



ÉTUDE DU RÔLE DES THIORÉDOXINES F DANS LA MORT CELLULAIRE PROGRAMMÉE ET EN  
RÉPONSE À DIVERS STRESS ABIOTIQUES CHEZ LA PLANTE MODÈLE *ARABIDOPSIS THALIANA*

par

Solange Villette

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, Mai 2015

Le 30 avril 2015

*le jury a accepté la thèse de Madame Solange Villette  
dans sa version finale.*

Membres du jury

Professeure Nathalie Beaudoin

Directrice de recherche

Département de Biologie

Professeur Jean-Benoit Charron

Évaluateur externe

McGill University, Department of Plant Science

Professeur Richard Blouin

Évaluateur interne

Département de Biologie

Professeur Peter Moffett

Président-rapporteur

Département de Biologie

## SOMMAIRE

La mort cellulaire programmée, ou MCP, est un processus dynamique où les cellules ont la capacité de déclencher et de contrôler leur propre mort. Elle est essentielle et présente chez tous les organismes multicellulaires. Chez les plantes, la MCP permet le développement optimal (ex : formation du xylème, morphologie des feuilles, etc.) de la plante tout en protégeant contre divers stress biotiques et abiotiques (ex : la sécheresse, la chaleur, les UV, etc.). Malgré les avancées de ces dernières années, peu de gènes impliqués dans la mise en place de la MCP induite par les UV-C ont été identifiés chez les plantes. L'objectif était donc de caractériser ces gènes chez *Arabidopsis thaliana*.

L'un des candidats est le gène *BI-1*, pour *Bax Inhibitor-1*. Il code pour un facteur anti-apoptotique de la MCP animale également retrouvé chez *Arabidopsis thaliana*. BI-1 régule aussi le taux de calcium du réticulum endoplasmique, ainsi que la formation des espèces réactives de l'oxygène (ROS), permettant l'activation de la réponse de la cellule au stress. L'expression de ce gène suite à une exposition aux UV-C est augmentée, faisant de lui un candidat pour la réponse aux UV-C. Une fusion du promoteur du gène *AtBI-1* au gène rapporteur de la luciférase (*pAtBI-1::luciférase*) a été insérée dans le génome d'*Arabidopsis*. Une plante homozygote pour l'insertion de l'ADN-T, 5PL20E, a été isolée. Cette lignée parentale a été ensuite mutagénisée, et un crible effectué sur la descendance exposée aux UV-C a permis d'identifier un mutant, 2017, dont l'expression de la luciférase était modifiée. Le premier objectif de ce projet était de caractériser ce mutant et de déterminer le lien potentiel avec la régulation de *BI-1*.

Dans une deuxième partie, nous nous sommes intéressés aux rôles des thiorédoxines (TRX) dans la MCP végétale. Ces protéines sont présentes chez tous les organismes vivants. Elles régulent les activités de beaucoup d'enzymes en réduisant leurs ponts disulfures. Peu représentées chez l'homme (deux gènes), elles ont néanmoins un rôle de protection dans la voie de signalisation de l'apoptose. Par contre, chez *Arabidopsis*, une vingtaine de gènes codant pour les thiorédoxines sont connus. Suite à un autre crible aux UV-C d'une banque de mutants d'insertion, un nouveau mutant pour lequel l'insertion de l'ADN-T était dans le

promoteur du gène codant pour la thiorédoxine f1 (*AtTRX f1*) a été identifié. Chez *Arabidopsis*, deux gènes codent pour les TRX f. Ces protéines ont d'abord été étudiées en tant que régulateur d'enzymes du cycle de Calvin. Plus récemment, d'autres fonctions ont été attribuées, surtout à la TRX f1. Nous avons obtenu de simples mutants pour les deux gènes et produit par croisement des doubles mutants, pour étudier l'implication des TRX f dans la MCP végétale induite par les UV-C (ultraviolets de type C), le MV (methyl viologen) et l'ABA (acide abscissique). En parallèle, des surexprimeurs de la TRX f1 ont été analysés pour ces mêmes stress abiotiques. L'objectif était de déterminer s'il y a une redondance de fonction entre les deux gènes, puisque ces deux protéines, de la même sous-famille, sont localisées au niveau des chloroplastes. Suite à une induction de la MCP par l'un des stress abiotiques, les réponses observées chez les simples mutants sont similaires à celles des plantes sauvages. Par contre, les doubles mutants paraissent plus résistants aux divers stress, alors que les surexprimeurs semblent nettement plus sensibles que les plantes sauvages. Enfin, un dernier axe a été développé sur le rôle des TRX f dans le contrôle des voies de synthèse et de dégradation de l'amidon pour l'ensemble des plantes de notre essai. Il s'avère que les surexprimeurs produisent une plus grande quantité d'amidon que les plantes sauvages. À l'opposé, les simples mutants ont moins d'amidon au niveau des différents tissus étudiés que les plantes sauvages, et les doubles mutants n'en présentent quasiment pas. La présence d'une quantité plus importante d'amidon chez les surexprimeurs de TRX f influence la sensibilité de ces plantes aux stress abiotiques. À l'inverse, les doubles mutants sont plus résistants à ces mêmes stress, où cette quantité d'amidon est fortement diminuée pour ces plantes.

Mots clés : *Arabidopsis*, MCP, Bax Inhibitor-1, TRX f, UV-C, Amidon, MV, ABA.

## REMERCIEMENTS

Je tiens d'abord à remercier ma directrice de thèse, la Dre Nathalie Beaudoin pour m'avoir accueillie et permis de travailler sur ce sujet passionnant. Merci pour ton encadrement et d'avoir partager tes connaissances dans ce domaine.

Je souhaite également remercier mes conseillers, la Dre Carole Beaulieu et le Dr Peter Moffett pour leurs conseils avisés lors de nos rencontres et pour l'évaluation de ce travail. Je remercie pareillement les Dr Richard Blouin pour avoir accepté d'évaluer ce travail et Dr Jean-Benoit Charon d'avoir accepté d'être l'évaluateur externe de mon jury de thèse.

Je veux remercier tous les membres du laboratoire Beaudoin, en commençant par Hélène, pour m'avoir aidée à trouver mes marques lorsque je suis arrivée. Ensuite, je souhaite remercier l'ensemble des étudiants stagiaires, dont Sébastien, Catherine, Maxime, Jean-Christophe et Mickael pour leur précieuse aide sur mon sujet, et Sophie et Jessica pour leur bonne humeur et gentillesse. Enfin, je tiens à remercier Fatima, et récemment Jenia, pour leur sens de l'humour qui nous ont permis d'avoir quelques conversations dynamiques et drôles, et pour leur soutien, surtout durant les périodes de doutes.

Finalement, j'aimerais remercier chaleureusement ma famille et mes amis de France, ainsi que mes nouveaux amis du Canada. Tout d'abord, à maman "préférée bien qu'unique" pour son soutien et son réconfort tout au long de ce doctorat. Je remercie mon frère pour s'être chargé de corvées familiales en mon nom et pour sa répartie qui m'a aidé à me changer les idées. Enfin, je vous remercie tous, où que vous soyez, pour votre amitié qui m'a réconforté durant les moments difficiles.

## TABLE DES MATIÈRES

SOMMAIRE.....	3
REMERCIEMENTS .....	5
TABLE DES MATIÈRES.....	6
LISTE DES ABRÉVIATIONS .....	10
LISTE DES FIGURES .....	15
CHAPITRE 1.....	18
INTRODUCTION GÉNÉRALE.....	18
I.1. Généralités sur la mort cellulaire programmée (MCP) .....	18
I.2. L'apoptose animale, une MCP spécifique aux animaux.....	20
I.2.1. Les caspases .....	20
I.2.2. Les protéines de la famille Bcl-2 .....	23
I.3. L'autophagie chez les animaux, un second type de MCP .....	25
I.4. La mort cellulaire programmée chez les végétaux.....	27
I.4.1. Caractéristiques des MCP végétales .....	27
I.4.2. La MCP au cours du cycle de développement.....	29
I.4.2.1. L'embryogenèse et la germination.....	30
I.4.2.2. Les éléments du xylème.....	31
I.4.2.3. La sénescence.....	33
I.4.3. La MCP ou réponse hypersensible en réponse au stress biotique.....	34
I.4.4. La MCP induite par des stress abiotiques .....	36
I.4.4.1. Induction de la MCP par une forte salinité .....	36
I.4.4.2. Induction de la MCP par le stress hydrique .....	37
I.4.4.3. Induction de la MCP par les UV-C/UV-B .....	38
I.4.5. Les molécules intervenant au cours de la MCP végétale.....	40
I.4.5.1. Molécules impliquées dans la signalisation cellulaire.....	41
I.4.5.1.1. Le rôle du cytochrome <i>c</i> , ou <i>cyt c</i> .....	41
I.4.5.1.2. Le rôle du calcium.....	42
I.4.5.1.3. Le rôle des espèces réactives de l'oxygène, ou ROS .....	44
I.4.5.2. Quelques protéines régulatrices de la MCP végétale.....	46
I.4.5.2.1. DAD-1 : Defender against Apoptotic Death-1.....	46
I.4.5.2.2. Homologues des caspases animales : les métacaspases.....	48
I.4.6. BI-1 : Bax Inhibitor-1 .....	51
I.4.6.1. Généralités sur BI-1 et la famille de gènes .....	52
I.4.6.2. BI-1 régule le calcium.....	54
I.4.6.3. BI-1 régule les espèces réactives de l'oxygène .....	56
I.4.6.4. Rôle de BI-1 dans les stress oxydatifs .....	56
I.4.7. Les Thiorédoxines (Trx) .....	58
I.4.7.1. Généralités et fonctions.....	58
I.4.7.2. Les thiorédoxines chez les bactéries .....	60
I.4.7.3. Les thiorédoxines chez la levure.....	61

I.4.7.4. Les thiorédoxines animales.....	63
I.4.7.5. Les thiorédoxines végétales .....	67
I.4.7.5.1. Les différents types de thiorédoxines et généralités.....	67
I.4.7.5.2. Les thiorédoxines cytoplasmiques et mitochondriales.....	70
I.4.7.5.3. Les thiorédoxines plastidiques .....	73
I.4.7.5.3.1. Vue d'ensemble des fonctions des thiorédoxines plastidiques	73
I.4.7.5.3.2. Le type z : une thiorédoxine à part, essentielle dans la	
transcription plastidique.....	75
I.4.7.5.3.3. Les types x et y : contrôle rédox du plaste et protection contre	
l'oxydation des molécules .....	76
I.4.7.5.3.4. Les types m et f : régulation du cycle de Calvin et de la	
photosynthèse.....	77
I.4.7.5.3.5. Régulation de l'activité protéique par les thiorédoxines	
chloroplastiques .....	80
I.4.7.5.3.5.1. Cycle de Calvin-Benson et voie oxydative des pentose-	
phosphates .....	80
I.4.7.5.3.5.2. Les thiorédoxines et la synthèse et dégradation de l'amidon	
.....	83
I.5. Objectifs .....	91
CHAPITRE 2.....	92
MATÉRIELS ET MÉTHODES .....	92
II.1. Conditions de culture et matériels biologiques.....	92
II.2. Crible de mutants régulant l'expression de <i>BI-1</i> : détection de la luminescence.....	93
II.2.1. RT-PCR et RT-qPCR .....	94
II.2.2. Essai de PCR-Inverse pour déterminer l'insertion de l'ADN-T auprès	
du mutant 2017 .....	94
II.3. Isolement des mutants des <i>TRX f1</i> et <i>f2</i> .....	95
II.4. Microorganismes .....	97
II.5. Analyse bio-informatique .....	98
II.6. Plasmides et constructions .....	98
II.6.1. Surexpression dans les levures et les protoplastes.....	99
II.6.2. Vérification de la présence de l'ADN-T .....	101
II.7. Transformation des levures et essais de fonctionnalité dans les levures .....	103
II.7.1. Transformation des levures.....	103
II.7.2. Essai de fonctionnalité dans <i>S. cerevisiae</i> QX95001.....	104
II.8. Expression transitoire dans les protoplastes et localisation subcellulaire.....	105
II.9. Induction de la MCP .....	105
II.9.1. Les UV-C.....	105
II.9.2. Le Méthyl viologen (MV) .....	106
II.10. Test de germination avec de l'acide abscissique (ABA).....	106
II.11. Analyse transcriptionnelle .....	106
II.11.1. Extraction des ARN Totaux.....	106
II.11.2. RT-PCR .....	107
II.11.3. Quantification par RT-qPCR.....	107



II.12. Fragmentation de l'ADN génomique .....	109
II.12.1. Extraction de l'ADN génomique.....	109
II.12.2. Gel d'électrophorèse .....	109
II.13. Dosage de la chlorophylle .....	109
II.14. Mesure de la taille des racines (MV) et de la croissance racinaire (ABA).....	110
II.15. Mesure de la conductivité.....	110
II.16. Microscopie .....	110
II.16.1. Visualisation de la mortalité cellulaire .....	110
II.16.2. Visualisation de la production de ROS au niveau des chloroplastes.....	111
II.16.3. Visualisation du contenu en amidon au niveau de la pointe racinaire.....	111
II.17. Amidon .....	112
II.17.1. Comparaison qualitative du contenu en amidon au niveau des feuilles .....	112
II.17.2. Quantification à l'aide d'une trousse du contenu en amidon.....	112
II.17.3. Traitement au froid .....	113
CHAPITRE 3.....	114
RÉSULTATS .....	114
III.1. Identification et caractérisation de mutants qui régulent le promoteur de <i>BI-1</i> en réponse aux UV-C .....	114
III.1.1. Crible de mutants.....	114
III.1.2. Caractérisation du mutant 2017.....	116
III.1.3. Localisation de l'insertion : PCR-Inverse .....	118
III.2. Implication des thiorédoxines f dans les voies de signalisation de la plante en réponse à divers stress abiotiques.....	120
III.2.1. Identification d'un gène de thiorédoxine répondant aux UV-C.....	120
III.2.2. Comparaison des séquences des thiorédoxines f chez <i>Arabidopsis</i> .....	121
III.2.3. Expression des thiorédoxines f chez <i>Arabidopsis</i> .....	123
III.2.4. Localisation subcellulaire des thiorédoxines f par expression transitoire dans des protoplastes.....	124
III.2.5. Implication des TRX f dans la MCP induite par Bax : Essai de fonctionnalité dans <i>S. cerevisiae</i> QX95001 .....	127
III.2.6. Identification de nouveaux mutants des thiorédoxines f1 et f2 et surexpression de la thiorédoxine f1 .....	129
III.2.7. Caractérisation de l'expression des gènes de thiorédoxines f chez les mutants et le surexprimeur.....	133
III.2.8. Évaluation du rôle des thiorédoxines f dans l'induction de la MCP.....	134
III.2.8.1. Implication des TRX f dans la MCP induite par UV-C .....	134
III.2.8.1.1. Évolution de l'expression des gènes après traitement aux UV-C.....	135
III.2.8.1.2. Quantification de la chlorophylle après traitements aux UV-C .....	140
III.2.8.1.3. Fragmentation de l'ADN génomique après traitement aux UV-C .....	141
III.2.8.1.4. Mortalité des cellules racinaires exposées aux UV-C .....	142
III.2.8.1.5. Production des ROS induits par les UV-C .....	145
III.2.8.2. Effet d'un stress oxydatif induit par le méthyl viologène (MV) .....	147

III.2.9. Analyse phénotypique des mutants et surexpresses	152
III.2.9.1. Germination	152
III.2.9.2. Sensibilité à l'acide abscissique (ABA)	153
III.2.10. Accumulation d'amidon	158
III.2.10.1. Quantification de l'amidon	159
III.2.10.2. Phénotype particulier à 4 °C	163
CHAPITRE 4	166
DISCUSSION GÉNÉRALE ET CONCLUSION	166
IV.1. Détermination des éléments des voies de signalisation qui activent le promoteur de <i>AtBI-1</i> en réponse aux UV-C	166
IV.2. Implication des TRX f dans les voies de signalisation de la plante en réponse à divers stress abiotiques	168
ANNEXES	180
ANNEXE 1. INSERTION DES ADN-T DANS AT3G02730 - GÈNE DE <i>TRX F1</i>	180
ANNEXE 2. INSERTION DES ADN-T DANS AT5G16400 - <i>TRX F2</i>	180
ANNEXE 3. SCHÉMA DE <i>PSCA-EYFP</i>	181
ANNEXE 4. SCHÉMA DE <i>PYX112</i>	182
BIBLIOGRAPHIE	183

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

$\Delta\Psi_m$	Potentiel de la membrane mitochondriale
%	Pourcentage
2,4-D	Acide 2,4-dichlorophénoxyacétique
3-PGA	3-Phosphoglycérate
ABA	Acide abscissique
ACD2	Accelerated cell death 2
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
ADNg	ADN génomique
ADN-T	ADN de transfert
ADP	Adénosine di-phosphate
Afap-1	Apoptotic protease-activating factor-1
AGPase	ADP-glucose pyrophosphorylase
AMY	$\alpha$ -amylase
AMP	Adénosine monophosphate
AOX	Oxydase alternative
AP-1	Activator protein 1
ARNm	Acide ribonucléique messenger
AS	Acide salicylique
ASK1	Apoptosis signal-regulating kinase 1
<i>Atg</i>	Autophagy related genes
ATP	Adénosine triphosphate
AtRaptor	Regulatory associated protein of TOR d' <i>Arabidopsis</i>
Bak	Bcl-2 antagonist killer
BAM	$\beta$ -amylase
Bax	Bcl-2-associated protein X
Bcl-2	B-cell lymphoma-2
Bcl-x <sub>L</sub>	B-cell lymphoma-x Long
BH	Bcl-2 homology domain
BI-1	Bax inhibitor-1
bZIP	Basic leucine zipper
°C	Degrés celsius
C-ter	C-terminale
Ca <sup>2+</sup>	Ion calcium
CBF2	C-repeat/dehydration responsive element binding factor 2
CBSX	Cystathionine $\beta$ -synthase domain-containing
CCA1/LHY	Circadian clock associated late elongated hypocotyls
CITRX	Cf-9-interacting thioredoxin"
CO <sub>2</sub>	Dioxyde de carbone
cyt <i>c</i>	Cytochrome <i>c</i>

cytMDH	Cytosolic malate dehydrogenase
DAD-1	Defender against apoptotic death-1
DISC	Death-inducing signaling complex
DO	Densité optique
<i>dry2/sqe1-5</i>	Drought hypersensitive/squalene epoxidase 1-5
ECB1	Early chloroplast biogenesis 1
FAD	Flavine adénine dinucléotide
FBPase	Fructose-1,6-bisphosphatase
Fd	Ferrédoxine
FDA	Diacétate de fluorescéine
FLN	Fructokinase-like proteins
Fru-6-P	Fructose-6-phosphate
FTR	Ferredoxin-thioredoxin reductase
g	Grammes
G6PDH	Glucose-6-phosphate déshydrogénase
GAPDH	Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase
GBS	Granule-bound starch synthase
GFP	Green fluorescent protein
Glc-1-P	Glucose-1-phosphate
Glc-6-P	Glucose-6-phosphate
GLT1	Glucose transporter 1
GM	Milieu de germination
GR	Glutathione réductase
GWD1	Glucan, water dikinase 1
h	Heures
H <sup>+</sup>	Proton
H <sub>2</sub> DCFDA	2',7'-dichlorofluorescein diacetate probe
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peroxyde d'hydrogène
HIF $\alpha$	Sous-unité $\alpha$ de Hypoxia-inducible factor-1
IEM	Membrane de l'enveloppe intérieure
IP	Iodure de propidium
IP <sub>3</sub> R	Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor
ISA	Isoamylase
kDa	kilo Dalton
kJ	kilo Joules
L	Litre
LDA1	Limit dextrinase 1
LSD1	Lesion simulating disease 1
M	Molaire
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MCP	Mort cellulaire programmée
MDHAR	Monodéhydroascorbate réductase
MeJA	Méthyl jasmonate
MEX1	Maltose transporter 1

$\mu\text{mol}$	$10^{-6}$ mol
Mn-SOD	Mn-superoxide dismutase
mTOR	Mammalian target of rapamycin
MS	Murashige et Skoog
MSR	Méthionine sulfoxide réductase
MV	Methyl viologen
N-ter	N-terminale
NaCl	Chlorure de calcium
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NB-LRR	Nucleotide-binding site-leucine rich repeat
NES	Signal d'export du noyau
NO	Monoxyde d'azote
NPQ	Non-photochemical quenching
NTR	NADPH-dependent thioredoxin reductase
$\text{O}_2$	Dioxygène
$\text{O}_2^{\cdot-}$	Superoxyde
$\cdot\text{OH}$	Radical hydroxyle
OPPP	Oxidative pentose phosphate pathway
pb	Paire de bases
PCR	Réaction en chaîne de la polymérase
PDI	Protein disulfide isomerase
PEP	Plastid-encoded RNA polymerase
PEPCK1	Phosphoénolpyruvate carboxykinase 1
PGI1	Phosphoglucoisomérase 1
PGM1	Phosphoglucomutase
PHS1	$\alpha$ -glucan phosphorylase 1
Pi	Phosphate
PI3K-III	Class III PI3K
PPi	Pyrophosphate
PRK	Phosphoribulokinase
Prx	Peroxydases
PRX	Peroxyrédoxine
PSI	Photosystème I
PTEN	Phosphatase and TENsin homolog
PWD1	Phosphoglucan, water dikinase 1
RdCVFL	Trx-like protein (rod-derived cone viability factor)
RE	Réticulum endoplasmique
Ref-1	Redox factor 1
RH	Réponse hypersensible
RNR	Ribonucléotide réductase
RNS	Espèces réactives de l'azote
ROS	Espèces réactives de l'oxygène
rpm	Tour par minute
RRase	Ribonucléotide réductase

RT	Transcription inverse
RubisCo	Ribulose 1,5 bisphosphate carboxylase/oxygénase
SAG	Senescence-associated genes
SBE	Starch branching enzymes
SBPase	Sédoheptulose-1,7-bisphosphatase
SEX	Starch excess
SPT	Sérine palmitoyltranférase
STS	Starch synthase
T6P	Tréhalose 6-phosphate
Tic	Translocon at the inner envelope membrane of chloroplasts
TM	Transmembranaire
TMBIM	Transmembrane Bax inhibitor-containing motif
TPI	Triose phosphate isomérase
TPNH	Triphosphorydine nucléotide
TR	Thiorédoxine réductase
TRX	Thiorédoxine
Trx-S <sub>2</sub>	Thiorédoxine oxydée
Trx-(SH) <sub>2</sub>	Thiorédoxine réduite
TSN	Tudor staphylococcal nuclease
TXNIP	Thioredoxin interacting protein
UPR	Unfolded protein response
URA	Uracile
UV	Ultraviolets
UVR8	UV resistance locus8
VDAC	Voltage-dependent anion chanel
Yap1	Yeast activator protein 1
YFP	Yellow fluorescent protein
ZEN1	Zinnia endonuclease 1
Zn <sup>2+</sup>	Ion zinc

## LISTE DES TABLEAUX

1. Amorces utilisées pour les PCR-Inverses selon l'enzyme de restriction utilisée .....	95
2. Liste des mutants sélectionnés pour notre étude .....	97
3. Liste des microorganismes utilisés .....	98
4. Liste des divers vecteurs utilisés .....	99
5. Amorces pour les diverses clonages et expression dans la levure et dans les protoplastes .....	100
6. Amorces utilisées pour la vérification de la présence de l'ADN-T par PCR sur ADN génomique .....	102
7. Association des amorces pour détecter l'ADN-T ou la construction.....	103
8. Amorces utilisées pour les RT-PCR et les RT-qPCR .....	108
9. Diminutions relatives de l'expression de <i>AtTRX f1</i> et <i>AtTRX f2</i> chez les mutants d'insertion et chez le surexprimeur par RT-qPCR par rapport au WT.....	134

## LISTE DES FIGURES

1. Représentation schématique des voies intrinsèque et extrinsèque de l'apoptose .....	22
2. Représentation simplifiée des domaines des membres de la famille Bcl-2.....	24
3. Schéma des étapes de l'autophagie et des composants des différents complexes chez les plantes.....	29
4. Représentation des différents domaines des protéines de la superfamille des caspases ..	49
5. Représentation des structures des protéines de BI-1 de l'homme et d'Arabidopsis.....	53
6. Mécanisme de la réduction des ponts disulfures des protéines dépendant du NADPH ...	59
7. Le système des thiorédoxines de mammifères a un rôle central dans un grand nombre de maladies humaines.....	65
8. Localisation subcellulaire des TRX et de certaines TRX-like chez les plantes .....	68
9. Les différentes types de réduction des thiorédoxines chloroplastiques chez les plantes..	69
10. Les différents processus du chloroplaste contrôlés par les thiorédoxines .....	74
11. Réduction des enzymes du cycle de Calvin-Benson et inactivation des enzymes de la voie oxydative des pentose-phosphates par les thiorédoxines de type f en phase lumineuse ..	81
12. Inactivation des enzymes du cycle de Calvin-Benson et réduction des enzymes de la voie des pentoses phosphates par les thiorédoxines de type f durant la nuit.....	82
13. Structure de l'amidon composé d'amylose et d'amylopectine .....	84
14. Modèle de la voie de biosynthèse de l'amidon dans les plastes .....	85
15. Modèle de la voie de dégradation de l'amidon dans les plastes .....	88
16. Principe du crible de mutants qui ont la construction <i>AtBI-1::luciférase</i> .....	93
17. Principe de la PCR-Inverse adapté de Szabados <i>et al.</i> , 2002 .....	95
18. Schéma de l'hybridation des 3 amorces sur l'ADN génomique en fonction de l'insertion ou non de l'ADN-T chez les mutants de <i>trx f1</i> et <i>trx f2</i> .....	101
19. Observation de luminescence .....	115
20. Évaluation de l'expression de <i>AtBI-1</i> , <i>AtLIL3:2</i> et la <i>luciférase</i> par RT-PCR chez la lignée parentale, 5PL20E, et le mutant 2017 comparée au sauvage (WT) .....	116
21. PCR-Inverse pour déterminer le site d'insertion de l'ADN-T chez 5PL20E et 2017 .....	119
22. PCR-Inverse avec <i>EcoRI</i> pour déterminer le site d'insertion de l'ADN-T chez 5PL20E et 2017 .....	119
23. Observation de luminescence .....	121
24. Alignement des séquences protéiques de la TRX f1 ( <i>At3g02730</i> ) et la TRX f2 ( <i>At5g16400</i> ) réalisé à l'aide du site internet NPS@ .....	122
25. Expression absolue des gènes <i>AtTRX f1</i> et <i>AtTRX f2</i> pour divers organes de la plante .	124
26. Localisation subcellulaire de la YFP et des fusions TRXf1:YFP et TRXf2:YFP dans des protoplastes d'une culture de cellules chlorophylliennes.....	125
27. Localisation subcellulaire de la YFP et des fusions TRXf1:YFP et la TRXf2:YFP dans des protoplastes obtenus à partir de cellules mésophylliennes de feuilles.....	126
28. Croissance des levures <i>S. cerevisiae</i> QX95001 exprimant les protéines $\Delta_{N\text{-ter}}\text{TRXf1}$ , $\Delta_{N\text{-ter}}\text{TRXf2}$ , <i>AtBI-1</i> en présence ou non de Bax.....	128



29. Analyse PCR de l'ADN génomique de mutants pour la présence de l'ADN-T dans le gène <i>AtTRX f1</i> .....	131
30. Analyse PCR de l'ADN génomique de mutants pour la présence de l'ADN-T dans le gène <i>AtTRX f1</i> pour le mutant <i>trxf1-2</i> .....	132
31. Analyse PCR de l'ADNg de mutants pour la présence de l'ADN-T dans le gène <i>AtTRX f2</i> .....	132
32. Gel d'électrophorèse d'une RT-PCR pour évaluer l'expression de <i>AtTRX f1</i> et <i>AtTRX f2</i> chez les mutants d'insertion et chez le surexprimeur .....	133
33. Évaluation de l'expression de <i>AtTRX f1</i> et <i>f2</i> par RT-PCR semi-quantitative avant et après une exposition aux UV-C .....	135
34. Expression des trois <i>TRX m</i> par RT-PCR avant et après une exposition aux UV-C.....	137
35. Expression de <i>MYB15</i> et <i>RRTF1</i> évaluée par RT-PCR avant et après une exposition aux UV-C .....	138
36. Quantification de la chlorophylle chez des plantules avant et après une exposition aux UV-C .....	140
37. Fragmentation d'ADNg détectée par gel d'électrophorèse marqué avec SYBRGold.....	142
38. Coloration au FDA et PI de la pointe racinaire de plantules âgées de 3 jours, 24 h après une exposition aux UV-C .....	143
39. Estimation du pourcentage de cellules vivantes et mortes au niveau de la racine 24 h après une exposition aux UV-C .....	144
40. Mise en évidence de la production de ROS par coloration au H <sub>2</sub> DCFDA de cotylédon 24 h après une exposition aux UV-C à 10, 30 et 50 kJ/m <sup>2</sup> .....	146
41. Pourcentage des graines germées en présence de MV dans le milieu au sixième jour de germination.....	148
42. Croissance racinaire avec différentes concentrations de MV dans le milieu .....	149
43. Quantification du contenu en chlorophylle a+b chez des plantules sur milieu contenant du MV (0 à 1 µM) .....	150
44. Mesure de la conductivité rapportée sur le poids frais pour dix rondelles de feuilles poolées traitées durant une heure dans une solution de MV à 0,25 µM.....	151
45. Pourcentage de germination sur milieu GM des différents mutants en cycle de jours longs à 22°C sur 7 jours .....	152
46. Pourcentage des plantules survivantes à la présence d'ABA dans le milieu au septième jour de germination .....	154
47. Quantification du contenu en chlorophylle a+b chez des plantules sur milieu contenant de l'ABA (0 et 1 µM) .....	155
48. Croissance racinaire totale en présence d'ABA dans le milieu pendant quatre jours.....	156
49. Évaluation de l'expression par RT-PCR semi-quantitative de <i>AtTRX f1</i> et <i>AtTRX f2</i> pour des plantules ayant germé sur milieu avec ou sans ABA .....	157
50. Visualisation de l'amidon chez différents mutants après une coloration au Lugol 1% ..	159
51. Estimation de la surface des rosettes colorées au Lugol de la Figure 50.A réalisée à l'aide du logiciel CellProfiler .....	161
52. Observation de l'organisation morphologique des chloroplastes, après une coloration au Lugol 1% .....	161

53. Contenu (en %) en amidon présent dans les feuilles des plantules âgées de trois semaines à l'aide de la trousse de Megazyme .....	162
54. Phénotype des hypocotyles des différents géotypes placés à l'obscurité à une température ambiante de 4°C .....	164
55. Mesure de la taille moyenne des hypocotyles en mm .....	164

## CHAPITRE 1

### INTRODUCTION GÉNÉRALE

#### **I.1. Généralités sur la mort cellulaire programmée (MCP)**

Un équilibre complexe se met en place chez les organismes pluricellulaires entre la division ou prolifération cellulaire et la mort des cellules. Par le biais de signaux, ces mécanismes permettent d'éliminer les cellules endommagées ou malades, ou bien d'éliminer les cellules superflues au cours du développement de l'organisme. Ces éléments sont essentiels à la survie de ces êtres vivants.

Le processus dynamique qui permet aux cellules de déclencher et de contrôler leur propre mort a été qualifié de mort cellulaire programmée, ou MCP. Pour le moment, la mise en évidence des facteurs intervenant dans ce type de mort a été nettement plus étudiée chez les animaux. Plusieurs types de MCP sont maintenant connus, mais les premières études portaient initialement sur l'apoptose animale, un type de MCP décrit pour la première fois en 1972 par John Kerr et ses collègues. L'apoptose des cellules animales suit un programme bien précis décrit ultérieurement (cf. partie I.2.).

Il n'est pas surprenant qu'une dérégulation du cycle cellulaire et/ou de l'apoptose, causée par des dommages ou des mutations qui empêchent les cellules d'activer le programme de mort, soit impliquée dans le développement de nombreuses maladies, telles que les cancers, ou les maladies d'Alzheimer et de Parkinson. Ainsi, on observe une prolifération anarchique des cellules défectueuses, voire une immortalité de celles-ci, puisque leur cycle cellulaire est dérégulé. Par ailleurs, les cascades de signalisation peuvent être perturbées, altérant ainsi l'expression de certains gènes et le contrôle de l'activité de certaines protéines impliquées dans ce programme de mort (Cory et Adams, 2002).

Comme énoncé rapidement, il existe d'autres types de mort cellulaire. La nécrose en est un autre, bien différent du type apoptotique, puisque la nécrose est une mort généralement non-contrôlée résultant d'un dérèglement de l'équilibre interne. Ainsi, la nécrose animale débute par l'augmentation du volume de la cellule. La lyse de la membrane plasmique se produit puisque la cellule se gorge d'eau. De ce fait, le contenu cytoplasmique se déverse dans le milieu environnant, et provoque une réaction inflammatoire (Kerr, 2002). Enfin, l'autophagie est comme l'apoptose, une mort lente et contrôlée, qui permet un recyclage des nutriments pour les cellules environnantes, par l'autodigestion cellulaire. Cela se produit par la fusion entre un lysosome et des vésicules qui ont séquestré une partie des constituants cellulaires, voire les organites (cf. partie I.3., Fink et Cookson, 2005).

L'apoptose provient du grec (*apo* - au loin et *ptosis* – chute) et ce mot désignait la chute des feuilles. Paradoxalement, les MCP retrouvées chez les plantes ne sont pas de ce type. Tout comme pour les animaux, les MCP végétales sont vitales pour les plantes. En effet, ce programme joue un rôle essentiel dans le cycle de vie des plantes pour la formation des vaisseaux du xylème, la morphologie des feuilles, la sénescence, lors de la fécondation ou de la germination (Han *et al.*, 2011)... Pareillement, il intervient en réponse aux stress rencontrés par la plante. Ces stress peuvent être abiotiques comme la sécheresse (Smirnov, 1993), le froid (O'Kane *et al.*, 1996), le mannose (Stein et Hansen, 1999) ou l'ozone (Kadono *et al.*, 2010), ou lors de stress génotoxiques comme les ultraviolets (UV) (Rao *et al.*, 1996, Danon et Gallois, 1998). Ils peuvent être aussi biotiques, tels que la réponse hypersensible lors de l'attaque par un agent pathogène. Quelques fois, suite à une infection de la plante par un agent pathogène, les cellules contaminées vont mettre en place une MCP pour limiter la propagation de l'infection. Ce mécanisme de défense permet de limiter la propagation à la zone d'infection (cf. partie I.4.3., Hofius *et al.*, 2007).

Contrairement aux animaux, la MCP végétale reste moins étudiée, et plusieurs zones d'ombre masquent les événements moléculaires qui régulent ce processus. Néanmoins, certaines caractéristiques de la MCP végétale s'apparentent à l'apoptose animale, avec des mécanismes

similaires d'induction, ou des protéines ayant une homologie de fonction. Je décrirai donc brièvement les mécanismes régulant l'apoptose et l'autophagie animale avant de présenter la MCP végétale.

## **I.2. L'apoptose animale, une MCP spécifique aux animaux**

L'apoptose est à ce jour assez bien caractérisée. Elle fait intervenir des molécules bien particulières qui activent des changements morphologiques bien spécifiques. Nous ne verrons ici que les grandes caractéristiques de cette MCP. Tout d'abord, le volume cellulaire diminue du fait de la condensation de la cellule, du noyau et de la chromatine. Rapidement, la membrane plasmique bourgeonne pour former les corps apoptotiques, qui seront reconnus et dégradés par les macrophages. Parallèlement, l'ADN est fragmenté en morceaux dont la taille moyenne fait 180 pb, ce qui concorde à la longueur de l'ADN enroulé autour d'un octamère d'histones qui composent un nucléosome (Fink et Cookson, 2005). Enfin, les corps apoptotiques sont phagocytés par les macrophages. Il n'y a donc pas de réaction inflammatoire lors de l'apoptose animale, contrairement à un autre type de mort, la nécrose.

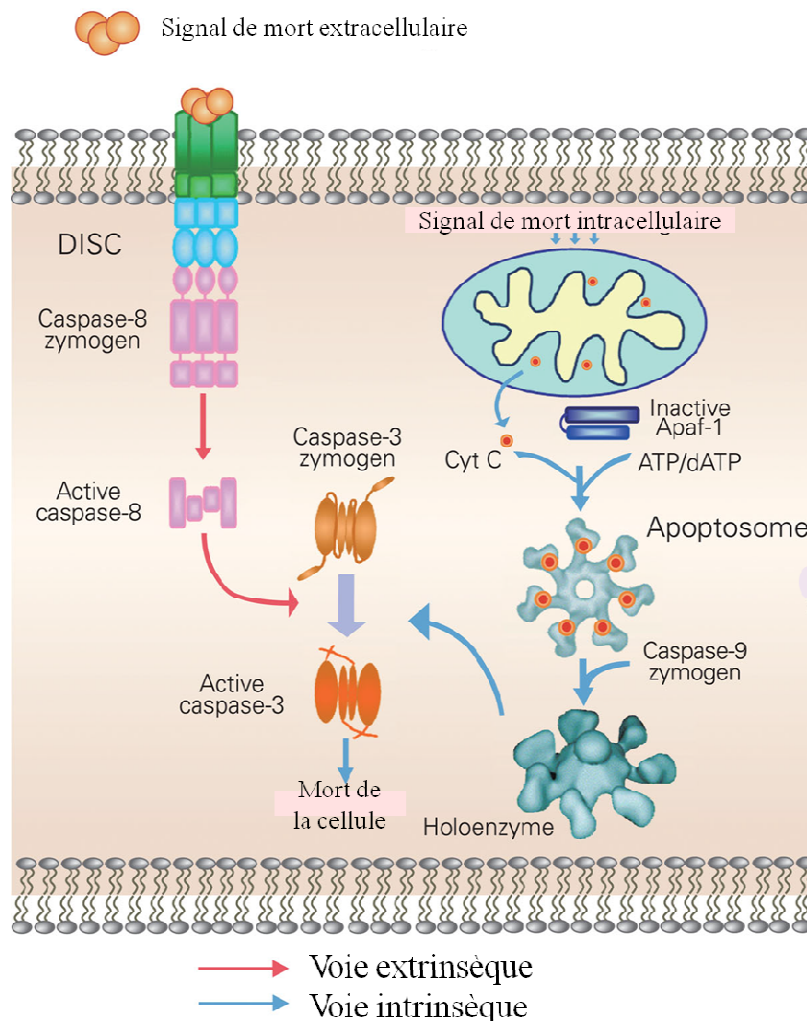
Parmi les acteurs de l'apoptose qui ont été découverts, nous nous intéressons particulièrement à certaines protéines stimulées par des signaux intrinsèques ou extrinsèques à la cellule (cf. Figure 1), dont notamment les caspases. Ensuite, nous verrons les protéines de la famille Bcl-2, dont certains membres activent la mise en place de la MCP (pro-apoptotiques), alors que d'autres membres inhibent l'apoptose (anti-apoptotiques).

### **I.2.1. Les caspases**

Les caspases animales (cysteiny-l-aspartate-cleaving-proteases) sont des cystéines protéases qui ont conservé ce résidu dans leur site actif et clivent après un résidu aspartique. Dans un premier temps, elles sont synthétisées sous une forme inactive. Ces procaspases ou zymogène

sont constituées de deux sous-unités, p20 (environ 20 kDa) et p10 (10 kDa, qui est le site catalytique) ainsi que d'un prodomaine sur la partie N-terminale (ou N-ter) de la séquence. Dans un second temps, les formes inactives sont clivées pour former les protéines actives. Celles-ci sont constituées alors de l'association de deux sous-unités identiques p20 avec deux autres sous-unités identiques p10.

Environ quinze gènes codant pour des caspases animales sont connus (Philchenkov, 2004). On distingue deux types de caspases : les initiatrices et les effectrices. Les sous-unités p20 et p10 sont généralement bien conservées comparativement au prodomaine pour les deux types. Les caspases initiatrices sont situées à proximité des unes des autres et proches d'un récepteur membranaire de mort, pour l'activation de la voie extrinsèque, cf. Figure 1 (Riedl et Shi, 2004). Un signal de mort est transmis quand le ligand se lie au récepteur, et permet d'auto-activer les pro-caspases, dont la procaspase-8, par un clivage mutuel et élimination du prodomaine (Ho et Hawkins, 2005). Les caspases effectrices sont clivées par les caspases initiatrices pour ainsi amplifier les signaux. Les caspases effectrices ont un prodomaine beaucoup plus court que celui des caspases initiatrices. Cela s'explique par le fait que les caspases initiatrices sont activées, en partie, par des interactions protéiques avec leurs cofacteurs au niveau de leur prodomaine (Ho et Hawkins, 2005). Cette cascade protéolytique permet la mise en place de l'apoptose.



