descendance. Au cours de la mise au point de l'induction, d'autres caractéristiques typiques de l'apoptose, préalablement montrées dans d'autres études, ont été étudiés, notamment le relâchement du cyt *c* par la mitochondrie (Balk *et al.*, 1999; Stein et Hansen, 1999) mais celui-ci n'a pas pu être observé dans le cas des UV-C. Par la suite, plusieurs études sont venues corroborer et préciser ces résultats en mettant en évidence la présence d'activités «caspase-like» (Danon *et al.*, 2004) ou l'implication des ROS générés au niveau des mitochondries et des chloroplastes (Gao *et al.*, 2008) dans le processus de mort induit par les UV-C. Les observations phénotypiques réalisées sur des plantules traitées aux UV-C suggèrent que la MCP mise en place pourrait s'apparenter, dans ses symptômes, à la sénescence. Les plantes traitées aux UV-C, à des doses non létales, montrent rapidement un arrêt de croissance et une perte de chlorophylle progressive affectant essentiellement le tissu foliaire. Cette dégénérescence lente des feuilles, observée à travers leur jaunissement, est accompagnée, quelques jours après, d'une reprise de croissance de la plante et de l'apparition de nouvelles feuilles, suggérant, comme pour la sénescence, une redistribution au profit des

feuilles en formation. Il est d'ailleurs établi que certains facteurs exogènes comme les UV-B sont capables de promouvoir la sénescence (Lim *et al.*, 2007; Love *et al.*, 2008).

La mise au point du crible reposait ensuite sur la sélection d'un gène régulé par les UV-C et impliqué dans la MCP. Plusieurs candidats potentiels ont été évalués tels que les gènes *SAG12* (Greenberg, 1996; Morris *et al.*, 2000) ou *DAD-1* (Gallois *et al.*, 1997), mais leur rôle dans la MCP demeurerait soit hypothétique, soit indirect. Notre choix s'est arrêté sur le gène *AtBI-1* qui est directement impliqué dans la MCP chez les plantes (Watanabe et Lam, 2009). La protéine, localisée essentiellement dans la membrane du RE, fonctionne comme un inhibiteur de la MCP (Kawai-Yamada *et al.*, 2001, 2004; Watanabe *et al.*, 2006), mais régule plus spécifiquement la MCP mise en place à la suite de stress subi par le RE (Watanabe et Lam, 2008). L'analyse transcriptionnelle du gène *AtBI-1* suite au traitement par les UV-C, montre une forte induction de son expression. Ce résultat est corrélée avec ce qui avait été montré jusqu'à présent dans la littérature, en réponse à toute une panoplie de stress (Sanchez *et al.*, 2000; Kawai-Yamada *et al.*, 2004; Watanabe et Lam, 2006). Cette induction de l'expression du gène *AtBI-1* pourrait à priori avoir pour rôle d'augmenter la quantité de protéines disponibles afin d'atténuer ou stabiliser la mise en place de la MCP par les UV-C. Sachant que les radiations de type UV peuvent occasionner des dommages au niveau des organelles, dont le RE (Somosy, 2000), il est possible que le stress occasionné à ce niveau entraîne l'activation d'une voie menant à la mise en place de la MCP (Watanabe et Lam, 2008). Il est probable cependant que cette voie ne soit pas la seule à être activée, car les UV-C ont un impact certain sur d'autres processus. L'action du gène *AtBI-1* pourrait se faire à travers le contrôle de la production de ROS au niveau du RE (Watanabe et Lam, 2008; Kim *et al.*, 2009) mais aussi au niveau du contrôle de la quantité de Ca^{2+} libéré au niveau du RE (Ihara-Ohori *et al.*, 2007). Suite à un traitement par les UV-C, l'expression du gène *AtBI-1* pourrait donc contribuer à retarder la MCP, le temps pour la cellule d'effectuer une tentative de réparation des dégâts occasionnés. Cette hypothèse est renforcée par le fait que l'induction du gène *AtBI-1* se maintienne encore cinq jours après le traitement par les UV-C. L'expression du gène *AtBI-1* retarderait ainsi la MCP mais n'empêcherait pas sa mise en place. Enfin, il n'est pas à exclure que la protéine AtBI-1 puisse, dans certaines conditions,

avoir une fonction pro-MCP, comme le suggèrent certaines études (Kim *et al.*, 2008), même si la sur-expression du gène *AtBI-1* inhibe, à priori, la mort induite par les UV-C (Danon *et al.*, 2004).

Après clonage, transformation et sélection des lignées, les analyses d'expression ont montré que le gène codant pour la luciférase, sous contrôle du promoteur inhérent au gène *AtBI-1* était généralement moins exprimé que le gène endogène même si la régulation par les UV-C était effectivement fonctionnelle. Ceci suggère qu'au moins une autre séquence en dehors de la région 5', vraisemblablement de type «enhancer», contribue également à l'expression du gène. Malgré cela, la luminescence émise suite au traitement par les UV-C est suffisante pour être détectée par la caméra, indiquant l'état d'induction du promoteur, tandis qu'aucune luminescence n'est visible avant induction aux UV-C. La luminescence détectée à la caméra reflète donc bien le comportement du gène *AtBI-1* en réponse aux UV-C.

Au final, la lignée 3PL20D, qui possède une seule insertion et présente la plus forte activité luciférase, a été autofécondée (génération T4). Environ 53000 graines ont été mutées à l'EMS (Compagnie Lehle Seeds, USA). Ces graines mutées aléatoirement sont actuellement en cours de semis/récolte pour obtenir la génération suivante, nécessaire pour l'identification des mutants récessifs. Les premières analyses réalisées à la caméra ont permis d'isoler un certain nombre de lignées dérégulées qui doivent être prochainement confirmées. Ce crible devrait permettre d'identifier des mutants dérégulés dans des voies de signalisation menant au promoteur du gène *AtBI-1* et donc hypothétiquement impliqués dans la MCP. Ces mutants pourraient être affectés dans des gènes codant pour certains facteurs de transcription ou encore des protéines impliquées dans la signalisation de la MCP, comme des MAPK. Le fait que le traitement aux UV-C entraîne une certaine variabilité de réponse au sein d'une même boîte de pétri, les plantules n'étant pas toutes irradiées de façon homogène, se reflète sur l'activité du promoteur contrôlant la luciférase (figure 28). Le criblage de la banque de mutant sera donc basé sur la détection d'une perte complète d'expression ou alors sur la détection d'une expression constitutive de la luciférase.

L'analyse fonctionnelle du promoteur contrôlant le gène *AtBI-1* s'est faite à travers une série de quatre délétions, fusionnées au gène rapporteur GUS afin d'identifier la ou les régions responsables de la régulation du gène en réponse aux UV-C au cours de la MCP. Après clonage, transformation et sélection des lignées transformées, les tests histochimiques GUS réalisés sur les plantules ont permis d'identifier une partie du promoteur contenant la région responsable de sa régulation en réponse aux UV-C, comprise entre les sites de restriction *BgIII_A* et *BgIII_B*. L'absence de cette région, longue d'environ 114 pb, est suffisante pour entraîner une perte de régulation par les UV-C. En contrepartie, on observe une activité GUS plus importante dans ces lignées par rapport aux lignées contenant le promoteur complet. Ces résultats suggèrent que le fragment de délétion compris entre les sites de restriction *BgIII_A* et *BgIII_B*, comporte une ou plusieurs séquences responsables de la répression du gène en conditions normales. Cette répression serait levée suite à une induction du promoteur par les UV-C. Le mécanisme de répression est encore inconnu mais il est possible que cette séquence soit reconnue par une protéine, qui pourrait s'y maintenir afin d'empêcher ou limiter la transcription du gène *AtBI-1* en conditions normales. Suite à un traitement par les UV-C, cette protéine perdrait sa capacité de liaison à l'ADN, soit via une interaction avec une autre protéine ou d'autres changements tels que des modifications post-traductionnelles

L'analyse du fragment *BgIII_A-BgIII_B* est actuellement en cours dans le laboratoire. Des essais de «gel à retardement» vont être prochainement effectués afin de déterminer si la région identifiée est effectivement reconnue par une ou plusieurs protéines nucléaires. Par la suite, on pourra réaliser des mutations ponctuelles de cette région afin de cibler plus précisément la séquence liant spécifiquement la protéine impliquée dans la répression du promoteur. On pourra également réaliser des expériences d'empreinte à la DNase I afin de déterminer précisément les nucléotides qui interagissent avec le ou les facteurs de transcription responsables de la répression du gène. Le gène *AtBI-1* étant induit par de nombreux stress, il est probable que la séquence responsable de la régulation du promoteur ne soit pas spécifique seulement aux UV-C. Sa caractérisation ainsi que celle du facteur qui s'y lie devrait permettre d'améliorer nos connaissances concernant le fonctionnement du gène *AtBI-1* au cours de la MCP.

3.2. IMPLICATION DU GÈNE *TRX F1* DANS LA MCP

Le crible de la collection de mutants d'insertion luciférase a permis d'identifier la lignée TL-72H pour laquelle la luminescence due à l'expression de la luciférase est réprimée suite au traitement par les UV-C. Ces résultats suggèrent que l'ADN-T, qui contient le gène de la luciférase sans promoteur, s'est intégré près de régions régulatrices réprimant l'expression d'un gène en réponse aux UV-C. Nous avons montré que dans la lignée TL-72H, l'ADN-T s'est intégré au niveau du chromosome 3, dans la région 5' UTR du gène *Trx fl* (At3g02730). Ce gène nucléaire code pour une thioredoxine localisée essentiellement au niveau des chloroplastes (Jacquot *et al.*, 1997). Nos résultats indiquent qu'en dehors de tout stress, le gène *Trx fl* est fortement exprimé dans la plante sauvage (Col-0). Toutefois, l'expression de ce gène devient très rapidement réprimée en réponse aux UV-C, ce qui est corrélé au comportement de la luciférase chez le mutant TL-72H, contrôlée par le même promoteur. Dans la lignée TL-72H, l'expression du gène *Trx fl* est fortement altérée par l'insertion de l'ADN-T dont l'intégration se situe 43 nucléotides en amont du site d'initiation de la traduction. Après induction par les UV-C, la perte d'expression semble complète dans le mutant, les transcrits étant indétectables par RT-PCR, alors que dans le type sauvage, l'expression est fortement réduite mais pas complètement réprimée.

Les différentes expériences réalisées montrent que la perte d'expression du gène *Trx fl* dans le mutant TL-72H entraîne une MCP accrue dans l'ensemble de la plante. Ces changements sont subtils, notamment au niveau foliaire, vraisemblablement en raison de la possible redondance de fonction avec d'autres thioredoxines. La thioredoxine de type f est normalement localisée au niveau des chloroplastes où elle régule des protéines intervenant dans le cycle de Calvin. Deux études récentes réalisées chez le pois avaient montré que la thioredoxine de type f était également exprimée au niveau racinaire (De Dios Barajas-Lopez *et al.*, 2007; Traverso *et al.*, 2008). Dans la lignée TL-72H, la mortalité induite par les UV-C apparaît également plus importante au niveau des racines. La quasi-absence d'expression de *Trx fl* dans la lignée TL-72H rend donc les racines plus sensibles aux UV-C.

Chez *A. thaliana*, hormis la protéine Trx f1, les chloroplastes possèdent un autre homologue du même type, Trx f2, ainsi que trois autres types de Trx, m, x et y (Ruelland et Miginiac-Maslow, 1999; Mestres-Ortega et Meyer, 1999; Lemaire *et al.*, 2003). Malgré cela, il est surprenant de constater que la seule mutation du gène *Trx f1* dans la lignée TL-72H ait un effet sur la réponse de la plante au stress induit par les UV-C, ce qui renforce l'hypothèse que chaque thiorédoxine puisse avoir une fonction spécifique, comme le suggèrent certaines études (Arner et Holmgren, 2000; Montrichard *et al.*, 2009). On ne peut pas exclure qu'il puisse y avoir un phénomène de redondance, expliquant pourquoi la mortalité plus importante observée chez le mutant TL-72H en réponse aux UV-C, reste tout de même subtile. Néanmoins, cette mortalité accrue n'est pas spontanée mais apparaît progressivement au cours du temps. Elle serait donc régulée, ce qui laisse supposer une implication potentielle du gène *Trx f1* dans la MCP. La fragmentation internucléosomale de l'ADN, caractéristique de la MCP, apparaît plus importante dans le mutant par rapport au type sauvage suite au traitement par les UV-C. Ceci suggère que la mortalité accrue observée chez le mutant est bien la conséquence d'une MCP. Ces résultats corrélés au fait que le gène *Trx f1* soit régulé négativement par les UV-C laissent penser que ce gène pourrait être impliqué dans la régulation de la MCP. La nécessité d'être en partie réprimée pourrait signifier que ce gène fonctionne comme un régulateur négatif au cours de la MCP.

Afin de vérifier cette hypothèse et d'évaluer plus précisément l'implication du gène *Trx f1* au cours de la MCP, la levure *S. cerevisiae* a été utilisée pour exprimer la protéine, en présence de la protéine Bax. Bien que la levure ne possède aucun équivalent des membres de la famille Bcl-2, ces derniers apparaissent tout de même fonctionnels dans ce système. Ainsi, l'expression de la protéine Bax se révèle létale pour la levure et empêche la formation des colonies (Greenhalf *et al.*, 1996). Dans la levure, la protéine Bax se retrouve localisée au niveau de la mitochondrie (Zha *et al.*, 1996) et les ROS régulent la mise en place de cette mort (Madeo *et al.*, 1999). L'utilisation de ce modèle a permis notamment d'identifier la fonction protectrice du gène *BI-1* (Xu et Reed, 1998).

Dans notre cas, la co-expression des gènes *Trx f1* et *Bax* dans la levure a permis de réduire significativement la mort induite par *Bax* par rapport aux levures exprimant exclusivement la protéine *Bax*. Bien qu'aucun transfert de type western n'ait été fait afin de vérifier la présence des protéines, les résultats suggèrent un effet de la protéine *Trx f1*. À première vue, cette dernière n'est pas aussi efficace que la protéine *AtBI-1*, utilisée comme contrôle expérimental, pour inhiber la mort induite par la protéine *Bax*. Le fait que cette protection soit partielle peut s'expliquer par l'absence de système FTR (ferrédoxine-thiorédoxine réductase) dans la levure. Ce système est en effet responsable de la réduction des Trxs dans les chloroplastes (Dai *et al.*, 2004). La levure possède deux Trxs localisées dans le cytosol qui sont réduites par une Trx réductase (Gan, 1991). Il est probable que cette dernière soit moins efficace que le système FTR pour réduire la protéine *Trx f1*. La capacité de *Trx f1*, qui est une protéine chloroplastique, à réprimer la mort induite par *Bax* dans la levure est surprenante. Cette protection octroyée par *Trx f1* pourrait en fait être liée à son possible rôle dans la détoxification des ROS, lesquels sont produits par l'action de la protéine *Bax* au niveau de la mitochondrie (Zha *et al.*, 1996; Madeo *et al.*, 1999). Cette hypothèse est renforcée par le fait que la protéine *Trx f* du pois est capable de compléter partiellement les deux Trxs de *S. cerevisiae*, qui interviennent dans la détoxification des ROS (Traverso *et al.*, 2008) à travers la réduction des Prxs. *Trx f1* pourrait donc contribuer à réduire les Prxs de *S. cerevisiae*, lesquelles agiraient sur les ROS produits par l'action de *Bax*, contribuant à limiter la mort.