**Figure 1. Représentation schématique des voies intrinsèque et extrinsèque de l'apoptose (adapté de Chai et Shi, 2014).**

Un second mode d'activation de l'apoptose débute par le relâchement du cytochrome *c* (cyt *c*) par la mitochondrie suite à la perception d'un signal intracellulaire par l'organite. C'est la voie d'activation intrinsèque de l'apoptose. Le cyt *c* va se lier à la protéine Apaf-1 (apoptotic protease-activating factor-1) et à la caspase-9 (Riedl et Shi, 2004). Suite à l'hydrolyse d'une molécule d'ATP en ADP, le complexe s'associe et forme l'apoptosome actif. Ce dernier clive d'autres caspases, dont la caspase-3, pour accroître le signal et la réponse de la cellule (Würstle *et al.*, 2012). Quant à la caspase-9, elle est nécessaire pour les changements morphologiques

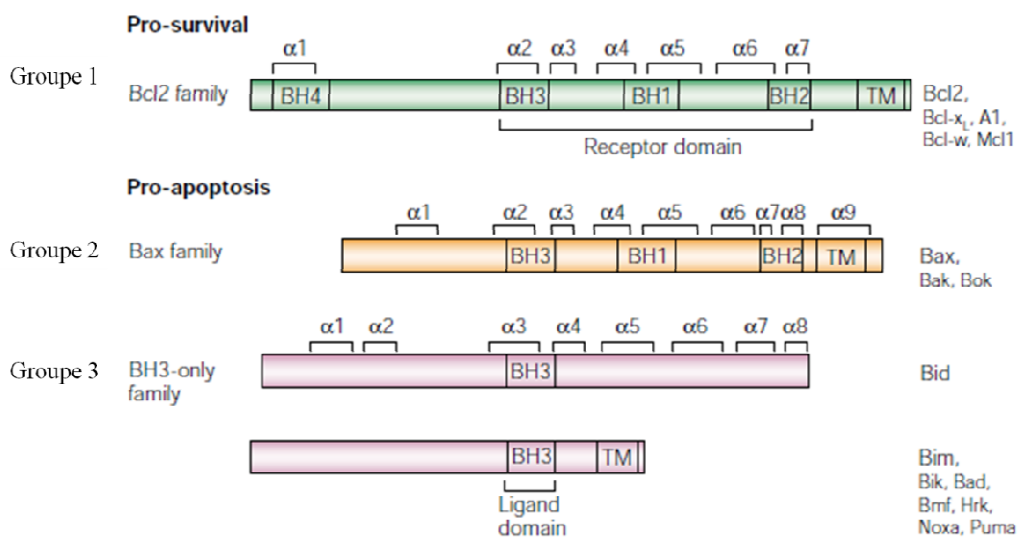
des mitochondries et la production de ROS (espèces réactives de l'oxygène). Après l'activation de l'apoptosome, la caspase-3 inhibe la production de ROS. La caspase-3 est importante pour l'exécution efficace de l'apoptose, alors que la caspase-7 effectrice est nécessaire pour le détachement des cellules apoptotiques (Brentnall *et al.*, 2013). En parallèle, la caspase-8 peut elle aussi activer la caspase-3 dans la voie intrinsèque. Certains chercheurs supposent que le complexe formé avec la caspase-8 pourrait servir de signal intracellulaire (Young *et al.*, 2012). Le changement de conformation du complexe DISC ("Death-inducing Signaling Complex") peut également modifier le programme protecteur autophagique de la cellule pour activer l'apoptose de la cellule (Young *et al.*, 2012).

Après l'amplification des signaux de mort par les caspases, des protéines, dont celles de la famille Bcl-2 activent la réponse de MCP dans la cellule.

### **I.2.2. Les protéines de la famille Bcl-2**

La protéine Bcl-2, pour B-cell lymphoma-2, a été le premier membre de cette famille à être identifié (Cory et Adams, 2002). Cette protéine inhibait la mort cellulaire dans les lymphomes, mais promouvait la prolifération des cellules. Ce régulateur de la mort a un domaine spécifique bien conservé le "Bcl-2 homology domain" ou BH. Tous les membres de cette famille ont le domaine BH3, pour l'homodimérisation (cf. Figure 2). Par contre, certaines d'entre elles possèdent en plus les domaines BH1 et BH2 pour l'hétérodimérisation. Ces régions nécessaires à la régulation de l'apoptose permettent de classer les membres de cette famille en deux groupes. D'un côté, les facteurs pro-apoptotiques induisent la mort, comme Bax (Bcl-2-associated protein X) ou Bak (Bcl-2 antagonist killer). Et de l'autre côté, les facteurs anti-apoptotiques protègent la cellule de l'entrée en mort, tels que Bcl-2 ou Bcl-x<sub>L</sub> (B-cell lymphoma-x Long). La plupart de ces protéines ont aussi un domaine transmembranaire (TM) en C-terminal (C-ter), pour un ancrage aux membranes des mitochondries ou du réticulum endoplasmique (RE). Par ces interactions protéines-protéines, la cellule met en place ou non l'apoptose.





**Figure 2. Représentation simplifiée des domaines des membres de la famille Bcl-2 (adaptée de Cory et Adams, 2002).**

La voie de signalisation impliquant cette famille de protéines est la voie intrinsèque de l'apoptose (cf. partie I.2.1 et Figure 1). La séquestration du *cyt c* dans la mitochondrie est possible par la protéine Bcl-2. Ainsi, les cellules n'entrent pas en apoptose puisqu'il n'y a pas la formation de l'apoptosome. Il est possible qu'une interaction entre Bcl-2 et Bax se produise (Oltval *et al.*, 1993). L'efflux de protéines apoptotiques de la mitochondrie ne se fait plus puisqu'il n'y a plus de dimérisation de la protéine Bax. Mais cette protection est abolie lorsque les protéines Bax et Bak s'homodimérisent à la membrane de la mitochondrie. Le *cyt c* est alors libéré dans le cytoplasme. Les dimères de Bax constituent aussi des pores transitoires pour les ions, ce qui dépolarise les membranes des mitochondries. D'autres éléments accompagnent ces événements, dont une production de ROS qui ont un rôle dans la voie de signalisation de l'apoptose. La perception des signaux par les cellules favorise la synthèse de ces molécules anti-apoptotiques ou pro-apoptotiques. Par ailleurs, les protéines Bax et Bak contrôlent la voie de signalisation intracellulaire de l'apoptose, et de ce fait, peuvent contrôler l'activation des caspases initiatrices (Ruiz-Vela *et al.*, 2005).

Il est intéressant de noter que certaines de ces protéines ont des fonctions conservées dans d'autres organismes, incluant les plantes. Par exemple, même si la protéine Bcl-2 est absente chez les plantes, sa fonction anti-apoptotique n'est pas altérée. Ainsi des plantes transgéniques de tabac qui expriment Bcl-2, survivent à un traitement provoquant la MCP, soit par un stress biotique, soit par un stress abiotique (Li et Dickman, 2004).

Un équilibre est présent entre l'apoptose et l'autophagie. Il permet à la cellule d'adapter rapidement sa réponse en fonction des signaux perçus.

### **I.3. L'autophagie chez les animaux, un second type de MCP**

Tous les organismes vivants recyclent et renouvellent continuellement une partie de leur contenu. De cette manière, les composants sont remplacés par d'autres qui ont été en partie synthétisés à l'aide d'éléments préexistants.

Ainsi, une autre sorte de MCP a été identifiée chez les animaux : l'autophagie. En effet, cette mort lente permet un recyclage des nutriments pour les cellules environnantes, par l'autodigestion cellulaire. Deux systèmes sont utilisés pour dégrader les molécules. Le premier est le protéasome qui passe par l'ubiquitinylation des protéines, et est donc très spécifique. Le second implique le lysosome. Lors de l'autophagie, une fusion entre un lysosome et des vésicules, ou autophagosomes, se produit.

Il existe trois types d'autophagies (la microautophagie, l'autophagie médiée par les protéines chaperonnes et la macroautophagie) qui aboutissent toutes au même résultat. Celle qui nous intéresse est la macroautophagie, la plus étudiée (Mizushima et Komatsu, 2011). Les autophagosomes sont spécifiques à cette mort. Les chercheurs supposent qu'ils se forment à partir ou à proximité du RE ou de l'appareil de Golgi, mais d'autres structures comme les mitochondries ou la membrane plasmique pourraient y participer (Tooze et Yoshimori, 2010). Pour qu'un autophagosome se forme, il faut l'expression des gènes *Atg*, pour "Autophagy

related genes" (Mizushima et Komatsu, 2011). Cette famille de gènes est très conservée chez les eucaryotes, incluant *Saccharomyces cerevisiae* (Suzuki *et al.*, 2013), les mammifères (Mizushima *et al.*, 2011) et les plantes (Kuzuoglu-Ozturk *et al.*, 2012, Pei *et al.*, 2014). Chez la souris, une délétion de *Atg8* ou de *Atg3* est létale pour l'animal et ces deux gènes sont primordiaux pour la formation de l'autophagosome (Sou *et al.*, 2008). Par contre, tous les gènes *Atg* ne sont pas nécessairement impliqués dans l'autophagie de la cellule, mais ils jouent un rôle dans la modulation du transport cellulaire, ou dans les processus de sécrétion (Subramani et Malhotra, 2013). De plus, certains éléments des autres voies de MCP peuvent induire des facteurs de l'autophagie. Ainsi, durant l'activation par les récepteurs de la mort cellulaire, *Atg3* devient un nouveau substrat de la caspase-8 (Oral *et al.*, 2012). Dans certaines conditions, *Atg3* est directement clivé par la caspase-8 active, ce qui inhibe l'autophagie pour favoriser l'apoptose. Mais en présence d'inhibiteur de la caspase-8, celle-ci ne peut plus cliver *Atg3*, alors la voie de l'autophagie est mise en place (Oral *et al.*, 2012).

Un autre élément est important pour la formation de l'autophagosome : les complexes mTOR, pour "mammalian target of rapamycin". Plusieurs facteurs influencent l'activité des mTORC et permettent une réponse adéquate de la cellule (Mizushima et Komatsu, 2011). La restauration des niveaux cellulaires d'acides aminés ou de glucose, ou la perception de stress environnementaux réactivent la protéine sérine/thréonine kinase mTORC1. Ce complexe catalytique est un régulateur négatif de l'autophagie qui supprime la formation du complexe ULK1 (un homologue d'*Atg1*) sous les conditions riches en nutriments. Lorsque les complexes mTORC1 et mTORC2 sont inhibés dans des cellules cancéreuses, l'autophagie est induite chez ces cellules qui entrent en mort (Sini *et al.*, 2010).

Enfin, l'enzyme Beclin1 est particulière puisqu'elle peut lier Bcl-2, et former un complexe (Patingre *et al.*, 2005), ou interagir avec Bcl-X<sub>L</sub> par son domaine BH3 (Oberstein *et al.*, 2007, Maiuri *et al.*, 2007). En fonction du complexe formé, l'autophagie est soit activée avec Bcl-2, soit non-activée avec Bcl-X<sub>L</sub> (Wang, 2008). Beclin1 forme aussi avec d'autres protéines, un complexe PI3K-III, nommé "class III PI3K" (Thoresen *et al.*, 2010). Certaines sous-unités de PI3K-III, dont Beclin1, régulent la division cellulaire ou le métabolisme (Thoresen *et al.*,

2010). La protéine Beclin2, tout comme Beclin1, a une fonction dans l'autophagie de la cellule et interagit aussi bien avec Bcl-2 et les composants du complexe PI3K-III (He *et al.*, 2013). Mais Beclin2 est aussi requis dans la régulation de GASP1, qui active la dégradation de plusieurs récepteurs couplés protéines G par les lysosomes (He *et al.*, 2013). Avec ce type de protéines, qui peuvent interagir avec des éléments de l'apoptose, les cellules ont un éventail de possibilités pour répondre rapidement aux modifications des conditions environnantes.

Nous verrons ci-après que chez les végétaux, la MCP de type autophagique est un peu différente de celle des animaux.

#### **I.4. La mort cellulaire programmée chez les végétaux**

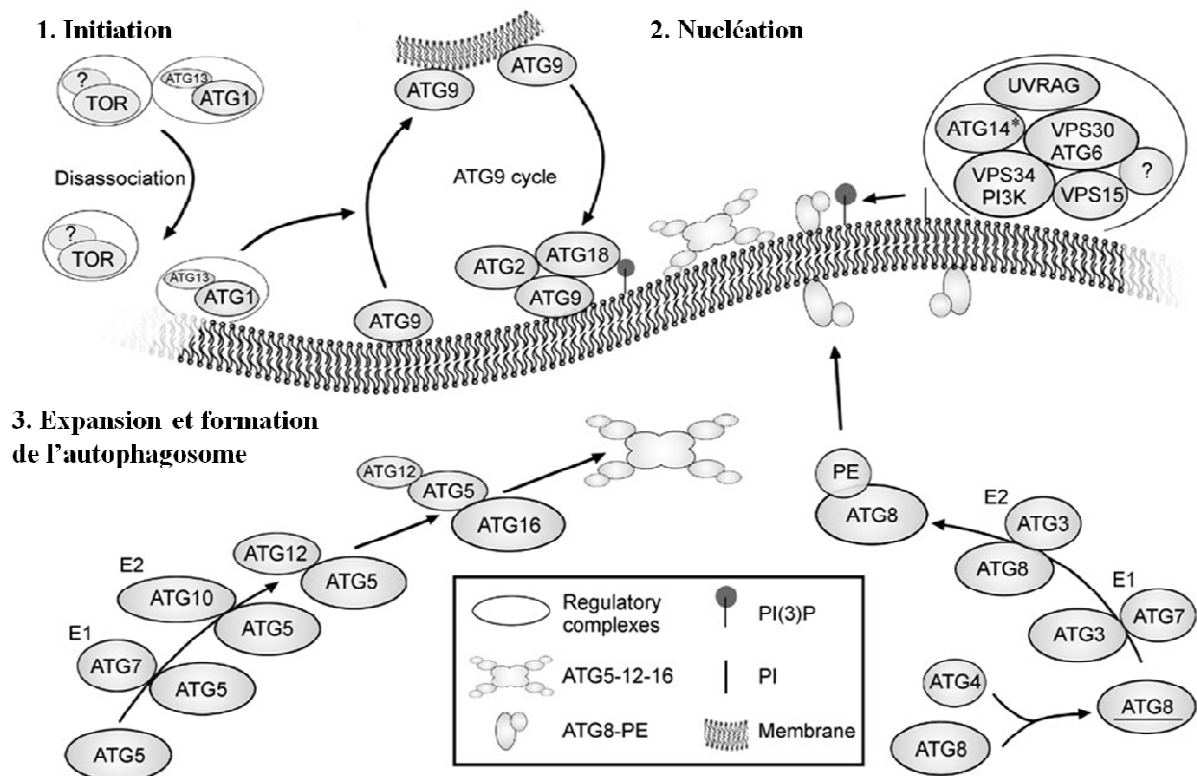
##### **I.4.1. Caractéristiques des MCP végétales**

La MCP fait partie du cycle de vie des organismes pluricellulaires, et les végétaux n'y font pas exception. Comme chez les animaux, plusieurs types de MCP peuvent avoir lieu chez la plante. Les différents types de MCP se produisent aussi bien durant les phases de développement végétatif et reproductif des plantes, que durant les moments d'agression extérieurs provoqués par des agents pathogènes ou par d'autres facteurs abiotiques. Selon le facteur inducteur de la mort, la réponse en résultant diffère d'un point de vue moléculaire. Néanmoins, certaines caractéristiques communes avec l'apoptose animale sont retrouvées chez les végétaux, comme la formation de ROS, l'activation de protéases spécifiques, et éventuellement une fragmentation de l'ADN.

Grâce aux critères morphologiques observés, une classification des différents types de MCP chez les plantes a été proposée (Van Doorn *et al.*, 2011). Parmi toutes les possibilités, le type de MCP qui est le plus représenté chez les plantes est le type autophagique. Il est crucial puisqu'il permet le recyclage des nutriments, a un rôle dans l'homéostasie cellulaire et dans la

défense contre certains agents pathogènes. Plus particulièrement, l'autophagie est la MCP qui est mise en place durant le développement des plantes. Elle débute par une augmentation de la taille de la vacuole associée à une réduction de la taille du cytoplasme. Les organites intracellulaires disparaissent progressivement et sont séquestrés dans des vacuoles autophagiques. Le premier à y être intégré est le RE, et les derniers à disparaître par la fusion de l'autophagosome avec la vacuole sont le noyau et quelques mitochondries. Une fois que les organites sont complètement dégradés, le tonoplaste et la membrane plasmique se désintègrent.

Pour que la vésicule autophagique se forme, il faut des protéines actives bien spécifiques faisant partie d'une machinerie conservée, les ATG (Kuzuoglu-Ozturk *et al.*, 2012). Globalement, la voie et les ATG impliquées sont similaires à ce qui se produit chez les cellules animales. L'étude de plusieurs mutants de gènes *ATG* a permis de déterminer leurs fonctions spécifiques. Chez *Arabidopsis*, plus de 30 gènes de la famille *ATG* ont été identifiés et plusieurs ont été caractérisés (Han *et al.*, 2011). Par exemple, on sait que le gène *ATG18* chez *Arabidopsis thaliana* (*AtATG18*) est requis pour la formation de l'autophagosome durant la sénescence ou en cas de stress nutritionnel (Xiong *et al.*, 2005). Globalement, *ATG18a* joue aussi un rôle dans le ralentissement de la croissance, dans la réponse à plusieurs hypersensibilités provoquées par des conditions de famine, par la sécheresse, par le sel et par le stress oxydatif (Liu et Bassham, 2012). Lors de la sénescence ou en cas de stress, la destruction du chloroplaste est enclenchée. La plante réalloue l'azote des feuilles vers les autres organes. Pour ce faire, des protéines du stroma, dont Rubisco, sont remobilisées à la vacuole par le système de *ATG8*, sans destruction au préalable du chloroplaste (Ishida *et al.*, 2008). Un autre gène important de cette famille est *ATG6*, qui intervient dans beaucoup de mécanismes dont l'augmentation de la production d'anthocyanines, ou encore a un effet sur la diminution du nombre des siliques produites (Liu et Bassham, 2012). L'autophagie peut aussi se produire suite à une infection de la plante par un agent pathogène, et fera intervenir certains *ATG* (Hofius *et al.*, 2009). Pratiquement toutes les étapes de la vie de la plante font intervenir au moins l'un des gènes de la famille *ATG*. Un schéma général de la formation de l'autophagosome chez les plantes est présenté en Figure 3.



**Figure 3. Schéma des étapes de l'autophagie et des composants des différents complexes chez les plantes (adapté de Han *et al.*, 2011).**

D'autres types de MCP interviennent également pendant le développement de la plante et en réponse à différents agents externes. Nous allons développer quelques types de mort ainsi que les molécules signales intervenant.

#### **I.4.2. La MCP au cours du cycle de développement**

Comme pour les animaux, la MCP chez les plantes se produit à toutes les étapes de leur vie, dont chacune a son importance (Van Hautegeem *et al.*, 2014). Ainsi, la MCP végétale se déroule aussi bien pendant les différentes étapes de la reproduction de la plante, que celles de la formation des organes des fleurs (le méristème floral donnant les étamines et le carpelle,

incluant les gamétophytes), qui déterminera le sexe de la plante si elle est monogame. Cette MCP se fait aussi durant l'embryogenèse, la germination, dans les processus de xylogénèse, lors de la pollinisation ou de la sénescence de la plante. D'autres évènements de morts se produisent au cours de la croissance de l'organisme. Par exemple, les cellules de la coiffe meurent, pour fournir des éléments nutritifs aux cellules du méristème racinaire (qui sont en mitose active) et pour les protéger. Nous allons en aborder que quelques uns, en commençant par l'embryogenèse et la germination.

#### **I.4.2.1. L'embryogenèse et la germination**

Pour que le développement du nouvel organisme se fasse correctement, la germination doit se dérouler parfaitement (Van Hautegeem *et al.*, 2014). Chez les Angiospermes, le tissu de réserve des graines est constitué de deux types de cellules : l'albumen amylicé, et l'aleurone (Pennell et Lamb, 1997). L'embryon reçoit de l'énergie et des nutriments fournis par l'albumen. La phase de maturation de la graine se déroule en deux étapes. Tout d'abord, il y a l'étape de division cellulaire active, qui est accompagnée d'une biosynthèse abondante en protéines, lipides et amidon. Ensuite, la graine entre en dormance, et la MCP est induite pour absorber progressivement tout le tissu, excepté la couche de l'aleurone qui reste intacte. Cette MCP est précise pour ne pas compromettre la germination et fournir un maximum d'éléments nutritifs.

Au cours de la germination, les cellules de l'aleurone jouent un rôle capital en synthétisant et sécrétant les enzymes hydrolytiques chargées de dégrader les réserves de l'albumen. Ces cellules contribuent une dernière fois à la croissance de l'embryon en exécutant l'autophagie, pour redistribuer leurs propres éléments à l'embryon. Des observations faites chez le maïs ont montré que les cellules de l'aleurone, qui entrent en MCP, montrent une vacuolisation rapide avec une activité lytique importante dans le cytoplasme, tandis que le noyau devient irrégulier. À la fin du processus, le noyau montre les symptômes de dégradation, qui est un élément central de ce type de mort (Domínguez *et al.*, 2004). Une condensation de la chromatine est observée, suivie la fragmentation de l'ADN, toutes deux probablement orchestrées par une

nucléase (Domínguez *et al.*, 2004). Par exemple, durant l'embryogenèse végétale de l'épicéa commun, (*Picea abies*), la cystéine protéase mCII-Pa est responsable de l'exécution de ce programme de mort. Cette métacaspase (cf. partie I.4.2.2.2.) est transloquée du cytoplasme vers le noyau des cellules différenciées, où elle est localisée au pore nucléaire et à la chromatine, causant la dislocation de l'enveloppe nucléaire et la fragmentation de l'ADN. Si une mutation survient au niveau du site catalytique, l'enzyme perd sa fonction et il y a un blocage de la dégradation nucléaire (Bozhkov *et al.*, 2005).

L'initiation de l'autophagie dans la graine se fait par le système des protéines TOR (équivalent animal cf. partie I.3.). Les gènes *AtRaptor*, "regulatory associated protein of TOR" d'*Arabidopsis*, sont essentiels pour la croissance post-embryonnaire de la plante (Anderson *et al.*, 2005). Sans ces gènes, les complexes protéiques formés avec les protéines TOR ne sont plus recrutés, ni phosphorylés par les enzymes TOR. Les doubles mutants *AtRaptor1A/AtRaptor1B* ont un développement de la graine normal, mais présentent une activité du méristème post-embryonnaire minimale (Anderson *et al.*, 2005).

Après la germination, d'autres molécules vont elles aussi entrer en action pour permettre la formation des éléments conducteurs de la plante, dont le xylème.

#### **I.4.2.2. Les éléments du xylème**

Le xylème transporte la sève brute, alors que le phloème transporte la sève élaborée. Cependant, les cellules constituant le xylème sont mortes et véhiculent l'eau et les autres éléments qui ont été puisés du sol vers tout le reste de la plante. La différenciation des éléments trachéides implique l'élongation des cellules et la déposition de composés cellulaires sur la paroi, dont la lignine, et l'autolyse (Pennell et Lamb, 1997).

La formation des vaisseaux du xylème se déroule en trois étapes. Elle débute par l'isolement des cellules du mésophylle, qui perdent leur habileté à faire la photosynthèse. Au stade I, la



croissance des cellules continue sans division cellulaire. Une réorganisation de la cellule se produit, notamment avec une réorientation des microtubules. En parallèle, la synthèse de protéines impliquées dans la formation de la paroi secondaire est accentuée. Cela permet une augmentation de l'épaisseur et de la rigidité de la paroi, nécessaire à la résistance des cellules contre la pression exercée par le flux du liquide. Au stade II, on observe à nouveau une augmentation importante de la synthèse des protéines et des ARNm. À la fin de ce stade, il y a un point de contrôle irréversible dans la différenciation des cellules en xylème. Enfin, le stade III est caractérisé par la détection de marqueurs spécifiques des cellules du xylème, qui sont le dépôt de la paroi secondaire et la mort cellulaire (Fukuda, 1997).

La MCP aboutissant à la formation des vaisseaux conducteurs n'a pas les mêmes caractéristiques morphologiques que celles décrites précédemment. Au cours de la différenciation des cellules en éléments conducteurs, une dégénérescence de tous les organites, y compris le noyau, débute suite à la dégradation de la membrane vacuolaire. Les membranes des autres organites cellulaires se détériorent, en commençant par l'appareil de Golgi, le RE, puis le noyau, libérant ainsi leur contenu dans le cytoplasme. Contrairement à l'apoptose, la dégradation de l'enveloppe nucléaire n'est précédée ni par la condensation, ni par la fragmentation de l'ADN. L'ADNg est probablement fragmenté par les nucléases provenant de la dispersion du contenu vacuolaire (Fukuda, 1997, et 2000). La vacuole joue donc un rôle central dans ce type de MCP (Fukuda, 2000).

Certaines nucléases ont été proposées pour leur implication dans la fragmentation de l'ADN. Par exemple, la protéine ZEN1 (Zinnia endonuclease 1) a l'habileté de dégrader l'ADN nucléaire de *Zinnia elegans* en présence de  $Zn^{2+}$  (Ito et Fukuda, 2002). Toutefois, les connaissances sur les signaux aidant à la rupture de la vacuole sont assez limitées. Quelques suppositions ont été émises sur l'importance du flux de calcium et sur l'intervention d'une sérine protéase (Groover et Jones, 1999). Dernièrement, des éléments de la MCP de type autophagique ont été associés à la création du xylème. Ainsi, on soupçonne l'implication de la protéine ATG5 puisque les mutants *AtATG5* ont un nombre nettement moins important de cellules formant le protoxylème et le métaxylème. De plus, il a été montré que la petite

protéine de liaison au GTP, la RabG3b, a un rôle dans la différenciation des éléments trachéides à travers sa fonction dans l'autophagie (Kwon *et al.*, 2010). En plus de stimuler les dépôts protéiques pour la formation de la paroi secondaire, la protéine RabG3b active induit l'expression des gènes de la MCP, dont la métacaspase 9.

### **I.4.2.3. La sénescence**

La dernière phase du développement végétatif et reproducteur est la sénescence. Pendant ce processus, l'intégrité membranaire et la compartimentation cellulaire sont maintenues jusqu'aux derniers stades, pour permettre un recyclage actif des nutriments cellulaires pour les autres organes et pour limiter la sortie du contenu cellulaire. Il s'agit d'une MCP lente pour une meilleure redistribution des éléments nutritifs (Pennell et Lamb, 1997).

Ce phénomène peut être régulé par plusieurs éléments, dont les hormones végétales (Quirino *et al.*, 2000). Par exemple, l'éthylène induit la sénescence, alors qu'à l'inverse, les cytokinines la bloquent. En particulier, l'éthylène provoque une redistribution du  $Ca^{2+}$  et induit la phosphorylation de protéines altérées. De plus, l'éthylène et l'augmentation de la production de ROS activent l'expression de gènes particuliers, les SAG pour "senescence-associated genes" (Quirino *et al.*, 2000). Une comparaison des séquences protéiques a mis en évidence une homologie de séquence des SAG avec les cystéines protéases. De plus, les ROS agiraient en messagers secondaires, et seraient donc impliquées dans la voie de signalisation de la MCP végétale (cf. partie I.4.5.1.3., Navabpour *et al.*, 2003).

D'autres éléments caractéristiques de la MCP ont été détectés au cours de la sénescence. Une observation de la fragmentation de l'ADN 48 h après l'induction de la sénescence dans les tissus, en fragments de 180 pb, est observée sur des plants de brocoli (Coupe *et al.*, 2004). Ce phénomène est également retrouvé lors de la sénescence chez *Arabidopsis*. Plusieurs protéines ont été impliquées dans cette MCP, tel que BI-1 (Bax inhibitor-1), LSD1 (Lesion Simulating disease 1) et SPT (sérine palmitoyltransférase). Généralement, pour *Arabidopsis* comme pour

le brocoli, on observe l'augmentation de l'expression de ces gènes au moment du détachement de la feuille. Une autre étude a montré qu'une surexpression de l'activateur de transcription CBF2 (C-repeat/dehydration responsive element binding factor 2) chez *Arabidopsis*, augmente leur longévité en retardant la chute des feuilles (Sharabi-Schwager *et al.*, 2010).

Enfin, quelques membres de la famille ATG ont aussi un rôle dans la mise en place de la sénescence. En plus de l'AtATG18 obligatoire à la formation de l'autophagosome (Xiong *et al.*, 2005), le complexe kinase ATG1/13 est essentiel à la remise des vésicules autophagiques à la vacuole et est impliqué dans l'élimination sélective des mitochondries (Suttangkakul *et al.*, 2011). Chez *Arabidopsis*, l'un des éléments de ce complexe, ATG11 semble être l'enzyme qui régule l'activité du complexe kinase ATG1/13 et sa signalisation pour la formation de vésicules autophagiques appropriées (Li *et al.*, 2014).

#### **I.4.3. La MCP ou réponse hypersensible en réponse au stress biotique**

La réponse hypersensible, ou RH, est un type de mort cellulaire programmée particulier, dont le but est de limiter l'infection par un agent pathogène. En effet, les plantes peuvent aussi être contaminées par divers agents pathogènes. L'intérêt de la mort rapide au niveau du site d'infection et autour de ce point est de retarder, voire stopper la prolifération de la bactérie, du champignon ou du virus.

Des molécules signales sont impliquées dans le contrôle de la RH, tels que la flambée oxydative (avec la formation du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) ou le N (Beers et McDowell, 2001). Ce processus de production des ROS est rapide, transitoire et initié au niveau du point d'infection. Cette forte accumulation permet l'induction de nombreux gènes de défense, et/ou encore le renforcement des parois cellulaires. De plus, la biosynthèse de nombreuses hormones végétales est stimulée, comme l'éthylène, et surtout l'acide salicylique (AS). Cette double accumulation, AS et ROS, est nécessaire pour induire la MCP durant la réponse hypersensible. Par ailleurs, le cytochrome *c* sortant de la mitochondrie favorise l'entrée en MCP, puisque la perméabilité membranaire de

la mitochondrie est l'un des signes de la RH. Comme l'AS peut induire une inhibition rapide de la chaîne de transport des électrons des mitochondries, de cette manière, une phosphorylation oxydative dans les cellules de tabac est provoquée (Xie et Chen, 2000). Cette MCP, induite sur les cellules de tabac par un éliciteur de réponse hypersensible produit par *Erwinia amylovora* (la molécule Harpin), est associée à une altération des fonctions de la mitochondrie (Xie et Chen, 2000).

Généralement, la réponse hypersensible s'accompagne du phénomène de la résistance. Pour limiter la croissance de l'agent pathogène, la plante doit donc coordonner l'activation de plusieurs gènes de défense. La résistance s'exprime lorsqu'il y a une reconnaissance dite « gène-pour-gène », qui peut se faire de manière directe ou indirecte entre le gène *R*, gène dominant de l'hôte, avec le gène *avr*, gène dominant de l'agent pathogène (Greenberg et Yao, 2004). Des modifications cellulaires accompagnent les reconnaissances et sont variables en fonction de l'agent pathogène. Des changements morphologiques des mitochondries sont observés, puis ultérieurement, un dysfonctionnement de la membrane et une vacuolisation progressive du cytoplasme sont remarqués (Greenberg et Yao, 2004).

Un facteur de régulation essentiel dans la propagation de la réponse hypersensible est LSD1. Chez *Arabidopsis*, le mutant *lsd1* montre une hypersensibilité pour initier la mort, mais limite sa progression. Cette protéine appartient à la famille des protéines possédant un motif doigt de zinc (zinc finger protein). Elle est dépendante de la voie de signalisation des ROS (dont le superoxyde), dont le signal doit être suffisant pour activer le facteur (Dietrich *et al.*, 1997). Les protéines induisant la mort ou la protection des cellules sont soit réprimées, soit activées par ce régulateur de transcription. Par exemple, LDS1 peut empêcher l'entrée du facteur de transcription bZIP10 (basic leucine zipper) dans le noyau et inhiber son rôle de protection. En effet, ce dernier protège les cellules d'*Arabidopsis* de la mort induite par un stress oxydatif en activant la transcription des gènes de défense (Kaminaka *et al.*, 2006).

Nous avons vu que la RH est un autre type de MCP végétale. Certains acteurs de la voie de signalisation sont bien définis et sont également impliqués dans la réponse à d'autres types de stress amenant à la MCP chez les plantes, comme les stress abiotiques.

#### **I.4.4. La MCP induite par des stress abiotiques**

Divers stress abiotiques peuvent perturber le fonctionnement des cellules végétales allant même jusqu'à induire la MCP. Nous ne verrons ici que quelques stress, comme la salinité, le stress hydrique et les UV.

##### **I.4.4.1. Induction de la MCP par une forte salinité**

Lorsque la salinité est trop élevée, celle-ci peut être nocive pour les plantes. Les plantes utilisent des modifications de concentrations pour divers éléments protecteurs (les sucres, les acides organiques ou les protéines) lorsqu'elles sont exposées à un stress ionique. Par exemple, un traitement au NaCl des feuilles du pois (*Pisum sativum*) est généralement toxique pour les cellules. En effet, de sérieux dommages sont causés au niveau des chloroplastes liés à la formation de superoxyde et de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Hernández *et al.*, 1995). Par contre, certaines plantes tolérantes ont des activités croissantes pour des enzymes les protégeant de la toxicité des ROS (comme les antioxydants), telles que la superoxyde dismutase et l'ascorbate peroxydase (Hernández *et al.*, 1995). D'autres études menées sur des plants de tomate (*Lycopersicon pennellii*) ou du millet des oiseaux (*Setaria italica*) arrivent aux mêmes conclusions : le stress salin a des effets sur la peroxydation des lipides et sur les antioxydants (Shalata et Tal, 1998, Sreenivasulu *et al.*, 2000).

Le stress salin est perçu en premier lieu par les racines de la plante. En formant de nouvelles racines, les plantes peuvent survivre à ce stress transitoire (Katsuhara et Shibasaka, 2000). Malgré les changements de l'abondance de certaines protéines observés chez les racines d'*Arabidopsis* exposées au NaCl, la régulation post-transcriptionnelle module toujours

l'activité des gènes associés à la réponse de ce stress (Jiang *et al.*, 2007). En particulier, la protéine ATG8, qui est nécessaire pour la formation de l'autophagosome, fait partie tout comme ATG18a, des protéines dont l'expression est stimulée après une exposition à des concentrations importantes en sels (Slavikova *et al.*, 2008, Liu *et al.*, 2009).

C'est sur les racines de l'orge exposées à un stress salin que la première MCP provoquée par ce stress a été démontrée (Katsuhara et Shibasaka, 2000). Une dégradation du noyau de la cellule a été observée 24 h après un traitement de 300 mM de NaCl. Plusieurs expériences ultérieures ont permis de mettre en évidence divers composés probablement impliqués dans l'initiation de la réponse au stress salin par les plantes. On a également observé chez la levure et *Arabidopsis thaliana* qu'un déséquilibre ionique cause la fragmentation du noyau, la vacuolisation et enfin la lyse des cellules subissant un stress salin (Huh *et al.*, 2002). Encore une fois, cette MCP est détectée chez des protoplastes (cellules végétales dépourvues de paroi cellulaire) de tabac exposés au sel, et fait intervenir les ROS et le déséquilibre ionique de la cellule (Lin *et al.*, 2006).

#### **I.4.4.2. Induction de la MCP par le stress hydrique**

Le manque d'eau, ou stress hydrique, peut être problématique pour la vie d'un organisme. Ce stress mène à la formation de ROS qui vont activer des voies de signalisation pour limiter les dommages causés, ou activeront la MCP. Dans ce cas, une inhibition de la croissance et une baisse de la conductance des stomates sont observées (Smirnoff, 1993). Les ROS ayant un effet sur la peroxydation des lipides, déstabilisent la membrane jusqu'à sa dégradation (Thompson *et al.*, 1987).

Chez le pois (*Pisum sativum*), une diminution de plusieurs activités cellulaires est provoquée par le stress hydrique. Ainsi, on a observé une réduction de la photosynthèse, de la transpiration, et de l'oxydase glycolate (Moran *et al.*, 1994). À l'opposé, la superoxyde dimustase a vu son activité augmenter contribuant ainsi à la formation des ROS (Mittler *et al.*,

2004). La sécheresse induit aussi une augmentation des métaux catalytiques, dont le cuivre qui aurait un rôle crucial dans la toxicité des ROS (Moran *et al.*, 1994). Les plantes mutées pour le gène "drought hypersensitive/squalene epoxidase 1-5 (*dry2/sqe1-5*)" sont plus sensibles au stress hydrique. La réponse de leurs stomates en est altérée, et la composition en stérols au niveau de leurs racines est défectueuse, ce qui contribue à la formation des ROS (Posé *et al.*, 2009).

Comme pour le stress salin, la démonstration de l'activation de la MCP chez les plantes subissant un stress hydrique n'a été faite que récemment. La MCP de type autophagique est déclenchée lorsque le milieu environnant de la racine est déficient en eau (Liu *et al.*, 2009). Dans cette voie de signalisation, le gène *Atg18* est surexprimé ainsi que la NADPH Oxydase (Liu *et al.*, 2009). Malheureusement, peu d'éléments sont connus dans la MCP racinaire activée au cours d'un stress hydrique. Par contre, on sait que l'expression du gène *BI-1* (Bax Inhibitor-1) augmente lors d'un stress hydrique (Duan *et al.*, 2010). La protéine BI-1 est un atténuateur de la MCP, et lors d'un stress du RE, elle va aider à la sortie du calcium dans le cytoplasme (cf. partie I.4.2.2.3.2.).

#### **I.4.4.3. Induction de la MCP par les UV-C/UV-B**

Les rayons ultraviolets (ou UV) sont classés en fonction de leur longueur d'onde : les UV de type A (entre 320 nm et 380 nm), les UV-B (entre 280 nm et 320 nm), et enfin les UV-C (entre 200 nm et 280 nm). Après une exposition des cellules à ces rayonnements électromagnétiques, des dommages à l'ADN apparaissent. Ce sont des facteurs qualifiés de génotoxiques. Ce dernier type de stress abiotique provoque lui aussi la MCP. De ce fait, les UV ont beaucoup été utilisés pour induire l'apoptose chez les cellules animales. Heureusement, la couche d'ozone et l'atmosphère constituent une forme de défense naturelle puisqu'ils sont un bouclier pour la plupart de ces radiations dangereuses. Ces protections filtrent, voire arrêtent ces rayons : ainsi, la grande majorité de la lumière UV, qui atteint la surface de la Terre, appartient à la gamme des UV-A.

Les deux premiers types d'UV n'ont pas les mêmes conséquences sur les plantes. Les UV-A affectent la croissance et la signalisation cellulaire, puisqu'ils interfèrent avec l'induction d'une enzyme clé dans la voie de biosynthèse des flavonoïdes (Wang *et al.*, 2012). Les UV-B eux, ont un effet plus général sur la croissance, le développement, la morphologie et le métabolisme. En effet, ils induisent la formation de dimères de thymines qui causent des dommages à l'ADN et à l'ARN. Non réparés, ces dimères perturbent la transcription des gènes, la réplication de l'ADN, donc le métabolisme cellulaire. Lorsque les plantules sont placées à la lumière après une irradiation, les dommages sont toujours plus conséquents (Dany *et al.*, 2001). En effet, l'exposition aux UV-B cause une perte de chlorophylle et une augmentation des dommages lipidiques (John *et al.*, 2001). De plus, un grand nombre de gènes associés à la sénescence sont induits suite à une exposition aux UV-B, ce qui a pour conséquence, l'apparition de symptômes caractéristiques de la sénescence. Les dimères de la protéine UVR8, pour "UV Resistance locus 8", perçoivent les UV-B chez les plantes (Rizzini *et al.*, 2011). Cette perception se fait via les résidus tryptophane de la protéine qui provoquent la conversion du dimère en monomères (O'Hara et Jenkins, 2012). Plusieurs voies sont activées par UVR8 pour une meilleure réponse de la plante (Tilbrook *et al.*, 2013).

Les UV-C restent les plus dommageables pour les organismes. Suite à une exposition aux UV-C des cellules (animales ou levures), il a été démontré que de nouveaux produits étaient formés, dont les ROS et des dimères de pyrimidines. Ces molécules sont très mutagènes. En temps normal, suite à l'apparition de fragmentation de l'ADN, des systèmes de réparation se mettent en place. Des corrections ou des excisions sont effectuées sur les anomalies décelées. Ce phénomène est conservé pour les êtres vivants, et il est appliqué si les dommages ne sont pas trop conséquents pour la viabilité des organismes, ni trop coûteux en ressources.

En 1998, Danon et Gallois ont étudié pour la première fois les changements induits, suite à un traitement aux UV-C sur le noyau de protoplastes et de plantules d'*Arabidopsis thaliana*. Pour des doses supérieures à 10 kJ/m<sup>2</sup>, les premiers symptômes de MCP sont apparus. En effet, la cellule déclenchait son programme de mort puisque les dommages causés par l'irradiation



étaient trop importants. Les UV-C provoquent la fragmentation de l'ADN en petits fragments de 180 pb, et son multiple, par l'activation d'une DNase. La confirmation de ce résultat a été obtenue par l'étude de la cinétique de la fragmentation de l'ADN évaluée par Southern. Ainsi, plus le temps après l'exposition était long, plus la fragmentation augmentait. En complément de cette analyse, une quantification des noyaux fragmentés marqués *in situ* avec des tests TUNEL a été faite, sur des protoplastes exposés aux UV-C. Encore ici, le nombre de noyaux marqués augmentait avec le temps et la dose appliquée. Les doses d'UV-C requises pour induire la même réponse de mort sont en moyennes 1000 fois supérieures pour les plantes, les cellules animales étant beaucoup plus sensibles. Les végétaux possèdent des caractéristiques qui leur sont propres et qui les protègent des UV-C, telles que la présence de flavonoïdes, ou des parois cellulaires et les cires de la cuticule (réflexion des UV).

Quelques protéines répondant à une exposition aux UV-C ont été identifiées, soit la métacaspase-8 qui régule la réponse de la cellule (He *et al.*, 2008) et la HY1 qui protège la cellule des effets des UV-C (Xie *et al.*, 2012). Les plantes mutées dans le gène *HY1* sont hypersensibles aux UV-C puisque les voies de biosynthèse des caroténoïdes et des flavonoïdes sont altérées et la régulation des défenses par les antioxydants est diminuée (Xie *et al.*, 2012).

Ce moyen simple d'induire la MCP est retenu pour notre étude. Un éventail de doses sera appliqué pour analyser la réponse de la plante.

#### **I.4.5. Les molécules intervenant au cours de la MCP végétale**

Suite à un stress biotique ou abiotique, l'organisme met en place des réponses d'adaptation si les dommages ne sont pas trop conséquents, sinon, il induira la MCP. Les organites intracellulaires, mitochondries, chloroplastes et peroxyosomes, peuvent être très impliqués dans les productions et les variations de concentrations de messagers secondaires. Nous ne développerons pas les effets des hormones végétales sur l'induction des voies de signalisation en réponse au divers stress environnementaux, mais elles ont également une importance dans

la transduction des signaux. Ici, nous étudions brièvement quelques messagers secondaires, comme les flux d'ions avec le calcium, les ROS et le cyt *c*, mais aussi quelques protéines actrices du devenir de la cellule.

#### **I.4.5.1. Molécules impliquées dans la signalisation cellulaire**

Nous avons rapidement vu au début que les protéines de la famille de Bcl-2 peuvent influencer la perméabilité de la membrane mitochondriale chez les cellules animales (Oltval *et al.*, 1993). Les divers signaux de stress cellulaires sont perçus et transmis aux organites. Ces éléments cellulaires initient l'exécution d'une voie de signalisation, pouvant aboutir à la MCP. Beaucoup de régulateurs protéiques ont été caractérisés chez l'humain ou la mouche, mais la grande majorité d'entre eux sont absents du génome d'*Arabidopsis*. Les plantes utilisent probablement d'autres régulateurs pour contrôler ce processus. Par contre, certains messagers secondaires qui activent les voies de signalisation menant à la MCP chez les plantes ont également un rôle semblable chez d'autres organismes. Nous parlerons ici du rôle du cyt *c*, du calcium et des ROS.

##### **I.4.5.1.1. Le rôle du cytochrome *c*, ou cyt *c***

Comme nous l'avons vu précédemment, le cyt *c* intervient dans la cascade de signalisation de la MCP chez les animaux. Il fait partie de la chaîne mitochondriale du transport des électrons, et de l'expulsion des protons de la matrice vers l'espace inter-membranaire. Plus précisément, le cyt *c* se trouve dans l'espace entre les deux membranes de la mitochondrie, et permet le transport des 2 électrons du complexe III au complexe IV de la chaîne. Ces deux électrons seront assimilés à  $\frac{1}{2}$  molécule  $O_2$  et 2 protons ( $H^+$ ) pour former une molécule d'eau. Néanmoins, la sortie du cyt *c* de la mitochondrie peut être causée aussi bien par les ROS, que par l'élévation du calcium, ou par l'inhibition de la chaîne de transport des électrons (Hoerberichts et Woltering, 2002).

Chez les cellules végétales, la sortie du *cyt c* de la mitochondrie a été associée à certaines MCP. Dans un premier temps, des études ont montré que la perte du potentiel de la membrane mitochondriale ( $\Delta\Psi_m$ ) se produisait tôt dans la MCP végétale, et était un élément important pour l'exécution de la mort (Yao *et al.*, 2004). Cette perte provoque d'abord des changements morphologiques du noyau, et éventuellement est accompagnée par la sortie du *cyt c* par les pores de la membrane externe de la mitochondrie. Plusieurs protéines peuvent avoir des effets sur la perméabilité de la mitochondrie et activer la MCP. Par exemple, la protéine ACD2 (Accelerated Cell Death2) qui est localisée aux chloroplastes, peut altérer les fonctions de la mitochondrie lorsqu'elle est surexprimée ou absente. L'action de ce régulateur de la MCP suggère qu'il y a une communication entre les chloroplastes et les mitochondries pour activer la MCP (Yao *et al.*, 2004).

Rares sont les protéines présentes à la surface de la membrane externe de la mitochondrie, comparée à la membrane interne. Parmi ces quelques protéines, on trouve la VDAC, pour "Voltage-Dependent Anion Channel", qui est un pore membranaire facilitant les échanges entre l'organite et le cytosol. VDAC est impliquée dans les pores de perméabilité transitoire, qui, lorsqu'ils sont ouverts, provoquent la perte du potentiel de la membrane interne, donc une sortie du *cyt c* (Kusano *et al.*, 2009).

La sortie du *cyt c* ne se produit pas pour tous les types de MCP. Chez les végétaux, son rôle n'a pas encore été bien défini comme pour les animaux (cf. partie I.4.5.1.1.) avec la formation de l'apoptosome.

#### **I.4.5.1.2. Le rôle du calcium**

L'ion calcium, ou  $\text{Ca}^{2+}$ , est un messager secondaire universel, contrôlant un grand nombre de processus biologiques, incluant l'apoptose animale. Chez les plantes, le calcium est aussi une molécule signal. Son action se fait grâce aux variations de sa concentration dans le cytoplasme, en provenance des organites intracellulaires. Ainsi, les flux de calcium peuvent

aussi activer directement certaines voies de MCP en réponse à un stress général ou lors des mécanismes de défense de la plante.

Le RE, avec les mitochondries et la vacuole, est l'un des réservoirs du calcium dans la cellule. C'est la raison pour laquelle une sortie importante de  $\text{Ca}^{2+}$  du RE est observée au cours d'un stress du RE. L'élévation de la concentration en calcium dans le cytoplasme peut se faire par les pompes à  $\text{Ca}^{2+}$  ou par les canaux perméables au  $\text{Ca}^{2+}$  présents sur les membranes biologiques. Chez les animaux, des dommages au RE peuvent déclencher l'activation des caspases. La voie de signalisation du stress du RE est liée à l'apoptose : une sortie du calcium des organites et une diminution importante de production en ATP sont des éléments indispensables de l'induction de la MCP par le RE. En conséquence, on observe l'apparition de protéines anormalement repliées, accompagnée de sécrétions de protéines apoptotiques du compartiment RE-Golgi (Chae *et al.*, 2004).

Le calcium peut réguler d'autres molécules. La NADPH oxydase a un rôle dans la flambée oxydative (cf. partie I.4.5.1.3.), et pourrait être régulée par le calcium au niveau des motifs EF-hand en N-terminale de la protéine (N-ter). Il a été montré chez la pomme de terre (*Solanum tuberosum*) que la NADPH oxydase peut être activée par phosphorylation grâce à l'activation de protéines kinases dépendantes de la sortie du calcium du RE, dont la CDPK5 (Kobayashi *et al.*, 2007). Également, un traitement à l'ozone de suspensions cellulaires d'*Arabidopsis thaliana* crée un influx de calcium du RE et provoque la formation de ROS, par l'activation de la NADPH oxydase (Kadono *et al.*, 2010). Un système à peu près équivalent (protéines kinases/NADPH oxydase) serait requis lors d'une infection par un agent pathogène pour permettre une propagation rapide du signal (Dubiella *et al.*, 2013).

Les ROS, qui sont produits en réponse à divers stimuli physiologiques, fonctionnent comme des messagers cellulaires, et à leur tour, modulent l'activité des protéines. L'une de leurs actions serait d'activer l'ouverture des canaux à calcium (Mori et Schroeder, 2004).

### **I.4.5.1.3. Le rôle des espèces réactives de l'oxygène, ou ROS**

Les divers stress environnementaux provoquent des modifications de l'homéostasie cellulaire par la production de ROS. L'accumulation de ces composés est toxique et peut entraîner la mort de la cellule, voire de l'organisme entier.

L'oxygène est utilisé au cours des réactions du métabolisme aérobie, pour fournir de l'énergie à la plante. Les cytochromes de la chaîne respiratoire réduisent l'oxygène. Mais en parallèle, des radicaux oxygénés sont produits, ce qui constitue l'une des principales sources de ROS dans la cellule végétale. Parmi ces molécules, des radicaux libres très réactifs sont retrouvés dans la cellule comme le radical superoxyde ( $O_2^{\bullet-}$ ), le radical hydroxyle ( $\bullet OH$ ) ou le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ). Ces dérivés de l'oxygène ne sont que partiellement réduits en  $H_2O$ , car une partie des électrons s'échappent et conduisent à la formation du radical  $O_2^{\bullet-}$ . Cette molécule est un intermédiaire toxique qui diffuse facilement pour aller former d'autres composés, comme le  $H_2O_2$  (qui produit lui-même  $\bullet OH$ , radical très délétère). Le peroxyde d'hydrogène est une molécule signalé qui diffuse rapidement au travers des membranes, et peut stimuler l'expression de certains gènes, comme ceux codant pour des antioxydants. En parallèle, les gènes reliés à la photosynthèse ne seront plus transcrits, notamment, pour limiter la production de ROS (Jabs, 1999, Parent *et al.*, 2008).

Les organites associés à cette production de ROS sont les chloroplastes (pendant la photosynthèse), les mitochondries (au cours de la chaîne du transport des électrons) et les peroxysomes. Ils deviennent les éléments centraux du contrôle du stress oxydatif causé par une variation de l'environnement, comme nous allons le voir un peu plus en détail. Ensuite, nous verrons qu'une enzyme participe aussi à la production des ROS.

Les chloroplastes sont la principale source de production des ROS chez les plantes (Foyer *et al.*, 1994, Dat *et al.*, 2000). La photosynthèse est une succession de réactions redox qui absorbent l'énergie lumineuse et la transforment en énergie cellulaire (production de NADPH et d'ATP). Les électrons d'une molécule d'eau sont transportés le long d'une chaîne pour

éventuellement être fixés par le NADP<sup>+</sup>. Lorsque les conditions pour la fixation du CO<sub>2</sub> sont limitantes, d'autres accepteurs d'électrons comme l'O<sub>2</sub> peuvent intervenir. Ainsi, des molécules de O<sub>2</sub><sup>•-</sup> se forment dans le stroma du chloroplaste (Dat *et al.*, 2000).

La seconde source de production de ROS se déroule dans le peroxyosome, qui participe à la photorespiration. En fonction de la localisation des peroxyosomes dans un tissu, les fonctions de ces organites diffèrent. Les peroxyosomes sont chargés de la détoxification de la cellule en dégradant les composés inutiles ou toxiques. Lorsque la photosynthèse est inhibée, l'oxygénation du ribulose 1,5-biphosphate est favorisée, ce qui entraîne la production de phosphoglycolate. Ce dernier est transloqué au peroxyosome, où il est converti en glyoxylate et forme du NO (Corpas *et al.*, 2001). Cependant, le peroxyosome a deux rôles : un initiateur du stress oxydatif et une source de molécules signales, dont les ROS et les RNS (espèces réactives de l'azote) (Del Río *et al.*, 2006).

La respiration peut aussi permettre la formation de ROS dans certaines conditions (Dat *et al.*, 2000). La chaîne de transport d'électrons de la mitochondrie peut former du O<sub>2</sub><sup>•-</sup> lorsque l'oxygène entre en compétition avec les accepteurs naturels d'électrons. Dans le cas d'un traitement des protoplastes aux UV-C, des observations microscopiques ont montré que les mitochondries formaient des agrégats au milieu du cytoplasme et perdaient leur potentiel transmembranaire (Gao *et al.*, 2008). Il y avait donc une perte de la mobilité des organites, accompagnée de la formation de ROS par les chloroplastes, et d'une augmentation de la concentration du calcium cytoplasmique, qui est l'un des régulateurs des ROS. Par ailleurs, l'AOX, ou l'oxydase alternative, a une influence conséquente sur la formation des ROS ou des RNS par les mitochondries (Vanlerberghe, 2013).

Plusieurs enzymes sont connues pour être capables de produire des ROS en réponse à un stress biotique, mais celle qui semble la plus importante est la NADPH oxydase. Ce complexe enzymatique est associé à la membrane plasmique et catalyse une réaction assez simple (Dat *et al.*, 2000). Il transfère des électrons du NADPH cytosolique à une molécule O<sub>2</sub> du milieu extracellulaire (Hancock *et al.*, 2001). La grosse sous-unité du complexe fonctionne comme

une pompe à proton, et compense la charge qui traverse la membrane. D'autres composés cytoplasmiques s'ajoutent sur la face interne au complexe pour donner la forme active (Dat *et al.*, 2000, Hancock *et al.*, 2001). Un traitement avec l'acide abscissique (ABA) sur des feuilles de *Zea mays* (maïs) induit la voie de défense des antioxydants. Ce traitement provoque une augmentation de l'activité de la NADPH oxydase, donc la production de ROS. L'ABA déclenche l'influx de calcium. L'augmentation de la concentration cytosolique en  $Ca^{2+}$  stimule la production de ROS par la NADPH oxydase de la membrane plasmique. Au final, il y a une activation de l'activité des enzymes antioxydantes (Jiang et Zhang, 2003).

Les ROS sont considérées comme étant des molécules phytotoxiques et produites par les éléments de l'organisme lui-même. Elles peuvent dégrader tous les constituants cellulaires, comme l'ADN, les protéines, les lipides, etc (Dean *et al.*, 1997). Elles peuvent aussi jouer un rôle dans la signalisation cellulaire vis-à-vis de réponse aux contraintes environnementales. Dat *et al.* (2000) résumant l'ensemble des facteurs biotiques et abiotiques permettant la production de ROS. Au cours de la réponse hypersensible induite par un agent pathogène, le processus de production des ROS, rapide et transitoire, est initié et permet l'induction de nombreux gènes de défense (cf, partie I.4.3.).

#### **I.4.5.2. Quelques protéines régulatrices de la MCP végétale**

Un certain nombre de protéines sont connues pour avoir des fonctions pro-apoptotiques ou anti-apoptotiques selon le type d'induction de MCP. Certaines d'entre elles peuvent amplifier et/ou interagir avec le calcium, les ROS ou le *cyt c* qui régulent aussi la MCP végétale.

##### **I.4.5.2.1. DAD-1 : Defender against Apoptotic Death-1**

Les premières études réalisées sur la protéine DAD-1 ont permis de mettre en évidence son implication dans le contrôle de la MCP chez les animaux. Le gène *DAD-1* a été exprimé dans une lignée cellulaire mutante de hamster (lignée parentale BHK21), qui rendait la souche

sensible à la variation de température. Lorsque la température de croissance des cellules passait à 39,5 °C, au lieu de 33,5 °C, cette lignée cellulaire, tsBN7, entrait en apoptose. La perte de fonction de cette nouvelle protéine chez ces mutants entraînait l'entrée en apoptose des cellules (Nakashima *et al.*, 1993). Tout comme la protéine Bcl-2, DAD-1 a un rôle de suppresseur de la MCP chez les cellules animales.

Des études comparatives des séquences protéiques de DAD-1 ont démontré la conservation du gène dans le règne animal tout comme dans le règne végétal. C'est aussi la protéine humaine DAD-1 qui fut la première protéine identifiée comme ayant un rôle dans la MCP végétale (Gallois *et al.*, 1997). La protéine AtDAD-1 d'*Arabidopsis thaliana*, qui n'a que 49 % d'identité avec celle de hamster, peut lorsqu'exprimée dans cellules tsBN7, les empêcher également d'entrer en apoptose. Elle est donc aussi efficace que celle de l'humain pour sauver de l'apoptose les cellules de hamster (Gallois *et al.*, 1997). Une confirmation de son rôle d'inhibiteur de la MCP a été déterminée avec la protéine DAD-1 du riz, qui empêchait elle aussi l'entrée en apoptose de la lignée tsBN7 (Tanaka *et al.*, 1997).

Une étude de l'expression des protéines DAD chez des plantes d'*Arabidopsis* irradiées avec les UV-C a permis de caractériser leur rôle dans cette réponse (Danon *et al.*, 2004). Il existe deux homologues du gène chez la plante modèle, qui ne diffèrent l'une de l'autre que par cinq acides aminés en N-ter. L'étude s'est orientée sur le gène *AtDAD-1*, qui, lorsque transcrit, est localisé au RE. Une surexpression de *AtDAD-1* et *AtDAD-2* permet de diminuer significativement la fragmentation de l'ADN suite à un traitement aux UV-C (Danon *et al.*, 2004). Ainsi, après une irradiation aux UV-C des plantes, la protéine AtDAD-1 doit limiter ou prévenir le stress du RE, ou doit s'associer directement à des régulateurs de la MCP. L'homologue de DAD-1 chez l'algue verte *Chlamydomonas reinhardtii* a été aussi étudié en réponse aux UV-C. Suite à une exposition de 12 J/m<sup>2</sup> aux UV-C des cellules, une relation a été établie entre la régulation négative de *DAD-1* et la régulation positive de *APAF-1*, pour "protease activating factor-1" (Moharikar *et al.*, 2007). Cette diminution est corrélée avec l'initiation de la MCP des cellules et accompagnée par l'activation du facteur pro-apoptotique APAF-1 (Moharikar *et al.*, 2007). Chez le blé, DAD-2 serait également un régulateur négatif



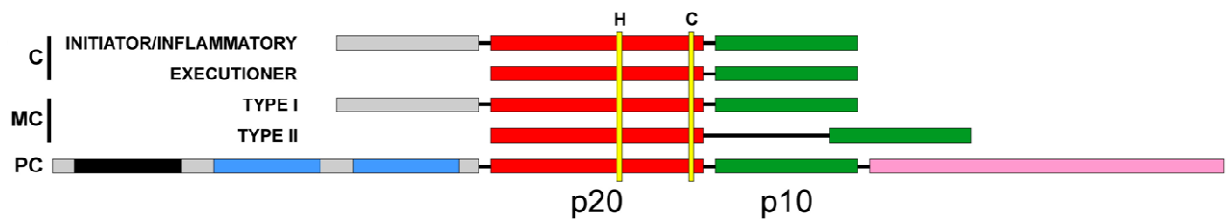
de la MCP et son expression est diminuée quelques temps après une infection par un champignon (Wang *et al.*, 2011).

Mais pour le moment, nous ne connaissons pas précisément le mode d'action de ces protéines en réponse à divers stress qui provoquent la MCP.

#### **I.4.5.2.2. Homologues des caspases animales : les métacaspases**

Les caspases animales ont leurs homologues de structure chez les plantes, et sont regroupées en une famille de protéines (Uren *et al.*, 2000). L'hypothèse d'une origine commune pour la famille des caspases-like est très probable, et cela implique une homologie fonctionnelle de ces protéines. Cette superfamille résulte de l'évolution d'une cystéine protéase ancestrale commune, ayant donné les caspases pour les animaux, les paracaspases présentes chez les métazoaires et le *Dictyostelium*, et les métacaspases retrouvées chez les plantes, les champignons et les protozoaires.

Les métacaspases clivent après un résidu basique, une arginine ou une lysine, alors que les caspases clivent après un résidu aspartate (cf. partie I.2.1.). Chez *Arabidopsis thaliana*, neuf métacaspases ont été découvertes, dont trois appartenant au type I et six au type II, regroupées selon la présence d'une partie N-terminale supplémentaire pour le type I, nommée prodomaine (Figure 4, Vercammen *et al.*, 2004). Cette extension N-ter comprend un domaine en doigt de zinc et une région riche en proline (Vercammen *et al.*, 2004). L'activité auto-catalytique des métacaspases de type II dépend d'un résidu cystéine catalytique et génère les sous-unités p20 et p10. Mais, il semble que les métacaspases de type II ne soient pas directement responsables de l'activité des caspases-like retrouvée chez les plantes. En effet, les métacaspases 4 et 9 ne clivent pas les substrats spécifiques des caspases (Vercammen *et al.*, 2004). Cette activité serait due aux sapases, qui sont des sérines protéases.



**Figure 4.** Représentation des différents domaines des protéines de la superfamille des caspases (tirée de Vercammen *et al.*, 2007). Légende : C, caspases; MC, métacaspases; PC, paracaspases; sous-unité p20 en rouge et p10 en vert. Les résidus histidine et cystéine sont indiqués en jaune. Le prodomaine est en gris. Les paracaspases comprennent un domaine de mort (noir) et un ou deux domaines Ig, immunoglobuline (bleu). Le domaine en rose est impliqué dans l'ubiquitinylation de la protéine.

Comme pour beaucoup de gènes appartenant à une même famille, les métacaspases ont des spécificités d'expression temporelle et développementale, ainsi qu'une spécificité de réponse à divers stress biotiques (Kwon et Hwang, 2013). Plus précisément, la métacaspase 9 est autorégulée par le pH (activée à un pH acide) et la S-nitrosylation, alors que les métacaspases 4 et 5 le sont par le calcium (Vercammen *et al.*, 2007). La TSN, ou "Tudor Staphylococcal Nuclease", est connue pour être clivée par la caspase 3 chez l'homme, et est l'un des tout premiers substrats découverts pour être clivés par une métacaspase (Sundström *et al.*, 2009). L'homologue végétal de TSN est primordial pour le développement de l'organisme, puisque son absence peut engendrer des problèmes de fertilité. En effet, la TSN doit être clivée pour compromettre la viabilité des cellules. Chez les animaux, les cellules sont plus sensibles à l'apoptose quand son expression diminue. Pour les plantes, il existe deux TSN végétales pour *Arabidopsis*. L'analyse de leur séquence protéique a révélé la présence de plusieurs sites de clivages potentiels pour les métacaspases. L'absence de régulation de TSN cytoplasmique dans les cellules végétales provoque des symptômes de mort (Sundström *et al.*, 2009). Cette molécule est nécessaire pour la survie de la cellule.

Chez le poivron (*Capsicum annuum*), la métacaspase 9 joue un rôle de régulateur positif de la mort cellulaire induite par l'infection de bactéries *Xanthomonas campestris* (Kim *et al.*, 2013). Cette enzyme a aussi pour substrat la phosphoénolpyruvate carboxykinase 1 (PEPCK1), une enzyme clé dans la gluconéogenèse. L'activité de cette dernière est renforcée par la protéolyse dépendante de la métacaspase 9 (Tsiatsiani *et al.*, 2013). Enfin, une autre fonction de la métacaspase 9 a été découverte et montre son implication dans la mort cellulaire lors de la formation des vaisseaux du xylème (Bollhöner *et al.*, 2013, Minina *et al.*, 2013). Dans ce groupe, la fonctionnalité des différents résidus de la métacaspase 1 de la tomate est déterminée pour l'auto-activation de la molécule par la formation d'un lien avec le  $\text{Ca}^{2+}$  et dépendante du pH (Wen *et al.*, 2013).

Plusieurs traitements, comme les UV-C, le  $\text{H}_2\text{O}_2$  ou le methyl viologen, provoquent la production de ROS dans les chloroplastes, et donc une réponse de la plante. Parmi les métacaspases de type II, c'est la métacaspase 8 (ou AtMCP2e) qui semble être impliquée dans les voies de réponse de MCP induite par ces stress abiotiques (He *et al.*, 2008). Cette métacaspase est donc activée par un stress oxydatif, et est régulée soit au niveau transcriptionnel par RCD1, connue pour interagir avec des facteurs de transcription, soit au niveau de son activité protéolytique (He *et al.*, 2008).

Watanabe et Lam ont publié deux articles en 2011 sur les métacaspases de type II, notamment sur la 4, nommée AtMCP2d, qui est la métacaspase la plus abondante dans la cellule. La métacaspase 4 est synthétisée sous une forme inactive. Comme pour les caspases initiatrices, la métacaspase 4 devient active soit par un autoclivage, soit par un clivage intermoléculaire. Une forte concentration en calcium, beaucoup trop élevée pour refléter la réalité, initierait l'activation de la protéine par son clivage, grâce à la lysine 225, un résidu très conservé (Watanabe et Lam, 2011a). La protéine est un régulateur positif dans la réponse de la MCP induite par un stress biotique ou abiotique (Watanabe et Lam, 2011b). Deux mutants pour ce gène, dont l'expression est fortement diminuée, ont un taux de mortalité réduit après un traitement par des mycotoxines. Par contre, lors d'une surexpression de l'enzyme ou de ses

produits, les auteurs observent une progression accélérée de la MCP chez ces plantes (Watanabe et Lam, 2011b).

Des expérimentations ont aussi été menées sur les métacaspases de type I (Coll *et al.*, 2010). Notamment, une étude s'est penchée sur l'implication du prodomaine des métacaspases 1 et 2 dans la régulation de la RH. Ces enzymes ont une séquence plus proche de la protéine LSD1 que la métacaspase 3. La métacaspase 1 interagit avec LSD1, qui est un régulateur de la réponse hypersensible chez les plantes (Dietrich *et al.*, 1997). Par contre, ce n'est pas le cas de la métacaspase 2. De plus, le prodomaine de la métacaspase 1 régulerait de manière négative l'activité de pro-mort de LSD1 (Coll *et al.*, 2010). Ainsi, la métacaspase 2, qui a une activité antagoniste à la 1, protège les cellules de la mort, lorsqu'une réponse de type hypersensible est induite. Plus récemment, un lien entre l'autophagie et la métacaspase 1 a été révélé avec la découverte d'un parallèle entre ces deux voies. Ces dernières sont régulées positivement pour la RH chez de jeunes plantes, mais régulées négativement au cours de la sénescence pour des plantes âgées (Coll *et al.*, 2014). De plus, trois métacaspases de type II sont connues pour le maïs, *Zea mays*. L'activité de ces enzymes est ajustée en réponses à l'ozone et à la sénescence chez les plantes âgées, puisqu'elle augmente avec le temps (Ahmad *et al.*, 2012).

#### **I.4.6. BI-1 : Bax Inhibitor-1**

La protéine Bax Inhibitor-1 de l'homme a été d'abord identifiée par Xu et Reed (1998), en utilisant le phénotype létal de l'expression de Bax chez la levure. Bax est absent chez la levure, mais son expression dans cet organisme induit l'apoptose. L'objectif de cette étude était d'identifier des protéines de mammifère pouvant sauver les levures de la mort induite par Bax en utilisant une banque d'expression d'ADNc. BI-1 s'est montrée capable de sauver les cellules de la mort induite par Bax. Par ailleurs, certains éléments caractéristiques de la famille Bcl-2 sont présents chez BI-1. Ainsi, grâce à cette étude, BI-1 a été identifié comme étant un nouveau régulateur de la voie de signalisation de la MCP contrôlée par Bcl-2 et Bax. Plus spécifiquement, on sait maintenant que BI-1 supprime la MCP en protégeant les cellules lors

d'un stress du RE (Lisbona *et al.*, 2009; Castillo *et al.*, 2011). Nous verrons plus en détails le mode d'action de BI-1.

#### **I.4.6.1. Généralités sur BI-1 et la famille de gènes**

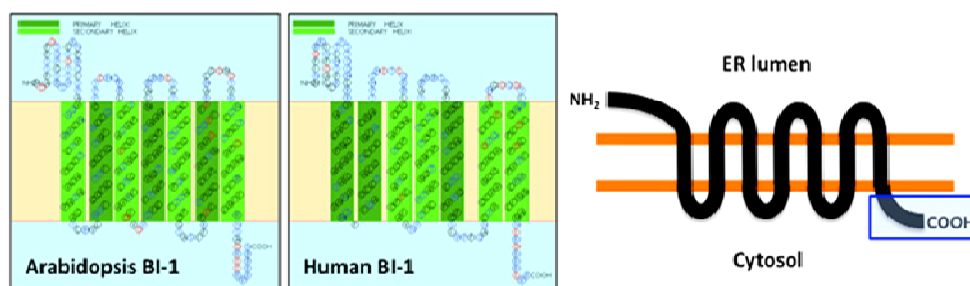
Comme nous l'avons brièvement vu (cf. partie I.2.2.), certaines protéines sont dites pro-apoptotiques comme Bax, et d'autres sont anti-apoptotiques. En effet, la protéine Bax favorise la sortie du cyt *c* de la mitochondrie dans le cytosol (Manon *et al.*, 1997), et induit donc la MCP. En plus d'augmenter la concentration du cyt *c* cytoplasmique, Bax aurait un effet sur la diminution de la quantité de la cytochrome *c* oxydase, la dernière protéine de la chaîne respiratoire. Enfin, il faut soit l'expression de Bcl-2 dans les cellules animales, soit celle Bcl-x<sub>L</sub> dans les levures pour prévenir la sortie du cyt *c* de la mitochondrie.

Initialement, le rôle de BI-1 a été étudié dans la réponse de MCP induite par Bax dans la levure (Kawai *et al.*, 1999, et Sanchez *et al.*, 2000). Un homologue végétal de ce gène a été identifié chez *Arabidopsis* et *Oryza sativa* (le riz). L'expression d'ADNc de *OsBI-1* dans les levures supprime la mort cellulaire induite par la protéine Bax (Kawai *et al.*, 1999). Cette protéine est bien conservée chez les animaux et les végétaux, puisqu'elle a été mise en évidence par l'homologie des séquences en acides aminés. Lorsque l'expression de protéines pro-apoptotiques est faite chez la levure, AtBI-1 peut supprimer ce phénotype de mort, comme pour celui des mammifères. De plus, une régulation positive de l'expression du gène *AtBI-1* est constatée suite à une infection par un agent pathogène ou une blessure (Sanchez *et al.*, 2000). Malgré l'absence de Bax chez les végétaux, il y aurait tout de même une conservation de la fonction de BI-1 chez les végétaux.

BI-1 fait partie de la famille TMBIM, ou "transmembrane Bax inhibitor-containing motif" puisque cette petite protéine possède le motif protéique de la famille (Zhou *et al.*, 2008). Les études génétiques et bioinformatiques ont démontré une origine procaryote avec une bonne conservation des gènes de cette famille au travers des différentes espèces (Hückelhoven,

2004). Les membres de TMBIM possèdent entre six et sept domaines transmembranaires. BI-1 possède d'ailleurs sept domaines transmembranaires (Carrara *et al.*, 2012, et Figure 5).

Une fusion du gène *BI-1* avec celui de la GFP (green fluorescent protein) sous le contrôle du promoteur constitutif 35S a permis de localiser BI-1 à la membrane du RE (Kawai-Yamada *et al.*, 2001). Une étude de la fonction du gène a été faite *in planta* par l'utilisation de plantes transgéniques qui ne possèdent pas le gène inducteur Bax. Lors d'une expression de Bax (sous le contrôle d'un promoteur inductible) induite par la dexaméthasone dans *Arabidopsis*, ces plantes montrent les caractéristiques de la MCP. Mais, le phénotype de mort cellulaire disparaît lorsqu'AtBI-1 est surexprimée chez ces mêmes plantes. La protéine BI-1 active permet donc la suppression de l'action de Bax aussi bien chez les animaux que chez les végétaux.



**Figure 5. Représentation des structures des protéines de BI-1 de l'homme et d'*Arabidopsis* (adaptée de Watanabe et Lam, 2009).**

Plusieurs autres homologues du gène *BI-1* sont retrouvés chez d'autres plantes. Ainsi, *BI-1* est aussi présent dans le génome du colza (*Brassica napus*) et du tabac (*Nicotiana tabacum* : Bolduc *et al.*, 2003), de la tomate (*Lycopersicon esculentum* : Chae *et al.*, 2003) ou du piment rouge (*Capsicum annuum* : Isbat *et al.*, 2009). Comme précédemment, la protéine est localisée à la membrane du RE, la partie C-ter se trouvant du côté cytosolique (Figure 5). Cette partie est primordiale pour maintenir la fonction de protection de la protéine contre la mort, induite par Bax (Kawai-Yamada *et al.*, 2004). En effet, sans ces 14 derniers acides aminés, la protéine, toujours localisée au RE chez les cellules de tabac et de la levure, n'est plus en

mesure d'inhiber la MCP de ces cellules. Le motif consensus de ces acides aminés est EKDKKKKEKK, une région riche en lysines (Kawai-Yamada *et al.*, 2004). Ces derniers sont essentiels pour assurer le rôle anti-apoptotique de BI-1, pour sa fonction d'adhésion via l'actine et pour ses fonctions de régulation du calcium dans la cellule (Kim *et al.*, 2008, Lee *et al.*, 2010). Chez la plante modèle *Arabidopsis thaliana*, deux autres gènes présentant de fortes homologies avec *BI-1* ont été découverts (Xu et Reed, 1998, Lam *et al.*, 2001). La séquence la plus conservée chez les deux autres *BI-like* est la partie C-ter des protéines prédites. Ces dernières ont des spécificités : *AtBI-2* (sur le chromosome 4) a une séquence différente en N-ter de *BI-1*, et *AtBI-3* (sur le même chromosome que *BI-1*, le 5) a perdu le domaine en N-ter. Par contre, il a été démontré que seul BI-1 intervenait dans plusieurs processus de MCP puisque l'expression de ces deux *BI-like* était beaucoup plus faible.

#### **I.4.6.2. BI-1 régule le calcium**

Le RE étant le réservoir de la cellule en calcium, il est probable de par sa localisation que BI-1 intervienne dans la régulation du calcium cytosolique et/ou l'équilibre redox (Matsumura *et al.*, 2003). D'un côté, il est possible que la protéine s'oligomérisse pour former des pores ou des canaux ioniques (Xu et Reed, 1998, Bolduc *et al.*, 2003). D'un autre côté, il a été montré que la surexpression de BI-1 protège les cellules de souris qui ont subis un stress du RE, alors qu'une diminution de la quantité de  $Ca^{2+}$  provenant du RE stimule le déclenchement de la MCP, suggérant que BI-1 est bien impliquée dans la régulation du  $Ca^{2+}$  (Chae *et al.*, 2004). D'autres éléments appuient cette implication de BI-1 dans l'homéostasie du  $Ca^{2+}$ . Par exemple, l'interaction de BI-1 avec la calmoduline a été montrée par complémentation de fluorescence dans les cellules de levures et de plantes, suggérant sa participation dans les réponses dépendantes au  $Ca^{2+}$  (Ihara-Ohori *et al.*, 2007). Par ailleurs, BI-1 aurait un effet sur une pompe ATPase à  $Ca^{2+}$  localisée à la membrane du RE. Cette pompe est impliquée dans les mouvements transmembranaires d'ions du calcium et du manganèse. De ces faits, BI-1 a un effet sur l'homéostasie du calcium dans la cellule végétale (Ihara-Ohori *et al.*, 2007).

Plus récemment, BI-1 a été décrite comme étant une protéine de transport de calcium (Bultynck *et al.*, 2012, Rojas-Rivera *et al.*, 2012). Certains pensent que la partie C-ter de BI-1 forme un pore à  $\text{Ca}^{2+}$  au niveau du RE qui permet l'efflux du calcium en cas de stress (Bultynck *et al.*, 2012). En effet, la concentration intra-RE en calcium serait contrôlée par BI-1 qui interagirait au niveau la partie C-ter avec l' $\text{IP}_3\text{R}$ , ou "inositol 1,4,5-trisphosphate receptor" (Kiviluoto *et al.*, 2012). De plus, BI-1 pourrait aussi être un régulateur de l'autophagie chez la souris en utilisant le  $\text{Ca}^{2+}$  relargué par l' $\text{IP}_3\text{R}$  et utilisé comme lien entre le RE et les mitochondries. Cela entraînerait une réduction de la consommation en oxygène de la cellule, et aurait un impact sur le niveau d'ATP provoquant alors l'autophagie (Sano *et al.*, 2012). D'autres pensent que la perméabilité du  $\text{Ca}^{2+}$  du RE est due au pH de la cellule (Kim *et al.*, 2008, Bultynck *et al.*, 2014). En conditions acides, une quantité plus importante de  $\text{Ca}^{2+}$  est libérée dans le cytoplasme via la partie C-ter de BI-1, et cela a des conséquences sur la mitochondrie, comme le recrutement de Bax et la sortie du *cyt c* (Kim *et al.*, 2008). Plus récemment, on a montré qu'une régulation séquentielle par BI-1 de l'uniport mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  et du canal mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$ -dépendant du  $\text{K}^+$  provoque l'ouvertures de ces derniers pour favoriser l'entrée du  $\text{Ca}^{2+}$  dans la mitochondrie, et ainsi induire une protection de la cellule (Lee *et al.*, 2014). Cette fonction de BI-1 liée au pH acide de la cellule est qualifiée d'activité anti-pore  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$  par la protéine (Yun *et al.*, 2012).

Du côté des plantes, très peu d'éléments supplémentaires ont été mis à jour depuis les résultats d'Ihara-Ohori *et al.* (2007). Il a été déterminé que la liaison entre la calmoduline et AtBI-1 se produisait au niveau de la partie C-ter (Kawai-Yamada *et al.*, 2009). La perte du lien avec la calmoduline réduit d'ailleurs fortement l'activité suppresseur de mort de BI-1 dans les plantes (Kawai-Yamada *et al.*, 2009). Enfin, il est possible que chez les plantes, BI-1 régule l'homéostasie du  $\text{Ca}^{2+}$  de la cellule au travers des interactions de la protéine dans le RE avec la calmoduline et l'ATPase- $\text{Ca}^{2+}$  (Ishikawa *et al.*, 2011).



### **I.4.6.3. BI-1 régule les espèces réactives de l'oxygène**

L'autre initiateur du stress du RE, en plus de  $\text{Ca}^{2+}$ , est la formation des ROS par les différents organites cellulaires (Zhang, 2010). Pour prévenir des effets nuisibles des ROS, BI-1 adopte une structure de type coiled-coil (Kawai-Yamada *et al.*, 2004). Cet agencement est perdu lorsque l'on change certains acides aminés. Chez les animaux, BI-1 peut interagir avec d'autres protéines de la famille de Bcl-2 (Xu et Reed, 1998), via son domaine BH4, mais pas avec Bax (Bolduc *et al.*, 2003). Par ailleurs, BI-1 régule aussi cette production de ROS. Dans les cas où BI-1 est surexprimé, la MCP induite par un stress oxydatif est supprimée (Kawai-Yamada *et al.*, 2004, Baek *et al.*, 2004, Eichmann *et al.*, 2006, Ishikawa *et al.*, 2009). Par contre, même si le gène est surexprimé, il ne s'accompagne pas nécessairement d'une réduction de la production de ROS (Kawai-Yamada *et al.*, 2004, Baek *et al.*, 2004). Il s'avère que l'activité du cytochrome p450 est régulée négativement par BI-1 et donc limite l'accumulation de ROS lors d'un stress du RE (Kim *et al.*, 2009).

Les éléments connus pour les végétaux sont nettement moins avancés que ceux pour les animaux. Mais jusqu'à présent, les fonctions de la protéine découvertes chez les animaux sont conservées chez les végétaux lorsque les molécules équivalentes sont identifiées.