Chez l'humain, les Trxs sont impliquées directement dans l'apoptose (Nonn *et al.*, 2003; Tonissen et Trapani, 2009). Elles sont notamment capables d'inactiver directement ASK1, une MAPK impliquée dans l'apoptose (Masutani *et al.*, 2005). Au cours de l'apoptose, ASK1 va activer un certain nombre de MAPK qui à leur tour vont activer certaines protéines de la famille Bcl-2 dont la protéine *Bax*, entraînant sa translocation au niveau de la mitochondrie (Kim *et al.*, 2006; Tonissen et Trapani, 2009). Les Trxs, en inactivant ASK1, bloquent l'activation de la protéine *Bax* et sa translocation au niveau de la membrane mitochondriale. Dans la littérature, aucun article ne fait mention de l'existence d'un homologue de la protéine ASK1 dans la levure. En contrepartie, ASK1 partage une faible homologie de séquence avec

deux MAPK de levures, SSK2 et SSK22. Par contre, ASK1 est capable de compléter la perte de fonction de l'une ou l'autre de ces MAPK dans la levure (Ichijo *et al.*, 1997). On ne peut donc pas exclure qu'un homologue de fonction de la protéine ASK1 soit présent dans la levure et soit responsable de la translocation de Bax au niveau de la mitochondrie. Dans ce cas-ci, on peut imaginer que la protéine Trx f1 pourrait, hypothétiquement, inactiver cet homologue de la protéine ASK1 et en conséquence perturber la translocation de Bax.

Afin de vérifier si l'effet anti-MCP observé dans la levure se produisait également dans les plantes, une construction a également été réalisée pour sur-exprimer le gène *Trx f1* dans *A. thaliana*. Après transformation, trois lignées homozygotes ont été sélectionnées par rapport au niveau d'expression du gène *Trx f1*. Des tests ont été réalisés afin de voir si la sur-expression de ce gène dans la plante pouvait éventuellement accroître la protection contre les UV-C et diminuer le degré de mortalité. Les expériences réalisées, notamment les analyses phénotypiques, et les dosages de chlorophylle, ont montré que les lignées sur-exprimant le gène *Trx f1* montraient une réponse semblable au type sauvage (Col-0) (résultats non montrés).

Ces résultats suggèrent, à première vue, que la sur-expression du gène *Trx f1* n'a aucun impact sur le degré de mortalité des plantes en réponse aux UV-C. Pourtant les résultats obtenus dans la levure vont dans le sens d'une protection accrue lorsque le gène *Trx f1* est sur-exprimé. Il est donc possible que la construction soit non fonctionnelle ou bien que l'absence d'effet de la sur-expression du gène *Trx f1* dans les plantes soit due aux conditions expérimentales utilisées pour ces tests.

Il est également envisageable que la protéine subisse, dans les plantes, une régulation au niveau post-traductionnel, pouvant conduire à son inactivation ou à sa dégradation pendant la mise en place de la MCP. Une étude a en effet montré que Trx f1 pouvait être modifiée au niveau-post traductionnel (Michelet *et al.*, 2005). Il apparaît que, parmi toutes les Trxs présentes dans les chloroplastes, seule la protéine Trx f1 peut subir une S-glutathionylation au niveau d'une cystéine conservée (Michelet *et al.*, 2005). Cette modification post-

traductionnelle opérée par une Glutathione (GSH), consiste en la formation d'un pont disulfure entre la protéine cible et la GSH (Dixon *et al.*, 2005). Cette modification, réversible, réduit fortement l'activité de la protéine Trx f1, réduisant par la même occasion l'activité de toutes les protéines cibles qu'elle régule comme celles impliquées dans le cycle de Calvin. De même, la capacité de Trx f1 à être réduite par le système FTR se retrouve diminuée. Cette modification se produit essentiellement en condition de stress oxydatif (Michelet *et al.*, 2005). Cette modification de la protéine pourrait donc expliquer pourquoi l'effet de la sur-expression observée dans la levure n'a pas lieu dans la plante. D'un autre côté, on ne peut pas exclure que la protéine traduite ne soit, tout simplement, pas fonctionnelle. Lors du clonage, le gène *Trx f1* a été fusionné à une séquence codant pour une étiquette HA (Hémagglutinine). L'ajout de neuf acides aminés à la protéine Trx f1, ce qui représente environ 15 % de la protéine, a peut être modifiée la structure et donc l'activité de cette dernière.

Dans les plantes, la protéine Trx f1 est essentiellement localisée au niveau des chloroplastes (Clancey et Gilbert, 1987), mais aussi dans des tissus non photosynthétiques comme les racines (De Dios Barajas-Lopez *et al.*, 2007; Traverso *et al.*, 2008). Dans ces dernières, la protéine Trx f1 semble être également réduite par un système de type FTR, identifié notamment dans les amyloplastés (Balmer *et al.*, 2006; De Dios Barajas-Lopez *et al.*, 2007). En ce qui concerne les tissus photosynthétiques, quelques évidences mettent en lumière l'importance des chloroplastes au cours de la MCP, notamment en ce qui concerne la production de ROS. Dans le cas de la MCP mise en place à la suite d'un traitement par les UV-C, les ROS sont générés au niveau des mitochondries mais également des chloroplastes (Gao *et al.*, 2008). L'utilisation du DCMU qui inhibe la chaîne de transport des électrons dans les chloroplastes diminue la production de ROS, entraînant une inhibition partielle de la MCP (Gao *et al.*, 2008). Chez les plantes, entre autres fonctions, les Trxs, du moins certaines, sont suspectées d'être impliqués dans la détoxification des ROS à travers la régulation d'autres protéines comme les Prxs (Balmer *et al.*, 2002; Navrot *et al.*, 2006). Dans notre contexte, il est donc possible que la protéine Trx f1 puisse agir au cours de la MCP, à travers le contrôle des ROS.

Afin de vérifier l'hypothèse d'un lien avec les ROS générés au cours de la MCP, le mutant TL-72H a été mis en présence de MV, qui induit la MCP à travers la production de ROS par les chloroplastes (Chen et Dickman, 2004). À une concentration de 0,2 μ M, le mutant, qui n'exprime presque plus le gène *Trx f1* se révèle plus sensible au MV que le type sauvage (Col-0). Ce résultat, conforte l'hypothèse d'un rôle de la protéine Trx f1 dans la détoxification des ROS, de manière directe ou alors à travers la régulation de Prxs au cours de la MCP. De même, comme chez les animaux, elle pourrait intervenir dans la réparation des dommages causés par les ROS (Stadtman *et al.*, 2002).

Ces résultats suggèrent donc que le gène *Trx f1* pourrait intervenir dans la MCP, possiblement à travers la régulation des ROS générés au niveau des chloroplastes suite à un traitement aux UV-C. La répression de ce gène suite au traitement par les UV-C pourrait être requise afin de favoriser la mise en place de la MCP à travers la production de ROS par les chloroplastes.

Dans les racines, l'implication dans la détoxification des ROS reste possible malgré l'absence de chloroplastes. La mortalité accrue observée dans les racines en réponse aux UV-C chez le mutant TL-72H suggère fortement l'implication de Trx f1, vraisemblablement localisée au niveau des plastes non photosynthétiques. On peut également imaginer qu'à l'instar des animaux, où les Trxs régulent l'apoptose, à la fois à travers l'interaction directe avec certaines protéines mais aussi à travers la détoxification des ROS, Trx f1 puisse réguler des protéines importantes pour la mise en place de la MCP.

En conclusion de ces travaux, il apparaît que la quasi-absence d'expression du gène *Trx f1* dans le mutant TL-72H entraîne une MCP plus importante par rapport au type sauvage. De plus, la protéine Trx f1 est capable seule de limiter la mort induite par Bax dans la levure ce qui renforce l'idée que ce gène pourrait être impliqué dans la MCP. Ces résultats montrent pour la première fois qu'une thioredoxine pourrait jouer un rôle dans la régulation de la MCP chez les plantes.

La suite de ce projet va consister à cerner plus précisément le rôle de la protéine Trx f1 au cours de la MCP. Des puces à ADN ont été réalisées à cet effet et sont actuellement en cours d'analyse. De plus, la sur-expression de la protéine dans la plante va à nouveau être analysée, possiblement à travers de nouvelles constructions, afin d'évaluer si le rôle protecteur observé dans la levure se produit également dans la plante. Des expériences préliminaires ont montré que le mutant TL-72H présentait une résistance accrue à des agents pathogènes biotrophes de type bactérien comme *Xanthomonas campestris pv. campestris* 8004 et *Pseudomonas syringae* DC3000 (P.S. Torres, communication personnelle). Le développement bactérien est limité dans le mutant en comparaison du type sauvage (Col-0). Le fait que ces agents pathogènes biotrophes aient besoin de tissus vivants pour se développer suggère que l'absence de Trx f1 dans le mutant TL-72H pourrait favoriser plus facilement la mise en place de la MCP par rapport au type sauvage, renforçant l'idée d'une fonction de régulateur négatif de la MCP. Tout comme la protéine AtBI-1 dont la sur-expression inhibe la mise en place de la MCP, rendant les plantes plus sensibles à des agents pathogènes biotrophes (Huckelhoven *et al.*, 2003), la sur-expression de Trx f1 pourrait au contraire rendre les plantes plus sensibles au pathogènes biotrophes en raison de son rôle d'inhibiteur de la MCP.

ANNEXES

Tableau 10. Composition du tampon d'extraction d'ADN.

Composition du tampon d'extraction	Concentration finale
Sorbitol	140 mM
Tris-HCl pH 8.0	220 mM
EDTA pH 8.0	22 mM
NaCl	800 mM
Sarkosyl	1%
CTAB	0.8%

Tableau 11. Composition du tampon de préhybridation et d'hybridation pour les buvardages de type Southern.

Composition du tampon	Concentration finale
SSC	5X
Denhart	5X
SDS	0.5%
ADN de sperme de hareng	100 µg/ml

Tableau 12. Composition des solutions et conditions de lavage pour les buvardages de type Southern.

Composition de la solution de lavage	température et durée
2X SSC, 0.1% SDS	42°C, 20 min
1X SSC, 0.1% SDS	42°C, 20 min

Tableau 13. Composition du tampon d'extraction d'ARN.

Composition du tampon d'extraction	Concentration finale
LiCl	100 mM
Tris-HCl pH 8.0	100 mM
EDTA pH 8.0	10 mM
SDS	1%

Tableau 14. Composition du tampon de préhybridation et d'hybridation pour les buvardages de type Northern.

Composition du tampon	Concentration finale
SDS	7%
Na ₂ HPO ₄	0.25 M
EDTA	2 mM
ADN de sperme de hareng	100 µg/ml
Héparine	0.2 mg/ml

Tableau 15. Composition des solutions et conditions de lavage pour les buvardages de type Northern.

Composition de la solution de lavage	température et durée
2X SSC, 0.1% SDS	42°C, 20 min
1X SSC, 0.1% SDS	42°C, 20 min
0.2X SSC, 0.1% SDS	42°C, 20 min
0.1X SSC, 0.1% SDS	42°C, 20 min

BIBLIOGRAPHIE

- Abramovitch, R.B., Kim, Y.J., Chen, S., Dickman, M.B. and Martin, G.B. (2003). Pseudomonas type III effector AvrPtoB induces plant disease susceptibility by inhibition of host programmed cell death. *EMBO J.* 20, 60-69.
- Abramovitch, R.B., Anderson, J.C., and Martin, G.B. (2006). Bacterial elicitation and evasion of plant innate immunity. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 7, 601-611.
- Adrain, C., and Martin, S.J. (2001). The mitochondrial apoptosome: a killer unleashed by the cytochrome seas. *Trends Biochem. Sci.* 26, 390-397.
- Adrain, C., Martin, S.J. (2006). Double knockout blow for caspases. *Science* 311, 785-786.
- Airenne, T.T., Kidron, H., Nymalm, Y., Nylund, M., West, G., Mattjus, P., and Salminen, T.A. (2006). Structural evidence for adaptive ligand binding of glycolipid transfer protein. *J. Mol. Biol.* 355, 224-236.
- Alkhalifi, F., Renard, M., Vensel, W.H., Wong, J., Tanaka, C.K., Hurkman, W.J., Buchanan, B.B., and Montrichard, F. (2007). Thioredoxin-linked proteins are reduced during germination of *Medicago truncatula* seeds. *Plant Physiol.* 144, 1559-1579.
- Alnemri, E.S., Livingston, D.J., Nicholson, D.W., Salvesen, G., Thornberry, N.A., Wong, W.W., and Yuan, J. (1996). Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell* 87, 171.
- Alvarado, M.C., Zsigmond, L.M., Kovacs, I., Cséplö, A., Koncz, C., and Szabados, L.M. (2004) Gene trapping with firefly luciferase in *Arabidopsis*. Tagging of stress-responsive genes. *Plant Physiol.* 134, 18-27.
- Antebi, A., and Fink, G.R. (1992). The yeast Ca²⁺-ATPase homologue, PMR1, is required for normal Golgi function and localizes in a novel Golgi-like distribution. *Mol Biol Cell* 3, 633-654.
- Apel, K., and Hirt, H. (2004). Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.* 55, 373-399.
- Arner, E.S., Holmgren, A. (2000). Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. *Eur. J. Biochem.* 267, 6102-6109.
- Asai, T., Stone, J.M., Heard, J.E., Kovtun, Y., Yorgey, P., Sheen, J. and Ausubel, F.M. (2000). Fumonisin B1-induced cell death in *Arabidopsis* protoplasts requires jasmonate-, ethylene-, and salicylate-dependent signaling pathways. *Plant Cell* 12, 1823-1836.

Aviv, D.H., Rusterucci, C., Holt, B.F., Dietrich, R.A., Parker, J.E., and Dangl, J.L. (2002). Runaway cell death, but not basal disease resistance, in *lsd1* is SA- and NIM1/NPR1-dependent. *Plant J.* 29, 381-391.

Awada, T., Dunigan, D.D., Dickman, M.B. (2003). Animal anti-apoptotic genes ameliorate the loss of turgor in water-stressed transgenic tobacco. *Canadian Journal of Plant Science* 83, 499-506.

Baek, D., Nam, J., Koo, Y.D., Kim, D.H., Lee, J., Jeong, J.C., Kwak, S.S., Chung, W.S., Lim, C.O., Bahk, J.D., Hong, J.C., Lee, S.Y., Kawai-Yamada, M., Uchimiya, H., and Yun, D.J. (2004). Bax-induced cell death of *Arabidopsis* is mediated through reactive oxygen-dependent and -independent processes. *Plant Mol. Biol.* 56, 15-27.

Balk, J., Leaver, C.J., and McCabe, P.F. (1999). Translocation of cytochrome c from the mitochondria to the cytosol occurs during heat-induced programmed cell death in cucumber plants. *FEBS Lett.* 463, 151-154.

Balk, J., Chew, S.K., Leaver, C.J., and McCabe, P.F. (2003). The intermembrane space of plant mitochondria contains a DNase activity that may be involved in programmed cell death. *Plant J.* 34, 573-583.

Balmer, Y., Koller, A., del Val, G., Manieri, W., Schürmann, P., and Buchanan, B.B. (2002). Proteomics gives insight into the regulatory function of chloroplast thioredoxins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100, 370-375.

Balmer, Y., Vensel, W.H., Cai, N., Manieri, W., Schürmann, P., Hurkman, W.J., and Buchanan, B.B. (2006). A complete ferredoxin/thioredoxin system regulates fundamental processes in amyloplasts. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103, 2988-2993.

Bartsch, S., Monnet, J., Selbach, K., Quigley, F., Gray, J., von Wettstein, D., Reinbothe, S., and Reinbothe, C. (2008). Three thioredoxin targets in the inner envelope membrane of chloroplasts function in protein import and chlorophyll metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105, 4933-4938.

Beere, H.M. (2004). "The stress of dying": the role of heat shock proteins in the regulation of apoptosis. *J. Cell. Sci.* 117, 2641-2651.

Behl, C. (2000). Apoptosis and Alzheimer's disease. *J. Neural Transm.* 107, 1325-44.

Belenghi, B., Romero-Puertas, M.C., Vercammen, D., Brackeiner, A., Inze, D., Delledonne, M., and Van Breusegem, F. (2007). Metacaspase activity of *Arabidopsis thaliana* is regulated by S-nitrosylation of a critical cysteine residue. *J. Biol. Chem.* 282, 1352-1358.

Bent, A.F., and Mackey, D. (2007). Elicitors, effectors, and *R* genes: the new paradigm and a lifetime supply of questions. *Annu. Rev. Phytopathol.* 45, 399-436.

Berridge, M.J., Lipp, P., and Bootman, M.D. (2000). The versatility and universality of calcium signalling. *Nat. Rev. 1*, 11-21.

Bicknell, G.R., Cohen, G.M. (1995). Cleavage of DNA to large kilobase pair fragments occurs in some forms of necrosis as well as apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun. 207*, 40-47.

Blackstone, N.W., Green, D.R. (1999). The evolution of a mechanism of cell suicide. *Bioessays 21*, 84-88.

Boise, L.H., and Thompson, C.B. (1997). Bcl-xL can inhibit apoptosis in cells that have undergone Fas-induced protease activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. 94*, 3759-3764.

Boise, L.H., González-García, M., Postema, C.E., Ding, L., Lindsten, T., Turka, L.A., Mao, X., Nuñez, G., and Thompson, C.B. (1993). bcl-xL, a bcl-2-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death. *Cell 74*, 597-608.

Boldin, M.P., Goncharov, T.M., Goltsev, Y.V., and Wallach, D. (1996). Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1- and TNF receptor-induced cell death. *Cell 85*, 803-815.

Bolduc, N., and Brisson, L.F. (2002). Antisense down regulation of NtBI-1 in tobacco BY-2 cells induces accelerated cell death upon carbon starvation. *FEBS Lett. 532*, 111-114.

Bolduc, N., Lamb, G.N., Cessna, S.G., and Brisson, L.F. (2007). Modulation of Bax Inhibitor-1 and cytosolic Ca²⁺ by cytokinins in *Nicotiana tabacum* cells. *Biochimie 89*, 961-971.

Bolduc, N., Ouellet, M., Pitre, F., and Brisson, L.F. (2003). Molecular characterization of two plant BI-1 homologues which suppress Bax-induced apoptosis in human 293 cells. *Planta 216*, 377-386.

Bonneau, L., Ge, Y., Drury, G.E., and Gallois, P. (2008). What happened to plant caspases? *J. Exp. Bot. 59*, 491-499.

Borner, C. (2003). The Bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions. *Mol. Immunol. 39*, 615-647.

Boya, P., and Kroemer, G. (2009). Beclin 1: a BH3-only protein that fails to induce apoptosis. *Oncogene 28*, 2125-2127.

Boyce, M., and Yuan, J. (2006). Cellular response to endoplasmic reticulum stress: a matter of life or death. *Cell Death Differ. 13*, 363-373.

Bozhkov, P. V., Suarez, M. F., Filonova, L. H., Daniel, G., Zamyatin, A. A., Jr., Rodriguez-Nieto, S., Zhivotovsky, B., and Smertenko, A. (2005). Cysteine protease mCII-Pa executes

programmed cell death during plant embryogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *102*, 14463-14468.

Brodersen, P., Malinovsky, F.G., Hématy, K., Newman, M.A., and Mundy, J. (2005). The role of salicylic acid in the induction of cell death in *Arabidopsis acd11*. *Plant Physiol.* *138*, 1037-1045.

Brodersen, P., Petersen, M., Pike, H.M., Olszak, B., Skov, S., Odum, N., Jørgensen, L.B., and Brown, R.E. (2002). Knockout of *Arabidopsis accelerated-cell-death 11* encoding a sphingosine transfer protein causes activation of programmed cell death and defense. *J. Genes Dev.* *16*, 490-502.

Brown, R.E., Jarvis, K.L. and Hyland, K.J. (1990). Purification and characterization of glycolipid transfer protein from bovine brain. *Biochim. Biophys. Acta.* *1044*, 77-83.

Buchanan, B.B., and Balmer, Y. (2005). Redox regulation, a broadening horizon. *Ann. Rev. Plant Biol.* *56*, 187-220.

Buchanan-Wollaston, V., Page, T., Harrison, E., Breeze, E., Lim, P.O., Nam H.G., Lin J.F., Wu S.H., Swidzinski J., Ishizaki K., and Leaver C.J., (2005). Comparative transcriptome analysis reveals significant differences in gene expression and signaling pathways between developmental and dark/starvation-induced senescence in *Arabidopsis*. *Plant J.* *42*, 567-585.

Budihardjo, I., Oliver, H., Lutter, M., Luo, X. and Wang, X. (1999). Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annu. Rev. Dev. Biol.* *15*, 269-290.

Bump, N.J., Hackett, M., Hugunin, M., Seshagiri, S., Brady, K., Chen, P., Ferenz, C., Franklin, S., Ghayur, T., Li, P., Licari, P., Mankovitch, J., Shi, L., Greenberg, A.H., Miller, L.K., and Wong, W.W., (1995). Inhibition of ICE family proteases by baculovirus antiapoptotic protein p35. *Science* *269*, 1885-1888.

Bursch, W. (2001). The autophagosomal-lysosomal compartment in programmed cell death. *Cell Death Differ.* *8*, 569-581.

Bursch, W., Hochegger, K., Torok, L., Marian, B., Ellinger, A., and Hermann, R.S.(2000). Autophagic and apoptotic types of programmed cell death exhibit different fates of cytoskeletal filaments. *J. Cell Sci.* *113*, 1189-1198.

Cao, J., Jiang, F., and Sodmergen, C.K. (2003). Time-course of programmed cell death during leaf senescence in *Eucommia ulmoides*. *J. Plant Res.* *162*, 7-12.

Chae, H.J., Ke, N., Kim, H.R., Chen, S., Godzik, A., Dickman, M., and Reed, J.C. (2003). Evolutionarily conserved cytoprotection provided by Bax Inhibitor-1 homologs from animals, plants, and yeast. *Gene* *323*, 101-113.

Chae, H.J., Kim, H.R., Xu, C., Bailly-Maitre, B., Krajewska, M., Krajewski, S., Banares, S., Cui, J., Digicaylioglu, M., Ke, N., Kitada, S., Monosov, E., Thomas, M., Kress, C.L., Babendure, J.R., Tsien, R.Y., Lipton, S.A., and Reed, J.C. (2004). BI-1 regulates an apoptosis pathway linked to endoplasmic reticulum stress. *Mol. Cell* 15, 355-366.

Chandra-Shekara, A.C., Gupte, M., Navarre, D., Raina, S., Raina, R., Klessig, D. and Kachroo, P. (2006). Light-dependent hypersensitive response and resistance signaling against turnip crinkle virus in *Arabidopsis*. *Plant J.* 45, 320-334.

Chen, S., and Dickman, M.B. (2004). Bcl-2 family members localize to tobacco chloroplasts and inhibit programmed cell death induced by chloroplast-targeted herbicides. *J. Exp. Bot.* 55, 2617-2623.

Chen, S.R., Dunigan, D.D., and Dickman, M.B. (2003). Bcl-2 family members inhibit oxidative stress-induced programmed cell death in *Saccharomyces cerevisiae*. *Free Radical Biology and Medicine* 34, 1315-1325.

Chibani, K., Wingsle, G., Jacquot, J.P., Gelhaye, E., and Rouhier, N. (2009). Comparative genomic study of the thioredoxin family in photosynthetic organisms with emphasis on *Populus trichocarpa*. *Mol. Plant* 2, 308-322.

Chichkova, N.V., Kim, S.H., Titova, E.S., Kalkum, M., Morozov, V.S., Rubtsov, Y.P., Kalinina, N.O., Taliansky, M.E., and Vartapetian, A.B. (2004). A plant caspase-like protease activated during the hypersensitive response. *Plant Cell* 16, 157-171.

Chisholm, S. T., Coaker, G., Day, B., and Staskawicz, B. J. (2006). Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response. *Cell* 124, 803-814.

Chivers, P.T., and Raines, R.T. (1997). General acid/base catalysis in the active site of *Escherichia coli* thioredoxin. *Biochemistry* 36, 15810-15816.

Cho, S.G. and Choi, E.J. (2002). Apoptotic signaling pathways: caspases and stress-activated protein kinases. *J. Biochem. Mol. Biol.* 35, 24-27.

Clancey, C.J., and Gilbert, H.F. (1987). Thiol/disulfide exchange in the thioredoxin catalyzed reductive activation of spinach chloroplast fructose-1,6-bisphosphatase. Kinetics and thermodynamics. *J. Biol. Chem.* 262, 13545-13549.

Clough, S.J., and Bent, A.F. (1998) Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis*. *Plant J.* 16, 735-743.

Codogno, P., and Meijer, A.J. (2005). Autophagy and signaling: their role in cell survival and cell death. *Cell Death Differ.* 12, 1509-1518.

- Coffeen, W.C., and Wolpert, T.J. (2004). Purification and characterization of serine proteases that exhibit caspase-like activity and are associated with programmed cell death in *Avena sativa*. *Plant Cell* 16, 857-873.
- Counis, M.F., Torriglia, A. (2000). DNases and apoptosis. *Biochem. Cell Biol.* 78, 405-414.
- Coupe, S.A., Watson, L.M., Ryan, D.J., Pinkney, T.T. and Eason, J.R. (2004). Molecular analysis of programmed cell death during senescence in *Arabidopsis thaliana* and *Brassica oleracea*: cloning broccoli LSD1, Bax inhibitor and serine palmitoyltransferase homologues. *J. Exp. Bot.* 55, 59-68.
- Couzinet, A., Hérics, Z., and Hueber, A.O. (2002). Régulation de la mort cellulaire programmée: vers une conception plus dynamique. *Médecine/Sciences* 18, 841-852.
- Cronin, S.R., Rao, R., and Hampton, R.Y. (2002). Cod1p/Spf1p is a P-type ATPase involved in ER function and Ca²⁺ homeostasis. *J. Cell Biol.* 157, 1017-1028.
- Curtis, M.J., and Wolpert, T.J. (2004). The victorin-induced mitochondrial permeability transition precedes cell shrinkage and biochemical markers of cell death, and shrinkage occurs without loss of membrane integrity. *Plant J.* 38, 244-259.
- Dai, S., Johansson, K., Miginiac-Maslow, M., Schürmann, P., and Eklund, H. (2004). Structural basis of redox signaling in photosynthesis: structure and function of ferredoxin:thioredoxin reductase and target enzymes. *Photosynth. Res.* 79, 233-248.
- D'Amours, D., Sallmann, F.R., Dixit, V.M., and Poirier, G.G. (2001). Gain-of-function of poly(ADP-ribose) polymerase-1 upon cleavage by apoptotic proteases: implications for apoptosis. *J. Cell. Sci.* 114, 3771-3778.
- Dangl, J.L., Dietrich, R.A. and Richberg, M.H. (1996). Death Don't Have No Mercy: cell death programs in plant-microbe interactions. *Plant Cell* 8, 1793-1807.
- Dangl, J.L., and Jones, J.D. (2001). Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* 411, 826-833.
- Danon, A. and Gallois P. (1998). UV-C radiation induces apoptotic-like changes in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett.* 437, 131-136.
- Danon, A., Rotari, V.I., Gordon, A., Mailhac, N., and Gallois, P. (2004). Ultraviolet-C overexposure induces programmed cell death in *Arabidopsis*, which is mediated by caspase-like activities and which can be suppressed by caspase inhibitors, p35 and *Defender against Apoptotic Death*. *J. Biol. Chem.* 279, 779-787.

Das, K.C., and Das, C.K., (2000). Thioredoxin, a singlet oxygen quencher and hydroxyl radical scavenger: Redox independent functions, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 277, 443-447.

De Dios Barajas-López, J., Serrato, A.J., Olmedilla, A., Chueca, A., and Sahrawy, M. (2007). Localization in roots and flowers of pea chloroplastic thioredoxin f and thioredoxin m proteins reveals new roles in nonphotosynthetic organs. *Plant Physiol.* 145, 946-60.

De Jong, A.J., Hoeberichts, F.A., Yakimova, E.T., Maximova, E., and Woltering, E.J. (2000). Chemical-induced apoptotic cell death in tomato cells: involvement of caspase-like proteases. *Planta* 211, 656-662.

De Pinto, M.C., Paradiso, A., Leonetti, P., and De Gara, L. (2006). Hydrogen peroxide, nitric oxide and cytosolic ascorbate peroxidase at the crossroad between defence and cell death. *Plant J.* 48, 784-795.

De Wit, P.J.G.M. (1997). Pathogen avirulence and plant resistance: a key role for recognition. *Trends Plant Sci.* 2, 452-458.