### **I.4.6.4. Rôle de BI-1 dans les stress oxydatifs**

Bien que BI-1 ne soit pas essentielle pour le développement des plantes, ni pour la croissance végétative normale, son implication en réponse à plusieurs types de stress biotiques et abiotiques (Watanabe et Lam, 2006) et aussi durant la sénescence (Bolduc *et al.*, 2003, Yue *et al.*, 2012) a été démontrée. En effet, la surexpression d'AtBI-1 retarde la sénescence des feuilles induite par le méthyl jasmonate, ou MeJA, puisqu'il n'y a plus d'élévation du  $\text{Ca}^{2+}$  cytosolique qui activait la voie de MPK6 dépendante du calcium (Yue *et al.*, 2012). Il n'est donc pas surprenant que plusieurs stress activent l'expression de BI-1. Ainsi, il est possible d'induire l'expression de *AtBI-1* aussi bien par le  $\text{H}_2\text{O}_2$  que par l'acide salicylique, dans des

suspensions cellulaires d'*Arabidopsis*, ou encore en réponse aux UV-C chez de jeunes plantules (Djoumad, 2010). Par contre, une exposition prolongée à certains stress, comme les métaux lourds ou la sécheresse, entraîne une diminution de l'expression du gène (Isbat *et al.*, 2009).

BI-1 tient aussi un rôle dans la réponse suite à une infection par un agent pathogène, mais qui diffère selon l'organisme infectieux. En effet, suite à une infection par le champignon *Magnaporthe grisea*, des lignées cellulaires du riz (*Oryza sativa* L.) qui surexpriment *AtBI-1* montrent une résistance significative à la MCP (Matsumura *et al.*, 2003). D'autres infections par divers champignons ont été testées sur les plantes (Eichmann *et al.*, 2006, Imani *et al.*, 2006). Globalement, les auteurs supposent qu'une surexpression de BI-1 aurait le potentiel de supprimer les réactions de défense de l'hôte, puisque les champignons sont des organismes nécrotrophes et ont besoins de cellules mortes pour se développer. En opposition, des mutants d'insertion d'ADN-T dans *BI-1* chez *Arabidopsis* montrent une sensibilité accrue à la bactérie *Pseudomonas syringae* (Kawai-Yamada *et al.*, 2009). Plusieurs autres organismes, comme *Puccinia striiformis* ou *Erysiphe cruciferarum*, ont été testés et confirment l'importance de BI-1 dans la RH (Wang *et al.*, 2012, Weis *et al.*, 2013). Cependant, toutes les plantes n'ont pas la même résistance/sensibilité selon l'organisme pathogène infectant. Les interactions plante-champignon semblent être dépendantes du mode de vie du pathogène (Babaeizad *et al.*, 2009).

BI-1 participerait donc à un grand nombre de réaction de défense et de protection contre diverses agressions. Tout comme chez les animaux, les recherches aboutissent globalement à la conclusion que BI-1 serait un atténuateur de mort lorsqu'un stress du RE est provoqué (Watanabe et Lam, 2008, Duan *et al.*, 2010). Quelque soit le type de stress induisant à une MCP, l'expression de ce gène augmente significativement pour permettre la survie éventuelle de la plante (Isbat *et al.*, 2009, Wang *et al.*, 2012). Ce rôle protecteur de BI-1, en réponse à un stress du RE, nous intéresse pour la poursuite de notre étude.

#### **I.4.7. Les Thiorédoxines (Trx)**

Les thiorédoxines animales sont de petites protéines d'oxydoréduction qui se sont montrées essentielles à la survie des cellules. Comme plusieurs autres protéines impliquées dans la MCP, leurs rôles sont toutefois multiples. Les thiorédoxines apportent des modifications post-traductionnelles sur plusieurs protéines en modifiant leur statut rédox et en régulant la formation des ponts disulfures (Michalska *et al.*, 2009). Elles participent ainsi aux voies de réponse de stress et influencent la sensibilité ou la résistance de la cellule. Ces réactions sont en fait assurées par la super famille des thiorédoxines, regroupant les thiorédoxines, les glutarédoxines, les thiorédoxines-like, et même parfois les peroxyrédoxines. Leur mode d'action et les fonctions connues sont abordés dans la partie suivante.

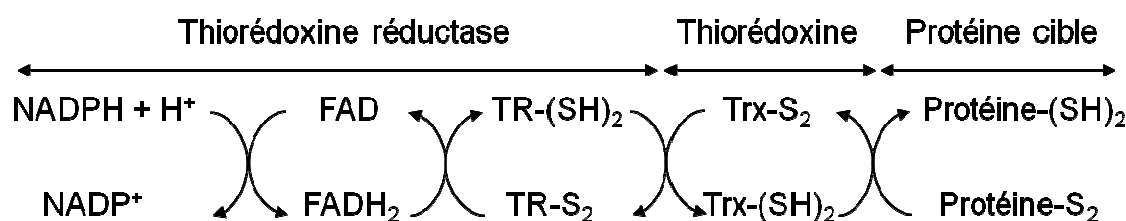
Chez l'homme, seulement deux thiorédoxines ont été identifiées, mais l'absence de l'une ou de l'autre de ces protéines est létale (Holmgren et Lu, 2010). Elles ont donc un rôle essentiel pour empêcher l'activation du programme apoptotique. Chez les plantes, les thiorédoxines constituent une très grande famille de protéines, avec des fonctions diverses. Toutefois, jusqu'à ce jour, l'implication de thiorédoxines végétales dans la MCP n'a pas encore été étudiée. Nous réviserons les informations connues sur les thiorédoxines végétales et évaluerons leur implication possible lors de la MCP induite en réponse aux UV-C.

##### **I.4.7.1. Généralités et fonctions**

Les thiorédoxines (Holmgren, 1972) et les glutarédoxines (Holmgren, 1976) sont présentes chez tous les organismes vivants. Ayant une activité enzymatique semblable, elles sont potentiellement impliquées dans les mêmes processus biologiques. En effet, elles présentent une activité oxydoréductase par la réduction des ponts disulfures des protéines cibles.

Les thiorédoxines se retrouvent sous deux formes : la forme oxydée, notée thiorédoxine-S<sub>2</sub>, et la forme réduite, notée thiorédoxine-(SH)<sub>2</sub>. Une visualisation de ces deux formes a pu être

possible par l'étude du spectre d'émission de la fluorescence de la thiorédoxine chez *Escherichia coli* (Holmgren, 1972). En effet, la protéine ayant deux résidus tryptophane, en position 28 et 31, absorbe l'énergie lumineuse à une longueur d'onde précise, pour émettre à une autre longueur d'onde. Ainsi, en fonction de l'état d'oxydation de la protéine, l'intensité de fluorescence du tryptophane varie : elle est plus haute pour la forme réduite que pour la forme oxydée (Holmgren, 1972). La thiorédoxine réduite va réduire la protéine cible (Protéine-S<sub>2</sub> en Protéine-(SH)<sub>2</sub>) selon le mécanisme général impliquant le NADPH présenté sur la Figure 6. De ce fait, la protéine cible devient active sous la forme réduite. De plus, pour que la thiorédoxine elle-même soit à nouveau active, la forme oxydée, Trx-S<sub>2</sub>, est réduite par la thiorédoxine réductase (NTR, "NADPH-dependent thioredoxin reductase") (Zanetti et Williams, 1967). Cette enzyme comprend au niveau de son centre réactionnel (Zanetti et Williams, 1967) une molécule de NADPH ou de Ferrédoxine (Fd, lorsqu'impliquée dans la phase photochimique chez les plantes). Ultérieurement, nous développerons le mécanisme faisant intervenir la Fd au lieu du NADPH dans le système des thiorédoxines chez les plantes (cf. partie I.4.7.5.3.1.).



**Figure 6.** Mécanisme de la réduction des ponts disulfures des protéines dépendantes du NADPH (adaptée de Meyer *et al.*, 1999). La thiorédoxine réductase dépendante du NADPH est une flavoprotéine de 70 kDa qui comprend deux sous-unités liées à deux molécules de FAD. Abréviations : TR, thiorédoxine réductase; Trx, thiorédoxine.

La masse moléculaire des thiorédoxines se situe entre 12 et 14 kDa (Meyer *et al.*, 1999). Leur site actif, représenté par la séquence Tryptophane-Cystéine-[Glycine/Proline]-Proline-

Cystéine, est très conservé, ce qui permet de regrouper ces enzymes dans la super famille des thiorédoxines (Martin, 1995, Meyer *et al.*, 1999, Meyer *et al.*, 2002)

Quant à elles, les glutarédoxines ont été mises en évidence suite à l'étude de mutants de thiorédoxine chez *E. coli*, qui ne pouvaient répliquer l'ADN du phage T7 (Holmgren, 1976). Le nouveau système en place dans ce cas est composé du NADPH, du glutathion, de la glutathion réductase et d'une dernière fraction de l'enzyme, la glutarédoxine (Holmgren, 1976). Par ailleurs, elles possèdent un site actif assez similaire et bien conservé : Cystéine-Proline-Tyrosine-Cystéine. Ainsi, la glutarédoxine effectue elle aussi la réduction des ponts disulfures de certaines protéines. Par contre, le système thiorédoxine et le système glutarédoxine représentent deux voies métaboliques différentes pour la formation des désoxyribonucléotides par le NADPH. Cependant, étant donné leur fonction commune avec les thiorédoxines, il est important d'en tenir compte dans l'interprétation des rôles des thiorédoxines seules. Nous ne développerons donc pas le système des glutarédoxines, qui est très similaire à celui des thiorédoxines et nous nous attarderons plus particulièrement sur la sous-famille des thiorédoxines dans les parties ultérieures.

#### **I.4.7.2. Les thiorédoxines chez les bactéries**

La première thiorédoxine bactérienne étudiée par Laurent *et al.* (1964) a été isolée de *Escherichia coli* B. Cette thiorédoxine est impliquée comme donneur d'hydrogène pour la ribonucléotide réductase (RRase), une molécule essentielle dans la synthèse d'ADN. Elle a été isolée dans une fraction contenant un triphosphorydine nucléotide (ou TPNH) réduit. La fonction de la thiorédoxine requiert l'interaction d'une thiorédoxine réductase telle que la TPNH, et permet ainsi la réduction des ponts disulfures des protéines cibles (Laurent *et al.*, 1964). Ce n'est qu'en 1968 que la séquence complète de la protéine active d'*E. coli* B est déterminée par Holmgren. Rapidement, d'autres thiorédoxines mises en évidence chez d'autres organismes ont été séquencées, comme la thiorédoxine du phage T4 (Sjöberg et Holmgren,

1972), celle de la levure du boulanger (Porqué *et al.*, 1970a), et celles d'organismes pluricellulaires.

### **I.4.7.3. Les thiorédoxines chez la levure**

Au cours de cette période, d'autres recherches ont été menées chez les cellules eucaryotes, notamment sur les levures, faisant intervenir une compartimentation de la cellule et introduisant une spécialisation du système des thiorédoxines. Une première analyse a mis en évidence deux formes de TRX cytosoliques qui utilisent, comme pour la bactérie, le NADPH comme donneur de proton au FAD contenu dans la thiorédoxine réductase (Porqué *et al.*, 1970a). Une troisième thiorédoxine (TRX3) a été identifiée à la mitochondrie par Pedrajas *et al.* (1999) chez la levure. Après alignement des séquences primaires, Hall *et al.* (1971) ont conclu que les trois gènes de la levure sont issus d'un ancêtre commun. Les TRX sont associées à l'une des deux thiorédoxines réductases, mettant en évidence deux systèmes distincts, celui du cytoplasme et celui de la mitochondrie (Pedrajas *et al.*, 1999). Rapidement, d'autres fonctions des TRX chez la levure ont été révélées. Ainsi, ces enzymes ne sont pas uniquement des donneurs de protons aux nucléotides réductases, elles participent aussi à d'autres réactions d'oxydoréduction (Wagner *et al.*, 1978). En plus d'être des réducteurs spécifiques pour les précurseurs de synthèse d'ADN (ribonucléotides), les TRX sont impliquées dans la réduction de la méthionine sulfoxide ou du sulfate (Porqué *et al.*, 1970b). Plusieurs études plus approfondies chez la levure (dont *Saccharomyces cerevisiae*), ont permis de mettre en évidence un lien entre le stress oxydatif et les TRX. C'est la TRX1 qui serait majoritairement impliquée dans la régulation de la méthionine sulfoxide réductase pour des conditions normales de croissance, mais lors d'un stress oxydatif, les deux TRX cytosoliques interviennent (Hanbauer et Moskovitz, 2006). Globalement, c'est la TRX2 cytoplasmique qui est la plus impliquée dans les réponses au stress oxydatif (Kuge et Jones, 1994).

Suite à une induction de production de ROS principalement au niveau des mitochondries, on observe chez la levure une induction rapide de l'expression de gènes de réponse au stress

oxydatif. En fait, la réponse au H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dans la levure implique un très grand nombre de gènes. Il y aurait plus d'une centaine de protéines stimulées par le traitement, dont des protéines de défenses anti-oxydantes (dont TRX2), des protéines chaperonnes, des protéases, et beaucoup liées à divers voies métaboliques dont le cycle des pentoses phosphates et la glycolyse (Godon *et al.*, 1998). À l'opposé, une cinquantaine de gènes seraient réprimés, codant essentiellement pour des protéines impliquées dans la traduction des molécules et les voies métaboliques du sulfure, des acides aminés et de la synthèse de la purine (Godon *et al.*, 1998). L'un des facteurs de transcription qui régule l'expression de ces gènes est Yap1, pour "Yeast activator protein 1" (Fernandes *et al.*, 1997, Drobna *et al.*, 2012), un facteur important qui favorise la résistance de la levure au stress oxydatif. En bref, Yap1 est normalement localisée au niveau du cytoplasme. Cette protéine contient un domaine de liaison à l'ADN de type bZIP, avec une partie riche en leucine qui permet sa dimérisation (Fernandes *et al.*, 1997). Suite à un stress oxydatif, l'activité de ce facteur de transcription est fortement augmentée pour permettre l'activation des gènes de réponse (Okazaki *et al.*, 2007). La formation de multiples ponts disulfure dans la protéine Yap1 est requise pour son transport au noyau (Kuge *et al.*, 2001) et passe Yap1 passe donc de la forme oxydée à la forme réduite grâce aux TRX (Carmel-Harel *et al.*, 2001, Okazaki *et al.*, 2007). Par ailleurs, le gène de la TRX 2 fait lui-même partie des nombreux gènes qui sont activés par Yap1 (Kuge et Jones, 1994, Izawa *et al.*, 1999). Mais Yap1p n'est pas l'unique facteur de transcription à être impliqué dans la réponse au stress oxydatif. Skn7 est aussi associé à ce type de réponse et forme un complexe avec Yap1p (Mulford et Fassler, 2011, Gómez-Pastor *et al.*, 2013). Ces deux facteurs de transcription sont les principaux impliqués dans les réponses de stress oxydatif chez la levure, et ainsi permettent l'activation ou la répression de certaines voies métaboliques.

Les TRX sont également impliquées dans d'autres processus cellulaires. Par exemple, lorsque les deux TRX cytoplasmiques ne sont plus exprimées chez des mutants, le cycle cellulaire est affecté. La phase S de réplication de l'ADN est allongée, sans que la synthèse des désoxyribonucléotides ne soit perturbée (Muller, 1995).

Enfin, le système des TRX est également présent au niveau des mitochondries et regroupe la TRX3 avec la thiorédoxine réductase 2, ou TRR2 (Pedrajas *et al.*, 1999). Le statut rédox de la TRX3 n'est pas affecté par la perte de la TRR2, mais davantage par le système des glutarédoxines (Trotter et Grant, 2005). La TRX3 est aussi impliquée dans la réponse au stress oxydatif. Comme pour la TRX2 chez les animaux (cf. partie I.4.7.4.), la TRX3 des levures est essentielle pour la croissance de l'organisme en conditions normales et de stress oxydatif (Pedrajas *et al.*, 1999, Trotter et Grant, 2005). L'oxydation de la TRX3 induit la MCP via la métacaspase Yca1, par un mécanisme qui reste à être précisé. Ainsi, chez les doubles mutants *glr1 trr2*, on observe une forte diminution du taux de cellules mortes (Greetham *et al.*, 2013). Par ailleurs, dans les conditions de stress, l'oxydation de la TRX3 par PRX1 n'assure pas la détoxification des ROS mitochondriales, et ainsi induit la MCP des cellules affectées (Greetham *et al.*, 2013).

En résumé, les thiorédoxines chez la levure ont un rôle prédominant dans la régulation du statut rédox de différentes enzymes qui vont promouvoir ou non la MCP suite à un stress oxydatif. Les TRX2 et TRX3 sont les deux enzymes les plus impliquées dans ce type de stress.

Le système des thiorédoxines est approfondi sur un autre type cellulaire, celui des cellules animales.

#### **I.4.7.4. Les thiorédoxines animales**

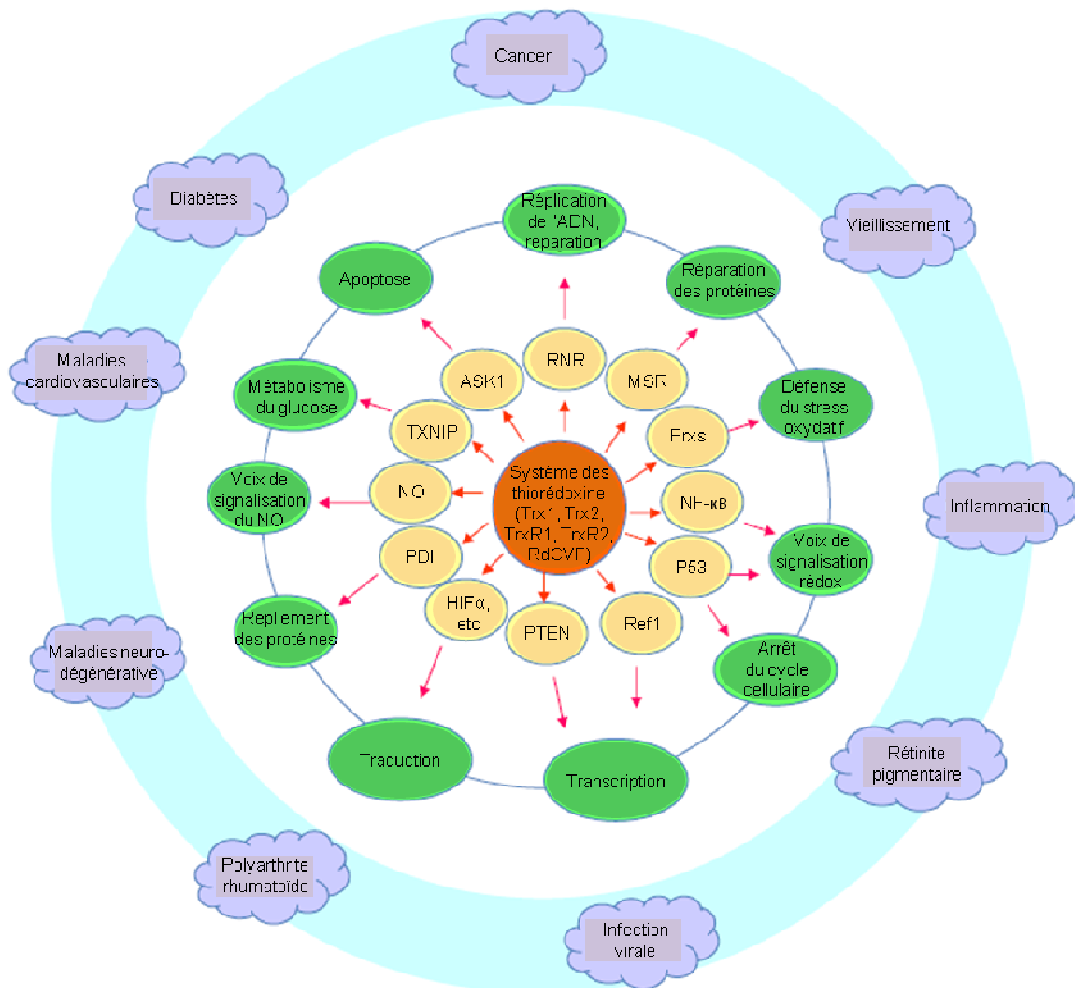
Les premières thiorédoxines animales ont été isolées à partir de cellules du foie de rat (Larson et Larsson, 1972), qui présentent deux isoformes. Comme précédemment, les premières analyses portaient sur la capacité de l'enzyme à fournir des protons pour convertir les ribonucléotides en désoxyribonucléotides. La fonction de cette première TRX est identique à celle d'*E. coli*, par contre, elle présente quelques caractéristiques qui lui sont propres, comme avoir trois fois plus de cystéines (Herrmann et Moore, 1973). De même, la thiorédoxine extraite du foie de veau présente deux fois plus de cystéines (Engström *et al.*, 1974), que celle



de la levure (Porqué *et al.*, 1970a) ou de *E. coli* (Holmgren, 1968). Ces cystéines supplémentaires rendent la purification de la protéine nettement plus difficile que pour celle d'*E. coli* (Herrmann et Moore, 1973, Engström *et al.*, 1974, Holmgren et Luthman, 1978)

Par la suite, les découvertes vont complexifier le système. La localisation subcellulaire de cette protéine indique que la protéine est présente aussi bien au niveau du noyau, que des mitochondries, des microsomes, des membranes et du cytosol (Holmgren et Luthman, 1978). Même si la thiorédoxine semble être très bien conservée chez différentes espèces, la thiorédoxine réductase du foie de rat interagit avec un plus large éventail de substrats que celle de la bactérie *E. coli* (Luthman et Holmgren, 1982).

Pour les thiorédoxines de l'homme, deux gènes ont été mis en évidence : l'un codant pour la Trx1 localisée dans le cytosol ou l'espace extra-cellulaire, et le second codant pour la Trx2 localisée à la mitochondrie (Holmgren et Lu, 2010). Le système des thiorédoxines peut activer différentes enzymes cibles et est donc impliqué dans un très grand nombre de processus (Figure 7).



**Figure 7. Le système des thiorédoxines de mammifères a un rôle central dans un grand nombre de maladies humaines (adaptée de Holmgren et Lu, 2010).**

Légende : Trx, thiorédoxine; TrxR, thiorédoxine réductase; RNR, ribonucléotide réductase; MSR, méthionine sulfoxide réductase; Prx, peroxyrédoxines; NF- $\kappa$ B; p53; Ref-1, "redox factor 1"; HIF $\alpha$ , sous-unité  $\alpha$  de "Hypoxia-inducible factor-1"; PTEN; AP-1, "activator protein 1"; ASK1, "apoptosis signal-regulating kinase 1"; TXNIP, "thioredoxin interacting protein"; PDI, "protein disulfide isomerase"; RdCVFL, "Trx-like protein (rod-derived cone viability factor)".

Sans entrer dans tous les détails, la Trx1 réduit la RNR (ribonucléotide réductase), enzyme essentielle pour la synthèse de l'ADN, puisqu'elle régule l'étape limitante de la synthèse de désoxyribonucléotides durant la phase S (Koc *et al.*, 2006). Le système joue aussi un rôle comme donneur d'électron pour des enzymes thiol-dépendantes comme les MSR (méthionine sulfoxide réductase) et autres peroxydases. Les résidus méthionine sulfoxide des protéines sont réparés ou protégés par les MSR contre le stress oxydatif en transformant ce résidu en méthionine (Lee *et al.*, 2009). Par contre, les Prx (peroxyrédoxines) transforment le peroxyde d'hydrogène en eau, et par la même occasion, maintiennent l'activité des thiorédoxines et la viabilité des cellules sous stress oxydatif. Lorsque la Prx est hyper oxydée, cela a pour conséquence d'inactiver la Trx qui ne peut réduire les protéines cibles, et rend la cellule sensible, voire provoque la MCP (Day *et al.*, 2012). Par ailleurs, le système des glutarédoxines peut intervenir pour moduler l'activité de la Trx1 (Du *et al.*, 2013). L'ensemble de ces systèmes reste lié les uns aux autres.

Les Trx et les TrxR opèrent aussi au niveau de la signalisation rédox, en contrôlant l'activité d'un grand nombre de facteurs de transcription comme NF- $\kappa$ B (Matthews *et al.*, 1992), p53 (Ravi *et al.*, 2005), Ref-1, HIF $\alpha$ , AP-1 (Hirota *et al.*, 1997), de suppresseur de tumeur tel que PTEN (Song *et al.*, 2007) et des récepteurs au glucocorticoïdes, etc. Les thiorédoxines ont aussi pour cible ASK1 et l'inactivent en se liant à la molécule, jusqu'à induire son ubiquitinylation et sa dégradation (Saitoh *et al.*, 1998, Liu et Min, 2002). Sans entrer dans les détails, les thiorédoxines ont bien un effet sur un grand nombre de maladies chez l'homme : aussi bien le cancer, le diabète (Hotta *et al.*, 1998), les maladies cardiovasculaires que la réponse aux infections virales (Figure 7).

Puisque les thiorédoxines ont un rôle central dans l'ensemble des réponses de stress, mais aussi lors d'infections, il est envisagé par certains qu'elles puissent être les futures molécules de traitement de demain. Notamment, la Trx 1 qui est une protéine de défense, a des propriétés anti-oxydatives, anti-apoptotiques et anti-inflammatoires (Watanabe *et al.*, 2010). Il semblerait que l'expression de la Trx 1 est modifiée pour de nombreuses pathologies, et serait donc un bon marqueur de détection (Sumida *et al.*, 2000, Sumida *et al.*, 2003, etc). De plus, dans

certains cas, l'expression de la Trx 1 est aussi augmentée lors de développement de résistances aux traitements (Kim *et al.*, 2005). Étant donné le très grand nombre d'interactions que les thiorédoxines ont avec les autres enzymes de la cellule, ces protéines deviennent des cibles pour des thérapies (Watanabe *et al.*, 2010). Plus particulièrement, les thiorédoxines seraient utiles dans les cas d'inflammation et de stress oxydatif (Watanabe *et al.*, 2010). Des auteurs pensent à un nouveau moyen de traitement, ainsi que d'administration des molécules actives aux organismes, juste par ingestion de plantes productrices des thiorédoxines humaines recombinées (Lim *et al.*, 2011).

Les plantes ont elles aussi leur propre système de thiorédoxines, qui est moins connu que celui des mammifères.

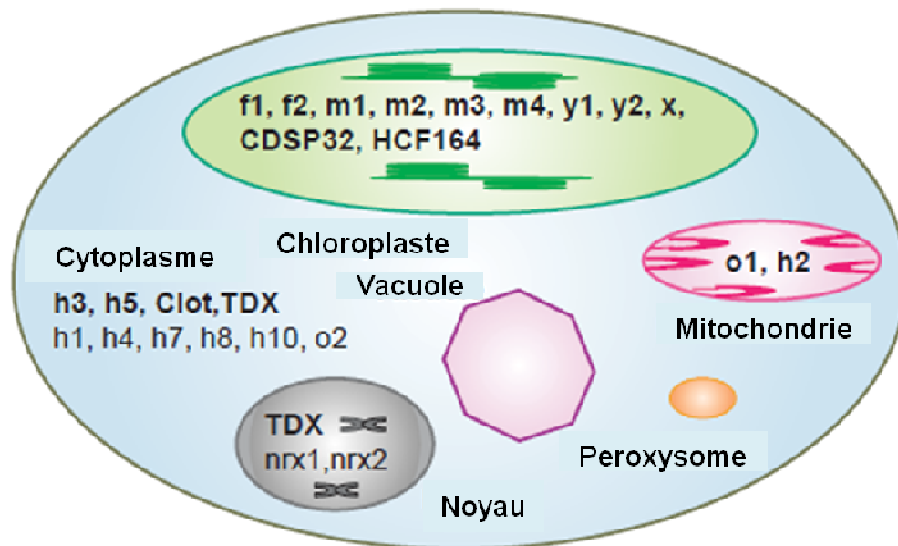
#### **I.4.7.5. Les thiorédoxines végétales**

##### **I.4.7.5.1. Les différents types de thiorédoxines et généralités**

La première TRX identifiée chez un organisme photosynthétique a été mise en évidence chez l'algue verte, *Scenedesmus obliquus*. Elle réalise la même fonction que celle d'*E. coli* : la réduction des désoxyribonucléotides (Wagner et Follman, 1977). Ensuite, les premières fonctions liées aux réactions photosynthétiques chez les épinards ont été avancées par Wolosiuk et Buchanan (1977 et 1978).

Comme vu précédemment, la famille des thiorédoxines compte peu de représentants chez les mammifères alors qu'on en retrouve plusieurs chez les plantes. Pour la plante modèle *Arabidopsis*, les six groupes majeurs de thiorédoxines sont représentés : TRX f (De Dios Barajas-López *et al.*, 2007), TRX m (De Dios Barajas-López *et al.*, 2007), TRX h (Reichheld *et al.*, 2002), TRX x (Collin *et al.*, 2003), TRX o (Bréhélin *et al.*, 2004) et TRX y (Marchand *et al.*, 2010). Avec les protéines dites TRX-like, qui ont des similarités importantes avec les

thiorédoxines, cette famille compte actuellement environ une quarantaine de gènes. Ces TRX sont regroupées selon leur localisation subcellulaire et leur similarité de séquence (Figure 8).

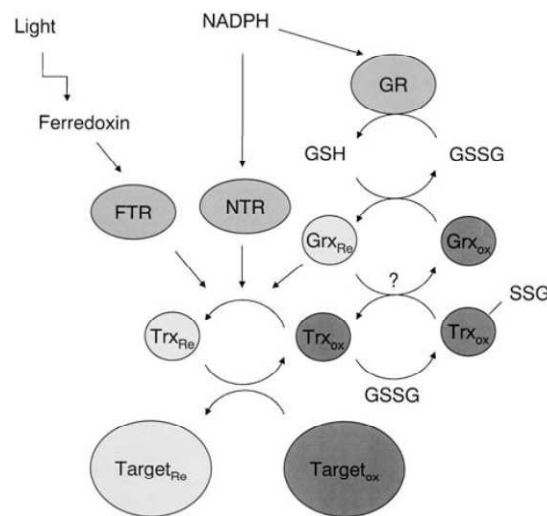


**Figure 8. Localisation subcellulaire des TRX et de certaines TRX-like chez les plantes (adaptée de Vieira Dos Santos et Rey, 2006).**

Les TRX h sont surtout localisées dans le cytosol de la cellule, mais peuvent aussi être localisées au noyau ou aux mitochondries (Reichheld *et al.*, 2002, Gelhaye *et al.*, 2004a, Meng *et al.*, 2009). Les deux TRX o sont principalement localisées aux mitochondries, mais comme pour le type h, elles sont aussi actives dans le noyau et le cytoplasme (Bréhélin *et al.*, 2004). Ces deux groupes ont une origine eucaryote, tout comme le type f retrouvé au chloroplaste (Dangoor *et al.*, 2009). Enfin, les autres thiorédoxines chloroplastiques regroupent, en plus du type f, les types m, x, y et z, qui elles ont une origine procaryote (Dangoor *et al.*, 2009, Arsova *et al.*, 2010).

Les thiorédoxines interagissent, comme nous l'avons vu précédemment, avec d'autres molécules, dont les thiorédoxines réductases. Ces dernières vont elles-mêmes posséder, au niveau de leur centre réactionnel, une molécule de NADPH ou de Fd. Généralement, les TRX végétales cytoplasmiques et mitochondriales, tout comme les Trx animales, sont réduites par

les thiorédoxines réductases NADPH-dépendantes (Bréhélin *et al.*, 2004). Cependant, certaines des TRX chloroplastiques sont associées à la chaîne photosynthétique et notamment à la Fd (Dai *et al.*, 2004). Il s'agit des TRX f et m qui peuvent être aussi bien réduites par les NTR que les FTR ("Ferredoxin-thioredoxin reductase": Figure 9).



**Figure 9. Les différents types de réduction des thiorédoxines chloroplastiques chez les plantes (tirée de Gelhaye *et al.*, 2005).**

Au cours de la photosynthèse, la stimulation lumineuse des chloroplastes active la chaîne de transfert des électrons au niveau des photosystèmes II et I. L'électron excité du photosystème I (PSI) réduit la Fd. Cette dernière est alors réduite par la FTR, qui elle-même va réduire les TRX f et m (Dai *et al.*, 2004). Par la suite, ces dernières vont à leur tour réduire les enzymes cibles qui seront ainsi réactivées dans la cellule. Par contre, très peu d'études ont démontré une activation de ces protéines par d'autres protéines. Néanmoins, Yoo *et al.* (en 2011) ont mis en évidence une famille de protéines ayant cette capacité. Les protéines "cystathionine  $\beta$ -synthase domain-containing" (ou CBSX) sont des régulateurs rédox, qui régulent donc les TRX avec le système Fd-TRX ou NADPH-TRX, pour moduler le développement de la plante et maintenir l'homéostasie de la cellule en conditions de stress (Yoo *et al.*, en 2011).

Ainsi, dans le règne végétal, la famille des thiorédoxines est nettement mieux représentée que chez les animaux. Quelques éléments sont connus pour certaines sur leur implication à diverses réponses.

#### **I.4.7.5.2. Les thiorédoxines cytoplasmiques et mitochondriales**

Deux groupes de TRX ne sont pas localisés aux plastides : le type h et le type o.

Tout d'abord, les TRX h sont principalement localisées dans le cytosol de la cellule. Le type h est un groupe hétérogène, subdivisé en trois sous-groupes basé sur un alignement des séquences protéiques. Le sous-groupe 1h comprend les protéines h1, h3, h4 et h5, et est le plus étudié. Le sous-groupe 2h comprend les TRX h2, h7 et h8, qui possèdent une extension N-ter (Traverso *et al.*, 2013). Enfin, les TRX h9 et h10 se retrouvent dans le dernier sous-groupe, le 3h, qui mélange les thiorédoxines atypiques ou qui ont un site catalytique particulier, WCGPC (Meyer *et al.*, 2002). Malgré une bonne représentation de cette famille, ces protéines ont une spécificité de réponse, notamment en réponse à des agents pathogènes (Reichheld *et al.*, 2002, Gelhaye *et al.*, 2004a et 2004b, Meng *et al.*, 2009).

Les fonctions connues pour le type h concernent surtout la réponse aux agents pathogènes. Principalement impliquée dans les réponses induites par les agents pathogènes, la TRX h5 est l'enzyme dont le rôle a le plus été étudié (Reichheld *et al.*, 2002, Laloi *et al.*, 2004, Lorang *et al.*, 2007, Tada *et al.*, 2008). Suite à une infection par la bactérie *Pseudomonas syringae* (Laloi *et al.*, 2004) ou le champignon *Cochliobolus victoriae* (Lorang *et al.*, 2007), l'expression de la TRX h5 est induite ou la protéine est activée pour permettre la mise en place de la RH par la plante. La TRX h3, faisant partie de ce même groupe, a aussi une fonction de protéine chaperonne (Park *et al.*, 2009). Enfin, la TRX h1 est connue pour avoir la "cytosolic malate dehydrogenase" (cytMDH) comme cible. La cytMDH catalyse la réaction de l'oxaloacétate en malate en utilisant le NADP<sup>+</sup>/NADPH chez les plantes. En présence de la TRX h1, la cytMDH oxydée et inactive est réduite en supprimant le lien covalent entre deux dimères de la molécule

(Hara *et al.*, 2006). La TRX h1 restaure aussi l'activité de AtCPK21, qui est une protéine kinase dépendante du calcium, lorsque celle-ci est oxydée par du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Il y a donc un lien entre la régulation rédox de la cellule et la signalisation calcique (Ueoka-Nakanishi *et al.*, 2013).

La TRX h9 d'*Arabidopsis* aurait une fonction différente. Elle serait impliquée dans la communication entre cellules. C'est au niveau de la partie N-ter de la protéine que se trouve la séquence d'adressage à la membrane plasmique et à la mobilité intercellulaire de la protéine, caractéristique des sous-groupes 2h et 3h (Traverso *et al.*, 2013). Les mutants d'insertion d'ADN-T ont montré le rôle de la TRX h9 dans la croissance et le développement de la plante (Meng *et al.*, 2009). Les acides aminés présents de la partie N-ter sont modifiés par une réaction de "*N*-myristoylation" et "*S*-palmitoylation". Les TRX du sous-groupe 2h doivent être modifiées par une *N*-myristoylation pour être dirigées vers les membranes du RE et de l'appareil de Golgi. Au contraire, pour celles du sous-groupe 3h, les protéines doivent avoir une double acylation pour être localisées à la membrane plasmique (Traverso *et al.*, 2013).

L'ensemble des recherches ne portent pas uniquement sur la plante modèle *Arabidopsis*. Chez l'algue verte, *Chlamydomonas reinhardtii*, il y a deux thiorédoxines de type h exprimées dans le cytoplasme de la cellule, ayant chacune des fonctions bien distinctes (Sarkar *et al.*, 2005). Cet organisme unicellulaire est étudié pour comprendre les mécanismes de dommages et de réparation de l'ADN suite à un stress oxydatif. Pour le blé, les TRX h ont plusieurs cibles potentielles, dont certaines connues, comme la "aldolase" ou la "NAD-malate dehydrogenase" (Wong *et al.*, 2003). De plus, les TRX h exprimées dans l'endosperme de la graine chez le blé régulent des enzymes associées à différentes fonctions, telles que la dégradation d'amidon, le stockage des protéines et le stress oxydatif. Ainsi, les TRX h du blé contrôlent la disponibilité de l'amidon, ce qui a pour conséquence d'avoir un rôle aussi bien dans les réponses de stress que dans la germination de la graine (Wong *et al.*, 2003). Chez le pois, les TRX h3 (proche de h1 d'*Arabidopsis*) et TRX h4 (correspondant à la h2 chez *Arabidopsis*) sont aussi exprimées dans la graine, mais leur implication est différente (Montrichard *et al.*, 2003). La TRX h4 a un lien très fort avec le processus de germination puisqu'elle est essentiellement exprimée au



niveau des axes embryonnaires, alors que la TRX h3 est aussi active dans les cotylédons. D'autres études sur le riz, *Oryza sativa* (Xie *et al.*, 2009, Zhang *et al.*, 2011), chez le grain de raisin *Vitis vinifera* (Haddad et Japelaghi, 2014) et chez le poivron (Yi *et al.*, 2007) montrent également des rôles dans les réponses aux stress biotiques ou abiotiques.

Les deux thiorédoxines du groupe o ont été d'abord localisées aux mitochondries, mais il semblerait que la TRX o2 serait plutôt dans le cytoplasme, puisqu'aucune bande n'est détectée sur les immunobuvardages effectués sur des extraits protéiques mitochondriaux (Laloi *et al.*, 2001). Ces thiorédoxines interagissent avec la NTR et le NADPH pour être réduites. Deux gènes codent pour les TRX de types o, et deux gènes codent pour la NTR chez la plante modèle (Reichheld *et al.*, 2005). La particularité des NTR, c'est qu'elles possèdent deux formes actives : l'une constituée d'une pré-séquence putative qui lui permet l'importation de protéines dans la mitochondrie, et une autre, plus petite qui la localise au cytoplasme. C'est la NTRA qui réduit de manière efficace la TRX o1 (Laloi *et al.*, 2001).

Par une analyse protéomique des TRX mitochondriales réalisée sur différents matériaux, (feuilles de pois et d'épinards, tubercules de pomme de terre) beaucoup de protéines cibles ont été identifiées (Balmer *et al.*, 2003). Elles sont associées à de nombreux processus cellulaires, tels que la synthèse de molécules d'énergie, à diverses voies métaboliques, à la synthèse protéique et à des réponses aux stress environnementaux. Enfin, une communication entre les TRX mitochondriales et chloroplastiques (décrites ci-après) s'effectuerait par des métabolites, tels que le dihydroxyacétone phosphate, le malate et le glycolate. De ce fait, la perception de la lumière par les chloroplastes a un effet sur l'activité des TRX des deux organites et la réponse de la mitochondrie (Balmer *et al.*, 2003).