Dean, C., Sjodin, C., Page, T., Jones, J., and Lister, C. (1992) Behavior of the maize transposable element Ac in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 2, 69-81

Degli-Esposti, M., and Dive, C. (2003). Mitochondrial membrane permeabilisation by Bax/Bak. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 304, 455-461.

Degterev, A., Boyce, M., & Yuan, J. (2003) A decade of caspases. *Oncogene* 22, 8543- 8567.

Del Pozo, O., and Lam, E. (1998). Caspases and programmed cell death in the hypersensitive response of plants to pathogens. *Curr. Biol.* 8, 896-897.

Del Pozo, O., and Lam, E. (2003) Expression of the baculovirus p35 protein in tobacco affects cell death progression and compromises N-mediated disease resistance response to tobacco mosaic virus. *Mol. Plant Microbe Interact.* 6, 485-494.

Delledonne, M., Xia, Y., Dixon, R.A., and Lamb, C. (1998). Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. *Nature* 394, 585-588.

Delorme, V., McCabe, P.F., Kim, D.J., and Leaver, C.J. (2000). A matrix metalloproteinase gene is expressed at the boundary of senescence and programmed cell death in cucumber. *Plant Physiol.* 123, 917-927.

Desikan, R., Reynolds, A., Hancock, J.T., and Neill, S.J. (1998). Harpin and hydrogen peroxide both initiate programmed cell death but have differential effects on defence gene expression in *Arabidopsis* suspension cultures. *Biochem. J.* 330, 115-120.

- Deveraux QL, Takahashi R, Salvesen GS, Reed JC. (1997). X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases. *Nature* 388, 300-304.
- Dickman, M.B., Park, Y.K., Oltersdorf, T., Li, W., Clemente, T., and French, R. (2001). Abrogation of disease development in plants expressing animal antiapoptotic genes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98, 6957-6962.
- Dietrich, R.A., Delaney, T.P., Uknes, S.J., Ward, E.J., Ryals, J.A. and Dangl, J.L. (1994). *Arabidopsis* mutants simulating disease resistance response. *Cell* 77, 565-578.
- Dietrich, R.A., Richberg, M.H., Schmidt, R., Dean, C. and Dangl, J.L. (1997). A novel zinc-finger protein is encoded by the *Arabidopsis lsd1* gene and functions as a negative regulator of plant cell death. *Cell* 88, 685-694.
- Dixon, D.P., Skipsey, M., Grundy, N.M., and Edwards, R. (2005). Stress-induced protein S-glutathionylation in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 138, 2233-2244.
- Dominguez, F., Moreno, J., and Cejudo, F.J. (2004). A gibberellin-induced nuclease is localized in the nucleus of wheat aleurone cells undergoing programmed cell death. *J. Biol. Chem.* 279, 11530-11536.
- Dong, Z., Saikumar, P., Weinberg, J.M., and Venkatachalam, M.A. (1997). Internucleosomal DNA cleavage triggered by plasma membrane damage during necrotic cell death. Involvement of serine but not cysteine proteases. *Am. J. Pathol.* 151, 1205-1213.
- Dong, X. (1998). SA, JA, ethylene, and disease resistance in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 1, 316-323.
- Doukhanina, E.V., Chen, S., van der Zalm, E., Godzik, A., Reed, J., and Dickman, M.B. (2006). Identification and functional characterization of the BAG protein family in *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* 281, 18793-801.
- Drake, R., John, I., Farrell, A., Cooper, W., Schuch, W., and Grierson, D. (1996). Isolation and analysis of cDNAs encoding tomato cysteine proteases expressed during leaf senescence. *Plant Molec. Biol.* 30, 755-767.
- Du, L., Ali, G.S., Simons, K.A., Hou, J., Yang, T., Reddy, A.S., and Poovaiah, B.W. (2009). Ca(2+)/calmodulin regulates salicylic-acid-mediated plant immunity. *Nature* 457, 1154-1158.
- Duke, R.C., Ojcius, D.M., and Young, J.D. (1996). Cell suicide in health and disease. *Sci. Am.* 275, 80-87.
- Durrant, W.E., and Dong, X. (2004). Systemic acquired resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.* 42, 185-209.

- Earnshaw, W.C., Martins, L.M., and Kaufmann, S.H. (1999). Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu. Rev. Biochem.* *68*, 383-424.
- Edinger, A.L., and Thompson, C.B. (2004). Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. *Curr. Opin. Cell Biol.* *16*, 663-669.
- Eichmann, R., Schultheiss, H., Kogel, K.H., and Huckelhoven, R. (2004). The barley apoptosis suppressor homologue BAX Inhibitor-1 compromises nonhost penetration resistance of barley to the inappropriate pathogen *Blumeria graminis* f. sp. *tritici*. *Mol. Plant Microbe Interact.* *17*, 484-490.
- Ellis, J., Dodds, P., and Pryor, T. (2000). Structure, function and evolution of plant disease resistance genes. *Curr. Opin. Plant Biol.* *3*, 278-284.
- Epple, P., Mack, A.A., Morris, V.R. and Dangl, J.L. (2003). Antagonistic control of oxidative stress-induced cell death in *Arabidopsis* by two related, plant-specific zinc finger proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *100*, 6831-6836.
- Errakhi, R., Dauphin, A., Meimoun, P., Lehner, A., Rebutier, D., Vatsa, P., Briand, J., Madiona, K., Rona, J.P., Barakate, M., Wendehenne, D., Beaulieu, C., and Bouteau, F. (2008). An early Ca^{2+} influx is a prerequisite to thaxtomin A-induced cell death in *Arabidopsis thaliana* cells. *J. Exp. Bot.* *59*, 4259-4270.
- Fadok, V.A., Bratton, D.L., Rose, D.M., Pearson, A., Ezekewitz, R.A., and Henson, P.M. (2000). A receptor for phosphatidylserine-specific clearance of apoptotic cells. *Nature* *405*: 85-90.
- Fadok, V.A., Voelker, D.R., Campbell, P.A., Cohen, J.J., Bratton, D.L., and Henson P.M. (1992). Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J. Immunol.* *148*, 2207-2216.
- Fernandes-Alnemri, T., Armstrong, R.C., Krebs, J., Srinivasula, S.M., Wang, L., Bullrich, F., Fritz, L.C., Trapani, J.A., Tomaselli, K.J., Litwack, G., and Alnemri, E.S. (1996). In vitro activation of CPP32 and Mch3 by Mch4, a novel human apoptotic cysteine protease containing two FADD-like domains. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *93*, 7464-7469.
- Ferri, K. F., and Kroemer, G. (2000). Control of apoptotic DNA degradation. *Nature Cell Biol.* *2*, 63-64.
- Filonova, L.H., Suárez, M.F., and Bozhkov, P.V. (2008). Detection of programmed cell death in plant embryos. *Methods Mol. Biol.* *427*, 173-179.
- Fukuda, H. (1996). Xylogenesis: initiation, progression, and cell death. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* *47*, 299-325.

- Fukuda, H. (1997). Tracheary element differentiation. *Plant Cell* 9, 1147-1156.
- Fukuda, H. (2000). Programmed cell death of tracheary elements as a paradigm in plants. *Plant Mol. Biol.* 44, 245-253.
- Gaido, M.L., and Cidlowski, J.A. (1991). Identification, purification, and characterization of a calcium-dependent endonuclease (NUC18) from apoptotic rat thymocytes. NUC18 is not histone H2B. *J. Biol. Chem.* 266, 18580-18585.
- Gallois, P., Makishima, T., Hecht, V., Despres, B., Laudie, M., Nishimoto, T., and Cooke, R. (1997). An *Arabidopsis thaliana* cDNA complementing a hamster apoptosis suppressor mutant. *Plant J.* 11, 1325-1331.
- Gan, Z.R. (1991) Yeast thioredoxin genes. *J. Biol. Chem.* 266, 1692-1696.
- Gan, S., and Amasino, R.M. (1995). Inhibition of leaf senescence by autoregulated production of cytokinin. *Science* 270, 1986-1988.
- Gao C, Xing D, Li L, Zhang L. (2008). Implication of reactive oxygen species and mitochondrial dysfunction in the early stages of plant programmed cell death induced by ultraviolet-C overexposure. *Planta* 227, 755-767.
- Gelhaye, E., Rouhier, N., Navrot, N., and Jacquot, J.P. (2005). The plant thioredoxin system. *Cell. Mol. Life Sci.* 62, 24-35.
- Giorgi, C., Romagnoli, A., Pinton, P., Rizzuto, R. (2008). Ca²⁺ signaling, mitochondria and cell death. *Curr. Mol. Med.* 8, 119-130.
- Gomez-Gomez, L. (2004). Plant perception systems for pathogen recognition and defence. *Mol. Immunol.* 41, 1055-1062.
- Govrin, E.M., and Levine, A. (2000). The hypersensitive response facilitates plant infection by the necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea*. *Curr. Biol.* 10, 751-757.
- Green, D.R., and Reed, J.C. (1998). Mitochondria and apoptosis. *Science* 281, 1309-1312.
- Greenberg, J.T. (1996). Programmed cell death: a way of life for plants. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93, 12094-12097.
- Greenberg, J.T. (1997). Programmed cell death in plant-pathogen interactions. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48, 525-545.
- Greenberg, J.T., and Yao, N. (2004). The role and regulation of programmed cell death in plant-pathogen interactions. *Cell Microbiol.* 6, 201-211.

Greenberg, J.T., Guo, A., Klessig, D.F., and Ausubel, F.M. (1994). Programmed cell death in plants: a pathogen-triggered response activated coordinately with multiple defense functions. *Cell* 77, 551-563.

Greenhalf, W., Stephan, C. and Chaudhuri, B. (1996). Role of mitochondria and C-terminal membrane anchor of Bcl-2 in Bax induced growth arrest and mortality in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* 380, 169-175.

Gunawardena, A.H., Greenwood, J.S. and Dengler, N.G. (2004). Programmed cell death remodels lace plant leaf shape during development. *Plant Cell* 16, 60-73.

Hacki, J., Egger, L., Monney, L., Conus, S., Rosse, T., Fellay, I., and Borney, C. (2000). Apoptotic crosstalk between the endoplasmic reticulum and mitochondria controlled by Bcl-2. *Oncogene* 19, 2286-2295.

Hahlbrock, K., Bednarek, P., Ciolkowski, I., Hamberger, B., Heise, A., Liedgens, H., Logemann, E., Nurnberger, T., Schmelzer, E., Somssich, I. E., and Tan, J. W. (2003). Non-self recognition, transcriptional reprogramming, and secondary metabolite accumulation during plant/pathogen interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100, 14569-14576.

Hardham, A.R., Jones, D.A., and Takemoto, D. (2007). Cytoskeleton and cell wall function in penetration resistance. *Curr. Opin. Plant Biol.* 10, 342-348.

Hatsugai, N., Kuroyanagi, M., Yamada, K., Meshi, T., Tsuda, S., Kondo, M., Nishimura, M., and Hara-Nishimura, I. (2004). A plant vacuolar protease, VPE, mediates virus induced hypersensitive cell death. *Science* 305, 855-858.

Hatsugai, N., Kuroyanagi, M., Nishimura, M., and Hara-Nishimura, I. (2006). A cellular suicide strategy of plants: vacuole-mediated cell death. *Apoptosis*. 11, 905-911.

He, R., Drury, G.E., Rotari, V.I., Gordon, A., Willer, M., Tabasum, F., Woltering, E.J., and Gallois, P. (2008). Metacaspase-8 modulates programmed cell death induced by UV and H₂O₂ in *Arabidopsis*. *J. Biol. Chem.* 283, 774-783.

He, Y., Fukushige, H., Hildebrand, D.F., and Gan, S. (2002). Evidence supporting a role of jasmonic acid in *Arabidopsis* leaf senescence. *Plant Physiol.* 128, 876-884.

Heath, M.C. (2000). Hypersensitive response-related death. *Plant Mol. Biol.* 44, 321-334.

Hengartner, M.O. (2000). The biochemistry of apoptosis. *Nature* 407, 770-776.

Hiraiwa, N., Nishimura, M. and Hara-Nishimura, I. (1999). Vacuolar, processing enzyme is self-catalytically activated by sequential removal of the C-terminal and N-terminal propeptides. *FEBS Lett.* 447, 213-216.

Hirata, H., Takahashi, A., Kobayashi, S., Yonehara, S., Sawai, H., Okazaki, T., Yamamoto, K., and Sasada, M. (1998). Caspases are activated in a branched protease cascade and control distinct downstream processes in Fas-induced apoptosis. *J. Exp. Med.* 187, 587-600.

Ho, P.K. and Hawkins, C.J. (2005). Mammalian initiator apoptotic caspases. *FEBS J.* 272, 5436-5453.

Hockenbery, D.M., Oltvai, Z.N., Yin, X.M., Milliman, C.L., and Korsmeyer, S.J. (1993). Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell* 75, 241-251.

Hoeberichts, F.A., and Woltering, E.J. (2003). Multiple mediators of plant programmed cell death: interplay of conserved cell death mechanisms and plant-specific regulators. *Bioessays* 25, 24-57.

Hoeberichts, F.A., ten Have, A., and Woltering, E.J. (2003). A tomato metacaspase gene is upregulated during programmed cell death in *Botrytis cinerea*-infected leaves. *Planta* 217, 517-522.

Holmgren, A., (1985). Thioredoxin. *Annu. Rev. Biochem.* 54, 237-271.

Holmgren, A. (1989). Thioredoxin and glutaredoxin systems. *J. Biol. Chem.* 264, 13963-13966.

Huckelhoven, R. (2007). Cell wall-associated mechanisms of disease resistance and susceptibility. *Annu. Rev. Phytopathol.* 45, 101-127.

Huckelhoven, R., Dechert, C. and Kogel, K.H. (2003). Overexpression of barley *BAX inhibitor 1* induces breakdown of Mlo-mediated penetration resistance to *Blumeria graminis*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100, 5555-5560.

Huh, G.H., Damsz, B., Matsumoto, T.K., Reddy, M.P., Rus, A.M., Ibeas, J.I., Narasimhan, M.L., Bressan, R.A., and Hasegawa, P.M. (2002). Salt causes ion disequilibrium-induced programmed cell death in yeast and plants. *Plant J.* 29, 649-659.

Hwang, C., Sinskey, A.J., and Lodish, H.F. (1992). Oxidized redox state of glutathione in the endoplasmic reticulum. *Science* 257, 1496-1502.

Ichijo, H., Nishida, E., Irie, K., ten Dijke, P., Saitoh, M., Moriguchi, T., Takagi, M., Matsumoto, K., Miyazono, K., and Gotoh, Y. (1997). Induction of apoptosis by ASK1, a mammalian MAPKKK that activates SAPD/JNK and p38 signaling pathways. *Science* 275, 90-94.

Ihara-Ohori, Y., Nagano, M., Muto, S., Uchimiya, H., and Kawai-Yamada, M. (2007). Cell death suppressor *Arabidopsis* bax inhibitor-1 is associated with calmodulin binding and ion homeostasis. *Plant Physiol.* 143, 650-660.

- Isbat, M., Zeba, N., Kim, S.R., and Hong, C.B. (2009). A BAX inhibitor-1 gene in *Capsicum annuum* is induced under various abiotic stresses and endows multi-tolerance in transgenic tobacco. *J. Plant Physiol.* *166*, 1685-1693.
- Ishiga, Y., Takeuchi, K., Taguchi, F., Inagaki, Y., Toyoda, K., Shiraishi, T., and Ichinose, Y. (2005). Defense responses of *Arabidopsis thaliana* inoculated with *Pseudomonas syringae* pv. *Tabaci* wild type and defective mutants for flagellin (Δ *fliC*) and flagellin-glycosylation (Δ *orf1*). *J. Gen. Plant Pathol.* *71*, 302-307.
- Iwata, Y., Fedoroff, N.V., and Koizumi, N. (2008). *Arabidopsis* bZIP60 is a proteolysis-activated transcription factor involved in the endoplasmic reticulum stress response. *Plant Cell* *20*, 3107-3121.
- Jabs, T., Dietrich, R.A. and Dangl, J.L. (1996). Initiation of runaway cell death in an *Arabidopsis* mutant by extracellular superoxide. *Science* *273*, 1853-1856.
- Jabs, T. (1999). Reactive oxygen intermediates as mediators of programmed cell death in plants and animals. *Biochem. Pharmacol.* *57*, 231-245.
- Jacquot, J.P., Eklund, H., Rouhier, N., and Schürmann, P. (2009). Structural and evolutionary aspects of thioredoxin reductases in photosynthetic organisms. *Trends Plant Sci.* *14*, 336-343.
- Jacquot, J.P., Lopez-Jaramillo, J., Miginiac-Maslow, M., Lemaire, S., Cherfils, J., Chueca, A., and Lopez-Gorge, J. (1997). Cysteine-153 is required for redox regulation of pea chloroplast fructose-1,6-bisphosphatase. *FEBS Lett.* *401*, 143-147.
- Jefferson, R.A., Kavanagh, T.A. and Bevan, M.W. (1987). GUS fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J.* *6*, 3901-3907.
- Jin, Z. and El-Deiry, W.S. (2005). Overview of cell death signaling pathways. *Cancer Biol. Ther.* *4*, 139-163.
- Jones, A.M. (2001). Programmed cell death in development and defence. *Plant Physiol.* *125*, 94-97.
- Jones, J.D.G., and Dangl, J.L. (2006). The plant immune system. *Nature* *444*, 323-329.
- Juarez-Diaz, J.A., McClure, B., Vazquez-Santana, S., Guevara-Garcia, A., Leon-Mejia, P., Marquez-Guzman, J., and Cruz-Garcia, F. (2006). A novel thioredoxin h is secreted in *Nicotiana glauca* and reduces S-RNase in vitro. *J. Biol. Chem.* *281*, 3418-3424.
- Jürgensmeier, J.M., Xie, Z., Deveraux, Q., Ellerby, L., Bredesen, D., and Reed, J.C. (1998). Bax directly induces release of cytochrome c from isolated mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *95*, 4997-5002.

Kabbage, M., and Dickman, M.B. (2008). The BAG proteins: a ubiquitous family of chaperone regulators. *Cell. Mol. Life Sci.* 65, 1390-1402.

Kang, C.H., Jung, W.Y., Kang, Y.H., Kim, J.Y., Kim, D.G., Jeong, J.C., Baek, D.W., Jin, J.B., Lee, J.Y., Kim, M.O., Chung, W.S., Mengiste, T., Koiwa, H., Kwak, S.S., Bahk, J.D., Lee, S.Y., Nam, J.S., Yun, D.J., and Cho, M.J. (2006) AtBAG6, a novel calmodulin-binding protein, induces programmed cell death in yeast and plants. *Cell Death Differ.* 13, 84-95.

Katsuhara, M., and Kawasaki, T. (1996). Salt stress induced nuclear and DNA degradation in meristematic cells of barley roots. *Plant Cell Physiol.* 37, 169-173.

Kaufmann, M., Bozic, D., Briand, C., Bodmer, J.L., Zerbe, O., Kohl, A., Tschopp, J., and Grütter, M.G. (2002). Identification of a basic surface area of the FADD death effector domain critical for apoptotic signaling. *FEBS Lett.* 527, 250-254.

Kaufmann, S.H. (1998). Cell death induced by topoisomerase-targeted drugs: more questions than answers. *Biochim. Biophys. Acta.* 1400, 195-211.

Kawai-Yamada, M., Pan, L., Reed, J.C., and Uchimiya, H. (1999). Evolutionally conserved plant homologue of the Bax inhibitor-1 (BI-1) gene capable of suppressing Bax-induced cell death in yeast. *FEBS Lett.* 464, 143-147.

Kawai-Yamada, M., Jin, L., Yoshinaga, K., Hirata, A. and Uchimiya, H. (2001). Mammalian Bax-induced plant cell death can be down-regulated by overexpression of *Arabidopsis* Bax Inhibitor-1 (*AtBI-1*). *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98, 12295-12300.

Kawai-Yamada, M., Ohori, Y., and Uchimiya, H. (2004). Dissection of *Arabidopsis* Bax inhibitor-1 suppressing Bax-, hydrogen peroxide-, and salicylic acid-induced cell death. *Plant Cell* 16, 21-32.

Kawai-Yamada, M., Saito, Y., Jin, L., Ogawa, T., Kim, K.M., Yu, L.H., Tone, Y., Hirata, A., Umeda, M., and Uchimiya, H. (2005). A novel *Arabidopsis* gene causes Bax-like lethality in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 280, 39468-39473.

Kelekar, A., and Thompson, C.B. (1998). Bcl-2-family proteins: the role of the BH3 domain in apoptosis. *Trends Cell Biol.* 8, 324-30.

Kelleher, D.J., and Gilmore, R. (1997). DAD1, the defender against apoptotic cell death, is a subunit of the mammalian oligosaccharyltransferase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94, 4994-4999.

Kerr, J.F., Wyllie, A.H., and Currie, A.R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* 26, 239-257.

Kerr, J.F., Gobe, G.C., Winterford, C.M., and Harmon, B.V. (1995). Anatomical methods in cell death. *Methods Cell Biol.* 46, 1-27.

Kerr, J.F. (2002). History of the events leading to the formulation of the apoptosis concept. *Toxicology 181-182*, 471-474.

Kiefer, M.C., Brauer, M.J., Powers, V.C., Wu, J.J., Umansky, S.R., Tomei, L.D., and Barr, P.J. (1995). Modulation of apoptosis by the widely distributed Bcl-2 homologue Bak. *Nature 374*, 736-739.

Kim, B.J., Ryu, S.W., and Song, B.J. (2006). JNK- and p38 kinase mediated phosphorylation of Bax leads to its activation and mitochondrial translocation and to apoptosis of human hepatoma HepG2 cells. *J. Biol. Chem. 281*, 21256–21265.

Kim, H.R., Lee, G.H., Ha, K.C., Ahn, T., Moon, J.Y., Lee, B.J., Cho, S.G., Kim, S., Seo, Y.R., Shin, Y.J., Chae, S.W., Reed, J.C., and Chae, H.J. (2008). Bax Inhibitor-1 is a pH-dependent regulator of Ca²⁺ channel activity in the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem. 283*, 15946-15955.

Kim, H.R., Lee, G.H., Chae, S.W., Ahn, T., and Chae, H.J. (2009). Bax inhibitor-1 regulates ER stress induced ROS accumulation through the regulation of cytochrome P450 2E1. *J. Cell Sci. 122*, 1126-1133.

Kim, J., and Klionsky, D. J. (2000). Autophagy, cytoplasm-to-vacuole targeting pathway, and pexophagy in yeast and mammalian cells. *Annu. Rev. Biochem. 69*, 303-342.

Kim, K.H., Yoon, J.B., Park, H.G., Park, E.W., and Kim, Y.H. (2004). Structural modifications and programmed cell death of chilli pepper fruit related to resistance responses to *Colletotrichum gloeosporioides* infection. *Phytopathol. 94*, 1295-1304.

Kim, M.C., Panstruga, R., Elliot, C., Muller, J., Devoto, A., Yoon, H.W., Park, H.C., Cho, M.J., and Schulze-Lefert, P. (2002). Calmodulin interacts with MLO protein to regulate defense against mildew in barley. *Nature 416*: 447-450.

Kimchi, A. (2007). Programmed cell death: From novel gene discovery to studies on network connectivity and emerging biomedical implications. *Cytokine Growth Factor Rev. 18*, 435-440.

Kliebenstein, D.J., Dietrich, R.A., Martin, A.C., Last, R.L., Dangel, J.L. (1999). LSD1 regulates salicylic acid induction of copper zinc superoxide dismutase in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Plant Microbe Interact. 12*, 1022-1026.

Klionsky, D.J., and Emr, S.D. (2000). Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. *Science 290*, 1717-1721.

Klionsky, D.J., Cregg, J.M., Dunn, W.A., Emr, S.D., Sakai, Y., Sandoval, I.V., Sibirny, A., Subramani, S., Thumm, M., Veenhuis, M., and Ohsumi, Y. (2003). A unified nomenclature for yeast autophagy-related genes. *Dev. Cell 5*, 539–545.

- Klionsky, D.J. (2005). The molecular machinery of autophagy: unanswered questions. *J. Cell Sci.* *118*, 7-18.
- Kluck, R.M., Bossy-Wetzel, E., Green, D.R., and Newmeyer, D.D. (1997). The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science* *275*, 1132-1136.
- Korthout, H.A., Berecki, G., Bruin, W., Van Duijn, B., and Wang, M. (2000). The presence and subcellular localization of caspase 3-like proteinases in plant cells. *FEBS Lett.* *475*, 139-144.
- Koukalova, B., Kovarik, A., Fajkus, J., and Siroky J. (1997). Chromatin fragmentation associated with apoptotic changes in tobacco cells exposed to cold stress. *FEBS Lett.* *414*, 289-292.
- Krause, M., and Durner, J. (2004). Harpin inactivates mitochondria in *Arabidopsis* suspension cells. *Mol. Plant Microbe Interact.* *17*, 131-139.
- Kroemer, G., and Levine, B. (2008). Autophagic cell death: the story of a misnomer. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* *9*, 1004-1010.
- Kulms, D., and Schwarz, T. (2000). Molecular mechanisms of UV-induced apoptosis. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* *16*, 195-201.
- Kulms, D., and Schwarz, T. (2002). Molecular mechanisms involved in UV-induced apoptotic cell death. *Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol.* *15*, 342-347.
- Kuroyanagi, M., Yamada, K., Hatsugai, N., Kondo, M., Nishimura, M., and Hara-Nishimura, I. (2005). Vacuolar processing enzyme is essential for mycotoxin-induced cell death in *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* *280*, 32914-32920.
- Lacomme, C., and Santa Cruz, S. (1999). Bax-induced cell death in tobacco is similar to the hypersensitive response. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *96*, 7956-7961.
- Laloi, C., Mestres-Ortega, D., Marco, Y., Meyer, Y., and Reichheld, J.P. (2004). The *Arabidopsis* cytosolic thioredoxin h5 gene induction by oxidative stress and its W-box-mediated response to pathogen elicitor. *Plant Physiol.* *134*, 1006-1016.
- Laloi, C., Rayapuram, N., Chartier, Y., Grienenberger, J.M., Bonnard, G., and Meyer, Y. (2001). Identification and characterization of a mitochondrial thioredoxin system in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *98*, 14144-14149.
- Lam, E., and del Pozo, O. (2000). Caspase-like protease involvement in the control of plant cell death. *Plant Mol. Biol.* *44*, 417-428.

- Lam, E., Kato, N., and Lawton, M. (2001). Programmed cell death, mitochondria and the plant hypersensitive response. *Nature* 411, 848-853.
- Lam, E. (2004). Controlled cell death, plant survival and development. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5, 305-315.
- Lam, M., Dubyak, G., Chen, L., Nunez, G., Miedfeld, R.L., and Distelhorst, W.D. (1994). Evidence that Bcl-2 represses apoptosis by regulating endoplasmic reticulum-associated Ca^{2+} fluxes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91, 6569-6573.
- Lamb, C., and Dixon, R.A. (1997). The oxidative burst in plant disease resistance. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48, 251-275.
- Lecourieux, D., Mazar, C., Pauly, N., Ranjeva, R., Pugin, A. (2002). Analysis and effects of cytosolic free calcium increases in response to elicitors in *Nicotiana plumbaginifolia* cells. *Plant Cell* 14, 2627-2641.
- Lemaire, S.D., Collin, V., Keryer, E., Quesada, A., and Miginiac-Maslow, M. (2003). Characterization of thioredoxin γ , a new type of thioredoxin identified in the genome of *Chlamydomonas reinhardtii*. *FEBS Lett.* 543, 87-92.
- Leon, J., Lawton, M.A., and Raskin, I. (1995). H_2O_2 stimulates salicylic acid biosynthesis in tobacco. *Plant Physiol.* 108, 1673-1678.
- Levine, A., Tenhaken, R., Dixon, R., and Lamb, C. (1994). H_2O_2 from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell* 79, 583-593.
- Levine, B., Sinha, S., and Kroemer, G. (2008). Bcl-2 family members: dual regulators of apoptosis and autophagy. *Autophagy.* 4, 600-606.
- Lew, D.J., Dulic, V., and Reed, S.I. (1991). Isolation of three novel human cyclins by rescue of G1 cyclin (Cln) function in yeast. *Cell* 66, 1197-11206.
- Li, W., and Dickman, M.B. (2004). Abiotic stress induces apoptotic-like features in tobacco that is inhibited by expression of human Bcl-2. *Biotechnol. Lett.* 26, 87-95.
- Liang, X.H., Jackson, S., Seaman, M., Brown, K., Kempkes, B., Hibshoosh, H., and Levine B. (1999). Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1. *Nature* 402, 672-676.
- Ligr, M., Madeo, F., Fröhlich, E., Hilt, W., Fröhlich, K.U., and Wolf, D.H. (1998). Mammalian Bax triggers apoptotic changes in yeast. *FEBS Lett.* 438, 61-65.
- Lim, P.O., Kim, H.J., and Nam, H.G. (2007). Leaf senescence. *Annu. Rev. Plant Biol.* 58, 115-136.

Lin, X., Mattjus, P., Pike, H.M., Windebank, A.J. and Brown, R.E. (2000). Cloning and expression of glycolipid transfer protein from bovine and porcine brain. *J. Biol. Chem.* *275*, 5104-5110.