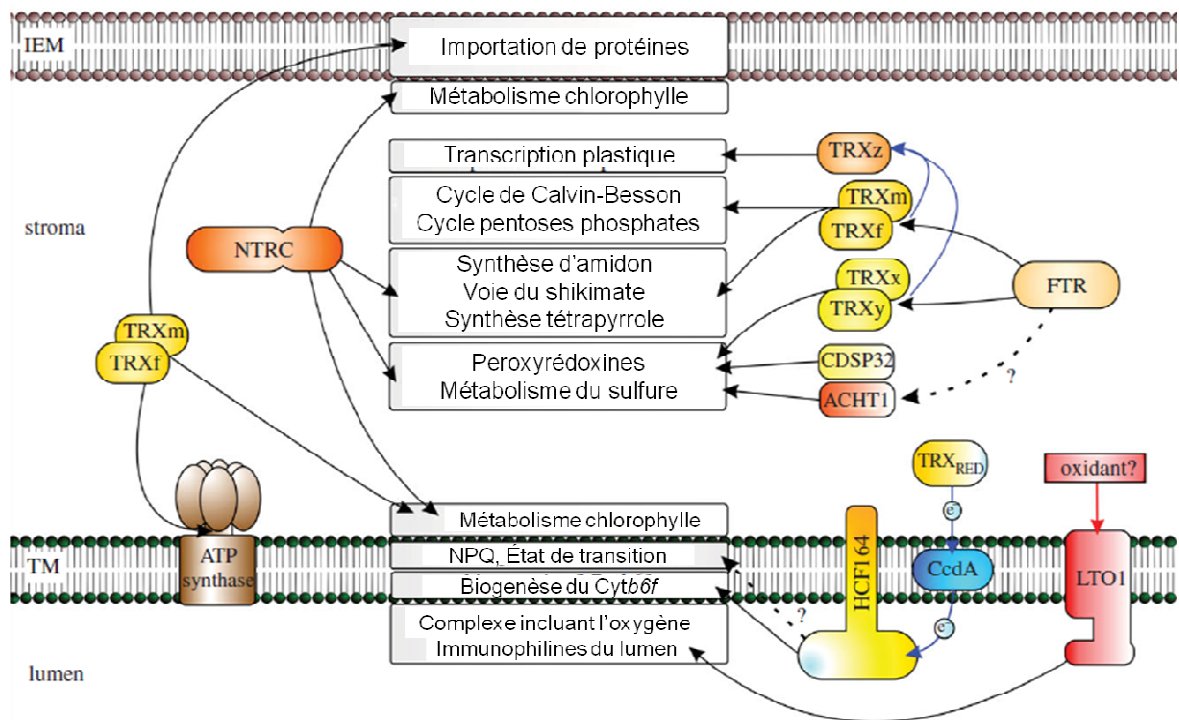
Ce groupe de TRX est aussi présent chez d'autres organismes végétaux comme chez le peuplier (Gelhaye *et al.*, 2004b), ou chez *Pisum sativum* localisée à la mitochondrie (Barranco-Medina *et al.*, 2008) ou au noyau (Martí *et al.*, 2009).

Ces deux premiers types de thiorédoxines ont un large spectre d'action dans la cellule. Même si le type h semble bien étudié, le type o reste peu connu. À ces deux premiers groupes, nous devons ajouter toutes celles présentes au niveau des plastes qui remplissent elles aussi différentes fonctions très importantes pour le métabolisme cellulaire.

### **I.4.7.5.3. Les thiorédoxines plastidiques**

#### **I.4.7.5.3.1. Vue d'ensemble des fonctions des thiorédoxines plastidiques**

Les thiorédoxines plastidiques sont plus nombreuses que les thiorédoxines des groupes précédents. Elles sont classées en cinq types : f, m, x, y et z. Pourtant, ces dernières ont des spécificités qui leur sont propres. D'un côté, nous trouvons les TRX chloroplastiques de type m, f, x et y. Ces dernières sont réduites par les thiorédoxines réductases dépendantes des ferrédoxines, ou FTR, comme décrit dans la partie I.4.7.5.1. (Dangoor *et al.*, 2009). Quant à elle, la TRX z ne réagit ni avec la FTR, ni avec une NTR bien spécifique, mais son activité est régulée par les autres TRX plastidiques (Bohrer *et al.*, 2012). Par ailleurs, une nouvelle NTR a d'abord été découverte chez le riz puis retrouvée chez *Arabidopsis*, nommée NTRC (Serrato *et al.*, 2004). Cette dernière, localisée au chloroplaste, possède, en plus du domaine thiorédoxine, une extension C-ter. Cette enzyme ne ferait pas partie du système des TRX, mais elle possède aussi bien les activités de TRX et que de NTR. L'ensemble de ces éléments supposent une implication de la NTRC dans la protection des plantes contre divers stress oxydatifs (Serrato *et al.*, 2004). La NTRC utilise le NADPH pour réduire la "2-Cys peroxiredoxin BAS1", qui va ainsi réduire le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, et constitue donc une alternative de protection des chloroplastes contre le stress oxydatif (Pérez-Ruiz *et al.*, 2006). Enfin, la NTRC est aussi impliquée dans la synthèse de l'amidon en activant l'ADP-glucose pyrophosphorylase ou AGPase (Michalska *et al.*, 2009). Globalement, les thiorédoxines sont impliquées dans pratiquement toutes les fonctions des chloroplastes qui sont présentées dans la Figure 10, et développées dans les paragraphes suivants.



**Figure 10. Les différents processus du chloroplaste contrôlés par les thiorédoxines (adaptée de Nikkanen et Rintamäki, 2014).** Légende : TM, Membrane de thylakoïde; IEM, membrane de l'enveloppe intérieure; HCF164, thiorédoxine-like localisée à la membrane du thylakoïde; CDSP32, thiorédoxine-like; ACHT1, "atypical Cys His-rich TRXs" thiorédoxine-like; NPQ, "non-photochemical quenching"; CcdA, transporteur thiol disulfure qui transmet un signal rédox mais ne possède pas de motif Trx.

Globalement, les protéines actives dans les chloroplastes ont une régulation circadienne. Dans des conditions lumineuses, le système des TRX est activé par l'oxydation de la Fd et du NADPH. En parallèle, il y a production de ROS qui ont un effet sur l'activité de ces thiols (Nikkanen et Rintamäki, 2014). Malgré tout, le système des thiorédoxines plastidiques reste complexe. Il sera développé dans les parties suivantes.

#### **I.4.7.5.3.2. Le type z : une thiorédoxine à part, essentielle dans la transcription plastidique**

La dernière TRX plastidique découverte fut la TRX z. Elle possède comme pour ses homologues une extension N-ter correspondant au peptide signal d'adressage au chloroplaste (Arsova *et al.*, 2010). Chez *Solanum lycopersicum*, un gène orthologue à *Arabidopsis*, nommé *CITRX* pour "Cf-9-interacting thioredoxin", a été étudié et code pour une protéine qui interagit avec la protéine de résistance Cf-9 au niveau de la partie C-ter de la protéine. Ainsi, *CITRX* agit comme un régulateur négatif de la mort cellulaire et des réponses de défense par le biais de Cf-9 chez la tomate (Rivas *et al.*, 2004). Un mutant knockout pour la TRX z chez *Arabidopsis* présente un phénotype de plantes albinos et le développement de ses chloroplastes est inhibé (Arsova *et al.*, 2010). Cette protéine aurait un rôle avec les deux protéines FLN ("fructokinase-like proteins") dans la régulation de la transcription dépendante de la PEP ("plastid-encoded RNA polymerase") dans les chloroplastes. Cette fonction de TRX z a été déterminée chez *Arabidopsis* et chez *Nicotiana benthamiana* et est essentielle pour le développement des chloroplastes (Arsova *et al.*, 2010). En effet, la TRX z serait l'une des sous-unité d'un complexe comprenant la PEP, puisque chez les mutants *trx z*, les plantes sont affectées dans l'expression du génome du chloroplaste (Schröter *et al.*, 2010). La TRX z n'a pas un rôle unique dans la régulation de la transcription des gènes du chloroplaste, mais chez le peuplier, cette enzyme pourrait être impliquée dans les réponses de stress en régulant l'activité des plusieurs antioxydants comme les Prx (Chibani *et al.*, 2011). De plus, puisque cette protéine est réduite *in vitro* par les autres thiorédoxines chloroplastiques, la TRX z présente des caractéristiques vraiment particulières (Bohrer *et al.*, 2012). Le complexe PEP peut être régulé par la protéine AtECB1, pour "early chloroplast biogenesis 1", qui a une activité thiorédoxine et interagit notamment avec la TRX z (Yu *et al.*, 2013). Pour que le complexe avec la PEP et la TRX z soit complet, il faut aussi compter sur la FLN1, ou "fructokinase-like protein 1", et ainsi former un complexe actif et essentiel (Wimmelbacher et Börnke, 2014).

#### **I.4.7.5.3.3. Les types x et y : contrôle rédox du plaste et protection contre l'oxydation des molécules**

Le type y, peu étudié jusqu'à présent, est constitué de deux isoformes y1 et y2, qui semblent avoir des fonctions complémentaires. La TRX y2 est surtout exprimée au niveau des feuilles et est induite par la lumière. Par contre, la TRX y1 est exprimée dans les organes non-photosynthétiques de la plante, durant l'accumulation des lipides dans les graines (Collin *et al.*, 2004). Ces thiorédoxines ne sont pas de bons activateurs pour les enzymes régulées par la lumière comme la fructose-1,6-bisphosphatase, mais elles le seraient pour les peroxyrédoxines Q (Collin *et al.*, 2004). Plus précisément, la TRX y1 est un régulateur physiologique de la monodéhydroascorbate réductase, ou MDHAR, dans les plastes des racines (Marchand *et al.*, 2010). La MDHAR catalyse la réaction de réduction du radical monodéhydroascorbate en ascorbate, mais participe aussi à la détoxification des ROS. D'un autre côté, la TRX y2 joue un rôle de donneur d'électrons aux MSR dans les organes photosynthétiques (Laugier *et al.*, 2013). Les MSR réduisent deux molécules, Met-S-O et Met-R-O, qui sont des méthionines oxydées dans les protéines. Cette réduction est essentielle pour la résistance au stress des cellules.

Tout comme la TRX z, la TRX x est codée par un seul gène dans le génome d'*Arabidopsis*, et serait impliquée, avec les TRX y, dans la protection des organites cellulaires contre les dommages de l'oxydation. La TRX x est l'enzyme la plus efficace pour réduire la peroxyrédoxine (Collin *et al.*, 2003). Chez la cyanobactérie *Synechocystis* sp. PCC 6803, la protéine orthologue de TRX y, TRX Q, n'est pas contrôlé par le flux d'électrons de la chaîne photosynthétique qui est régulé par le système des thiorédoxines. Par contre, la TRX B (ou la protéine orthologue de TRX x) a pour cible les protéines ribosomales (Pérez-Pérez *et al.*, 2009). Chez les plantes, comme nous l'avons vu précédemment, la NTRC réduit aussi une peroxyrédoxine, Prx (Pérez-Ruiz *et al.*, 2006). Cette réduction est principalement faite par la NTRC, mais d'autres thiorédoxines, comme la TRX x, effectuent cette réaction (Pulido *et al.*, 2010). En fait, la NTRC et la TRX x peuvent interagir l'une comme l'autre avec la Prx, qui est donc réduite par deux systèmes parallèles et complémentaires (Bernal-Bayard *et al.*, 2014).

Cependant, la NTRC a une plus grande affinité pour cette molécule, c'est donc elle qui contrôle le statut redox de la Prx (Pulido *et al.*, 2010).

#### **I.4.7.5.3.4. Les types m et f : régulation du cycle de Calvin et de la photosynthèse**

Les deux derniers sous-groupes sont les TRX m et TRX f, représentées par quatre et deux gènes respectivement chez *Arabidopsis*. En plus d'être présentes dans les tissus photosynthétiques, ces TRX ont été détectées ensemble chez le pois dans des tissus non-photosynthétiques au niveau des racines et des fleurs, suggérant un rôle dans les divisions cellulaires, la germination et la reproduction de la plante (De Dios Barajas-López *et al.*, 2007).

Très souvent, ces deux types de TRX sont étudiés en même temps, et semblent avoir quelques fonctions communes. En effet, la TRX m, chez *Pisum sativum*, peut compenser la perte de la TRX f. Ces deux protéines sont également les régulateurs principaux de la Mg chélatase, une enzyme impliquée dans la synthèse de la chlorophylle (Luo *et al.*, 2012). Les plantes issues d'expériences de silencing de ces deux gènes montrent un phénotype particulier. En plus d'avoir une réduction d'activité de la Mg chélatase, on observe une diminution de la capacité photosynthétique accompagnée d'une réduction du contenu en pigments (Luo *et al.*, 2012). Un lien a également été fait avec les brassinostéroïdes. Ces hormones végétales améliorent la tolérance à divers stress, tout en contrôlant l'assimilation du CO<sub>2</sub> et l'homéostasie de la cellule. Dernièrement, chez la tomate, on a montré que l'homéostasie du chloroplaste et l'assimilation du CO<sub>2</sub> sont régulées par les brassinostéroïdes et dépendent des TRX f et TRX m1/4 (Cheng *et al.*, 2014).

Les TRX seraient aussi impliquées dans l'importation des protéines dans le chloroplaste, dont les meilleurs candidats, sans distinctions particulières, seraient les TRX f et TRX m (Bartsch *et al.*, 2008). Ces TRX sont localisées au niveau de la membrane interne du chloroplaste et régulent les sous-unités Tic110 (pour "translocon at the inner envelope membrane of chloroplasts") et Tic55 du complexe (Bartsch *et al.*, 2008, Balsera *et al.*, 2009).

De plus, les TRX plastidiques ont aussi été impliquées dans la régulation du stress oxydatif. Par la transformation avec *PsTrx m* et *PsTrx f* d'une souche de levure chez qui les gènes de thiorédoxines ont été supprimés, l'hypothèse d'une implication des *PsTrx m* dans le mécanisme de détoxification des ROS a été émise (Traverso *et al.*, 2008). Plusieurs autres études portent sur ces deux types chez le pois et *Arabidopsis*, où une oscillation circadienne sur un cycle nuit/jour de l'expression de ces gènes a été observée, qui serait régulée par le facteur de transcription CCA1 (De Dios Barajas-López *et al.*, 2011). Chez le pois, le facteur de transcription *PsDOF7*, qui est induit par le glucose, peut se lier aux promoteurs des gènes de *PsTrx f* et *PsTrx m1*. De ce fait, le taux de protéines de ces deux TRX est sous le contrôle à court terme du taux de sucre et du statut rédox dans la plante (De Dios Barajas-López *et al.*, 2012). La même année, suite aux résultats obtenus par Fernández-Trijueque *et al.* (2012), cette équipe a montré un rôle des *PsTRX f* et *m1* dans la mobilisation des réserves dans les cotylédons des plantules (Fernández-Trijueque *et al.*, 2012).

Malgré des fonctions communes, ces enzymes ont des particularité qui leur sont propres (Rey *et al.*, 2013). Durant la photosynthèse, la régulation d'enzymes dépendantes de la lumière se fait d'ailleurs par le biais de thiorédoxines spécifiques (Wolosiuk *et al.*, 1979). Seules, les *TRX m1*, *TRX m2* et *TRX m4* sont primordiales pour la biogenèse du PSII (photosystème II) et empêchent l'accumulation d'oligomère CP47 oxydés, ce qui permet un assemblage correct de CP47 dans la PSII (Wang *et al.*, 2013). Très récemment, la *TRX m4* a été montrée comme ayant un rôle important dans la régulation du transfert d'électrons autour de PSI qui permet la préservation de l'équilibre ATP/NADPH dans l'organite (Courteille *et al.*, 2013). En surexprimant le type *m* dans le tabac, les plantes sont altérées dans leur croissance et leur contenu en chlorophylle est fortement diminué. Ces mêmes surexprimeurs suite à un stress oxydatif, sont nettement plus résistants que les plantes sauvages ou les surexprimeurs de *TRX f* (Rey *et al.*, 2013). De plus, chez le pois, il a été montré que la *PsTRX m2* dans les racines aurait des fonctions physiologiques bien précises, alors que la *PsTRX m1* serait importante pour les réponses au stress salin durant la germination (Fernández-Trijueque *et al.*, 2012). Enfin, la *TRX m3*, a été quant à elle impliquée dans la régulation du dépôt de callose et la

perméabilité symplastique, tous deux essentiels pour le maintien du méristème chez *Arabidopsis* (Benitez-Alfonso *et al.*, 2009).

Ainsi, le type m est impliqué dans toutes les activités en lien avec la photosynthèse, les mécanismes de l'homéostasie et des antioxydants dans le chloroplaste (Rey *et al.*, 2013).

Les TRX de type f ont elles aussi des fonctions particulières. Chez la plante modèle *Arabidopsis thaliana*, tout comme chez l'*Eucalyptus* (Barbosa et Marinho, 2005), deux gènes codent pour une TRX de type f, soit *TRX f1* et *TRX f2*, mais la majorité des espèces étudiées jusqu'à maintenant n'ont qu'une seule TRX de type f. La plupart des études ont d'ailleurs été réalisées sur le type f1 chez la plante modèle. L'une des premières études menées sur ce groupe portait sur le site actif et la partie N-ter, qui sert d'ancrage de la protéine à la membrane chloroplastique. En effet, les protéines deviennent solubles et stables lorsque la partie N-ter est tronquée. En leur absence, il n'y a plus la formation de dimère, et donc perte de la fonction de l'enzyme (Del Val *et al.*, 1999).

Les TRX de type f ont également une activité dépendante de la lumière et sont impliquées dans la régulation d'enzymes du cycle de Calvin (Marri *et al.*, 2009). Plus précisément, la TRX f1 activerait deux enzymes du cycle de Calvin : la GAPDH (glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase) et la PRK (phosphoribulokinase) (Marri *et al.*, 2009, Née *et al.*, 2009). Dernièrement, plusieurs surexpresseurs de la TRX f ont été étudiés. Chez le tabac, la surexpression de la TRX f n'augmente pas la résistance au méthyl viologen ou à de fortes intensités lumineuses combinées à de basses températures (Rey *et al.*, 2013). Par contre, ces plantes qui surexpriment la TRX f montrent une accumulation d'amidon au niveau des feuilles, accompagnée entre autres d'une augmentation de la teneur en sucres. Ceci suggère que la TRX f a un rôle dans la synthèse des sucres. Ces plantes sont d'autant plus intéressantes pour l'industrie, puisqu'une augmentation de la libération de ces sucres est notée (Sanz-Barrio *et al.*, 2013). L'implication des thiorédoxines dans les différentes voies métaboliques comme celle du cycle de Calvin-Besson/pentose phosphates et la synthèse/dégradation de l'amidon est abordée en détails dans la partie I.4.7.5.3.5.1.



Le système des thiorédoxines chez les végétaux reste complexe. Il est fort probable que certaines fonctions exécutées par des thiorédoxines de la même sous-famille (donc localisées au niveau d'un même organite cellulaire) soient redondantes. Néanmoins, chaque type de thiorédoxines semble tout de même avoir des fonctions bien spécifiques.

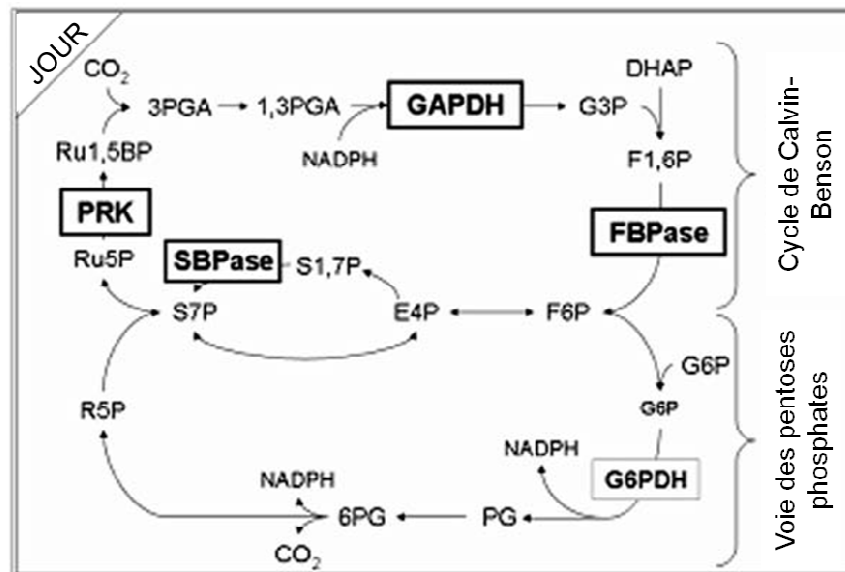
Les thiorédoxines régulent l'activité de nombreuses enzymes en modifiant leur statut rédox et en permettant la formation des ponts disulfures (Michalska *et al.*, 2009). En particulier, certaines des enzymes cibles des thiorédoxines de type f participent au cycle de Calvin-Benson ou à la synthèse d'amidon, tel que décrit dans les sections suivantes.

#### **I.4.7.5.3.5. Régulation de l'activité protéique par les thiorédoxines chloroplastiques**

##### **I.4.7.5.3.5.1. Cycle de Calvin-Benson et voie oxydative des pentose-phosphates**

Grâce à la photosynthèse, des molécules de CO<sub>2</sub> sont assimilées par les plantes au cours de différentes étapes de fixation du carbone. Une première série de réactions permet de convertir l'énergie lumineuse en énergie chimique sous la forme d'ATP et de NADPH. Ensuite, une autre série de réactions utilise l'ATP et le NADPH produit lors de la phase lumineuse et convertit des composés organiques en incorporant le CO<sub>2</sub> (Figure 11). Les sucres sont primordiaux pour la croissance et le développement des végétaux. D'un côté, il y a la production de sucres, dont le glucose, par le cycle de Calvin-Benson. L'enzyme clé pour cette synthèse est la RubisCo, pour Ribulose 1,5 bisphosphate carboxylase/oxygénase. D'un autre côté, il y a la voie oxydative des pentose-phosphates (ou OPPP, "oxidative pentose phosphate pathway") qui comporte plusieurs rôles majeurs (Figure 12). Celle-ci permet à la cellule de produire du NADPH qui sera utilisé pour la biosynthèse d'un grand nombre de molécules dont les acides gras. Elle permet aussi de générer le ribose-5-phosphate nécessaire à la synthèse des nucléotides qui seront incorporés à l'ARN et l'ADN. Enfin, l'érythrose-4-phosphate est fourni par cette voie. Notamment, c'est un précurseur pour la formation d'acides aminés aromatiques

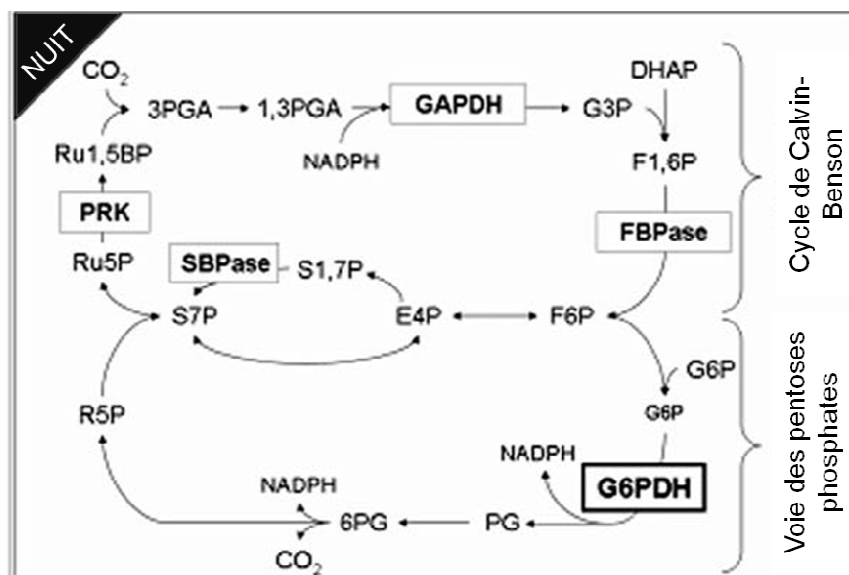
comme la phénylalanine, la tyrosine et le tryptophane. Pour l'ensemble de ces deux voies, certaines de ces enzymes ont leur activité dépendante de leur statut rédox. Elles peuvent donc être régulées par les thiorédoxines chloroplastiques.



**Figure 11. Réduction des enzymes du cycle de Calvin-Benson et inactivation des enzymes de la voie oxydative des pentose-phosphates par les thiorédoxines de type f en phase lumineuse (adaptée de Née *et al.*, 2009).** Activation des enzymes encadrées en noir pour le cycle de Calvin-Benson, et inactivation de celles en gris de la OPPP par les thiorédoxines de type f. Légende : PRK, phosphoribulokinase; GAPDH, glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase; FBPase, fructose-1,6-bisphosphatase; SBPase, Sédoheptulose-1,7-bisphosphatase; G6PDH, Glucose-6-phosphate déshydrogénase.

Toutes les TRX chloroplastiques n'ont pas un rôle à tenir dans ces voies. En particulier, ce sont les TRX f qui activent la GAPDH, la SBPase, la FBPase et de la PRK en les réduisant (Wolosiuk *et al.*, 1979, Collin *et al.*, 2003, Marri *et al.*, 2009). Comme pour beaucoup de réactions impliquant les thiorédoxines, cette réduction est dépendante de la variation de la lumière (Hutchison *et al.*, 2000). En clair, elles sont inactives sous la forme oxydées durant la

nuits, et actives le jour car réduites par le système des thiorédoxines en lien avec la Fd (Gontero et Salvucci, 2014). Plus précisément, les activités de la GAPDH et de la PRK sont inhibées la nuit par la formation d'un complexe avec une autre enzyme, la CP12, pour "chloroplast protein" régulée par la TRX f (Howard *et al.*, 2008). Par contre, leurs activités sont restaurées grâce à la TRX f1 qui les réduit et permet la dissociation de ce complexe lorsqu'un changement d'intensité lumineuse est perçue (Howard *et al.*, 2008, Marri *et al.*, 2009). Cette réduction des molécules du complexe est plus rapide que pour les enzymes prises individuelles, probablement, pour permettre à la plante de coordonner une transition rapide avec le passage de la nuit au jour (Marri *et al.*, 2009).



**Figure 12. Inactivation des enzymes du cycle de Calvin-Benson et réduction des enzymes de la voie des pentoses phosphates par les thiorédoxines de type f durant la nuit (adaptée de Née *et al.*, 2009).**

En parallèle, la TRX f est aussi impliquée dans l'oxydation de la voie de signalisation des pentoses phosphates, en régulant l'activité de la G6PDH, pour Glucose-6-phosphate déshydrogénase (Née *et al.*, 2009). La G6PDH est la première enzyme de l'OPPP, où elle catalyse la transformation du glucose 6-phosphate en phosphogluconolactone en formant du NADPH. L'interaction entre la TRX f1 et la G6PDH n'est pas stable, pourtant la formation

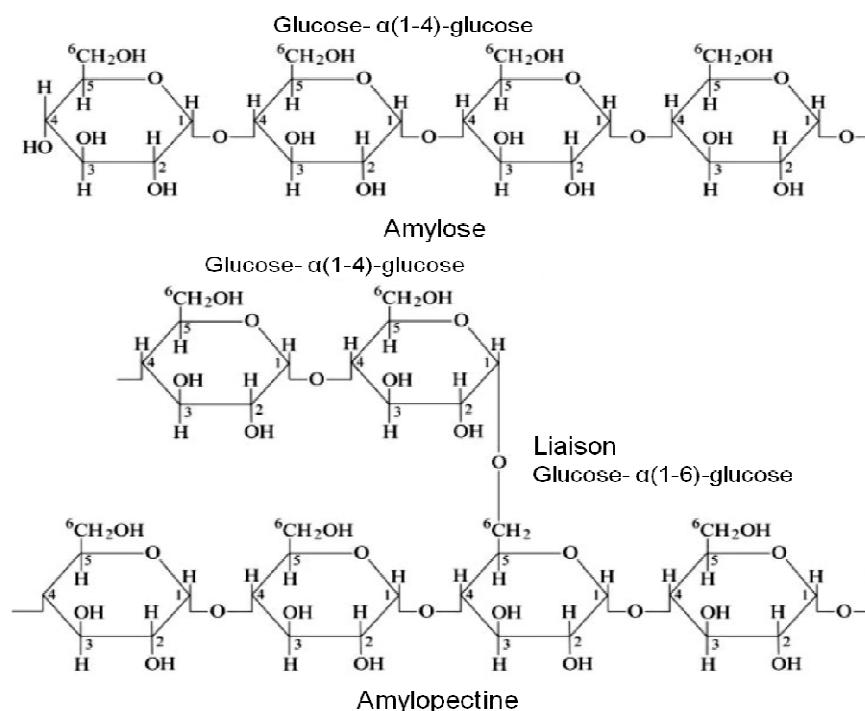
d'un pont disulfure est primordiale pour l'activation de l'enzyme (Née *et al.*, 2014). En effet, cela modifie grandement l'accessibilité au site actif ainsi que les propriétés de liaison des cofacteurs (Née *et al.*, 2014).

Récemment, une autre enzyme a été identifiée comme ayant un effet sur l'état rédox des diverses protéines de ces cycles, soit la CP12. Chez le tabac, la CP12 régule la répartition du carbone dans les chloroplastes et est primordiale pour la croissance normale et le développement correct de la plante (Howard *et al.*, 2011).

#### **I.4.7.5.3.5.2. Les thiorédoxines et la synthèse et dégradation de l'amidon**

Nous avons vu précédemment que les plantes qui surexpriment la TRX f montrent une accumulation de l'amidon au niveau des feuilles (Sanz-Barrio *et al.*, 2013, Rey *et al.*, 2013). Ces résultats suggèrent l'importance de la régulation du statut rédox de ces enzymes impliquées dans la synthèse ou la dégradation de l'amidon. L'amidon est un polysaccharide composé de molécules de glucoses, produites lors de réaction du cycle de Calvin-Benson. Il constitue la forme de réserve principale pour les végétaux supérieurs. Pour certains, la localisation de ce composé se situe au niveau de tissus particuliers (graines du maïs, tubercules de pomme de terre). Lorsque les organes de réserves ne sont pas développés, comme pour la plante modèle *Arabidopsis thaliana*, l'amidon est stocké dans les plastes de la plante, surtout au niveau de ses feuilles.

Plus précisément, l'amidon est constitué de deux composants principaux : l'amylose et l'amylopectine. Les liaisons qui lient les unités de D-glucose sont de types  $\alpha(1-4)$ , et pour les ramifications, elles sont de type  $\alpha(1-6)$ . L'amylose est une molécule peu ramifiée, contrairement à l'amylopectine, et est formée de longue chaîne linéaire d'unités glucose liées entre elles comme présenté dans la Figure 13.

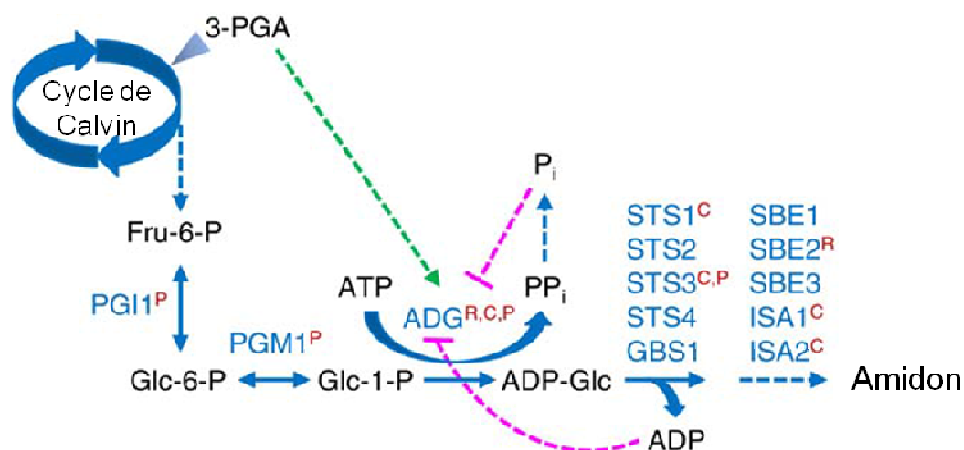


**Figure 13. Structure de l'amidon composé d'amylose et d'amylopectine (adaptée de Ghanbarzadeh et Almasi, 2013).**

La plante adapte son métabolisme global aux conditions environnementales. La balance entre synthèse et dégradation de l'amidon est bien modulée avec la durée du jour perçue par l'organisme végétal. En effet, lorsque les expositions lumineuses sont plus courtes durant le jour, la synthèse de l'amidon est plus importante pendant cette période, alors que l'utilisation de l'amidon durant la nuit est ralentie (Smith et Stitt, 2007). La dégradation de l'amidon ne se produit que la nuit et les réserves faites semblent être épuisées au début du jour, comme si une horloge dirigeait l'ensemble de ces étapes (Graf *et al.*, 2010, Scialdone *et al.*, 2013). Lorsque cet équilibre est perturbé, la croissance de la plante s'en trouve souvent altérée (Graf *et al.*, 2010). Cette perception de l'alternance jour/nuit se fait par différentes molécules. Le facteur de transcription CCA1/LHY (pour "circadian clock associated late elongated hypocotyls") est requis pour la dégradation adéquate de l'amidon et pour maintenir la croissance (Yazdanbakhsh *et al.*, 2011). La température a aussi un effet sur la dégradation de l'amidon. Une température de nuit plus basse réduit le taux de dégradation de l'amidon, et cela même

lors de changements brusques de température (Pyl *et al.*, 2012). C'est de cette manière que la plante alloue au mieux ses réserves en carbone pour réduire l'impact sur sa croissance dûes aux fluctuations de température de l'environnement. Cette variation d'expression des gènes et de fonction se produit sur un cycle de 24 h avec les changements jour/nuit, correspondant à une horloge circadienne (Chow et Kay, 2013, Haydon *et al.*, 2013, Atkins et Dodd, 2014). Il y a donc une adaptation des plantes aux variations de photopériodes et perception de la température, qui module l'utilisation de l'amidon et permet la survie des organismes (Graf *et al.*, 2010).

La voie de biosynthèse de l'amidon est connue depuis un certains temps (Figure 14). Cette synthèse est vraiment importante pour les végétaux, puisqu'elle permet de stocker l'énergie générée durant la photosynthèse pour assurer l'ensemble des réactions qui se déroulent à d'autres moments, en particulier durant les périodes obscures (Sulpice *et al.*, 2014, Figure 15). L'étude de mutants dépourvus d'amidon chez *Arabidopsis*, les *pgm*, ont permis de mettre en avant l'importance de l'alternance nuit/jour dans la synthèse/dégradation de l'amidon (Gibon *et al.*, 2004). Chez les mutants, le manque de sucres à la fin de la nuit provoque une inhibition temporaire de la croissance, accompagnée d'une activation de l'AGPase permettant une nouvelle accumulation de sucres (Gibon *et al.*, 2004).



**Figure 14.** Modèle de la voie de biosynthèse de l'amidon dans les plastides (adapté de Kötting *et al.*, 2010). Légende : en bleu : protéines; en noir : métabolites. Les

lettres en rouge informent sur les mécanismes de régulation de ces enzymes : R, statut rédox; C, formation d'un complexe, et P, phosphorylation de la protéine. La régulation par les métabolites est indiquée avec des flèches en pointillées verts (stimulation) et magenta (inhibition). 3-PGA, 3-phosphoglycérate; Fru-6-P, fructose-6-phosphate; Glc-1-P, glucose-1-phosphate; Glc-6-P, glucose-6-phosphate; ADP-Glc, ADP-Glucose; ATP, adénosine triphosphate; PPi, pyrophosphate; Pi, phosphate; ADP, adénosine diphosphate; ADG ou AGPase, ADP-glucose pyrophosphorylase; PGI1, Phosphoglucoisomérase 1; PGM1, Phosphoglucomutase; STS1, "Starch synthase I"; STS2, "Starch synthase II"; STS3, "Starch synthase III"; STS4, "Starch synthase IV"; GBS, "granule-bound starch synthase"; SBE1, "starch branching enzymes I"; SBE2, "starch branching enzymes II"; ISA1, isoamylase 1; ISA2, isoamylase 2.

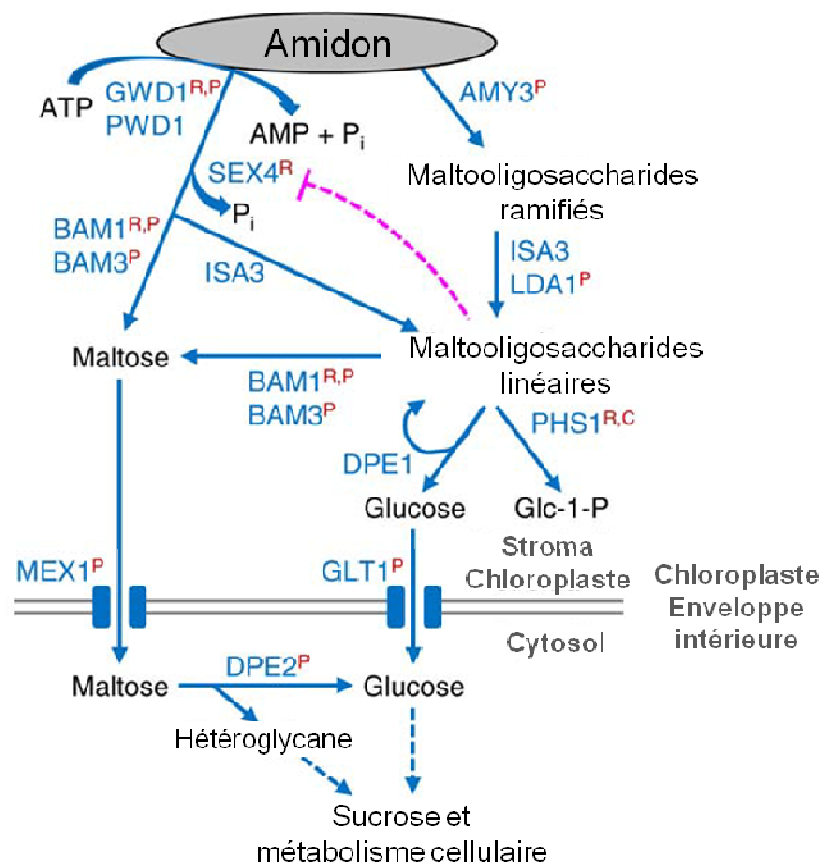
Les voies de synthèse et de dégradation de l'amidon impliquent plusieurs enzymes dont l'activité doit être régulée finement selon les stades et les conditions de croissance de la plante. Les enzymes de ces voies peuvent être régulées de trois manières différentes : par phosphorylation (Tetlow *et al.*, 2004, Heazlewood *et al.*, 2008), par la formation d'un complexe (Delatte *et al.*, 2005) et par le statut rédox de la protéine (Michalska *et al.*, 2009).

L'AGPase est un exemple d'enzyme dont l'activité est régulée par plusieurs mécanismes différents. L'AGPase est un hétéro tétramère composé de plusieurs sous-unités (deux grandes et deux plus petites) qui catalyse la première étape de la biosynthèse de l'amidon en formant l'ADP-Glucose et PPi en présence d'ATP et de Glc-1-P. Dans un premier temps, l'activité de l'AGPase peut être contrôlée par la phosphorylation de ses sous-unités (Okita *et al.*, 1990). En second lieu, d'autres molécules peuvent influencer l'activité de l'AGPase. Par exemple, le tréhalose 6-phosphate (ou T6P), un précurseur du tréhalose synthétisé dans le cytoplasme, est indispensable pour le contrôle de l'utilisation des sucres et de la croissance. Ce T6P a un effet sur le métabolisme des plastes, notamment en promouvant les modifications rédox de l'AGPase par le système des thiorédoxines (Kolbe *et al.*, 2005). Ainsi, le taux de sucre présent dans le cytosol peut avoir un effet sur la synthèse de l'amidon (Kolbe *et al.*, 2005). Finalement,

l'activité de l'AGPase peut également être régulée par son statut rédox. Dans ce cas, les TRX deviennent les enzymes candidates idéales qui assurent cette fonction dans la cellule. Comme abordé dans la partie I.4.7.5.3.1., le contrôle du statut rédox de l'AGPase peut être altéré par la NTRC ou par la TRX f1 (Michalska *et al.*, 2009, Thormählen *et al.*, 2013).

Des mutants d'insertion de ADN-T dans le gène de la *AtTrx f1* permettent de mettre en relation une probable interaction avec l'AGPase (Thormählen *et al.*, 2013). L'activation de cette enzyme est aussi contrôlée par le taux de sucrose durant la nuit. Il s'avère que l'activité de l'AGPase chez ces mutants n'est pas affectée par l'absence de la TRX f1 pour les feuilles à l'obscurité. Par contre, toute activation de l'enzyme chez ces mutants, qui est dépendante de la lumière, est altérée, puisque l'accumulation d'amidon baisse alors que le taux de sucrose augmente. Ainsi, le rôle de la TRX f1 dans l'activation de l'AGPase est important et dépendant de la lumière (Thormählen *et al.*, 2013). Mais toutes les régulations rédox de l'AGPase en réponse à la lumière ne sont pas aussi déterminantes pour l'activation de l'enzyme, comme celle de l'ASP1 par la NTRC (Li *et al.*, 2012). De ce fait, une accumulation en amidon dans les feuilles n'est pas uniquement due à cette synthèse, mais aussi, au contrôle de son utilisation. Une communication s'établit entre les différentes parties de la plante. Ainsi, les variations de luminosité sont perçues par les chloroplastes et transformées en signal par une modification du statut rédox (Balmer *et al.*, 2006).