Lisbona, F., Rojas-Rivera, D., Thielen, P., Zamorano, S., Todd, D., Martinon, F., Glavic, A., Kress, C., Lin, J.H., Walter, P., Reed, J.C., Glimcher, L.H., and Helz, C. (2009). BAX Inhibitor-1 is a negative regulator of the ER stress sensor IRE1 α . *Mol. Cell*, *33*, 679-691.

Liu, Y., and Min, W., (2002). Thioredoxin promotes ASK1 ubiquitination and degradation to inhibit ASK1-mediated apoptosis in a redox activity-independent manner. *Circ. Res.*, *90*, 1259-1266.

Liu, Y., Ren, D., Pike, S., Pallardy, S., Gassmann, W., and Zhang, S. (2007). Chloroplast-generated reactive oxygen species are involved in hypersensitive response-like cell death mediated by a mitogen-activated protein kinase cascade. *Plant J.* *51*, 941-954.

Lockshin, R.A., and Zakeri, Z. (2004). Apoptosis, autophagy, and more. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* *36*, 2405-19.

Lombardi, L., Ceccarelli, N., Picciarelli, P., and Lorenzi, R. (2007). Caspase-like proteases involvement in programmed cell death of *Phaseolus coccineus* suspensor. *Plant Science* *172*, 573-578.

Love, A.J., Milner, J.J., and Sadanandom, A. (2008). Timing is everything: regulatory overlap in plant cell death. *Trends Plant Sci.* *13*, 589-595.

Luo, X., Budihardjo, I., Zou, H., Slaughter, C., and Wang, X. (1998). Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* *94*, 481-490.

Madeo, F., Fröhlich, E., Ligr, M., Grey, M., Sigrist, S.J., Wolf, D.H., and Fröhlich, K.U. (1999). Oxygen stress: a regulator of apoptosis in yeast. *J. Cell Biol.* *145*, 757-767.

Madeo, F., Herker, E., Maldener, C., Wissing, S., Lachelt, S., Herlan, M., Fehr, M., Lauber, K., Sigrist, S.J., Wesselborg, S., and Fröhlich, K.U. (2002). A caspase-related protease regulates apoptosis in yeast. *Mol. Cell* *9*, 911-917.

Maiuri, M.C., Le Toumelin, G., Criollo, A., Rain, J.C., Gautier, F., Juin, P., Tasdemir, E., Pierron, G., Troulinaki, K., Tavernarakis, N., Hickman, J.A., Geneste, O., and Kroemer, G. (2007). Functional and physical interaction between Bcl-X(L) and a BH3-like domain in Beclin-1. *EMBO J.* *26*, 2527-2539.

Makishima, T., Nakashima, T., Nagata-Kuno, K., Fukushima, K., Iida, H., Sakaguchi, M., Ikehara, Y., Komiyama, S., and Nishimoto, T. (1997). The highly conserved DAD1 protein involved in apoptosis is required for N-linked glycosylation. *Genes Cells* *2*, 129-141.

- Mannick, J.B. (2007). Regulation of apoptosis by protein S-nitrosylation. *Amino Acids* 32, 523-526.
- Manon, S., Chaudhuri, B., and Guérin, M. (1997). Release of cytochrome c and decrease of cytochrome c oxidase in Bax-expressing yeast cells, and prevention of these effects by coexpression of Bcl-xL. *FEBS Lett.* 415, 29-32.
- Martin, G.B., Bogdanove, A.J., and Sessa, G. (2003). Understanding the functions of plant disease resistance proteins. *Annu. Rev. Plant. Biol.* 54, 23-61.
- Martin, J.L. (1995). Thioredoxin: a fold for all reasons. *Structure* 3, 245-250.
- Marx, C., Wong, J.H., and Buchanan, B. (2003). Thioredoxin and germinating barley: targets and protein redox changes. *Planta* 216, 454-460.
- Masutani, H., Ueda, S., and Yodoi, J. (2005). The thioredoxin system in retroviral infection and apoptosis. *Cell Death and Differ.* 12, 991-998.
- Mateo, A., Mühlenbock, P., Rusterucci, C., Chang, C.C., Miszalski, Z., Karpinska, B., Parker, J.E., Mullineaux, P.M., and Karpinski, S. (2004). Lesion simulating disease 1 is required for acclimation to conditions that promote excess excitation energy. *Plant Physiol.* 136, 2818-2830.
- Matsui, M., Oshima, M., Oshima, H., Takaku, K., Maruyama, T., Yodoi, J., and Taketo, M.M. (1996). Early embryonic lethality caused by targeted disruption of the mouse thioredoxin gene. *Dev. Biol.* 178, 179-185.
- Matsumura, H., Nirasawa, S., Kiba, A., Urasaki, N., Saitoh, H., Ito, M., Kawai-Yamada, M., Uchimiya, H., and Terauchi, R. (2003). Overexpression of Bax inhibitor suppresses the fungal elicitor-induced cell death in rice (*Oryza sativa* L.) cells. *Plant J.* 33, 425-434.
- Matsuyama, S., and Reed, J.C. (2000). Mitochondria-dependent apoptosis and cellular pH regulation. *Cell Death Differ.* 7, 1155-1165.
- McCabe, P.F., and Leaver, C.J. (2000). Programmed cell death in cell cultures. *Plant Mol. Biol.* 44, 359-368.
- Mestres-Ortega, D., and Meyer, Y. (1999). The *Arabidopsis thaliana* genome encodes at least four thioredoxins m and a new prokaryotic-like thioredoxin. *Gene* 240, 307-316.
- Meyer, Y., Reichheld, J.P., and Vignols, F. (2005). Thioredoxins in *Arabidopsis* and other plants. *Photosynthesis Res.* 86, 419-433.
- Meyer, Y., Siala, W., Bashandy, T., Riondet, C., Vignols, F., and Reichheld, J.P. (2008). Glutaredoxins and thioredoxins in plants. *Biochim. Biophys. Acta.* 1783, 589-600.

- Meyer, Y., Vignols, F., and Reichheld, J.P. (2002). Classification of plant thioredoxins by sequence similarity and intron position. *Methods Enzymol.* *347*, 394-402.
- Michelet, L., Zaffagnini, M., Marchand, C., Collin, V., Decottignies, P., Tsan, P., Lancelin, J.M., Trost, P., Miginiac-Maslow, M., Noctor, G., and Lemaire, S.D. (2005). Glutathionylation of chloroplast thioredoxine f is a redox signaling mechanism in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *102*, 16478-16483.
- Mitchell, D.A., Morton, S.U., Fernhoff, N.B., and Marletta, M.A. (2007). Thioredoxin is required for S-nitrosation of procaspase-3 and the inhibition of apoptosis in Jurkat cells, *Proc. Natl. Acad. Sci.* *104*, 11609-11614.
- Mitsuhara, I., Malik, K.A., Miura, M., and Ohashi, Y. (1999). Animal cell-death suppressors Bcl-XL and Ced-9 inhibit cell death in tobacco plants. *Curr. Biol.* *9*, 775-778.
- Mittler, R. and Lam, E. (1995). *In situ* detection of nDNA fragmentation during the differentiation of tracheary elements in higher plants. *Plant Physiol.* *108*, 489-493.
- Mittler, R., and Lam, E. (1996). Sacrifice in the face of foes: pathogen induced programmed cell death in higher plants. *Trends Microbiol.* *4*, 10-15.
- Mittler, R., Simon, L., and Lam, E. (1997). Pathogen-induced programmed cell death in tobacco. *J. of Cell Sci.* *110*, 1333-1344.
- Mittler, R., and Rizhsky, L. (2000). Transgene-induced lesion mimic. *Plant Mol. Biol.* *44*, 335-344.
- Mittler, R. (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci.* *7*, 405-410.
- Mizushima, N., Ohsumi, Y., and Yoshimori, T. (2002). Autophagosome formation in mammalian cells. *Cell Struct. Funct.* *27*, 421-429.
- Mohamad, N., Gutiérrez, A., Núñez, M., Cocca, C., Martín, G., Cricco, G., Medina, V., Rivera, E., and Bergoc, R. (2005). Mitochondrial apoptotic pathways. *Biocell* *29*, 149-161.
- Montrichard, F., Alkhalfioui, F., Yano, H., Vensel, W.H., Hurkman, W.J., and Buchanan, B.B. (2009). Thioredoxin targets in plants: the first 30 years. *J. Proteomics* *72*, 452-474.
- Morris, K., Mackerness, S.A., Page, T., John, C.F., Murphy, A.M., Carr, J.P., and Buchanan-Wollaston, V. (2000). Salicylic acid has a role in regulating gene expression during senescence. *Plant J.* *23*, 677-685.

- Moskovitz, J., Berlett, B.S., Poston, J.M., and Stadtman, E.R. (1997). The yeast peptide methionine sulfoxide reductase functions as an antioxidant in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *94*, 9585-9589.
- Motohashi, K., Kondoh, A., Stumpp, M.T., and Hisabori, T. (2001). Comprehensive survey of proteins targeted by chloroplast thioredoxin. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *98*, 11224-11229.
- Mühlenbock, P., Plaszczyca, M., Plaszczyca, M., Mellerowicz, E., and Karpinski, S. (2007). Lysigenous aerenchyma formation in *Arabidopsis* is controlled by LESION SIMULATING DISEASE1. *Plant Cell* *19*, 3819-3830.
- Mühlenbock, P., Szechynska-Hebda, M., Plaszczyca, M., Baudo, M., Mateo, A., Mullineaux, P.M., Parker, J.E., Karpinska, B., and Karpinski, S. (2008). Chloroplast signaling and LESION SIMULATING DISEASE1 regulate crosstalk between light acclimation and immunity in *Arabidopsis*. *Plant Cell* *20*, 2339-2356.
- Müller, E.G.D. (1991). Thioredoxin deficiency in yeast prolongs-S phase and shortens the G1 interval of the cell-cycle. *J. Biol. Chem.* *266*, 9194-9202.
- Mur, L.A., Kenton, P., Lloyd, A.J., Ougham, H., and Prats, E. (2008). The hypersensitive response; the centenary is upon us but how much do we know? *J. Exp. Bot.* *59*, 501-520.
- Murashige, T., and Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant* *15*, 473-497.
- Muzio, M., Chinnaiyan, A.M., Kischkel, F.C., O'Rourke, K., Shevchenko, A., Ni, J., Scaffidi, C., Bretz, J.D., Zhang, M., Gentz, R., Mann, M., Krammer, P.H., Peter, M.E., and Dixit, V.M. (1996). FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death-inducing signaling complex. *Cell* *85*, 817-827.
- Nagano, M., Ihara-Ohori, Y., Imai, H., Inada, N., Fujimoto, M., Tsutsumi, N., Uchimiya, H., and Kawai-Yamada, M. (2009). Functional association of cell death suppressor, *Arabidopsis* Bax inhibitor-1, with fatty acid 2-hydroxylation through cytochrome b. *Plant J.* *58*, 122-134.
- Nakashima T, Sekiguchi T, Kuraoka A, Fukushima K, Shibata Y, Komiyama S, and Nishimoto T. (1993). Molecular cloning of a human cDNA encoding a novel protein, DAD1, whose defect causes apoptotic cell death in hamster BHK21 cells. *Mol. Cell Biol.* *13*, 6367-6374.
- Nakaune S, Yamada K, Kondo M, Kato T, Tabata S, Nishimura M, and Hara-Nishimura I. (2005). A vacuolar processing enzyme, deltaVPE, is involved in seed coat formation at the early stage of seed development. *Plant Cell* *17*, 876-887.
- Navarre, D. A., and Wolpert, T. J. (1999). Victorin induction of an apoptotic/senescence-like response in oats. *Plant Cell* *11*, 237-249.

- Navrot, N., Collin, V., Gualberto, J., Gelhaye, E., Hirasawa, M., Rey, P., Knaff, D.B., Issakidis, E., Jacquot, J., and Rouhier, N. (2006). Plant glutathione peroxidases are functional peroxiredoxins distributed in several subcellular compartments and regulated during biotic and abiotic stresses. *Plant Physiol.* *142*, 1364-1379.
- Nawrath, C., Heck, S., Parinthewong, N., and Métraux, J.P. (2002). EDS5, an essential component of salicylic acid-dependent signaling for disease resistance in *Arabidopsis*, is a member of the MATE transporter family. *Plant Cell* *14*, 275-286.
- Ni, Z., Kim, E.D., Ha, M., Lackey, E., Liu, J., Zhang, Y., Sun, Q., and Chen, Z.J. (2009). Altered circadian rhythms regulate growth vigour in hybrids and allopolyploids. *Nature* *457*, 327-331.
- Nonn, L., Williams, R.R., Erickson, R.P., and Powis, G. (2003). The absence of mitochondrial thioredoxin 2 causes massive apoptosis, exencephaly, and early embryonic lethality in homozygous mice. *Mol. Cell. Biol.* *23*, 916-922.
- Nooden, L.D., Guamet, J.J., and John, I. (1997). Senescence mechanisms. *Physiol. Plant* *101*, 746-753.
- Nürnbergger, T. (1999). Signal perception in plant pathogen defense. *Cell. Mol. Life Sci.* *55*, 167-182.
- Oberstein, A., Jeffrey, P.D., and Shi Y. (2007). Crystal structure of the Bcl-XL-Beclin 1 peptide complex: Beclin 1 is a novel BH3-only protein. *J. Biol. Chem.* *282*, 13123-13132.
- Okada, H., and Mak, T.W. (2004). Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumour cells. *Nat. Rev. Cancer* *4*, 592-603.
- Oltvai, Z.N., Milliman, C.L., and Korsmeyer, S.J. (1993). Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* *74*, 609-619.
- Ori, N., Juarez, M.T., Jackson, D., Yamaguchi, J., Banowetz, G.M., and Hake, S. (1999). Leaf senescence is delayed in tobacco plants expressing the maize homeobox gene *knotted1* under the control of a senescence-activated promoter. *Plant Cell* *11*, 1073-1080.
- Orrenius, S., Zhivotovsky, B., and Nicotera, P. (2003). Regulation of cell death: the calcium apoptosis link. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *4*, 552-565.
- Orzaez, D., and Granell, A. (1997a). DNA fragmentation is regulated by ethylene during carpel senescence in *Pisum sativum*. *Plant J.* *11*, 137-144.
- Orzaez, D., and Granell, A. (1997b). The plant homologue of the defender against apoptotic death gene is down-regulated during senescence of flower petals. *FEBS Lett.* *40*, 275-278