**Figure 15. Modèle de la voie de dégradation de l'amidon dans les plastes (adapté de Kötting *et al.*, 2010).** Légende : en bleu, protéines; en gris, compartiments cellulaires; et en noir, métabolites. Les lettres en rouge informent sur les mécanismes de régulation de ces enzymes : R, statut rédox; C, formation d'un complexe, et P, phosphorylation de la protéine. La régulation par les métabolites est indiquée avec la flèche pointillée magenta (inhibition). ATP, adénosine triphosphate; Pi, phosphate; AMP, adénosine monophosphate; Glc-1-P; GWD1, "Glucan, water dikinase 1"; PWD1, "phosphoglucan, water dikinase 1"; SEX4 : "starch excess 4", BAM1,  $\beta$ -amylase 1; BAM3,  $\beta$ -amylase 3; ISA3, isoamylase 3; AMY3,  $\alpha$ -amylase 3; LDA1, "Limit dextrinase 1"; MEX1, "Maltose transporter 1"; DPE1, "glucanotransferase 1"; DPE2, transglucosidase 2, GLT1, "Glucose transporter 1"; PHS1,  $\alpha$ -glucan phosphorylase 1.

Le système de dégradation/utilisation de l'amidon est plus complexe et dépendant des besoins de la plante (Figure 15). Les enzymes de cette voie qui sont régulées par leur statut rédox sont la GWD1, la BAM1, la SEX4 et la PHS1 (Kötting *et al.*, 2010). Plus récemment, on a proposé que la AtAMY3 est aussi régulée par une thiorédoxine, puisqu'un pont disulfure est nécessaire pour l'activité de l'enzyme et que son activité optimale ne se produit qu'au pH chloroplastique (Seung *et al.*, 2013). Ces enzymes sont des cibles potentielles pour les thiorédoxines.

La GWD1 est la première enzyme de la voie de dégradation de l'amidon, grâce à la phosphorylation d'un résidu glucosyle. Cette enzyme est inactive sous la forme oxydée (Mikkelsen *et al.*, 2005), mais devient active lorsqu'un pont disulfure est formé. Par l'utilisation de mutants de TRX f et TRX m chez l'épinard, il a été mis en évidence que ces deux enzymes ont la capacité de réduire la GWD1 *in vitro*, avec une efficacité plus importante pour la TRX f. De plus, le contrôle de l'ensemble de ces éléments se produit par la perception de l'alternance nuit/jour (Mikkelsen *et al.*, 2005).

Sur les neuf BAM présentes dans le génome d'*Arabidopsis*, quatre BAM sont exprimées dans les chloroplastes. Une étude assez complète a analysé l'implication de ces quatre protéines dans la voie de dégradation de l'amidon (Fulton *et al.*, 2008). Tout comme les thiorédoxines, ces enzymes ont des spécificités bien précises. En effet, la BAM1 semble adaptée à des conditions différentes que celles de la BAM3 (Monroe *et al.*, 2014). Le pH pour une activité optimale est plus élevé pour la BAM1. La transcription du gène *BAM1* est induite par des stress de chaleur, alors que celle de *BAM3* l'est en condition de froid. Ces deux enzymes qui effectuent les mêmes réactions pour former du maltose, ont pourtant subi une adaptation thermique qui leur confère des spécificités d'activité (Monroe *et al.*, 2014). Par ailleurs, la BAM doit travailler en synergie avec l'AMY3 pour une dégradation efficace des grains d'amidon (Seung *et al.*, 2013). Lorsque le gène *RsBAMY1* (du radis, *Raphanus sativus*) est surexprimé chez *Arabidopsis*, les plantes mutées contiennent moins d'amidon comparativement au sauvage (Takahashi *et al.*, 2012). BAM1 est l'une des principales enzymes de l'utilisation de l'amidon par la cellule. Sur l'ensemble des thiorédoxines chloroplastiques, la TRX f1 semble être le meilleur candidat pour réguler l'activité de la

BAM1 ainsi que celle de l'AMY3 (Sparla *et al.*, 2006, Valerio *et al.*, 2011, Seung *et al.*, 2013). Par ailleurs, en condition de stress osmotique, l'activité de la BAM1 est augmentée et en parallèle, son état rédox est modifié, ce qui tend à confirmer la régulation de son activité par la TRX f1 (Valerio *et al.*, 2011).

La phosphatase SEX4 est requise pour la déphosphorylation du glucane. De plus, cette enzyme est inactivée lorsqu'elle est oxydée (Sokolov *et al.*, 2006). Dernièrement, la régulation de l'activité de cette enzyme a mis en évidence l'importance de la formation d'un pont disulfure entre deux cystéines du site actif (Silver *et al.*, 2013). À nouveau, la TRX f1 est la protéine qui semble être la plus efficace dans la restauration de la SEX4, alors que la TRX m3 ne paraît pas avoir de réels effets sur cette modification (Silver *et al.*, 2013). Ce changement de structure est dépendant du statut rédox de la molécule et régule par la même occasion l'activité de cette enzyme (Silver *et al.*, 2013).

La dernière enzyme, PHS1 ou PHO1, semble avoir un rôle mineur dans cette voie de dégradation. La PHS1 est localisée aux plastes, puisqu'il existe une autre enzyme présente dans le cytoplasme (Zeeman *et al.*, 2004). Chez des mutants d'insertion d'ADN-T dans ce gène, les plantes n'ont pas de modifications significatives du contenu en amidon en comparaison avec les plantes sauvages. Par contre, ces mutants sont plus sensibles lorsqu'il y a un déficit en eau dans le milieu (Zeeman *et al.*, 2004). La PHS1 serait aussi l'une des cibles des thiorédoxines, mais pour le moment, aucune n'a été identifiée clairement (Balmer *et al.*, 2006). Pourtant, ce statut rédox ne serait pas réversible comme pour les autres enzymes de cette voie (Glaring *et al.*, 2012). Par ailleurs, cette enzyme serait finalement plus importante pour la synthèse des malto-oligosaccharides (Hwang *et al.*, 2010).

En résumé, les thiorédoxines de type f semblent être impliquées dans la régulation d'enzymes associées à plusieurs voies de biosynthèse, comme le cycle de Calvin-Besson et la synthèse de l'amidon. Par ailleurs, l'ensemble de ces voies ont un lien assez fort avec l'alternance nuit-jour et la perception de ces variations, qui vont avoir un impact dans les réponses de la plante.

## I.5. Objectifs

La MCP végétale n'a pas été autant étudiée que la MCP animale, pourtant, quelques éléments commencent à être déterminés. Comme nous l'avons vu, certains mécanismes sont conservés entre les végétaux et les animaux. Malgré cela, les connaissances des mécanismes propres aux végétaux sont assez limitées. L'objectif général de ce projet doctoral était de mieux comprendre les mécanismes participant et régulant la MCP de la cellule végétale suite à un stress abiotique. Plus particulièrement, le but était d'identifier de nouveaux acteurs de la MCP végétale et de déterminer leur rôle dans la régulation de la MCP induite par les UV-C.

Nous nous sommes intéressés à deux gènes identifiés comme ayant une probable implication dans la MCP induite par les UV-C : *Bax Inhibitor-1* et *thiorédoxine f1*. En effet, l'homologue animal du gène de *BI-1* code pour un facteur anti-apoptotique avéré, c'est-à-dire, qu'il a la capacité de réprimer l'entrée en mort de la cellule. Par ailleurs, les homologues des thiorédoxines chez les mammifères ont aussi une fonction anti-apoptotique et jouent un rôle dans la régulation du stress oxydatif chez la cellule. Ces protéines, en interagissant avec les enzymes cibles, influent sur leur état rédox et donc sur leur activité. Certaines d'entre elles effectuent la détoxification suite à une activation par les TRX, et protègent notamment la cellule des effets néfastes des ROS.

Premier objectif : un premier objectif était d'identifier et de caractériser de nouveaux mutants altérés dans la régulation de l'expression de *BI-1* lors d'un traitement aux UV-C, un inducteur de la MCP. Un mutant appelé 2017 a été isolé dans ce crible mais sa caractérisation préliminaire a été interrompue pour des raisons techniques.

Deuxième objectif : un second objectif était de caractériser l'implication de la TRX f1 dans la MCP induite par les UV-C et dans la réponse à différents stress abiotiques. Cette analyse a été réalisée à l'aide de mutants d'insertion et de surexpresses des gènes *AtTRX f1* et *AtTRX f2*.

## CHAPITRE 2

### MATÉRIELS ET MÉTHODES

#### II.1. Conditions de culture et matériels biologiques

Au préalable de l'ensemble des expériences, les graines ont été stérilisées selon le protocole suivant. Un prélavage à l'éthanol 70% a été effectué puis les graines ont été placées en agitation continue durant 20 minutes dans la solution de stérilisation (10% sodium hypochlorite, et 0,02% triton). Après 5 lavages à l'eau, les graines ont été conservées dans la dernière eau de rinçage pendant deux à quatre jours à 4°C pour lever la dormance et synchroniser la germination.

Pour la culture en terre, les graines ont été semées et cultivées sur un mélange de terreau (Agro mix, 0.4-0-0.02) et de vermiculite (2:1, v:v). La photopériode de la chambre de croissance (Convion, modèle MTR30) était de 16 heures avec une intensité lumineuse de  $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  à 22°C, et la nuit était à 19°C.

Pour la culture *in vitro*, les graines ont été semées sur un milieu de germination (GM), comprenant 0,5 X de Murashige et Skoog (MS) à un pH de 5,7 (Murashige et Skoog, 1962), 1% de saccharose et 0,8% d'agar. Les plantes exposées aux UV-C ont été placées dans une chambre de croissance (Sanyo, modèle MLR-350) en lumière continue à 22°C et analysées selon les expériences entre trois et dix jours après la germination. Pour les expériences mesurant l'hypocotyle, les plantules ont été germées sur GM à l'obscurité à 4°C durant quatre semaines. Dans le cas des suspensions cellulaires, les cellules ont été cultivées dans un milieu liquide qui contient du MS à un pH de 5,7, 3% de sucrose, du MES hydrate ( $\text{C}_6\text{H}_{13}\text{NO}_4\text{S} \cdot \text{xH}_2\text{O}$ ) à 0,59 g/L, des vitamines Gamborg et du 2,4-D (acide 2,4-dichlorophénoxyacétique).

Ces cellules sont en lumière continue et agitées à 120 rpm. Enfin, pour les autres expériences, la photopériode a été maintenue à 16 heures avec l'intensité lumineuse précédente.

## II.2. Crible de mutants régulant l'expression de *BI-1* : détection de la luminescence

Djoumad (2010) a réalisé les constructions et les transformations pour ce crible de mutants. Le crible se base sur l'expression du gène rapporteur de la luciférase (Luc) qui a été placé sous le contrôle du promoteur de *BI-1* (*pAtBI-1::luciférase*). Les résultats de Djoumad ont montré que l'expression de *AtBI-1* augmente en réponse aux UV-C, un inducteur de MCP (Figure 16). Ainsi, un traitement aux UV-C augmente l'expression de la luciférase. Les graines homozygotes pour la transformation *pAtBI-1::luciférase* ont été mutagénéisées à l'EMS, ou l'ethyl methane sulfonate (Djoumad, 2010). Les graines M2 mutées ont été produites, puis germées sur GM. Des plantules de 10 jours ont été exposées aux UV-C et l'expression de la luciférase a ensuite été détectée avec une caméra ultra-sensible (MicroMAX System, Roper Scientific) et ensuite analysée avec le logiciel WinView/32. Les mutants affectés dans la régulation de l'expression de *AtBI-1* ou dans les voies de signalisation conduisant à l'activation du promoteur ont de ce fait été sélectionnés (modification de l'activité de la luciférase).

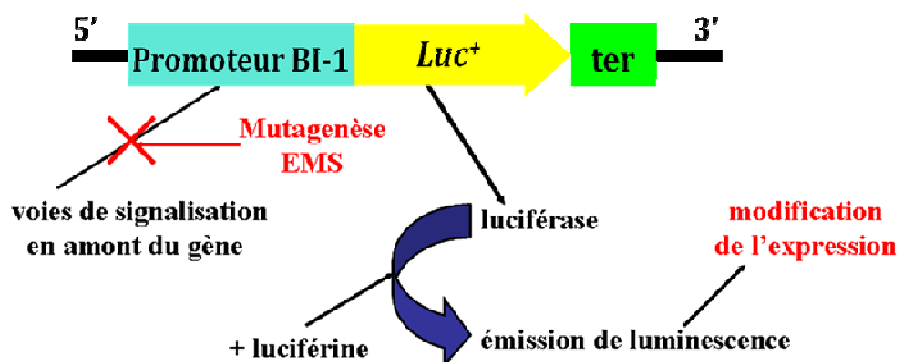


Figure 16. Principe du crible de mutants qui ont la construction *AtBI-1::luciférase*. Image tirée de la thèse de Djoumad (2010).

Par ailleurs, des PCR sur ADN génomique extraits selon les protocoles présentés ci-dessous (cf. vérification de la présence de l'ADN-T) ont été réalisées pour s'assurer de la présence de la construction.

### **II.2.1. RT-PCR et RT-qPCR**

Les protocoles d'extraction d'ARN, ainsi que ceux réalisés pour les RT-PCR et les RT-qPCR ont été présentés et détaillés dans la partie analyse transcriptionnelle. De même pour les amorces utilisées ici, elles sont présentées dans le Tableau 8.

### **II.2.2. Essai de PCR-Inverse pour déterminer l'insertion de l'ADN-T auprès du mutant 2017**

La détermination de l'insertion de l'ADN-T (fusion du promoteur de *AtBI-1* avec la *luciférase*) chez les mutants 5PL20E et 2017 est effectuée à l'aide de la technique de la PCR-Inverse. Le principe de cette technique est de digérer l'ADN génomique extrait de nos échantillons à tester avec une enzyme de restriction commune et connue. Dans ce cas-ci, les ADN génomiques sont digérés par *EcoRI*, *HindIII* ou *NcoI*. Ensuite, la T4 DNA ligase ligue cet ADN digéré sur lui-même, et le circularise. Enfin, une PCR-Inverse est faite avec l'utilisation d'amorces spécifiques connues (Figure 17 et Tableau 1). Les conditions de la PCR-Inverse sont : cycle 1 (1x) à 98°C, 2 minutes; puis cycle 2 (35x) avec une première étape à 98°C durant 10 secondes, une seconde étape à 60°C durant 30 secondes et une dernière étape à 72°C durant 4 minutes; enfin, le cycle 3 (1x) à 72°C durant 10 minutes. La Taq utilisée est la Taq High-Fidelity DNA polymerase Phusion (NEB), pour limiter le nombre d'erreurs faites par l'enzyme.

Les amorces ont été déterminées pour se liguer au niveau du promoteur de *BI-1* et de l'ADN-T. Par la suite, une purification sur gel de la PCR-Inverse pour les fragments non communs aux échantillons est réalisée avant d'envoyer les échantillons à séquencer.

Tableau 1. Amorces utilisées pour les PCR-Inverses selon l'enzyme de restriction utilisée.

Nom	Séquence
pBI-1 a NcoI_F	5' - TGGCTGTAGAGGAAGTTCCAGT - 3'
pBI-1 a NcoI_R	5' - AGAGAAACGCTTGGTGGAGAGA - 3'
pBI-1 a EcoRI_F	5' - TTCTCTCCACCAAGCGTTTCTC - 3'
pBI-1 a EcoRI_R	5' - GTTAATGGGCTTTGCGATCAGC - 3'
pBI-1 a HindIII_F	5' - GGCTGTAGAGGAAGTTCCAGTT - 3'
pBI-1 a HindIII_R	5' - CCATACTCTCGACCCATGATTTACG - 3'

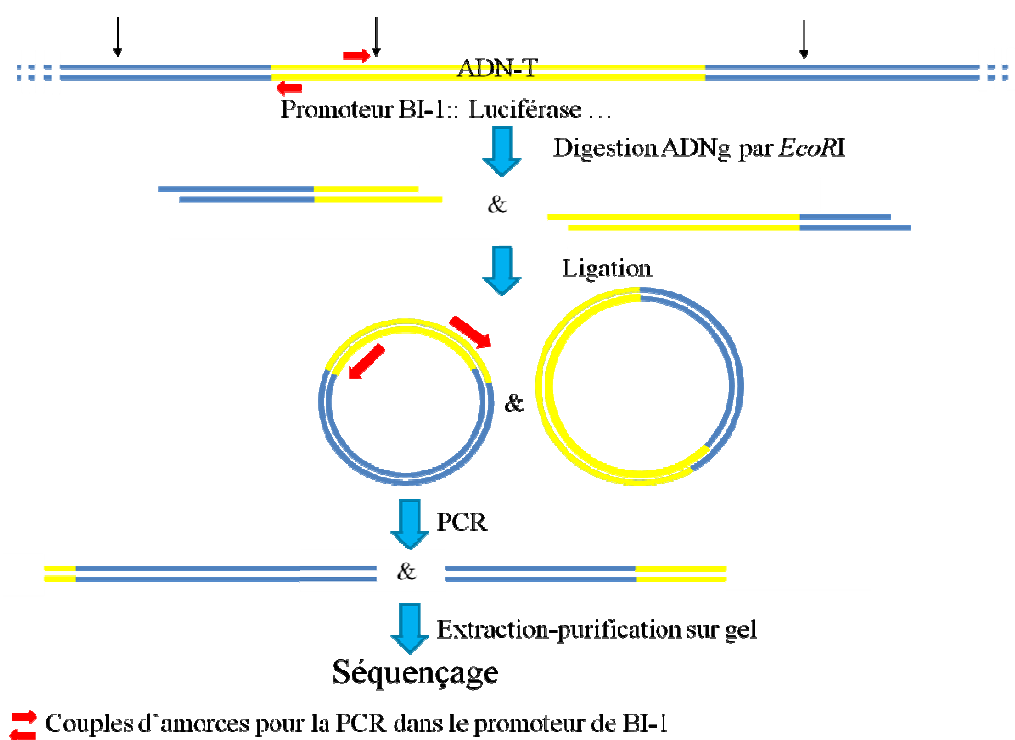


Figure 17. Principe de la PCR-Inverse adapté de Szabados *et al.*, 2002.

### II.3. Isolement des mutants des *TRX f1* et *f2*

Au cours d'une étude précédente, Djoumad (2010) a isolé un mutant appelé *72H* à partir d'une banque de mutants d'insertion d'ADN-T transformés avec le gène de la luciférase sans promoteur (Alvarado *et al.*, 2004). En bref, environ 100 à 300 graines provenant du pool de



graines T2 ont été semées sur GM entre 10 à 12 jours. Ensuite, 2 mM de D-Luciférine (Gold Biotechnology) ont été vaporisés sur les plantules. L'activité de la luciférase a été visualisée à l'aide d'une caméra CCD (MicroMAX System, Roper Scientific) et ensuite analysée avec le logiciel WinView/32. Un traitement aux UV-C (5 kJ/m<sup>2</sup>) des plantules a été réalisé avant que ces dernières ne soient replacées dans la chambre de croissance pour 24 heures. Enfin, l'activité de la luciférase a été à nouveau prise et analysée. Les plantules, qui avaient initialement une forte activité de la luciférase, mais qui avaient cette même activité fortement diminuée après l'exposition aux UV-C, ont été sélectionnées et transférées en sol pour l'obtention de graines. L'identification de la localisation de l'insertion de l'ADN-T dans le génome a été faite par Djoumad (2010), avec la technique du TAIL-PCR selon le protocole de John McElver (Weigel et Glazebrook, 2002). L'insertion de l'ADN-T chez le mutant 72H ayant été localisée dans le promoteur du gène *AtTRX f1*, le mutant a donc été renommé ici *trxf1-1*.

Des surexpresseurs de TRX f1 ont aussi été créés à l'aide du plasmide pBIN19, et nommés *35S::TRXf1* (Djoumad, 2010). Le gène de la *TRX f1* a été fusionné au promoteur constitutif 35S CaMV. Le gène *NPTII* qui confère une résistance à la Kanamycine (50 µg/mL), est aussi présent dans l'ADN-T.

Les autres lignées d'insertion d'ADN-T d'*Arabidopsis thaliana* ont été commandées auprès du stock center (ABRC, Ohio State University, Columbus, USA). Pour la TRX f1, nous avons le mutant SALK\_099762C, nommé *trxf1-2* et pour la TRX f2, nous avons CS307702, nommé *trxf2-1*. D'autres mutants d'insertion provenant de banque de gènes ont été testés, mais l'expression des *TRX f* n'était pas ou était peu affectée chez ces mutants. De ce fait, ces mutants ne sont pas étudiés dans cette thèse (cf. Annexes 1 et 2).

**Tableau 2. Liste des mutants sélectionnés pour notre étude.**

Nom	Nom d'origine	Insertion-construction
WT, sauvage	Columbia 0, ou Col 0	Référence
<i>trxf2-1</i>	Cs307702-1	Mutant d'insertion d'ADN-T dans l'intron 1
<i>trxf1-1</i>	72H	Mutant d'insertion d'ADN-T dans la région 5' UTR, obtenu dans notre laboratoire
<i>trxf1-2</i>	SALK_099762C	Mutant d'insertion d'ADN-T dans l'exon 2
<i>trxf1;f2</i>	Double mutant (A2-2)	Croisement entre <i>trxf1-1</i> (♀) et <i>trxf2-1</i> (♂)
<i>trxf2;f1</i>	Double mutant (B2-33)	Croisement entre <i>trxf2-1</i> (♀) et <i>trxf1-1</i> (♂)
<i>35S::TRXf1-1</i>	Surexpresseur (35S-21)	Gène <i>trxf1</i> sous le contrôle du promoteur constitutif <i>35S CaMV</i> , obtenus dans notre laboratoire
<i>35S::TRXf1-2</i>	Surexpresseur (35S-6)	
<i>35S::TRXf1-3</i>	Surexpresseur (35S11)	

#### II.4. Microorganismes

Des cellules compétentes d'*E. coli* DH5 $\alpha$  ont été utilisées pour les transformations bactériennes et l'obtention de plasmide recombinants (Tableau 3).

Pour les essais d'expression des TRX f1 et f2 dans la levure, deux souches de levure de *Saccharomyces cerevisiae* ont été utilisées. La souche utilisée est QX95001 (Tableau 3), dérivée de la souche BF264-15Dau (*MAT $\alpha$  ade1, his2, leu2-3, 112 trp1-1a, ura3*) (Lew *et al.*, 1991). Elle a servi pour répéter les expériences de Djoumad (2010). Le laboratoire de la Dre Louise Brisson (Université Laval, Québec, Canada) nous a fourni gracieusement cette souche. Des expériences d'essais d'expression des gènes *Trx f1* et *Trx f2* ont été faites pour étudier l'implication de ces gènes en réponse à l'expression de Bax, un inducteur de MCP.

**Tableau 3. Liste des microorganismes utilisés.**

<b>Nom</b>	<b>Constructions</b>	<b>Caractéristiques</b>
<i>E. coli</i> DH5a	Transformation chimique. Culture à 37°C.	Clonage.
<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 des gènes <i>Trx f1</i> et <i>Trx f2</i> en présence ou absence de la protéine <i>Bax</i> .

## **II.5. Analyse bio-informatique**

Les séquences des gènes ont été trouvées sur TAIR (<http://www.arabidopsis.org/>). Une analyse de leur expression dans la plante a été effectuée à l'aide du site internet Arabidopsis eFP Browser (<http://bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi>). L'alignement des séquences des TRX f a été réalisé avec le site internet NPS ([http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa\\_automat.pl?page=/NPSA/npsa\\_multalinan.html](http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_multalinan.html)).

## **II.6. Plasmides et constructions**

Suite à une extraction d'ARN de Col0 (WT) à l'aide de la trousse «RNeasy Plant Mini» (Qiagen), une RT-PCR a été réalisée en utilisant la polymérase *Pfu* (Stratagène). Les produits d'amplification ont été migrés sur gel d'électrophorèse puis purifiés avec la trousse « QIAquick Gel Extraction » (Qiagen). Selon le type de clonage, les fragments d'ADN ont été insérés dans les vecteurs de transformation finaux (Tableau 4).

**Tableau 4. Liste des divers vecteurs utilisés.**

Nom	Constructions	Caractéristiques
pSCA- <i>eyfp</i>	Clonage des gènes <i>trx f1</i> et <i>trx f2</i> sous contrôle du promoteur constitutif 35S CaMV. Transformation et expression transitoire dans les protoplastes d' <i>A. thaliana</i> .	Contient le gène <i>Amp-R</i> pour la résistance à l'ampicilline (50 µg/mL). Contient le gène de la <i>yfp</i> sans promoteur pour la localisation. (cf. Annexe 3)
pBIN 19	Clonage du gène <i>trx f1</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). = Réalisé par Djoumad (2010)
pYX112	Clonage des gènes <i>trx f1</i> et <i>trx f2</i> sous contrôle du promoteur constitutif TPI. Transformation et expression dans la levure <i>S. cerevisiae</i> , ayant le gène de l'uracile, URA3.	Contient le gène <i>Ap</i> pour la résistance à l'ampicilline (50 µg/mL). (cf. Annexe 4)

Le plasmide pSCA-*eyfp* nous a été donné par Dr Eric Ducos du laboratoire EA2106 - Biomolécules et Biotechnologies Végétales (Université François Rabelais, Tours, France). Le plasmide pYX112 nous a été fourni, tout comme pour la levure, par le laboratoire de la Dre Louise Brisson (Université Laval, Québec, Canada). Le plasmide pBIN19 provient du laboratoire du Dr Kamal Bouarab (Université de Sherbrooke, Québec, Canada).

### II.6.1. Surexpression dans les levures et les protoplastes

Les expériences de fonctionnalité des gènes *TRX f1* et *TRX f2* dans les deux souches de levures ont été réalisées à partir des protocoles utilisés par Djoumad (2010), alors que les expériences d'expression transitoire pour la localisation subcellulaire dans des protoplastes ont été réalisées à partir du protocole de Yoo *et al.* (2007).

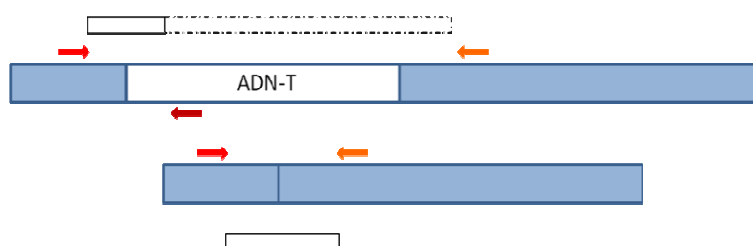
L'obtention des ADNc correspondant aux gènes de *TRX f1* et *TRX f2* a été réalisé par une RT-PCR en utilisant les amorces adéquates (Tableau 5). Des sites de restriction permettant le clonage des gènes dans pYX112 ou pSCA-*eyfp* ont été rajoutés à la séquence de l'amorce. De plus, dans le cas des expérimentations des levures, les séquences en 5' correspondant au peptide d'adressage aux chloroplastes ont été retirées pour que nos protéines soient fonctionnelles. L'ensemble des éléments, fragment d'ADN et plasmide, ont été digérés par les enzymes *EcoRI* et *BamHI* pour les levures, et par *BglIII* et *SpeI* pour les protoplastes. Après purification sur gel, les gènes ont été clonés soit dans le vecteur pYX112 sous le promoteur constitutif TPI (triose phosphate isomérase) pour les levures, soit dans le vecteur pSCA-*eyfp* sous le promoteur constitutif 35S CaMV.

**Tableau 5. Amorces pour les divers clonages et expression dans la levure et dans les protoplastes.**

Nom	Séquence de l'amorce	Utilisation
Trx EcoRI	f1- 5' - <u>CCGAATTC</u> CATGTGTAGCTTAGAAACCGTTAATG - 3'	Amplification et clonage du gène
Trx BamHI	f1- 5' - <u>CGGGATCCT</u> CATCCGGAAGCAGCAGACC - 3'	<i>TRX f1</i> dans le vecteur pYX112
Trx EcoRI	f2- 5' - <u>CCGAATTC</u> CATGTGTAGCTTAGAAACAGTGAATG - 3'	Amplification et clonage du gène
Trx BamHI	f2- 5' - <u>CGGGATCCT</u> CAGCCTGACCTTGCTGCTT - 3'	<i>TRX f2</i> dans le vecteur pYX112
TrxF1_BglIII	5' - <u>GGGAAGATCT</u> GGGATGCCTCTTCTCTCCGTCTTTC - 3'	Amplification et clonage du gène
TrxF1_SpeI	5' - CTAG <u>ACTAGT</u> TCCGGAAGCAGCAGACC - 3'	<i>TRX f1</i> dans le vecteur pSCA- <i>eyfp</i>
TrxF2_BglIII	5' - <u>GGGAAGATCT</u> GGGATGCCTCTCTCTCCGACTTGC - 3'	Amplification et clonage du gène
TrxF2_SpeI	5' - CTAG <u>ACTAGT</u> GCCTGACCTTGCTGCTTCAATG - 3'	<i>TRX f2</i> dans le vecteur pSCA- <i>eyfp</i>

## II.6.2. Vérification de la présence de l'ADN-T

Après une extraction des ADN génomiques selon la méthode d'Edwards *et al.* (1991), une PCR a été réalisée avec 1  $\mu$ L de l'extraction et les amorces appropriées (Tableau 6). Le couple d'amorces RP et FP correspond aux amorces situées de part et d'autre de la séquence codante du gène. La dernière amorce se fixe sur l'ADN-T inséré lorsque celui-ci est présent. L'objectif premier est de confirmer la présence de l'ADN-T inséré pour différents mutants de *trx f1* et *trx f2*. Si une amplification est observée pour le couple RP-FP, cela signifie que l'ADN-T n'est inséré que dans un des deux allèles, ou absent. Par contre, si une bande est observée avec l'une des deux autres combinaisons (RP et 3<sup>ème</sup> amorce, ou FP et 3<sup>ème</sup> amorce), alors l'ADN-T est bien inséré dans le génome à l'état homozygote (cf. Annexes 1 et 2, et Figure 18). Le test avec ces deux combinaisons d'amorces a été fait, puisque nous ignorons le sens de l'insertion de l'ADN-T dans le génome.



**Figure 18.** Schéma de l'hybridation des 3 amorces sur l'ADN génomique en fonction de l'insertion ou non de l'ADN-T chez les mutants de *trx f1* et *trx f2*.

Pour les surexpresses, le couple d'amorces utilisé permet de déterminer la présence de la construction. En effet, la première amorce s'hybride au niveau du promoteur du gène, alors que la seconde s'hybride dans la séquence codante de la TRX f1. Comme précédemment, suite à une extraction d'ADN génomique (ADNg) à la méthode d'Edwards, une PCR est réalisée avec le même mélange que pour la vérification de l'insertion. En plus du 1  $\mu$ L de l'extraction d'ADNg, le mélange réactionnel comprend aussi des dNTP à 0,4  $\mu$ M, les amorces à 0,4  $\mu$ M, le tampon (1X) de la *Taq* et la *Taq* DNA polymérase (à 2,5 unités, de New England Biolabs, NEB). Le programme de 35 cycles est utilisé pour les conditions suivantes : 95°C durant 30

secondes, 58°C pour 30 secondes et 72°C pour 4 minutes. À cela, un cycle de dénaturation de l'ADN au début, à 95°C durant 5 minutes, et un cycle d'élongation finale à la fin à 72°C durant 10 minutes sont ajoutés.

**Tableau 6. Amorces utilisées pour la vérification de la présence de l'ADN-T par PCR sur ADN génomique.**

Nom	Séquences	Utilisation
<b>ThrxF1-FPA</b>	5' - TCGAGAATTGCGGGTCAATCAG - 3'	Amorces pour des mutants <i>trx fl</i> (cf. Annexe 1)
<b>ThrxF1-RPA</b>	5' - AATGGCGTTGCGATGTCGAATG - 3'	
<b>ThrxF1-FPA3</b>	5' - TTTGCTCAGTCCGTTGAGACCT - 3'	Amorces pour des mutants <i>trx fl</i>
<b>ThrxF1-RPA3</b>	5' - GCACATTGCACCGAATCTTCCA - 3'	
<b>LBb1.3</b>	5' - ATTTTGCCGATTTTCGGAAC - 3'	Les différentes amorces hybridées sur les ADN-T
<b>LucF</b>	5' - AAGAGATACGCCCTGGTTCCT - 3'	
<b>ThrxF1-ADNT_1</b>	5' - ATATTGACCATCATACTCATTGC - 3'	Amorces pour les autres mutants <i>trx f2</i> (cf. Annexe 2)
<b>Thrx_FP1</b>	5' - GCGACGGAATCAAGTAGTTC - 3'	
<b>Thrx_RP1</b>	5' - TTGACCGTTCCACAAGAAATC - 3'	
<b>Thrx_FP2</b>	5' - CTTTAACAATTGGCCAGAACG - 3'	
<b>Thrx_RP2</b>	5' - TCTTGAACCTTGATCGATTGGG - 3'	
<b>Thrx_FP3</b>	5' - GATTCCGGTTAAGGGAACAGCA - 3'	
<b>Thrx_RP3</b>	5' - AATTCTGAACCTCGCGTCCATC - 3'	Amorces pour le mutant <i>trx f2-1</i>
<b>35S21-F2</b>	5' - CGTAAGGGATGACGCACAAT - 3'	Présence de la construction <i>35S::TRXfl</i>
<b>35S21-R2</b>	5' - GTAAGGAATCCGGCACTGTT - 3'	
<b>BI-1::LucF</b>	5' - ACCCTTCTCCGTGTTTAATGCC - 3'	Projet BI-1
<b>BI-1::LucR</b>	5' - TCATAGCTTCTGCCAACCGAAC - 3'	

Le Tableau 7 suivant présente les amplifications attendues lorsque les couples d'amorces peuvent s'hybrider et générer un nouveau fragment.

**Tableau 7. Association des amorces pour déceler l'ADN-T ou la construction.**

Nom	Nom d'origine	Couples d'amorces
WT, sauvage	Columbia 0, ou Col 0	Thrx_FP3 + Thrx_RP3 = gène entier de <i>TRX f2</i> ThrxF1-FPA + ThrxF1-RPA = gène entier de <i>TRX f1</i> (pour 72H) ThrxF1-FPA3 + ThrxF1-RPA3 = gène entier de <i>TRX f1</i> (pour SALK_099762C)
<i>trx f2-1</i>	Cs307702-1	Thrx_RP3 + ThrxF1-ADNT_1 = insertion ADN-T
<i>trx f1-1</i>	72H	ThrxF1-FPA + Luc = insertion ADN-T
<i>trx f1-2</i>	SALK_099762C	ThrxF1-FPA3 + LBb1.3 = insertion ADN-T LBb1.3 + ThrxF1-RPA3 = insertion ADN-T
<i>trx f1;f2</i>	Double mutant (A2-2)	Couples des simples mutants
<i>trx f2;f1</i>	Double mutant (B2-33)	
<i>35S::TRXf1-1</i>	Surexpressueur (35S-21)	35S21-F2 + 35S21-R2 = fusion du promoteur 35S CaMV avec le gène de <i>TRX f1</i>
<i>35S::TRXf1-2</i>	Surexpressueur (35S-6)	
<i>35S::TRXf1-3</i>	Surexpressueur (35S11)	
<i>PL20E</i>	Lignée parentale	BI-1::LucF + BI-1::LucR = présence de l'ADN-T, fusion du promoteur de <i>BI-1</i> avec le gène rapporteur de la luciférase (cf. partie II.15.)
<i>2017</i>	Mutant de BI-1	

## II.7. Transformation des levures et essais de fonctionnalité dans les levures

### II.7.1. Transformation des levures

Une pré-culture de 30 mL a été réalisée 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 pour la levure QX95001 avec *Yep51:Bax* (Xu et Reed, 1998). Pour la



seconde souche, l'acide aminé a été remplacé par de l'uracile. Lorsqu'une DO de 1 à 1,5 est atteinte, les levures sont centrifugées (2500 rpm, 5 min) et lavées 2 fois avec de l'eau stérile. Puis les levures sont reprises dans une solution fraîche de TE 0,1 M, LiAc 0,1 M et incubées à 30°C pendant 1 h en agitation (250 rpm). Ensuite, la transformation est effectuée en mettant dans un même tube 100 µL de culture, avec 1 µg de plasmide et 10 µL d'ADN de sperme de hareng (10 mg/mL) préalablement dénaturé. Ce mélange est mis en présence d'une solution de 700 µL constituée de PEG 4000 à 40%, de TE 0,1 M et de LiAc 0,1 M. Les levures sont incubées à 30°C durant 3 heures sous agitation constante (250 rpm). À la fin, elles subissent un choc thermique à 42°C durant 15 minutes, puis sont directement placées sur glace durant 2 minutes. Après centrifugation, les levures sont reprises dans de l'eau stérile puis étalées sur un milieu sélectif contenant du glucose pour être sélectionnées en absence des acides aminés de sélection. Enfin, une incubation à 30°C durant 3 jours est nécessaire avant d'effectuer les tests de fonctionnalité.

### **II.7.2. Essai de fonctionnalité dans *S. cerevisiae* QX95001**

Les essais de fonctionnalité des gènes *TRX f1* et *TRX f2* ont été effectués sur du milieu YNB contenant soit du glucose (2%) dans lequel le gène *Bax* n'est pas exprimé, soit du galactose (2%) pour induire l'expression du gène *Bax*. Tout d'abord, les levures contenant les vecteurs Yep51:*Bax* et pYX112 (avec ou non un gène) sont incubées à 30°C dans du milieu YNB liquide contenant du glucose et un mélange d'acides aminés dépourvu de leucine. Au bout de 24 heures, les cultures sont lavées avec de l'eau stérile, puis diluées de manière à avoir une DO de 1. Ensuite, une série de dilutions successives est réalisée ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  et  $10^{-5}$ ) avec de l'eau stérile. À partir de chaque dilution, 3 µL de chaque dilution sont prélevés et déposés sur 2 boîtes de pétri contenant du milieu YNB solide sans les 2 acides aminés de sélection (leucine et uracile). Les boîtes de pétri sont alors incubées à 30°C durant 2 jours (pour celles avec du glucose) et 4 jours (avec le galactose). Le glucose et le galactose sont les sources de carbone.

## **II.8. Expression transitoire dans les protoplastes et localisation subcellulaire**

L'obtention et l'isolement des protoplastes ont été réalisés à partir du protocole de Yoo *et al.* (2007). Les protoplastes ainsi obtenus proviennent soit d'une culture liquide de cellules chlorophylliennes d'*Arabidopsis*, soit de feuilles découpées finement qui proviennent de plants d'*Arabidopsis* ayant poussé en jours longs. Les transfections des protoplastes avec les diverses constructions de pSCA-*eyfp* ont été faites à l'aide d'une solution de Ca<sup>2+</sup>/PEG 4000 fraîche selon le protocole de Yoo *et al.* (2007). Les observations sont réalisées le lendemain entre lame et lamelle au microscope à fluorescence AxioImager M1 (Carl Zeiss). Le filtre de la GFP ("Green fluorescent protein") est utilisé pour détecter la YFP, qui émet de la fluorescence à une longueur d'onde d'environ 530 nm si excitée à 515 nm. De même, la fluorescence naturelle de la chlorophylle est observée à une longueur d'onde de 650 nm après excitation à 460 nm. L'image est reconstruite à l'aide du logiciel AxioVision Rel. 4.8.

## **II.9. Induction de la MCP**

### **II.9.1. Les UV-C**

Pour étudier la MCP induite par les UV-C, les plantes de 10 jours sont exposées à différentes intensités d'UV-C de 0 kJ/m<sup>2</sup>, 5 kJ/m<sup>2</sup>, 10 kJ/m<sup>2</sup>, 30 kJ/m<sup>2</sup>, à l'aide du Stratalinker 2400 (Stratagene). Puis ces plantules sont replacées en chambre de croissance en lumière continue. Une quantification du contenu en chlorophylle 72 h après le traitement est effectuée ainsi qu'un marquage de la mortalité des cellules 24 h après l'irradiation et observation au microscope.

## **II.9.2. Le Méthyl viologène (MV)**

Pour le traitement au méthyl viologène (MV), les graines stérilisées sont mises à germer sur GM contenant 0  $\mu\text{M}$ , 0,25  $\mu\text{M}$ , 0,5  $\mu\text{M}$  et 1  $\mu\text{M}$  de MV. Les plantules sont placées en jours longs (16 h lumière/ 8 h obscurité) et observées durant 10 jours. 100 graines pour chaque génotype sont semées et les graines germées sont comptées, puis utilisées pour une quantification de la chlorophylle au 10<sup>ème</sup> jour ou pour une mesure de la taille complète de la racine.

## **II.10. Test de germination avec de l'acide abscissique (ABA)**

De même, pour les tests de germination avec de l'ABA, les graines stérilisées sont mises à germer sur GM contenant 0  $\mu\text{M}$ , 0,5  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$  et 5  $\mu\text{M}$  d'ABA. Les conditions de croissance sont semblables à celles utilisées pour les tests au MV. 100 graines pour chaque génotype sont semées et les graines germées sont comptées sur 10 jours. Certaines sont utilisées pour une quantification de la chlorophylle le dernier jour du test.