- Otegui, M.S., Noh, Y.S., Martinez, D.E., Vila Petroff, M.G., Stachelin, L.A., Amasino, R.M., and Guamet, J.J. (2005). Senescence associated vacuoles with intense proteolytic activity develop in leaves of *Arabidopsis* and soybean. *Plant J.* *41*, 831-844.
- Patil, C., and Walter, P. (2001). Intracellular signaling from the endoplasmic reticulum to the nucleus: the unfolded protein response in yeast and mammals. *Curr. Opin. Cell Biol.* *13*, 349-355.
- Pennell, R.I., and Lamb, C. (1997). Programmed cell death in plants. *Plant Cell* *9*, 1157-1168.
- Perez-Ruiz, J.M., Spinola, M.C., Kirchsteiger, K., Moreno, J., Sahrawi, M., and Cejudo, F.J. (2006). Rice NTRC is a high-efficiency redox system for chloroplast protection against oxidative damage. *Plant Cell* *18*, 2356-2368.
- Petersen, N.H., Joensen, J., McKinney, L.V., Brodersen, P., Petersen, M., Hofius, D., and Mundy, J. (2009). Identification of proteins interacting with *Arabidopsis* ACD11. *J. Plant Physiol.* *166*, 661-666.
- Petersen, N.H., McKinney, L.V., Pike, H., Hofius, D., Zakaria, A., Brodersen, P., Petersen, M., and Brown, R.E. (2008). Human GLTP and mutant forms of ACD11 suppress cell death in the *Arabidopsis* *acd11* mutant. *FEBS J.* *275*, 4378-4388.
- Pinton, P., Ferrari, D., Rapizzi, E., Virgilio, F.D., Pozzan, T., and Rizzuto, R. (2001). The Ca^{2+} concentration of the endoplasmic reticulum is a key determinant of ceramide-induced apoptosis: significance for the molecular mechanism of Bcl-2 action. *EMBO J.* *20*, 2690-2701.
- Proskuryakov, S.Y., Gabai, V.L., and Konoplyannikov, A.G. (2002). Necrosis is an active and controlled form of programmed cell death. *Biochemistry* *67*, 387-408.
- Pyo, J.O., Jang, M.H., Kwon, Y.K., Lee, H.J., Jun, J.I., Woo, H.N., Cho, D.H., Choi, B., Lee, H., Kim, J.H., Mizushima, N., Oshumi, Y., and Jung, Y.K. (2005). Essential roles of Atg5 and FADD in autophagic cell death: dissection of autophagic cell death into vacuole formation and cell death. *J. Biol. Chem.* *280*, 20722-20729.
- Qiao, J., Mitsuhashi, I., Yazaki, Y., Sakano, K., Gotoh, Y., Miura, M., and Ohashi, Y. (2002). Enhanced resistance to salt, cold and wound stresses by overproduction of animal cell death suppressors Bcl-xL and Ced-9 in tobacco cells-their possible contribution through improved function of organelle. *Plant Cell Physiol.* *43*, 992-1005.
- Quirino, B.F., Noh, Y.-S., Hmelblau, E., & Amasino, T.M. (2000). Molecular aspects of leaf senescence. *Trends Plant Sci.* *5*, 278-282.

- Radhamony, R.N., Prasad, A.M., and Srinivasan, R. (2005). T-DNA insertional mutagenesis in *Arabidopsis*: a tool for functional genomics. *Elect. J. of Biotech.* 8.
- Reape, T.J., and McCabe, P.F. (2008). Apoptotic-like programmed cell death in plants. *New Phytol.* 180, 13-26.
- Reape, T.J., Molony, E.M., and McCabe, P.F. (2008). Programmed cell death in plants: distinguishing between different modes. *J. Exp. Bot.* 59, 435-444.
- Reed, J.C., Tsujimoto, Y., Alpers, J.D., Croce, C.M., and Nowell, P.C. (1987). Regulation of bcl-2 proto-oncogene expression during normal human lymphocyte proliferation. *Science* 236, 1295-1299.
- Reichheld, J.P., Meyer, E., Khafif, M., Bonnard, G., and Meyer, Y. (2005). AtNTRB is the major mitochondrial thioredoxin reductase in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett.* 579, 337-342.
- Rhee, S.G., Chae, H.Z., and Kim, K., (2005). Peroxiredoxins: A historical overview and speculative preview of novel mechanisms and emerging concepts in cell signaling, *Free Radic. Biol. Med.*, 38, 1543-1552..
- Richie, D.L., Miley, M.D., Bhabhra, R., Robson, G.D., Rhodes, J.C., and Askew, D.S. (2007). The *Aspergillus fumigatus* metacaspases CasA and CasB facilitate growth under conditions of endoplasmic reticulum stress. *Mol. Microbiol.* 63, 591-604.
- Ridout, C.J., Skamnioti, P., Porritt, O., Sacristan, S., Jones, J.D., and Brown, J.K. (2006). Multiple avirulence paralogues in cereal powdery mildew fungi may contribute to parasite fitness and defeat of plant resistance. *Plant Cell* 18, 2402-2414.
- Rivas, S., Rougon-Cardoso, A., Smoker, M., Schausser, L., Yoshioka, H., and Jones, J.D. (2004). CITRX thioredoxin interacts with the tomato Cf-9 resistance protein and negatively regulates defence. *EMBO J.* 23, 2156-2165.
- Rizzuto, R., Pinton, P., Carrington, W., Fay, F.S., Fogarty, K.E., Lifshitz, L.M., Tuft, R.A., and Pozzan, T. (1998). Close contacts with the endoplasmic reticulum as determinants of mitochondrial Ca²⁺ responses. *Science* 280, 1763-1766.
- Romero, H.M., Berlett, B.S., Jensen, P.J., Pell, E.J., and Tien, M. (2004). Investigations into the role of the plastidial peptide methionine sulfoxide reductase in response to oxidative stress in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 136, 3784-3794.
- Rose, T.L., Bonneau, L., Der, C., Marty-Mazars, D., and Marty, F. (2006). Starvation-induced expression of autophagy-related genes in *Arabidopsis*. *Biology of the Cell* 98, 53-67.

- Ruelland, E., and Miginiac-Maslow, M. (1999). Regulation of chloroplast enzyme activities by thioredoxins: activation or relief from inhibition? *Trends Plant Sci.* 4, 136-141.
- Rupinder, S.K., Gurpreet, A.K., and Manjeet, S. (2007). Cell suicide and caspases. *Vascul. Pharmacol.* 46, 383-393.
- Rustérucchi, C., Aviv, D.H., Holt, B.F. 3rd, Dangl, J.L., and Parker, J.E. (2001). The disease resistance signaling components EDS1 and PAD4 are essential regulators of the cell death pathway controlled by LSD1 in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 13, 2211-2224.
- Saelens, X., Festjens, N., Walle, L.V., van Gorp, M., van Loo, G., and Vandenabeele, P. (2004). Toxic proteins released from mitochondria in cell death. *Oncogene* 23, 2861-2874.
- Saitoh, M., Nishitoh, H., Fujii, M., Takeda, K., Tobiume, K., Sawada, Y., Kawabata, M., Miyazono, K., and Ichijo H. (1998). Mammalian thioredoxin is a direct inhibitor of apoptosis signal regulating kinase (ASK) 1. *EMBO J.* 17, 2596-2606.
- Samejima, K., Tone, S., and Earnshaw W.C. (2001). CAD/DFF40 nuclease is dispensable for high molecular weight DNA cleavage and stage I chromatin condensation in apoptosis. *J. Biol. Chem.* 276, 45427-45432.
- Sanchez, P., de Torres Zabala, M., and Grant, M. (2000). AtBI-1, a plant homologue of Bax inhibitor-1, suppresses Bax-induced cell death in yeast and is rapidly upregulated during wounding and pathogen challenge. *Plant J.* 21, 393-399.
- Sanmartin, M., Jaroszewski, L., Raikhel, N.V., and Rojo, E. (2005). Caspases. Regulating death since the origin of life. *Plant Physiol.* 137, 841-847.
- Savill, J., and Fadok, V. (2000). Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature* 407, 784-788.
- Schmitt, E., Cimoli, G., Steyaert, A., and Bertrand, R. (1998). Bcl-xL modulates apoptosis induced by anticancer drugs and delays DEVDase and DNA fragmentation-promoting activities. *Exp. Cell. Res.* 240, 107-121.
- Schürmann, P. and Buchanan, B.B. (2008). The ferredoxin/thioredoxin system of oxygenic photosynthesis. *Antioxid. Redox Signal* 10, 1235-1274.
- Schürmann, P., and Jacquot, J.P. (2000). Plant thioredoxin systems revisited. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 51, 371-400.
- Schwartz, L.M., Smith, S.W., Jones, M.E., and Osborne, B.A. (1993). Do all programmed cell deaths occur via apoptosis? *Proc. Natl Acad. Sci.* 90, 980-984.

- Scorrano, L., Oakes, S.A., Opferman, J.T., Cheng, E.H., Sorcinelli, M.D., Pozzan, T., and Korsmeyer, S.J. (2003). BAX and BAK regulation of endoplasmic reticulum Ca^{2+} : a control point for apoptosis. *Science* 300, 135-139.
- Sedlak, T.W., Oltvai, Z.N., Yang, E., Wang, K., Boise, L.H., Thompson, C.B., and Korsmeyer, S.J. (1995). Multiple Bcl-2 family members demonstrate selective dimerizations with Bax. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92, 7834-7838.
- Senda, K., and Ogawa, K. (2004). Induction of PR-1 accumulation accompanied by runaway cell death in the *lsl1* mutant of *Arabidopsis* is dependent on glutathione levels but independent of the redox state of glutathione. *Plant Cell Physiol.* 45, 1578-1585.
- Serrato, A.J., Perez-Ruiz, J.M., Spinola, M.C., and Cejudo, F.J. (2004). A novel NADPH thioredoxin reductase, localized in the chloroplast, which deficiency causes hypersensitivity to abiotic stress in *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* 279, 43821-43827.
- Shi, Y. (2002). Apoptosome: the cellular engine for the activation of caspase-9. *Structure* 10, 285-288.
- Shimizu, S., Kanaseki, T., Mizushima, N., Mizuta, K., Arakawa-Kobayashi, S., Thompson, C.B., and Tsujimoto, Y. (2004). A role of Bcl-2 family of proteins in nonapoptotic programmed cell death dependent on autophagy genes. *Nat. Cell Biol.* 6, 1221-1228.
- Shintani, T., and Klionsky, D.J. (2004). Autophagy in health and disease: a double-edged sword. *Science* 306, 990-995.
- Shiozaki, E.N., Chai, J., and Shi, Y. (2002). Oligomerization and activation of caspase-9, induced by Apaf-1 CARD. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99, 4197-4202.
- Shishodia, S., and Aggarwal, B.B., (2002). Nuclear factor-kappaB activation: A question of life or death. *J. Biochem. Mol. Biol.* 35, 28-40.
- Simeonova, E., Sikira, S., Charzynska, M., and Mostowska, A. (2000). Aspects of programmed cell death during leaf senescence of mono- and dicotyledonous plants. *Protoplasma* 214, 93-101.
- Simon, H.U., Haj-Yehia, A., and Levi-Schaffer, F. (2000). Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction. *Apoptosis* 5, 415-418.
- Simonen, M., Keller, H., and Heim, J. (1997). The BH3 domain of Bax is sufficient for interaction of Bax with itself and with other family members and it is required for induction of apoptosis. *Eur. J. Biochem.* 249, 85-91.
- Somosy, Z. (2000). Radiation response of cell organelles. *Micron* 31, 165-181.

Soylu, S. (2006). Accumulation of cell-wall bound phenolic compounds and phytoalexin in *Arabidopsis thaliana* leaves following inoculation with pathovars of *Pseudomonas syringae*. *Plant Sci.* 170, 942-952.

Srinivasula, S.M., Hegde, R., Saleh, A., Datta, P., Shiozaki, E., Chai, J., Lee, R.A., Robbins, P.D., Fernandes-Alnemri, T., Shi, Y., and Alnemri, E.S. (2001). A conserved XIAP-interaction motif in caspase-9 and Smac/DIABLO regulates caspase activity and apoptosis. *Nature* 410, 112-116.

Stadtman, E. R., Moskovitz, J., Berlett, B. S., and Levine, R. L., (2002). Cyclic oxidation and reduction of protein methionine residues is an important antioxidant mechanism. *Mol. Cell. Biochem.* 234–235, 3–9.

Stein, J.C., and Hansen, G. (1999). Mannose induces an endonuclease responsible for DNA laddering in plant cells. *Plant physiol.* 121, 71-79.

Stone, J.M., Heard, J.E., Asai, T. and Ausubel, F.M. (2000). Simulation of fungal-mediated cell death by fumonisin B1 and selection of fumonisin B1-resistant (fbr) *Arabidopsis* mutants. *Plant Cell* 12, 1811-1822.

Suarez, M.F., Filonova, L.H., Smertenko, A., Savenkov, E.I., Clapham, D.H., von Arnold, S., Zhivotovsky, B., and Bozhkov, P.V. (2004). Metacaspase-dependent programmed cell death is essential for plant embryogenesis. *Curr. Biol.* 14, 339-340.

Sun, Y.L., Zhao, Y., Hong, X., and Zhai, Z.H. (1999). Cytochrome c release and caspase activation during menadione-induced apoptosis in plants. *FEBS Lett.* 462, 317-321.

Sweat, T.A., and Wolpert, T.J. (2007). Thioredoxin h5 is required for victorin sensitivity mediated by a CC-NBS-LRR gene in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 19, 673-687.

Swidzinski, J.A., Sweetlove, L.J., and Leaver, C.J. (2002). A custom microarray analysis of gene expression during programmed cell death in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 30, 431-446.

Szabados, L., Kovacs, I., Oberschall, A., Abraham, E., Kerekes, I., Zsingingmond, L., Nagy, R., Alvarado, M., Krasovskaja, I., Gal, M., Berente, A., Rédei, G.P., Ben Haim, A., and Koncz, C. (2002). Distribution of 1000 sequenced T-DNA tags in the *Arabidopsis* genome. *Plant J.* 32, 233-242.

Tada, Y., Hata, S., Takata, Y., Nakayashiki, H., Tosa, Y., and Mayama, S. (2001). Induction and signaling of an apoptotic response typified by DNA laddering in the defense response of oats to infection and elicitors. *Mol. Plant Microbe Interact.* 14, 477-486.

Tada, Y., Kusaka, K., Betsuyaku, S., Shinogi, T., Sakamoto, M., Ohura, Y., Hata, S., Mori, T., Tosa, Y. and Mayama, S. (2005). Victorin triggers programmed cell death and the

defense response via interaction with a cell surface mediator. *Plant Cell Physiol.* 46, 1787-1798.

Tada, Y., Spoel, S.H., Pajerowska-Mukhtar, K., Mou, Z., Song, J., Wang, C., Zuo, J., and Dong, X. (2008). Plant immunity requires conformational changes of NPR1 via S-nitrosylation and thioredoxins. *Science* 321, 952-956.