## **II.11. Analyse transcriptionnelle**

### **II.11.1. Extraction des ARN Totaux**

L'ARN total est extrait à l'aide de la trousse "RNeasy Plant Mini kit" (Qiagen) après ou non le traitement considéré. Un traitement à la DNase (n° cat. 79254, Qiagen) sur la colonne est réalisé selon les conseils du protocole donné par la compagnie.

### II.11.2. RT-PCR

Pour l'obtention des ADNc après l'extraction, une réaction de transcription inverse (RT) est réalisée sur 2 µg d'ARN totaux en utilisant l'enzyme « AMV reverse transcriptase » (Promega). Tout d'abord, les ARN totaux sont dénaturés par un traitement à 70°C durant 5 minutes en présence de 1 µg de poly(dT) (Promega). Ensuite, les échantillons sont laissés sur la glace pour 5 minutes. Enfin, la réaction pour la synthèse d'ADNc est effectuée en ajoutant au mélange réactionnel précédant du tampon pour la RT (1X), de la RNasine 40 U, des dNTP 25 pmoles, de la RT (30 U). Ce mélange de 25 µL est incubé durant 90 minutes à 42°C.

Pour chaque réaction de PCR, 1 µL de la réaction de RT est utilisé. Globalement, les cycles effectués correspondent aux indications de la *Taq* DNA polymerase utilisée (NEB). Il n'y a que les températures d'hybridation qui peuvent changer selon le couple d'amorce, mais nous essayons de sélectionner ceux qui ont une température d'hybridation optimale comprise entre 57°C et 60°C.

### II.11.3. Quantification par RT-qPCR

La synthèse d'ADNc par transcription inverse a été effectuée de la même façon que pour les RT-PCR. Les PCR quantitatives ont été réalisées avec 1 µL de l'ADNc synthétisé par la réaction de RT. L'enzyme utilisée est la "i<sup>Taq</sup> Universal SYBR Green Supermix" (BioRad, Cat# 172-5121) qui comprend un tampon. Les amorces utilisées pour les RT-PCR et les RT-qPCR sont listées dans le Tableau 8. Les réactions de RT-qPCR sont réalisées avec l'appareil 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Le programme de 40 cycles est utilisé sous les conditions suivantes : 95°C durant 15 secondes, 60°C pour 60 secondes et 72°C pour 15 secondes. Le gène de référence est celui de l'actine2, et sert à normaliser les échantillons. L'expression relative des gènes est calculée selon la méthode des doubles  $\Delta Ct$  (Pfaffl, 2001).

**Tableau 8. Amorces utilisées pour les RT-PCR et les RT-qPCR.**

Nom	Séquence	Information
<b>Actine2-F</b>	5' - GATCGGTGGTTCCATTCTTG - 3'	Gène de référence
<b>Actine2-R</b>	5' - CCTTTGATCTTGAGAGCTTAGAAAC - 3'	
<b>f1a</b>	5' - TTTCTCCTTCGCCGACGGCTTTAT - 3'	TRX f1
<b>f1b</b>	5' - AGAAACCAATCTTCGTCTCGTCCGGA - 3'	
<b>f2F article</b>	5' - AGCTATCGGAGAAGTACCAGGAC - 3'	TRX f2
<b>f2R article</b>	5' - CTTCAATGGCTGCAAGTAAGTCT - 3'	
<b>AT3G30720_F</b>	5' - GAAGAAGCCTCCTTTCGATCTG - 3'	Le gène QQS, "Qua-Quine Starch"
<b>AT3G30720_R</b>	5' - GCTGACCGTGTGAGTCTTGTTT - 3'	
<b>MYB15_CF</b>	5' - GACGGCTATAGCAACGAGATTA - 3'	MYB15
<b>MYB15_CR1</b>	5' - CGATATCCGCACCAAAAGTT - 3'	
<b>RRTF1_AF</b>	5' - GCGCCGTGTCAGGGTTTTTCCA - 3'	RRTF1
<b>RRTF1_AR</b>	5' - CCGAGACATCCTTCGATCCTACA - 3'	
<b>Athm1-F</b>	5' - TCTCGCTACACAACAATGG - 3'	TRX m1
<b>Athm1-R</b>	5' - TTCCGGCAACACAGAGAACATC - 3'	
<b>Athm2-F</b>	5' - CTGAACATCTAGACCTGGATAA - 3'	TRX m2
<b>Athm2-R</b>	5' - GTGGTTCCATTAGTCTAGTCC - 3'	
<b>Athm3-F</b>	5' - CGACAGACGATCTCTCCTATCTT - 3'	TRX m3
<b>Athm3-R</b>	5' - TTCCCATGATCGTTGTGTAACCTCAG - 3'	
<b>Athm4-F</b>	5' - TGTTATCGTGGGTCCTCTTTGT - 3'	TRX m4
<b>Athm4-R</b>	5' - TGGTTCAACGTGGAGTTATGCT - 3'	
<b>BI-1::LucR</b>	5' - TCATAGCTTCTGCCAACCGAAC - 3'	Luciféra se
<b>LucF</b>	5' - AAGAGATACGCCCTGGTTCCT - 3'	
<b>BI-1 3</b>	5' - CACACCTCGGTGACATGGACTAT - 3'	Pour le gène de BI-1
<b>3-BI-1 3a</b>	5' - TGGCCACACACGATAACAACCA - 3'	
<b>5-Lil3 B</b>	5' - TTGTGGCTGTAGCTGGAGTTCT - 3'	LIL3
<b>3-Lil3 B</b>	5' - TCTGGCTCTTCCATGCAGCTT - 3'	

## **II.12. Fragmentation de l'ADN génomique**

### **II.12.1. Extraction de l'ADN génomique**

L'extraction est réalisée sur des plantules âgées de 10 jours et traitées ou non aux UV-C. Ces plantules ont germé sur milieu GM en lumière continue, et sont replacées dans ces mêmes conditions après l'exposition aux UV-C. Le protocole utilisé dans ce cas-ci est celui de Hameed *et al.*, 2004.

### **II.12.2. Gel d'électrophorèse**

Suite à cette extraction, un dosage de l'ADN génomique extrait est effectué au Nanodrop (Thermo Scientific, Nanodrop 2000, Spectrophotometer). Sur gel d'agarose, 10 µg d'ADN génomique est migré pendant 4 heures à 50 volts. Enfin, une coloration du gel avec du SYBR gold est effectuée durant 20 minutes dans un bain contenant un mélange du tampon 1X TAE et 0,1 µL/mL de SYBR Gold. La photo est prise avec le Typhoon FLA9500, en fluorescence et le filtre.

## **II.13. Dosage de la chlorophylle**

Pour la détermination de la chlorophylle, les plantes âgées de 10 jours sont exposées aux UV-C, ou ont germé sur GM avec différentes concentrations de MV ou d'ABA. Pour chaque génotype et traitement, 30 plantes sont prélevées, pesées et placées dans 5 mL d'acétone à 80%. Après une incubation de 24 heures à 4°C et l'obscurité, les chlorophylles a et b sont mesurées à l'aide du spectrophotomètre (Ultrospec 2100 *pro* de Biochrom) aux longueurs d'ondes 663 nm et 646 nm. La formule pour connaître le contenu en chlorophylle a et b utilisée pour les calculs a été présentée par Lichtenthaler (1987).

$$\text{contenu en chlorophylle} = \frac{[(7,15 \times A663) + (18,71 \times A646)] \times V \text{ (en mL)}}{m \text{ (en mg)}}$$

#### **II.14. Mesure de la taille des racines (MV) et de la croissance racinaire (ABA)**

Suite à un test de germination en présence de MV (0  $\mu\text{M}$ , 0,25  $\mu\text{M}$ , 0,5  $\mu\text{M}$  et 1  $\mu\text{M}$ ) ou d'ABA (0  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$  et 50  $\mu\text{M}$ ) dans le milieu, des photos sont prises des racines au 10<sup>ème</sup> jour (sur 10 plantes, testées 4 fois). Les photos ont été analysées avec le logiciel ImageJ.

#### **II.15. Mesure de la conductivité**

Des feuilles sont prélevées sur des plantes âgées de 4 semaines, et subissent un traitement qui induit la MCP, comme une exposition aux UV-C. Des disques de feuilles de 7 mm de diamètre sont réalisés. Ils peuvent être pesés avant d'être placés dans l'eau distillée pour les laver de tous les résidus de terre. Puis ces disques sont transférés dans 6 mL d'eau distillée. Il faut au moins 6 disques, mais nos essais ont été faits sur 10 disques. La mesure de la conductivité est réalisée à différents temps en plongeant la sonde du "VWR Traceable expanded range conductivity meter" (n° cat. 89094-958) dans le tube.

#### **II.16. Microscopie**

##### **II.16.1. Visualisation de la mortalité cellulaire**

Suite à une exposition aux UV-C, il est possible de visualiser la mortalité cellulaire au niveau des racines de plantules âgées de 4 jours après une coloration à l'iodure de propidium (IP) et au diacétate de fluorescéine (FDA). Les cellules vivantes sont colorées en vert par le FDA (50  $\mu\text{M}$ ) alors que les cellules mortes sont colorées par l'IP (2,78  $\mu\text{M}$ ) et visualisées en rouge. 24 heures après l'exposition aux UV-C, les plantules sont placées dans une solution fraîche de

FDA/IP durant 5 minutes. Puis les racines sont lavées 3 fois avec de l'eau et observées entre lame et lamelle au microscope à fluorescence AxioImager M1 (Carl Zeiss). Les photographies sont prises et les images finales sont assemblées avec le logiciel AxioVision Rel. 4.8. Une quantification à l'aide du logiciel CellProfiler a été aussi effectuée.

### **II.16.2. Visualisation de la production de ROS au niveau des chloroplastes**

Lors d'un stress oxydatif, des ROS sont produits notamment au niveau des chloroplastes. À l'aide d'une solution de H<sub>2</sub>DCFDA (2',7'-dochlorofluorescein diacetate probe), il est possible de marquer les ROS produites lors d'un stress oxydatif. Pour ce faire, un protocole adapté de Leshem *et al.* (2006) a été mise au point. Des plantules âgées de 10 jours poussées en lumière continue sont exposées aux UV-C (0 kJ/m<sup>2</sup>, 10 kJ/m<sup>2</sup>, 30 kJ/m<sup>2</sup> et 50 kJ/m<sup>2</sup>), et replacées dans les mêmes conditions durant 24 heures. Le jour suivant, ces plantules sont incubées dans une solution de "phosphate-buffered saline" (PBS) avec 10 µM de H<sub>2</sub>DCFDA, durant 30 minutes. Ensuite, ces plantules sont lavées deux fois avec la solution de PBS, puis observées au microscope à fluorescence AxioImager Z1 (Carl Zeiss) entre lame et lamelle.

### **II.16.3. Visualisation du contenu en amidon au niveau de la pointe racinaire**

Une adaptation du protocole de Ding et Friml (2010) a été réalisée pour pouvoir visualiser l'accumulation de grains d'amidon dans la pointe racinaire. Les plantules sont placées sur des pétris carrés contenant du milieu GM et placées 3 jours à la verticale pour qu'elles poussent à la surface. Elles sont déposées sur la lame, et la coloration avec la solution de lugol à 1% est effectuée durant 2 minutes. Ensuite deux lavages successifs à l'eau sont réalisés avant de rajouter la solution de Visikol<sup>TM</sup> (Phytosys LLC, New Brunswick, New Jersey, USA, n° catalogue 01-30), qui remplace le chloral hydrate (Villani *et al.*, 2013). Ce produit permet de fixer et de décolorer les tissus tout en étant, selon les producteurs, moins toxique que le chloral hydrate. Les observations sont effectuées à l'aide du microscope AxioImager Z1 (Carl Zeiss).



## **II.17. Amidon**

### **II.17.1. Comparaison qualitative du contenu en amidon au niveau des feuilles**

Les plantes sont placées en chambre de croissance soient avec une photopériode de 16 heures soient en lumière continue. Les échantillons de feuilles sont prélevés à la fin de la phase lumineuse, et sont bouillis dans un tube de 50 mL, avec 25 mL d'éthanol à 80% (v/v). Puis ces échantillons sont plongés dans une solution fraîche de Lugol ou I<sub>2</sub>/KI (10 g KI, 1 g I<sub>2</sub> dans 1 L d'eau) durant 10 minutes. Ceux-ci sont ensuite rincés trois fois avec de l'eau durant deux heures. Les photos sont prises immédiatement avec un appareil Coolpix S8200 de Nikon. Les plantules sont placées entre lame et lamelle, et positionnées sur un écran lumineux de International Biotechnologies Inc. Ce protocole a été décrit par Li *et al.* (2007). Une quantification de l'aire des feuilles colorées au Lugol a été effectuée à l'aide du logiciel CellProfiler.

### **II.17.2. Quantification à l'aide d'une trousse du contenu en amidon**

Les quantifications d'amidon sont faites à l'aide de trousse commerciales. Une extraction des échantillons broyés avec une solution d'éthanol à 80% précède la détermination de la quantité d'amidon. Un premier essai a été réalisé à l'aide de la trousse STA20 (de Sigma-Aldrich, USA), en utilisant la méthode de l'amylase/amyloglucosidase. Par la suite, l'ensemble des répétitions a été réalisé à l'aide de la trousse K-TSTA 07/11 de Megazyme (Megazyme International Ireland 2011). La procédure suivie est celle recommandée par le guide d'utilisation pour déterminer la quantité totale d'amidon dans les échantillons. La mesure de l'absorbance est effectuée au spectrophotomètre Ultrospec 2100 *pro* de Biochrom.

### **II.17.3. Traitement au froid**

Des graines sont semées sur GM et placées à l'obscurité soit à 4°C, soit à 22°C. Après 3 semaines de germination, leur phénotype est observé. Les hypocotyles ayant été placés à 4°C sont photographiés de la même manière que pour la comparaison qualitative du contenu en amidon au niveau des feuilles. Les échantillons sont placés entre lame et lamelle sur un fond noir. Par contre, lorsque les échantillons sont colorés au préalable avec une solution de Lugol à 1%, comme dans la partie visualisation du contenu en amidon au niveau de la pointe racinaire, les échantillons sont placés entre lame et lamelle sur le même écran lumineux que celui utilisé pour les photos d'amidon au niveau des feuilles.

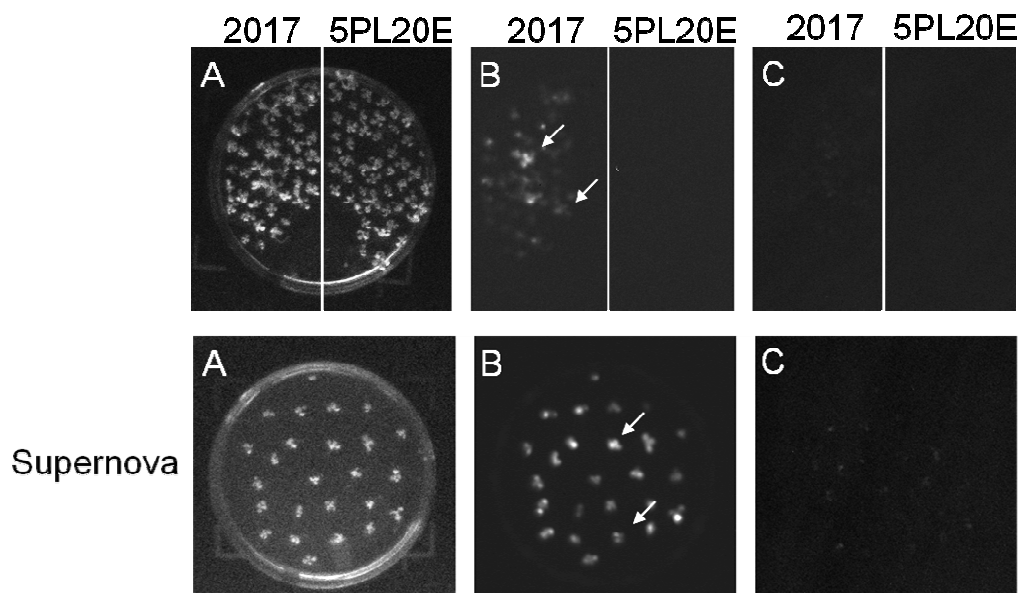
## CHAPITRE 3

### RÉSULTATS

#### **III.1. Identification et caractérisation de mutants qui régulent le promoteur de *BI-1* en réponse aux UV-C**

##### **III.1.1. Crible de mutants**

L'objectif de ce crible était d'identifier des composantes des voies de signalisation qui régulent l'activité du promoteur de *BI-1*, un gène impliqué dans la régulation de la MCP. Les premiers résultats obtenus par Djoumad (2010) montraient l'implication de BI-1 en réponse aux UV-C. En effet, une exposition aux UV-C augmente l'expression de *AtBI-1*. Des plantes d'*Arabidopsis* ont été transformées avec un ADN-T comprenant le promoteur du gène *AtBI-1* fusionné au gène de la luciférase (*pAtBI-1::luciférase*) (Djoumad, 2010). À l'aide d'une caméra ultra-sensible permettant de détecter l'activité de la luciférase en présence de son substrat, la luciférine, on peut détecter chez ces plantes l'augmentation de l'activité de la luciférase (luminescence) après une exposition aux UV-C. Après plusieurs rétrocroisements et sélection d'une lignée homozygote, appelée 5PL20E, les graines ont été mutagénéisées à l'EMS. Les graines de la génération M2 ont ensuite été générées pour effectuer le crible. Un crible de mutants basé sur la perte ou l'augmentation de l'expression de *pAtBI-1::luciférase* a été effectué à l'aide de la caméra ultra-sensible afin d'identifier des gènes mutés qui perturbent l'expression habituelle d'*AtBI-1* (tel que détecté par l'activité luciférase) en réponse aux UV-C. Par l'application de la luciférine et observation des plantules avant et après un traitement aux UV-C, les plantes, dont un changement d'intensité de luminescence a été observé (perte du signal ou augmentation importante de la luminescence), ont été sélectionnées.



**Figure 19. Observation de luminescence.** La première ligne représente les plantules 2017 à gauche et les plantules 5PL20E à droite. La seconde ligne est le témoin positif Supernova. **A.** Les plantules en lumière normale; **B.** Observation de l'activité de la luciférase (luminescence) avant un traitement aux UV-C; **C.** Observation de la luminescence 24 h après un traitement aux UV-C à 10kJ/m<sup>2</sup>. Les flèches blanches indiquent les plantules qui émettent de la luminescence avant une exposition aux UV-C.

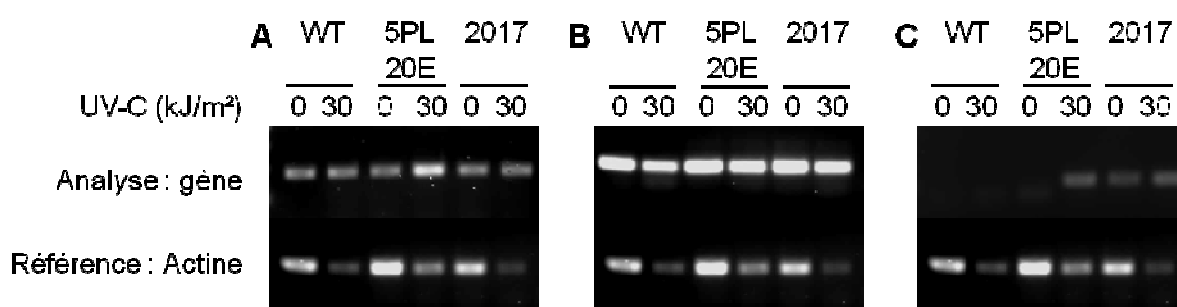
La mise au point du crible a été effectuée avec plusieurs témoins. D'abord, un témoin positif du surexpresseur Supernova (Alvarado *et al.*, 2004) qui exprime constitutivement et à haut niveau la luciférase est utilisé. Ce surexpresseur présente une très forte luminescence et permet donc d'effectuer une mise au point des paramètres de l'expérience. Des plantes sauvages ont été utilisées comme témoin négatif.

Ce crible a permis de sélectionner le mutant appelé 2017, qui présente une augmentation de la luminescence et donc de l'expression de *pBI-1::luciférase* avant même le traitement aux UV-C. Après autofécondation du mutant, de nouveaux tests ont été réalisés sur la progéniture de 2017 et de la lignée parentale, 5PL20E. Les résultats présentés à la Figure 19 confirment les

résultats précédents. Avant un traitement aux UV-C, de la luminescence est détectée chez 2017, alors que l'activité de la luciférase est non détectable chez le mutant 5PL20E. Par contre, après une exposition aux UV-C, le signal lumineux est très fortement réduit chez 2017. Malheureusement, pour la lignée parentale, nous aurions dû avoir un faible signal avant les UV-C, puis après l'exposition, une détection accrue de l'activité de la luciférase. Nous avons malgré tout poursuivi la caractérisation du mutant 2017.

### III.1.2. Caractérisation du mutant 2017

Nous avons d'abord évalué si l'augmentation de la luminescence chez le mutant 2017 corrélait avec une augmentation de l'expression du gène de *luciférase* régulé par le promoteur d'*AtBI-1* et avec une augmentation de l'expression du gène endogène *AtBI-1*. Une analyse semi-quantitative des niveaux d'expression avant et après un traitement aux UV-C a été réalisée par RT-PCR telle que présentée à la Figure 20. L'expression du gène *AtLIL3:2* (At5g47110) a également été évaluée, puisque ce gène est situé en amont du gène *AtBI-1* (At5g47120) et que ces deux gènes pourraient partager des éléments régulateurs communs au niveau de leur promoteur.



**Figure 20.** Évaluation de l'expression de *AtBI-1*, *AtLIL3:2* et la *luciférase* par RT-PCR chez la lignée parentale, 5PL20E, et le mutant 2017 comparée au sauvage (WT). **A.** *AtBI-1*, **B.** *AtLIL3* et **C.** *luciférase*. L'analyse est effectuée sur 30 plantules âgées de 10 jours, non-traitées (0 kJ/m<sup>2</sup>) ou 24 h après une exposition aux UV-C (30 kJ/m<sup>2</sup>).

L'actine a été utilisée ici comme gène de référence puisque son expression ne varie en général pas. En fait, les autres études publiées sur l'action des UV-C chez les plantes utilisent aussi l'actine comme gène de référence (Xie *et al.*, 2012), ou des UV-B (O'Hara et Jenkins, 2012, Wang *et al.*, 2012). Mais une exposition aux UV-C provoque des dommages sur l'ensemble des transcrits, et il s'avère que l'ARNm du gène de référence (l'actine) est aussi dégradé après ce traitement. Plusieurs autres gènes de référence ont été testés pour palier ce problème, dont le 18S, afin de pouvoir quantifier plus précisément la variation d'expression des gènes (données non montrées). Malheureusement, tous ont suivis le même profil que celui de l'actine. Nous avons donc continué malgré tout avec ce gène de référence en restant conscient de la limite expérimentale qu'il apporte à l'interprétation de nos résultats.

Tel qu'observé précédemment, l'expression de *AtBI-1* est clairement augmentée après un traitement aux UV-C chez la lignée parentale 5PL20E. Une augmentation néanmoins plus faible est également détectée dans les autres échantillons (WT et 2017), si on compare par rapport au niveau d'expression de l'actine. L'expression du gène de *luciférase* est également grandement stimulée par l'irradiation aux UV-C chez 5PL20E, alors qu'aucune luminescence n'a été détectée chez ces plantes. Chez le mutant 2017, l'expressions de la luciférase est déjà détectée avant l'irradiation aux UV-C, mais augmente également, dans une moindre mesure, après irradiation aux UV-C. Aucune bande n'est observée pour les plantes sauvages, puisqu'elles ne possèdent pas le gène. Enfin, l'expression de *AtLIL3:2* est réprimée dans tous les cas après une exposition aux UV-C. Ces premiers résultats n'ont pas permis de détecter un changement important du niveau d'expression d'*AtBI-1* chez le mutant 2017.

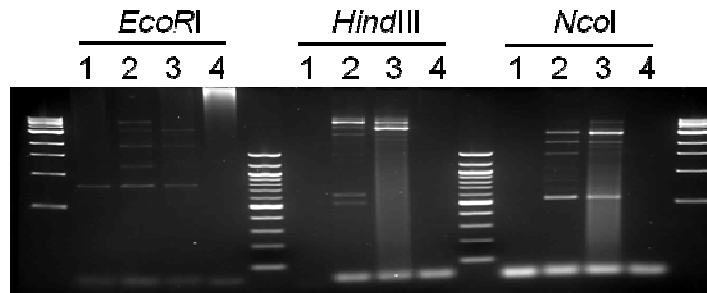
Pour préciser les niveaux d'expression de chaque gène, une quantification par RT-qPCR a été réalisée sur les mêmes échantillons. L'actine a été à nouveau utilisée comme gène de référence, mais il faut garder en tête que son niveau d'expression est aussi affecté par l'exposition aux UV-C. Ainsi, nos résultats ont montré que l'expression relative de *AtBI-1* chez les mutants est environ 2 fois plus importante avant les UV-C par rapport au type sauvage. De même, l'expression de *AtLIL3:2* est réprimée, avec une expression relative calculée d'environ

1,7 fois moins chez 2017 que pour le sauvage. Bien que l'expérience n'ait été faite qu'une seule fois, il n'est pas surprenant de détecter une expression relative de la *luciférase* nettement supérieure pour les mutants que pour le sauvage. Pour la lignée parentale, cette expression est augmentée de 10 fois. Mais pour le mutant 2017, elle l'est près de 800 fois. De plus, grâce à la détection de luminescence avec la caméra où l'activité de la luciférase y est observée chez les mutants, nous pouvons affirmer que la construction est fonctionnelle. Cette variation d'expression d'une plante à l'autre pourrait être due au site d'insertion de la construction dans le génome.

### **III.1.3. Localisation de l'insertion : PCR-Inverse**

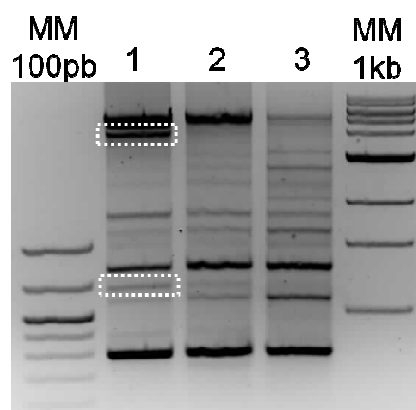
Puisque la variation de l'expression d'*AtBI-1* ne corrèle pas exactement avec celle de la luciférase chez la lignée parentale, nous avons décidé d'identifier le site d'insertion dans le génome de 5PL20E de l'ADN-T initial contenant *pBI-1::luciférase* par la technique de la PCR-Inverse. La lignée 5PL20E étant à l'origine du mutant 2017, les profils de PCR-Inverse doivent être identiques dans les deux cas. Dans un premier temps, nous avons sélectionné une enzyme de restriction qui peut couper dans le promoteur de *BI-1* et dans une région en amont du promoteur. Ceci permet d'isoler une région en amont du site d'insertion de l'ADN-T tout en incluant le promoteur de *AtBI-1*. Après digestion de l'ADNg, le fragment généré par la digestion est re-circularisé par une ligation. Ensuite, une PCR avec des amorces spécifiques au promoteur de *AtBI-1* est effectuée. Le résultat de cette amplification est migré sur gel d'agarose. Les bandes supplémentaires obtenues chez ces mutants par rapport au sauvage sont découpées et purifiées pour être envoyées à séquencer.

Les premiers essais portaient sur trois enzymes de restriction dont les résultats sont montrés dans la Figure 21 ci-dessous.



**Figure 21.** PCR-Inverse pour déterminer le site d'insertion de l'ADN-T chez 5PL20E et 2017. L'amplification a été faite à partir de fragments recircularisés après digestion par trois enzymes de restriction différentes *EcoRI*, *HindIII* ou *NcoI*. Génotypes : 1. 5PL20E, 2. 2017, 3. WT et 4. eau.

L'amplification étant faible, aucun nouveau fragment n'a été identifié par PCR-Inverse avec l'enzyme *EcoRI*. Les profils pour *HindIII* et *NcoI* ont permis d'identifier de nouveaux fragments chez le mutant 2017, mais les expériences ne semblent pas avoir fonctionné sur la lignée parentale. De plus, les nouveaux fragments étant peu abondants, il a été impossible d'avoir une quantité suffisante d'ADN pour pouvoir séquencer correctement ces échantillons. Une optimisation du protocole a donc été réalisée pour arriver à un résultat plus exploitable présenté à la Figure 22.



**Figure 22.** PCR-Inverse avec *EcoRI* pour déterminer le site d'insertion de l'ADN-T chez 5PL20E et 2017. Génotypes : 1. 5PL20E, 2. 2017 et 3. WT.



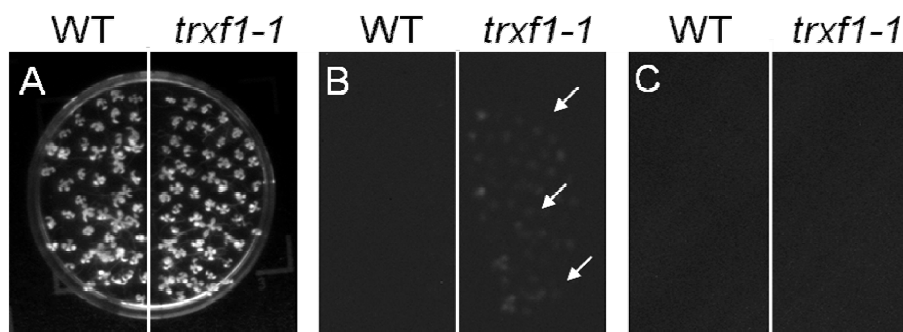
Après optimisation des différentes étapes, la PCR-Inverse avec l'enzyme *EcoRI* a été celle qui nous a donné les meilleurs résultats. Les fragments supplémentaires (en pointillés dans la Figure 22) ont été extraits et purifiés, puis envoyés à séquencer. Malheureusement, ces échantillons n'étaient pas assez concentrés. Même en combinant plusieurs expériences, nous n'avons pu obtenir assez de matériel.

Par ailleurs, nous avons constaté, dans la génération suivante chez notre mutant 2017, que l'ADN-T n'était plus détectable dans tous les essais. Étant donné l'importance de l'ADN-T pour suivre les changements de régulation de l'expression de *AtBI-1* chez ce mutant, nous avons choisi d'interrompre l'analyse du mutant 2017 pour se concentrer sur l'étude des thiorédoxines.

## **III.2. Implication des thiorédoxines f dans les voies de signalisation de la plante en réponse à divers stress abiotiques**

### **III.2.1. Identification d'un gène de thiorédoxine répondant aux UV-C**

Les travaux réalisés par Djoumad (2010) ont permis d'identifier un premier mutant d'insertion dans le gène de la thiorédoxine f1, nommé ici *trxf1-1*. Comme pour la première partie, la mise en évidence de ce mutant avait été faite par l'observation de l'activité de la luciférase avant et après un traitement aux UV-C en utilisant une banque de mutants d'insertion transformés avec un gène de luciférase sans promoteur. Le mutant sélectionné avait une expression importante de la luciférase avant un traitement aux UV-C, et cette expression était éliminée après le traitement aux UV-C. L'insertion de l'ADN-T a été localisée au niveau du promoteur du gène *AtTRX f1* (Djoumad, 2010). Ainsi, l'expression de la luciférase devenait contrôlée par le promoteur de ce gène. Les photographies prises à la caméra ultra sensible sont présentées dans la Figure 23 suivante.



**Figure 23. Observation de luminescence.** A. Les plantules en lumière normale; B. luminescence, avant un traitement aux UV-C; C. luminescence, 24 h après un traitement aux UV-C à 10 kJ/m<sup>2</sup>. Les flèches blanches indiquent les plantules qui émettent de la luminescence avant une exposition aux UV-C, mais qui n'en n'émettent plus après une irradiation.

Comme attendue, une activité luciférase est décelée chez le témoin positif, Supernova (données non montrées), mais pas pour les plantes sauvages, WT (Figure 23). Par contre, pour le mutant *trxf1-1*, cette activité n'est présente qu'avant une exposition aux UV-C. Après cette exposition, la luminescence n'est plus détectée par la caméra. La perte d'expression du gène *AtTRX f1* endogène par RT-PCR après une exposition aux UV-C a d'ailleurs été confirmée chez le sauvage, démontrant que c'est bien le promoteur de *AtTRX f1* qui régule ici l'expression de la luciférase dans le mutant *trxf1-1* (Djoumad, 2010).

Il a été démontré que les thiorédoxines animales sont importantes pour la mise en place de la protection des cellules contre la MCP. La suite de ce travail vise donc à étudier le rôle des thiorédoxines f dans la MCP activée notamment par les UV-C.

### III.2.2. Comparaison des séquences des thiorédoxines f chez *Arabidopsis*

Chez *Arabidopsis*, il existe deux gènes codant pour deux TRX f différentes. Une comparaison des séquences protéiques de TRX f1 et TRX f2 est présentée à la Figure 24.



**Figure 24.** Alignement des séquences protéiques de la TRX f1 (*At3g02730*) et la TRX f2 (*At5g16400*) réalisé à l'aide du site internet NPS@ ([https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa\\_automat.pl?page=/NPSA/npsa\\_multalin.html](https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_multalin.html)).

Légende cadres : bleu clair, peptide d'adressage aux plastes; noir, site catalytique des thiorédoxines. Légende lettres : rouge, identique; autre, acides aminés différents ou absents entre les deux séquences; vert ou noir, acides aminés de nature différente; bleu, de même nature (par exemple, de la famille des acides, comme Asp (D) ou Glu (E)).

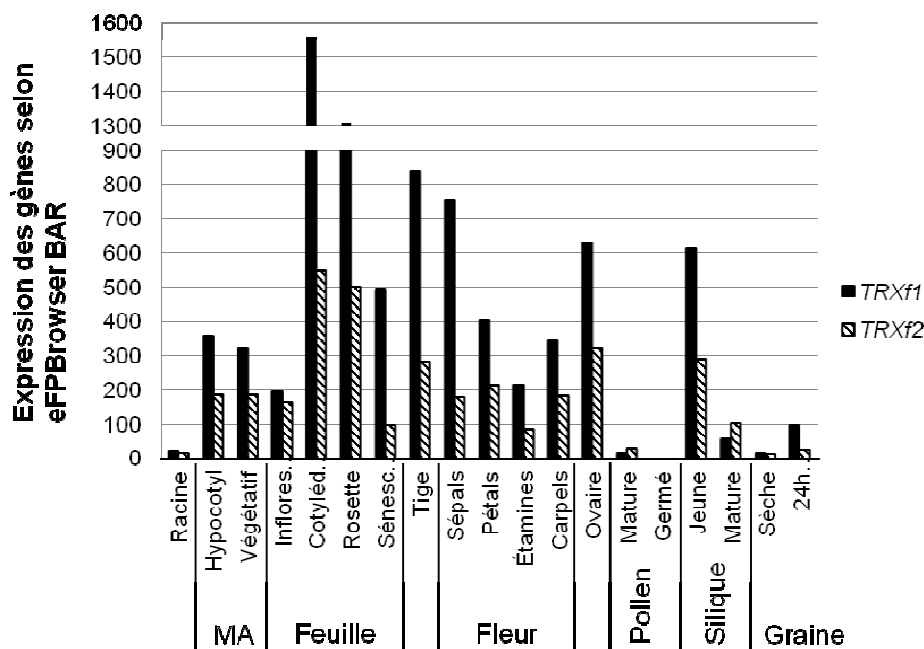
La taille des thiorédoxines f est de 178 résidus pour la TRX f1, et 185 acides aminés pour la TRX f2. Ces deux séquences protéiques ont environ 78% d'identité, c'est-à-dire que ces deux protéines ont 146 acides aminés strictement identiques. La partie N-ter est le peptide signal d'adressage aux chloroplastes des protéines. Une fois importée dans le chloroplaste, cette partie est clivée puisqu'elle n'est plus nécessaire au fonctionnement des TRX f dans le stroma du chloroplaste. Mais c'est aussi dans cette partie que les différences sont les plus importantes. En alignant les séquences du peptide signal, les séquences protéiques n'ont que 58% d'identité, soit 39 acides aminés identiques. La partie C-ter de la protéine, qui possède le site actif de l'enzyme, a 88% d'identité, soit 107 résidus conservés. D'un point de vue génomique, les deux gènes sont constitués de trois exons, dont le premier est le plus grand (avec 71% d'identité), suivi d'un intron assez grand, puis du deuxième exon (80% d'identité), le plus petit, et enfin le

dernier exon avec 77% d'identité. Les séquences d'ADN codantes ont 75% d'identité, et les différences majeures se trouvent au début de la séquence.

Ces deux gènes sont très semblables et codent pour des séquences protéiques très similaires. Il est donc possible qu'ils remplissent la même fonction dans la cellule, mais très peu d'études se sont penchées sur le rôle de la TRX f2 jusqu'à maintenant.

### **III.2.3. Expression des thiorédoxines f chez *Arabidopsis***

Les données d'expression des gènes *TRX f1* et *TRX f2* ont été obtenues du Arabidopsis eFP Browser (<http://bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi>, et Figure 25). On observe que les deux gènes sont exprimés dans la plupart des organes de la plantes. Par contre, *TRX f1* est plus représentée dans la majorité des organes, comparé à la *TRX f2*. Ainsi, la *TRX f1* est plus exprimée aux divers stades de développement des feuilles, des fleurs, de l'ovaire, des siliques jeunes et du méristème apical. Les quelques tissus où *TRX f2* est plus exprimée sont le grain de pollen mature (2,5 fois plus exprimée), les siliques matures (plus de 3 fois) et dans une moindre mesure, la racine.



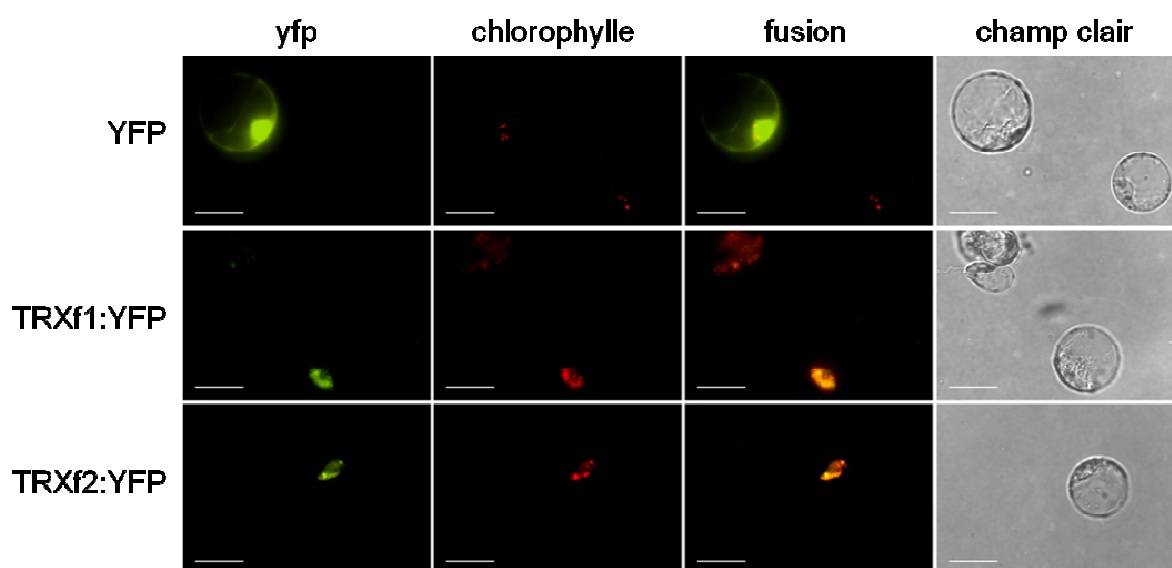
**Figure 25.** Expression absolue des gènes *AtTRX f1* et *AtTRX f2* pour divers organes de la plante. Données tirées du site BAR, Arabidopsis eFP Browser (<http://bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi>). Légende : MA, méristème apical; Inflores, Inflorescence; Cotyléd, Cotylédons; Sénesc, Sénescence; 24h, traitement des graines de 24 h avec l'auxine.

En plus de la forte homologie de séquence protéique, une grande similarité des patrons d'expression entre ces gènes suggèrent encore une fois qu'ils ont possiblement une fonction redondante chez *Arabidopsis*. Par contre, comme la fonction de la TRX f2 n'a pas été étudiée précédemment, des analyses supplémentaires sont requises pour confirmer cette redondance de fonction. Cette étude s'intéressera donc ici à la fois à la TRX f1 et à la TRX f2.