Tagaya, Y., Maeda, Y., Mitsui, A., Kondo, N., Matsui, H., Hamuro, J., Brown, N., Arai, K., Yokota, T., Wakasugi, H. and Yodoi, J. (1989). ATL-derived factor (ADF), an IL-2 receptor/Tac inducer homologous to thioredoxin; possible involvement of dithiol-reduction in the IL-2 receptor induction. *EMBO J.* 8, 757-764.

Takayama, S., Sato, T., Krajewski, S., Kochel, K., Irie, S., Millan, J.A. and Reed, J.C. (1995), Cloning and functional analysis of BAG-1: a novel Bcl-2-binding protein with anti-cell death activity. *Cell* 80, 279-284.

Tanaka, T., Hosoi, F., Yamaguchi-Iwai, Y., Nakamura, H., Masutani, H., Ueda, S., Nishiyama, A., Takeda, S., Wada, H., Spyrou, G., and Yodoi, J. (2002). Thioredoxin-2 (TRX-2) is an essential gene regulating mitochondria-dependent apoptosis. *EMBO J.* 21, 1695-1703.

Tanaka, Y., Makishima, T., Sasabe, M., Ichinose, Y., Shiraishi, T., Nishimoto, T., and Yamada, T. (1997). *DAD-1*, a putative programmed cell death suppressor gene in rice. *Plant Cell Physiol.* 38, 379-383.

Tao, W., Kurschner, C., and Morgan, J.I. (1997). Modulation of cell death in yeast by the Bcl-2 family of proteins. *J. Biol. Chem.* 272, 15547-15552.

Taylor, C.B., Bariola, P.A., del Cardayre, S.B., Raines, R.T., and Green, P.J. (1993). RNS2: a senescence associated RNase of *Arabidopsis* that diverged from the S-RNase before speciation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90, 5118-22

Thomas, S.G., and Franklin-Tong, V.E. (2004). Self-incompatibility triggers programmed cell death in *Papaver* pollen. *Nature* 429, 305-309.

Thompson, C.B. (1995). Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 267, 1456-1462.

Thompson, J., Taylor, C., and Wang, T.W. (2000). Altered membrane lipase expression delays leaf senescence. *Biochem. Soc. Trans.* 28, 775-777.

Thompson, J.E., Froese, C.D., Madey, E., Smith, M.D., and Hong, Y. (1998). Lipid metabolism during plant senescence. *Prog. Lipid Res.* 37, 119-141.

Tian, R., Zhang, G., Yan, C., and Dai, Y. (2000). Involvement of poly(ADP-ribose) polymerase and activation of caspase-3- like protease in heat shock-induced apoptosis in tobacco suspension cells. *FEBS Lett.* 474, 11-15.

Tonissen, K.F., and Di Trapani, G. (2009). Thioredoxin system inhibitors as mediators of apoptosis for cancer therapy. *Mol. Nutr. Food Res.* 53, 87-103.

Traverso, J.A., Vignols, F., Cazalis, R., Serrato, A.J., Pulido, P., Sahrawy, M., Meyer, Y., Cejudo, F.J., and Chueca, A. (2008). Immunocytochemical localization of *Pisum sativum* TRXs f and m in non-photosynthetic tissues. *J. Exp. Bot.* 59, 1267-1277.

Tsujimoto, Y., Cossman, J., Jaffe, E., and Croce, C.M. (1985). Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma. *Science* 228, 1440-1443.

Tsujimoto, Y., and Shimizu, S. (2000). Bcl-2 family: life-or-death switch. *FEBS Lett.* 466, 6-10.

Tsujimoto, Y., and Shimizu, S. (2005). Another way to die: autophagic programmed cell death. *Cell Death Differ.* 2, 1528-1534.

Turner, S., Gallois, P., and Brown, D. (2007). Tracheary element differentiation. *Annu. Rev. Plant Biol.* 58, 407-433.

Ueda, S., Masutani, H., Nakamura, H., Tanaka, T., Ueno, M., and Yodoi, J. (2002). Redox control of cell death. *Antioxid. Redox Signal* 4, 405-414.

Ueno, M., Masutani, H., Arai, R. J., Yamauchi, A., Hirota, K., Sakai, T., Inamoto, T., Yamaoka, Y., Yodoi, J., and Nikaïdo, T. (1999). Thioredoxin- dependent redox regulation of p53-mediated p21 activation. *J. Biol. Chem.* 274, 35809-35815.

Uren, A.G., O'Rourke, K., Aravind, L.A., Pisabarro, M.T., Seshagiri, S., Koonin, E.V., and Dixit, V.M. (2000). Identification of paracaspases and metacaspases: two ancient families of caspase-like proteins, one of which plays a key role in MALT lymphoma. *Mol. Cell* 6, 961-967.

Vacca, R.A., Valenti, D., Bobba, A., Merafina, R.S., Passarella, S., and Marra, E. (2006). Cytochrome c is released in a reactive oxygen species-dependent manner and is degraded via caspase-like proteases in tobacco Bright-Yellow 2 cells en route to heat shock-induced cell death. *Plant Physiol.* 141, 208-219.

Van Baarlen, P., Woltering, E.J., Staats, M., and Van Kan, J.A.L. (2007). Histochemical and genetic analysis of host and non-host interactions of *Arabidopsis* with three *Botrytis* species: an important role for cell death control. *Mol. Plant Pathol.* 8, 41-54.

- Van Breusegem, F., and Dat, J.F. (2006). Reactive oxygen species in plant cell death. *Plant Physiol.* *141*, 384-390.
- Van der Graaff, E., Schwacke, R., Schneider, A., Desimone, M., Flugge, U.I., and Kunze, R. (2006). Transcription analysis of *Arabidopsis* membrane transporters and hormone pathways during developmental and induced leaf senescence. *Plant Physiol.* *141*, 776-92.
- Van Doorn, W.G., and Woltering, E.J. (2004). Senescence and programmed cell death: substance or semantics? *J. Exp. Bot.* *55*, 2147-2153.
- Van Loon, L.C., and Van Strien, E.A., (1999). The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* *55*, 85-97.
- Van Loon, L.C., Rep, M., and Pieterse, C.M.J. (2006). Significance of inducible defense related proteins in infected plants. *Annu. Rev. Phytopathol.* *44*, 135-162.
- Vercammen, D., van de Cotte, B., De Jaeger, G., Eeckhout, D., Casteels, P., Vandepoele, K., Vandenberghe, I., Van Beeumen, J., Inze, D., and Van Breusegem, F. (2004). Type II metacaspases Atmc4 and Atmc9 of *Arabidopsis thaliana* cleave substrates after arginine and lysine. *J. Biol. Chem.* *279*, 45329-45336.
- Vercammen, D., Belenghi, B., van de Cotte, B., Beunens, T., Gavigan, J.A., De Rycke, R., Brackenier, A., Inze, D., Harris, J.L., and Van Breusegem, F. (2006). Serpin1 of *Arabidopsis thaliana* is a suicide inhibitor for metacaspase 9. *J. Mol. Biol.* *364*, 625-636.
- Walker, P.R., and Sikorska, (1997). M. New aspects of the mechanism of DNA fragmentation in apoptosis. *Biochem. Cell Biol.* *75*, 287-299.
- Wang, K., Yin, X.M., Chao, D.T., Milliman, C.L., and Korsmeyer, S.J. (1996a). BID: a novel BH3 domain-only death agonist. *Genes Dev.* *10*, 2859-2869.
- Wang, H., Li, J., Bostock, R.M., and Gilchrist, D.G. (1996b). Apoptosis: a functional paradigm for programmed plant cell death induced by a host-selective phytotoxin and invoked during development. *Plant Cell* *8*, 375-391.
- Watanabe, N., and Lam, E. (2004). Recent advance in the study of caspase-like proteases and Bax inhibitor-1 in plants: their possible roles as regulator of programmed cell death. *Mol. Plant Path.* *5*, 65-70.
- Watanabe, N., and Lam, E. (2005). Two *Arabidopsis* metacaspases AtMCP1b and AtMCP2b are arginine/lysine-specific cysteine proteases and activate apoptosis-like cell death in yeast. *J. Biol. Chem.* *280*, 14691-14699.

- Watanabe, N., and Lam, E. (2006). *Arabidopsis* Bax inhibitor-1 functions as an attenuator of biotic and abiotic types of cell death. *Plant J.* 45, 884-894.
- Watanabe, N., and Lam, E. (2008). BAX inhibitor-1 modulates endoplasmic reticulum stress-mediated programmed cell death in *Arabidopsis*. *J. Biol. Chem.* 283, 3200-3210.
- Watanabe, N., and Lam, E., (2009). Bax Inhibitor-1, a conserved cell death suppressor, is a key molecular switch downstream from a variety of biotic and abiotic stress signals in plants. *Int. J. Mol. Sci.* 10, 3149-3167.
- Wendehenne, D., Lamotte, O., Frachisse, J.M., Barbier-Brygoo, H., and Pugin, A. (2002). Nitrate efflux is an essential component of the cryptogein signaling pathway leading to defense responses and hypersensitive cell death in tobacco. *Plant Cell* 14, 1937-1951.
- Wendehenne, D., Durner, J., and Klessig, D.F. (2004). Nitric oxide: a new player in plant signalling and defence responses. *Curr. Opin. Plant Biol.* 7, 449-455.
- Westphalen, B.C., Wessig, J., Leyboldt, F., Arnold, S., and Methner, A. (2005). BI-1 protects cells from oxygen glucose deprivation by reducing the calcium content of the endoplasmic reticulum. *Cell Death Differ.* 12, 304-306.
- White E. (1996). Life, death, and the pursuit of apoptosis. *Genes Dev.* 10, 1-15.
- Wildermuth MC, Dewdney J, Wu G, and Ausubel FM. (2002). Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence. *Nature* 414, 562-565.
- Williams, B., and Dickman, M. (2008). Plant programmed cell death: can't live with it; can't live without it. *Mol. Plant Pathol.* 9, 531-544.
- Woltering, E.J., van der Bent, A., and Hoeberichts, F.A. (2002). Do plant caspases exist? *Plant Physiol.* 130, 1764-1769.
- Wong, J.H., Kim, Y.B., Ren, P.H., Cai, N., Cho, M.J., Hedden, P., Lemaux, P.G., and Buchanan B.B. (2002). Transgenic barley grain overexpressing thioredoxin shows evidence that the starchy endosperm communicates with the embryo and the aleurone. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99, 16325-16330.
- Wyllie, A.H. (1980). Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* 284, 555-556.
- Wyllie, A.H., Kerr, J.F.R., and Currie, A.R. (1980). Cell death: the significance of apoptosis. *Int. Rev. Cytol.* 68, 251-305.
- Wyllie, A.H., Morris, R.G., Smith, A.L., and Dunlop, D. (1984). Chromatin cleavage in apoptosis: association with condensed chromatin morphology and dependence on macromolecular synthesis. *J. Pathol.* 142, 67-77.

- Xu, Q., and Reed, J.C. (1998). Bax inhibitor-1, a mammalian apoptosis suppressor identified by functional screening in yeast. *Mol. Cell* 1, 337-346.
- Xu, Y., and Hanson, M.R. (2000). Programmed cell death during pollination-induced petal senescence in petunia. *Plant Physiol.* 122, 1323-1333.
- Xu, P., Rogers, S.J., Roossinck, M.J. (2004). Expression of antiapoptotic genes bcl-xL and ced-9 in tomato enhances tolerance to viral-induced necrosis and abiotic stress. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101, 15805-15810.
- Xu, C., Xu, W., Palmer, A.E., and Reed, J.C. (2008). BI-1 regulates endoplasmic reticulum Ca^{2+} homeostasis downstream of Bcl-2 family proteins. *J. Biol. Chem.* 283, 11477-11484.
- Yamada, T., Takatsu, Y., Kasumi, M., Marubashi, W., and Ichimura, K. (2004). A homolog of the defender against apoptotic death gene (*DADI*) in senescing gladiolus petals is down-regulated prior to the onset of programmed cell death. *J. Plant Physiol.* 161, 1281-1283.
- Yan, N. and Shi, Y. (2005). Mechanisms of apoptosis through structural biology. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 21, 35-36.
- Yang, E., Zha, J., Jockel, J., Boise, L.H., Thompson, C.B., and Korsmeyer, S.J. (1995). Bad, a heterodimeric partner for Bcl-XL and Bcl-2, displaces Bax and promotes cell death. *Cell* 80, 285-291.
- Yang, E., and Korsmeyer, S.J. (1996). Molecular thanatopsis: a discourse on the BCL2 family and cell death. *Blood* 88, 386-401.
- Yang, T., and Poovaiah, B.W. (2002). Hydrogen peroxide homeostasis: activation of plant catalase by calcium/calmodulin. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99, 4097-4102.
- Yao, N., Eisfelder, B.J., Marvin, J., and Greenberg, J.T. (2004). The mitochondrion – an organelle commonly involved in programmed cell death in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 40, 596-610.
- Yao, N., Tada, Y., Park, P., Nakayashiki, H., Tosa, Y., and Mayama, S. (2001). Novel evidence for apoptotic cell response and differential signals in chromatin condensation and DNA cleavage in victorin treated oats. *Plant J.* 28, 13-26.
- Yen, C.H., and Yang, C.H. (1998). Evidence for programmed cell death during leaf senescence in plants. *Plant Cell Physiol.* 39, 922-927.
- Yin, X.M., Oltvai, Z.N., Veis-Novack, D.J., Linette, G.P., and Korsmeyer, S.J. (1994). Bcl-2 gene family and the regulation of programmed cell death. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 59, 387-393.

Yu, X.H., Perdue, T.D., Heimer, Y.M., and Jones, A.M. (2002). Mitochondrial involvement in tracheary element programmed cell death. *Cell Death Differ.* *9*, 189-198.

Zapata, J.M., Guéra, A., Esteban-Carrasco, A., Martín, M., and Sabater, B. (2005) Chloroplasts regulate leaf senescence: delayed senescence in transgenic *ndhF*-defective tobacco. *Cell Death Differ.* *12*, 1277-1284.

Zeier, J., Pink, B., Mueller, M.J. and Berger, S. (2004). Light conditions influence specific defence responses in incompatible plant-pathogen interactions: uncoupling systemic resistance from salicylic acid and PR-1 accumulation. *Planta* *219*, 673-683.

Zha, H., Fisk, H.A., Yaffe, M.P., Mahajan, N., Herman, B., and Reed, J.C. (1996). Structure-function comparisons of the proapoptotic protein Bax in yeast and mammalian cells. *Mol. Cell Biol.* *16*, 6494-6508.

Zhang, R., Al-Lamki, R., Bai, L., Streb, J.W., Miano, J.M., Bradley, J., and Min, W. (2004). Thioredoxin-2 inhibits mitochondria-located ASK1-mediated apoptosis in a JNK-independent manner. *Circ. Res.* *94*, 1483-1491.