### III.2.4. Localisation subcellulaire des thiorédoxines f par expression transitoire dans des protoplastes

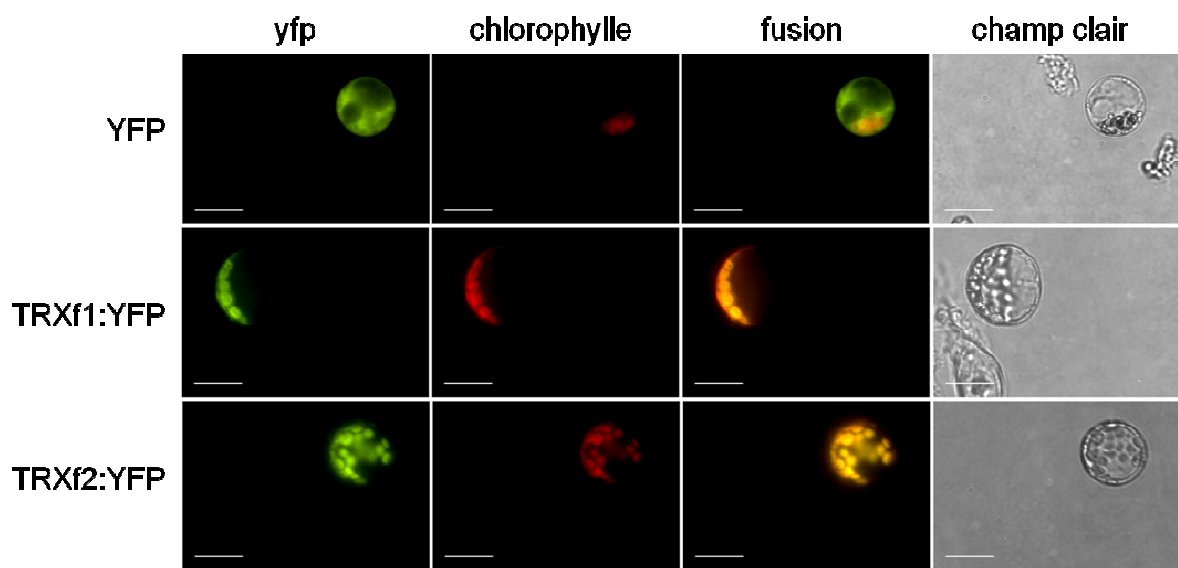
À l'aide des outils informatiques pour l'alignement des séquences protéiques (NPS@) et des sites de prédiction de localisation (comme Predotar v. 1.03,

<https://urgi.versailles.inra.fr/predotar/predotar.html>), les chercheurs en ont déduit que les deux TRX f d'*Arabidopsis* seraient localisées aux plastes. Pour confirmer cette prédiction, nous avons exprimé de façon transitoire ces protéines fusionnées à une protéine fluorescente, la YFP pour "Yellow Fluorescent Protein" en utilisant des protoplastes. Pour toutes les analyses, la fusion de la protéine d'intérêt avec la YFP n'est réalisée que dans un sens, soit en N-terminal, pour ne pas masquer la séquence d'adressage aux plastes. Les constructions réalisées utilisent donc le gène YFP fusionné en 5' ou non du gène d'intérêt, sous le contrôle du promoteur constitutif 35S CaMV. Dans ces conditions, la protéine de fusion est exprimée continuellement dans les cellules vivantes. Un premier essai a été effectué sur des protoplastes issus d'une culture cellulaire chlorophyllienne présentée dans la Figure 26.



**Figure 26. Localisation subcellulaire de la YFP et des fusions TRXf1:YFP et TRXf2:YFP dans des protoplastes d'une culture de cellules chlorophylliennes.** La première colonne est la fluorescence de la YFP (couleur jaune-verte), la seconde colonne est la fluorescence naturelle de la chlorophylle (rouge), la troisième colonne correspond à la superposition des fluorescences de la YFP et de la chlorophylle, et la dernière colonne est l'aspect des cellules en champ clair. Échelle : 20  $\mu$ m.

À l'aide d'un microscope à fluorescence, nous observons la fluorescence de la YFP. Lorsque les cellules sont transformées avec la YFP seule, la fluorescence de cette petite protéine est majoritairement localisées au niveau du noyau et plutôt diffuse dans le reste de la cellule. La fluorescence naturelle de la chlorophylle en rouge, nous permet de localiser les chloroplastes sous la forme de petites ponctuations dans le cytoplasme. Lorsque la TRX f1 ou TRX f2 est fusionnée à la YFP, des ponctuations apparaissent aussi bien pour la détection de la chlorophylle que pour celle de la YFP. Ces résultats montrent que les deux TRX f d'*Arabidopsis* sont bien localisées aux chloroplastes. Ces résultats ont été confirmés en effectuant une seconde expérience d'expression transitoire dans des protoplastes issus cette fois de cellules mésophylliennes, tel que présenté dans la Figure 27.



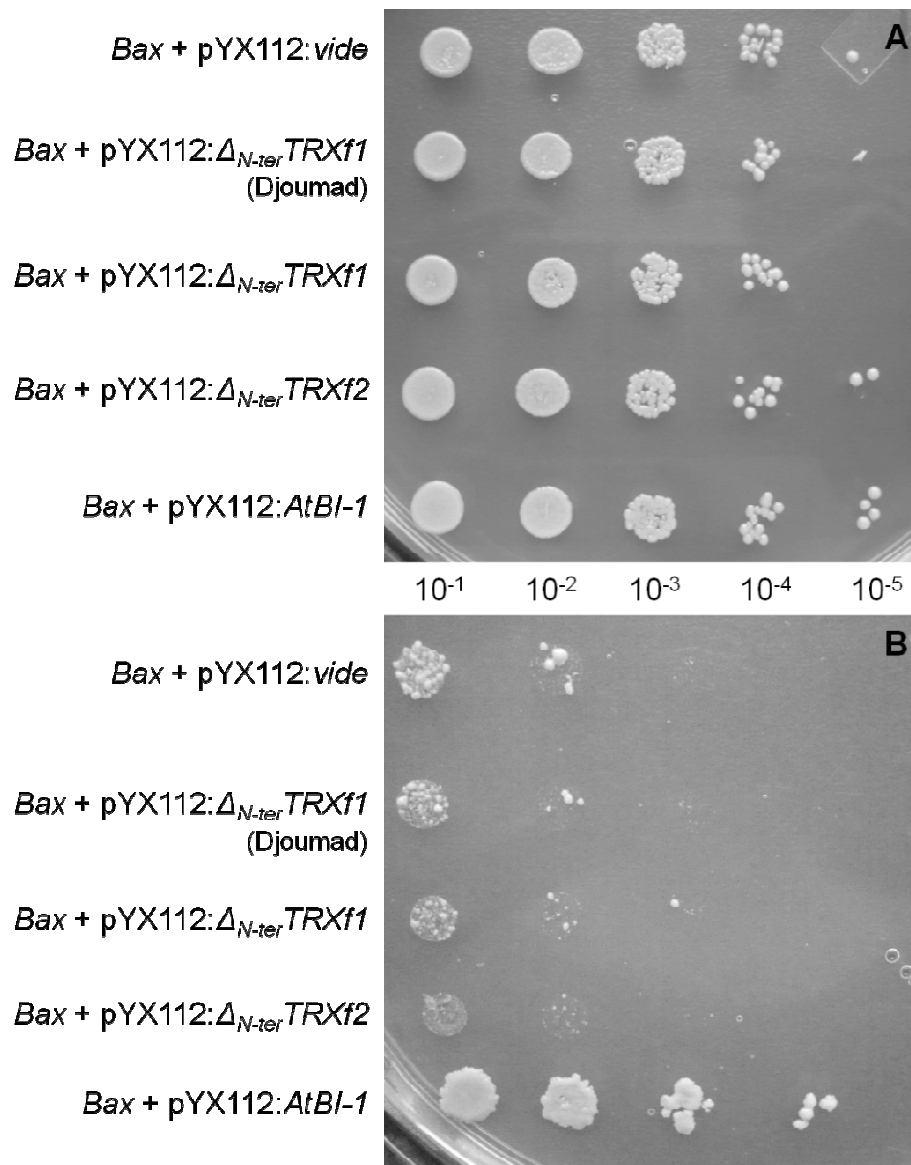
**Figure 27.** Localisation subcellulaire de la YFP et des fusions TRXf1:YFP et la TRXf2:YFP dans des protoplastes obtenus à partir de cellules mésophylliennes de feuilles. La première colonne est la fluorescence de la YFP, la seconde colonne est la fluorescence naturelle de la chlorophylle, la troisième colonne est la superposition des fluorescences de la YFP et de la chlorophylle, et la dernière colonne est l'aspect des cellules en champ clair. Échelle : 20  $\mu$ m.

Les conclusions obtenues pour ces observations sont les mêmes que précédemment. Pour la YFP non fusionnée, la fluorescence de la YFP est diffuse, alors que pour les protéines de fusion, elle est co-localisée aux chloroplastes. Ces résultats confirment la localisation chloroplastique des TRX f1 et TRX f2.

### **III.2.5. Implication des TRX f dans la MCP induite par Bax : Essai de fonctionnalité dans *S. cerevisiae* QX95001**

Des essais préliminaires, assez prometteurs, avaient été réalisés précédemment par Djoumad (2010). Les résultats obtenus suggéraient que la TRX f1 était capable d'inhiber, du moins partiellement, la MCP induite par la protéine Bax exprimée dans la levure. L'objectif de cet essai était ici de confirmer ces résultats et donc l'implication des TRX de type f dans la MCP induite par *Bax*. Pour ce faire, la levure *Saccharomyces cerevisiae* a été utilisée. La souche prise pour ce test possède le gène *bax* sous le contrôle d'un promoteur inductible par le galactose. De ce fait, en présence de galactose mais en absence de glucose, la MCP est déclenchée par l'expression de Bax. La survie des levures exprimant également l'une ou l'autre des TRX f d'*Arabidopsis* a été analysée en présence ou non de galactose. Pour cette analyse, les gènes *AtTRX f1* et *AtTRX f2* ont été clonés dans le vecteur pYX112, en excluant la séquence de la partie N-ter de la protéine qui correspond au peptide d'adressage aux plastides, avant d'être introduits dans la levure.





**Figure 28.** Croissance des levures *S. cerevisiae* QX95001 exprimant les protéines Δ<sub>N-ter</sub>*TRXf1*, Δ<sub>N-ter</sub>*TRXf2*, *AtBI-1* en présence ou non de *Bax*. **A.** Milieu avec du glucose, dans lequel le gène *bax* n'est pas exprimé; **B.** Milieu d'induction du gène *bax* contenant du galactose. Le vecteur vide, pYX112, et le gène *AtBI-1* ont été utilisés comme témoins négatifs et positifs respectivement. Des dilutions ont été faites de 10<sup>-1</sup> à 10<sup>-5</sup>.

Dans le milieu contenant du glucose, les levures transformées avec les différentes constructions poussent normalement. Mais en milieu galactose, qui induit l'expression de *bax* et donc de la MCP, l'ensemble des réponses n'est pas identique. La souche transformée avec le vecteur vide de pYX112 est sensible à l'activité de Bax et la MCP est mise en place. Par contre, une répression de cette mort est observée lorsque le gène anti-apoptotique *AtBI-1* est exprimé en présence de *bax*. Par contre, lorsque *AtΔ<sub>N-ter</sub>TRXf1* ou *AtΔ<sub>N-ter</sub>TRXf2* sont exprimées chez cette souche de levure et sur milieu d'induction avec du galactose, aucune de ces deux TRX ne protège de la MCP. Il en est de même avec la construction qui avait été réalisée précédemment par Djoumad (2010).

Pourtant, des PCR sur colonies ont été effectuées pour s'assurer de la présence de l'ensemble des différentes constructions chez la levure (données non présentées). Les constructions du vecteur pYX112 (avec ou sans les gènes *AtΔ<sub>N-ter</sub>TRXf1*, *AtΔ<sub>N-ter</sub>TRXf2* ou *AtBI-1*) sont bien présentes dans cette souche de levure transformée. De plus, une protection des cellules contre la MCP induite par BAX est bien observée en présence du gène anti-apoptotique *AtBI-1*. Le système devrait donc fonctionner si l'expression des gènes de thiorédoxines apportent bel et bien une protection contre la MCP induite par BAX. Des essais de culture avec les souches transformées par Djoumad et conservées au -80°C ont été testés sans succès. Contrairement aux résultats présentés par Djoumad (2010), nous concluons ici que les AtTRX f ne protègent pas contre la MCP provoquée par Bax chez la levure.

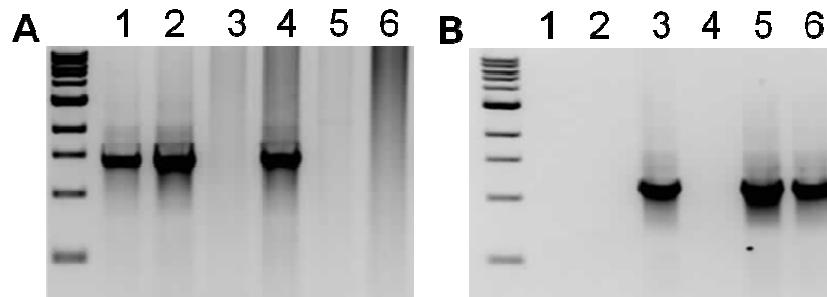
### **III.2.6. Identification de nouveaux mutants des thiorédoxines f1 et f2 et surexpression de la thiorédoxine f1**

Afin d'approfondir le rôle des thiorédoxines f chez *Arabidopsis thaliana*, nous avons utilisé des mutants d'expression pour la TRX f1 et TRX f2. Le premier mutant utile pour cette étude est le mutant d'insertion de *trxf1-1* identifié par Djoumad (2010) qui présente une expression fortement diminuée due à l'insertion de l'ADN-T dans son promoteur (Annexe 1). D'autres mutants d'insertions dans les gènes des thiorédoxines f ont aussi été obtenus du *Arabidopsis*

Stock Center, ABRC. Certains de ces mutants nous sont parvenus à l'état hétérozygote, l'ADN-T n'étant présent que sur l'un des deux allèles du gène. Pour ces mutants, la sélection des mutants homozygotes pour l'insertion de l'ADN-T a été effectuée à la génération suivante, après autofécondation de ces plantules.

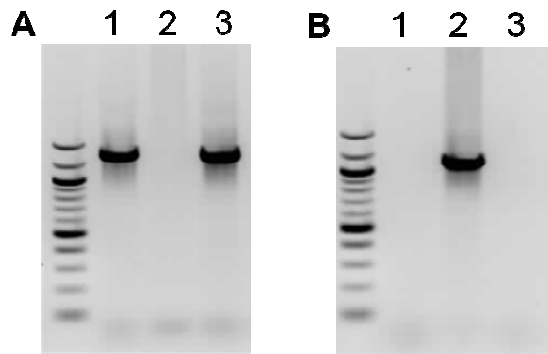
Pour chaque plantules, des réactions PCR sur ADN génomique ont été réalisées pour détecter si l'ADN-T était présent ou non, et s'il était à l'état homozygote. Un premier couple (A et B) d'amorces a été utilisé pour amplifier le gène natif. Si une amplification sur gel est détectée cela signifie qu'au moins un des allèles du gène est dépourvu de l'insertion. Par contre, l'absence d'amplification suggère que la séquence des deux allèles du gène est interrompue par l'insertion. Deux autres couples d'amorce ont été testés, la première amorce se fixant sur l'ADNg natif (A ou B), et la seconde s'hybridant sur l'ADN-T (C). Deux combinaisons ont été testées puisque nous ne connaissons pas le sens de l'insertion de l'ADN-T. Quand une amplification est obtenue pour l'une de ces deux combinaisons (A et C, ou B et C), alors l'ADN-T est présent sur au moins un des allèles du gène. En combinant ces résultats, il est possible de déterminer si un mutant est bien homozygote ou hétérozygote pour l'insertion de l'ADN-T.

Plusieurs mutants ont été testés pour les gènes *AtTRX f1* et *AtTRX f2* (Annexes 1 et 2), mais seuls ceux retenus sont présentés aux Figure 29-31. Deux simples mutants d'insertion de *AtTRX f1* ont été retenus, dont les noms d'origine sont 72H (*trxf1-1*) et SALK\_099762C (*trxf1-2*). De même pour le gène de *AtTRX f2*, le simple mutant retenu est CS307702-1 (*trxf2-1*). Plusieurs plantes surexprimant le gène *AtTRX f1* sous le contrôle du promoteur 35S (*35S::TRXf1-1*) qui avaient été produites par Djoumad (2010) ont également été utilisées dans nos analyses. Des croisements spécifiques entre les simples mutants d'insertion sélectionnés comme homozygotes ont également été faits pour créer des doubles mutants en utilisant dans un cas le mutant *trxf1-1* comme femelle et le mutant *trxf2-1* comme donneur de pollen pour donner le double mutant *trxf1;f2*. Le double mutant réciproque a également été produit pour donner le mutant *trxf2;trxf1*. La génération F2 a été analysée par une approche similaire afin d'identifier des lignées homozygotes pour l'insertion dans chacun des deux gènes.



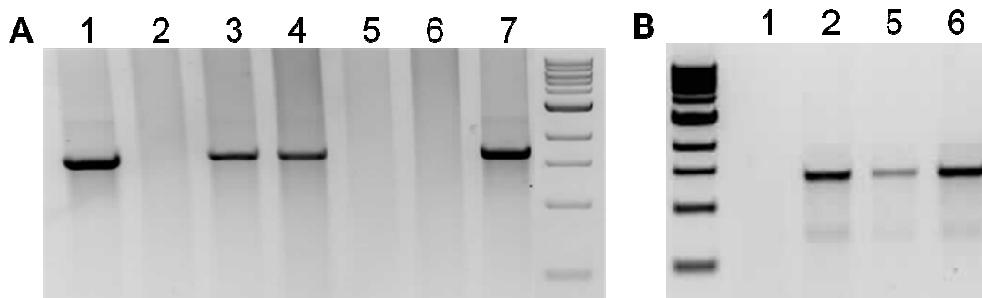
**Figure 29.** Analyse PCR de l'ADN génomique de mutants pour la présence de l'ADN-T dans le gène *AtTRXf1*. **A.** détection de la portion du gène natif en absence de l'ADN-T avec ce couple d'amorces, **B.** détection de l'insertion de l'ADN-T dans le gène avec une amorce se fixant sur une séquence dans le gène natif et l'autre dans la portion de l'ADN-T. Génotypes : **1.** WT, **2.** *trxf2-1*, **3.** *trxf1-1*, **4.** *trxf1-2*, **5.** *trxf1;f2*, et **6.** *trxf2;f1*. Marqueur de poids moléculaire de 100 pb.

Les résultats présentés dans la Figure 29 (A) montrent la détection du gène entier chez la plante sauvage (WT) et chez les mutants *trxf2-1* et *trxf1-2*. Ces résultats suggèrent qu'aucune insertion n'est présente dans ces lignées. Ce résultat était attendu pour WT et *trxf2-1*, mais également chez *trxf1-2* puisque la localisation de l'insertion chez ce mutant est prédite dans le second exon (Annexe 1) alors que les amorces utilisées permettent d'amplifier la région 5' et le premier exon du gène. De même, l'amplification du gène combiné à l'ADN-T est détectée chez *trxf1-1* et chez les doubles mutants seulement puisque la portion amplifiée se retrouve en aval du site d'insertion de l'ADN-T chez le mutant *trxf2-1* (Figure 29(B)). Le mutant *trxf1-1* et les doubles mutants sont bien homozygotes pour l'insertion. Un autre couple d'amorces permettant l'amplification de la région contenant l'ADN-T chez le mutant *trxf1-2* a spécifiquement été utilisé dans ce cas. Les résultats présentés dans la Figure 30 montrent une amplification du gène natif chez le WT et le surexprimeur *35S::TRXf1-1*, mais pas chez *trxf1-2*, alors que la seconde amplification détecte spécifiquement bien l'ADN-T chez *trxf1-2* mais pas chez les autres, confirmant qu'il s'agit bien d'un mutant homozygote.



**Figure 30.** Analyse PCR de l'ADN génomique de mutants pour la présence de l'ADN-T dans le gène *AtTRX f1* pour le mutant *trxf1-2*. **A.** détection de la portion du gène natif en absence de l'ADN-T avec ce couple d'amorces, **B.** détection de l'insertion de l'ADN-T dans le gène avec une amorce se fixant sur une séquence dans le gène natif et l'autre dans la portion de l'ADN-T. Génotypes : **1.** WT, **2.** *trxf1-2* et **3.** *35S::TRXf1-1*. Marqueur de poids moléculaire de 100 pb.

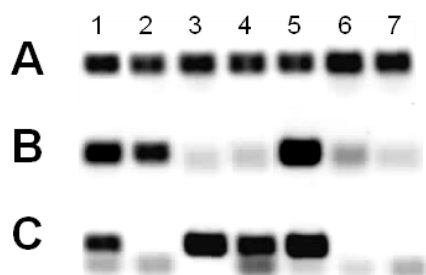
De la même façon, la confirmation d'un mutant homozygote pour l'insertion dans le gène de *AtTRX f2* a été réalisée (Figure 31), identifiant ainsi le mutant homozygote *trxf2-1*.



**Figure 31.** Analyse PCR de l'ADNg de mutants pour la présence de l'ADN-T dans le gène *AtTRX f2*. **A.** détection de la portion du gène natif en absence de l'ADN-T avec ce couple d'amorces, **B.** détection de l'insertion de l'ADN-T dans le gène avec une amorce se fixant sur une séquence dans le gène natif et l'autre dans la portion de l'ADN-T. Génotypes : **1.** WT, **2.** *trxf2-1*, **3.** *trxf1-1*, **4.** *trxf1-2*, **5.** *trxf1;f2*, **6.** *trxf2;f1*, et **7.** *35S::TRXf1-1*. Marqueur de poids moléculaire de 100 pb.

### III.2.7. Caractérisation de l'expression des gènes de thiorédoxines f chez les mutants et le surexprimeur

Pour évaluer l'effet de l'insertion de l'ADN-T sur l'expression des gènes dans les mutants identifiés, une analyse par RT-PCR et RT-qPCR a été faite. Seuls les mutants dont l'expression était diminuée de façon importante ont été conservés. Par exemple, le mutant 063799 (du stock center) avait été sélectionné, mais la diminution relative d'expression de *AtTRX f1* n'était que de 20 fois par rapport au sauvage. Ce mutant est considéré comme un knock-down puisque après RT-PCR, le gène semble encore exprimé avec la visualisation d'une bande sur gel d'électrophorèse (données non présentées). Par contre, la diminution de l'expression relative de *AtTRX f1* par RT-qPCR pour le mutant *trxf1-1* est de 30 fois, et d'environ 70 fois pour *trxf1-2* (cf. Tableau ). Les résultats des RT-PCR sont visibles sur la Figure 32.



**Figure 32.** Gel d'électrophorèse d'une RT-PCR pour évaluer l'expression de *AtTRX f1* et *AtTRX f2* chez les mutants d'insertion et chez le surexprimeur. Couple d'amorces pour A. Actine, B. *AtTRX f1* et C. *AtTRX f2*. Génotypes : 1. WT, 2. *trxf2-1*, 3. *trxf1-1*, 4. *trxf1-2*, 5. *35S::TRXf1-1*, 6. *trxf1;f2*, et 7. *trxf2;f1*.

**Tableau 9. Diminutions relatives de l'expression de *AtTRX f1* et *AtTRX f2* chez les mutants d'insertion et chez le surexprimeur par RT-qPCR par rapport au WT.**

Nom	<i>AtTRX f1</i>	<i>AtTRX f2</i>
<i>trxf2-1</i>	Pas de différences avec WT	- 14
<i>trxf1-1</i>	- 30	Pas de différences avec WT
<i>trxf1-2</i>	- 70	Pas de différences avec WT
<i>35S::TRXf1-1</i>	+ 40	Pas de différences avec WT
<i>trxf1;f2</i> et <i>trxf2;f1</i>	- 30	- 14
<i>35S::TRXf1-2</i>	+ 30	Pas de différences avec WT
<i>35S::TRXf1-3</i>	+2	Pas de différences avec WT

La quantification de *AtTRX f1* et *AtTRX f2* a été réalisée pour les autres mutants et surexprimeurs. Pour les doubles mutants, elle est la combinaison des quantifications d'expression relative obtenues pour les deux gènes chez les simples mutants, *trxf2-1* et *trxf1-1*. Pour *AtTRX f2*, chez le mutant *trxf2-1*, la diminution est de 14 fois. Enfin, pour les surexprimeurs de la *TRX f1*, l'expression relative est augmentée pour *AtTRX f1*, et est variable selon le surexprimeur considéré. Le *35S::TRXf1-3* est augmenté de 2 fois, mais pour le *35S::TRXf1-1*, cette augmentation est de 40 fois. Par contre, le choix définitif des surexprimeurs va se faire après l'analyse de l'expression de *AtTRX f1* après une exposition aux UV-C (Figure 32).

Tous ces mutants nous seront utiles pour déterminer le rôle des thiorédoxines f dans la réponse à différents stress abiotiques.

### III.2.8. Évaluation du rôle des thiorédoxines f dans l'induction de la MCP

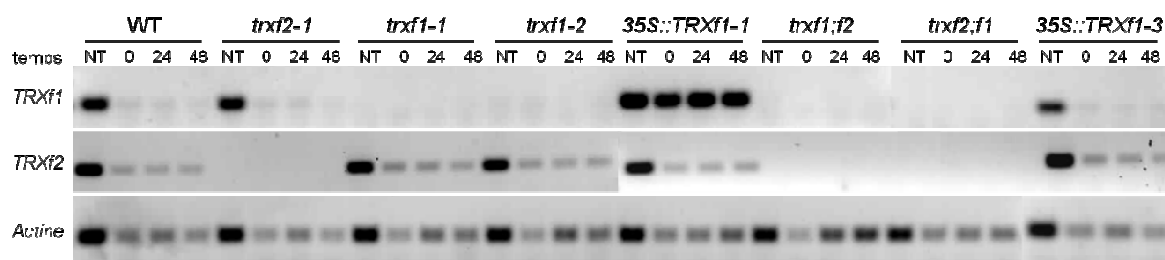
#### III.2.8.1. Implication des TRX f dans la MCP induite par UV-C

Chez les cellules animales, l'effet des UV-C dans l'activation de la MCP a bien été étudié. Quelques recherches menées sur les cellules végétales ont apporté les prémices de la réponse

mise en place par les végétaux. L'irradiation des cellules végétales par les UV-C active, entre autres, la dégradation de la chlorophylle, la fragmentation de l'ADN nucléaire et la production de ROS, qui s'associent aux différents processus moléculaires conduisant à la mort de la cellule. Néanmoins, peu de régulateurs de ces processus ont été identifiés jusqu'à maintenant. Étant donné le rôle anti-apoptotique des thiorédoxines animales, nous nous intéressons ici à étudier l'importance des thiorédoxines f dans la MCP végétale. Les mutants *trx f1* et *trx f2* ont ici été analysés pour l'évaluer l'implication des thiorédoxines f dans le processus de MCP induite par les UV-C.

### III.2.8.1.1. Évolution de l'expression des gènes après traitement aux UV-C

Comme rapporté précédemment (Djoumad, 2010), l'expression du gène *AtTRX f1* chez la plante sauvage diminue fortement après une exposition aux UV-C. Pour déterminer si cette variation est semblable pour le gène *AtTRX f2* et identique chez toutes les plantes étudiées, notamment chez les surexprimeurs, des analyses RT-PCR ont été réalisées (Figure 33).



**Figure 33.** Évaluation de l'expression de *AtTRX f1* et *f2* par RT-PCR semi-quantitative avant et après une exposition aux UV-C. Première ligne *AtTRX f1*; deuxième ligne *AtTRX f2*; troisième ligne Actine (gène de référence). Les prélèvements ont été faits avant le traitement (NT, non traités) puis à 0, 24 et 48 heures après l'exposition aux UV-C (30 kJ/m<sup>2</sup>).

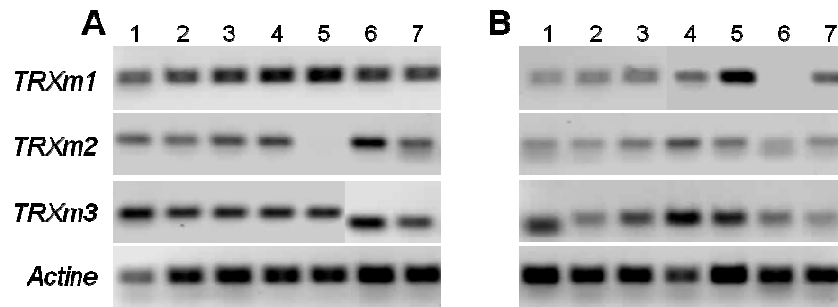
On observe, chez le type sauvage, que l'expression de *AtTRX f1*, tout comme celle de *AtTRX f2*, diminue suite à un traitement aux UV-C. Comme attendu, l'expression des gènes mutés



chez les simples mutants est perdue chez les échantillons non traités et suite aux traitements aux UV-C. Par contre, la perte de l'expression de *AtTRX f1* chez les mutants *trxf1-1* et *trxf1-2* n'est pas compensée par une plus forte expression de *AtTRX f2*. De même, le gène de *AtTRX f1* n'est pas plus exprimé chez le mutant *trxf2-1*. L'expression de l'actine, le gène contrôle, est également diminuée après une exposition aux UV-C. Cependant, pour les surexpressesurs *35S::TRXf1-1* et *35S::TRXf1-2* (données non présentées) l'expression n'est pas diminuée pour *AtTRX f1*, contrairement à *AtTRX f2* qui suit le même profil d'expression que chez le WT. En effet, ces surexpressesurs ont deux formes de contrôle de l'expression du gène : le promoteur natif avec le gène de *AtTRX f1* et le promoteur constitutif 35S CaMV introduit avec *AtTRX f1*. Le gène natif chez ces surexpressesurs suit très probablement la même diminution d'expression après une exposition aux UV-C, mais grâce à l'autre copie fusionnée au promoteur 35S CaMV, l'expression du gène reste importante. L'expression de *AtTRX f1* n'est alors plus contrôlée après l'exposition aux UV-C. Par contre, l'expression de *AtTRX f1* chez *35S::TRXf1-3* est régulée de la même manière que les plantes sauvage, probablement parce que le site d'insertion du transgène réduit sa transcription. Pour cette raison, la lignée *35S::TRXf1-3* n'a pas été retenue pour la suite des expérimentations. Notons finalement que l'expression de *AtTRX f1* n'a pas d'impact sur l'expression de *AtTRX f2*.

Malheureusement, la diminution du gène de référence *Actine* n'a pas permis une quantification précise de l'expression des gènes après les UV-C par RT-qPCR. Dans la partie III.1.2. (p.116), nous avons testé d'autres gènes de référence pour quantifier la variation d'expression, sans trouver de candidats. Malgré cela, l'expression relative des surexpressesurs *35S::TRXf1-1* et *35S::TRXf1-2* reste nettement plus forte que pour le reste des échantillons.

D'autres thiorédoxines localisées aux chloroplastes, telles que les TRX m, ont, comme pour les TRX f, une activité en lien avec la photosynthèse en plus de partager des patrons d'expression assez semblables. Pour cette raison, l'expression des gènes codant pour les TRX m a été évaluée en réponse aux UV-C (Figure 34).



**Figure 34.** Expression des trois *TRX m* par RT-PCR avant et après une exposition aux UV-C. Couple d'amorces : *TRX m1* (ligne 1), *TRX m2* (ligne 2), *TRX m3* (ligne 3) et Actine (ligne 4). Traitements : **A.** 0 kJ/m<sup>2</sup> et **B.** 30 kJ/m<sup>2</sup>. Génomes : **1.** WT, **2.** *trxf2-1*, **3.** *trxf1-1*, **4.** *trxf1-2*, **5.** *35S::TRXf1-1*, **6.** *trxf1;f2* et **7.** *trxf2;f1*.

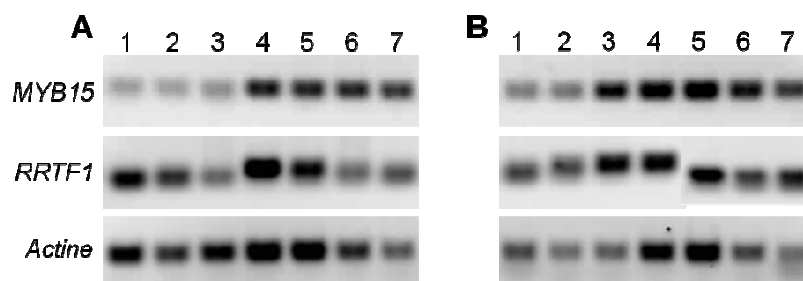
Dans les conditions de croissance normales, les *TRX m1* et *m3* sont les plus exprimées, suivies de *TRX m2*. *TRX m4* est très faiblement exprimé (données non présentées). Notons que l'expression de *TRX m2* est absente chez le surexprimeur. Après une exposition aux UV-C, la *TRX m1* semble être réprimée chez la majorité des génotypes testés, sauf pour le surexprimeur, où l'expression est comparable à l'échantillon non traité, alors qu'aucune expression n'est détectée chez le double mutant *trxf1;f2*. L'expression de *TRX m2* semble également être globalement réprimée, mais son expression est maintenant détectée chez le surexprimeur. Enfin, il y a également une certaine diminution de l'expression *TRX m3* après traitement aux UV-C, mais cette répression est nettement plus importante chez le mutant *trxf2-1* et les doubles mutants. Toutefois, un niveau d'expression comparable à celui détecté dans les échantillons non traités, voire même supérieur, est observé chez le mutant *trxf1-2* et le surexprimeur.

Ces résultats montrent que le traitement aux UV-C chez les plantes sauvages réduit l'expression des *TRX m1* et *m2*, et dans une moindre mesure, celle de *TRX m3*. Également, la surexpression de *TRX f1* a pour effet de maintenir l'expression de *TRX m1* et de *TRX m3*, malgré les traitements aux UV-C, tout en restaurant l'expression de *TRX m2* perdue en conditions normales. Il est possible qu'un surplus de TRX f1 lors d'une irradiation aux UV-C perturbe le statut redox du chloroplaste. La cellule pourrait compenser ce problème par une

augmentation d'expression des *TRX m* afin de rétablir un équilibre. Par contre, la perte de l'expression de soit *TRX f1* ou soit *TRX f2* chez les simples mutants a peu d'effet sur la régulation de l'expression de *TRX m1* et *m2*. Toutefois, l'expression de *TRX m3* est maintenue chez les mutants *trxf1-1* et *trxf1-2*, malgré le traitement aux UV-C. La perte d'expression de *TRX f1* pourrait encore ici perturber l'équilibre rédox du chloroplaste, impliquant alors une augmentation de l'expression de la *TRX m3* pour tenter de rétablir l'équilibre. Enfin, chez les doubles mutants, seule l'expression de *TRX m1* est abolie chez *trxf1;f2*.

L'expression de deux autres gènes impliqués dans la réponse aux stress a également été évaluée, puisque qu'ils seraient légèrement plus exprimés chez le mutant *trxf1-1* que le WT en conditions normales (données de microarray non-présentées). Le premier gène est *MYB15* (At3g23250) qui code pour un facteur de transcription impliqué dans la tolérance à la sécheresse et au stress salin (Ding *et al.*, 2009). *MYB15* est aussi un régulateur négatif de la tolérance au froid (Agarwal *et al.*, 2006), dont la surexpression induit l'hypersensibilité dans plantes à l'ABA exogène (Ding *et al.*, 2009). Le second gène *RRTF1* (At4g34410) qui code pour un autre facteur de transcription impliqué dans la régulation de gènes régulés par leur statut rédox (Khandelwal *et al.*, 2008). *RRTF1* agit simultanément comme un capteur de l'état rédox et comme un amplificateur de réponse induit par les stress abiotiques dont les fortes intensités lumineuses (Khandelwal *et al.*, 2008).

L'expression de ces deux gènes a été vérifiée avant et après exposition aux UV-C (Figure 35).



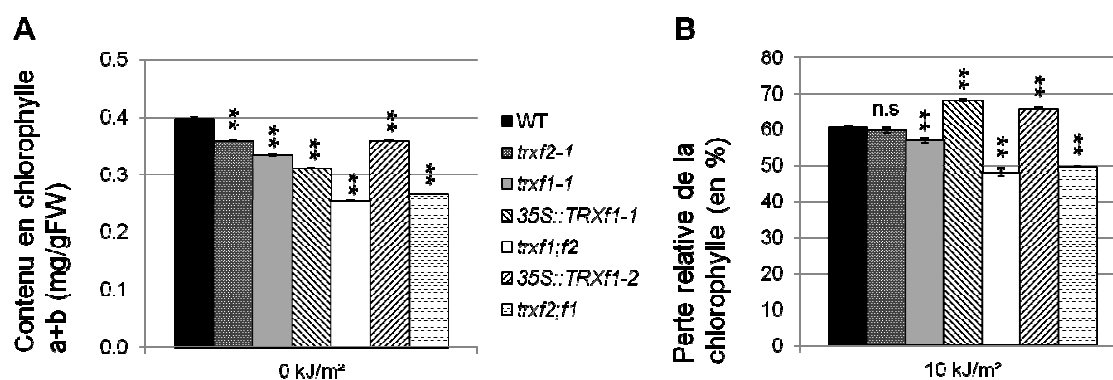
**Figure 35.** Expression de *MYB15* et *RRTF1* évaluée par RT-PCR avant et après une exposition aux UV-C. Couple d'amorces *MYB15* (ligne 1), *RRTF1* (ligne 2) et

Actine (ligne3). Traitements : **A.** 0 kJ/m<sup>2</sup> et **B.** 30 kJ/m<sup>2</sup>. Génomes : **1.** WT, **2.** *trxf2-1*, **3.** *trxf1-1*, **4.** *trxf1-2*, **5.** *35S::TRXf1-1*, **6.** *trxf1;f2* et **7.** *trxf2;f1*.

Dans un premier temps, on constate que l'expression de ces gènes chez les plantes sauvages est très peu affectée par le traitement aux UV-C, si on tient compte du niveau de l'Actine. Par contre, l'expression de ces deux gènes semble augmentée chez le mutant *trxf1-2*, mais pas chez le mutant *trxf1-1*. On remarque cependant que le traitement aux UV-C augmente davantage l'expression des deux gènes chez les deux mutants de *trxf1*. Tel que rapporté plus haut, le mutant *trxf1-2* a un niveau d'expression de *AtTRX f1* pratiquement nul, alors qu'un certain niveau de transcription est détecté chez le mutant *trxf1-1*. Par contre, puisqu'un traitement aux UV-C réduit davantage l'expression de *AtTRX f1*, il apparaît que la perte d'expression de *AtTRX f1* est en fait associée à une augmentation de l'expression de *MYB15* et *RRTF1*. Notons également que l'expression de ces deux gènes est aussi augmentée chez le surexprimeur à la fois dans les échantillons non traités et traités aux UV-C. Pardoxalement, ces résultats montrent qu'une surexpression de *AtTRX f1* a un effet semblable à la perte d'expression de ce gène sur l'expression de *MYB15* et *RRTF1*. Enfin, l'expression de *MYB15* chez les doubles mutants est augmentée par rapport au sauvage, et on note une légère augmentation de l'expression de *MYB15* après les UV-C. Par contre, l'expression de *RRTF1* est réduite chez les doubles mutants, mais légèrement augmentée après le traitement aux UV-C. L'état rédox de la cellule étant modifié après une exposition aux UV-C, il est normal d'observer une variation d'expression du facteur de transcription *RRTF1* qui détecte ce changement. Même si une implication de l'autre facteur de transcription, *MYB15*, reste inconnue dans ces conditions, il semblerait qu'il aurait lui aussi un rôle. Par ailleurs, un lien possible pourrait être établi entre les TRX f et ces facteurs de transcription, pour le maintien de l'équilibre rédox de la cellule et pour l'induction de la réponse. Ces résultats sont indicateurs d'une tendance, mais cette expérience doit être reproduite.

### III.2.8.1.2. Quantification de la chlorophylle après traitements aux UV-C

Un effet visible d'un traitement aux UV-C est la décoloration des tissus photosynthétiques causée par la dégradation des pigments chlorophylliens associée à la mort des cellules. Dans nos conditions, la dégradation de la chlorophylle est perceptible 72 heures après le traitement. Bien qu'une observation qualitative suggère que les surexprimeurs sont plus sensibles aux UV-C, une quantification précise de la chlorophylle permettra d'évaluer quantitativement les effets des UV-C chez les différents mutants. Il est en effet possible d'extraire les chlorophylles des tissus végétaux et de quantifier ces pigments. La sensibilité d'un végétal au traitement peut alors être estimée en calculant la quantité de pigments perdus suite au traitement par rapport à la quantité de pigments présents chez les tissus non traités (Figure 36).

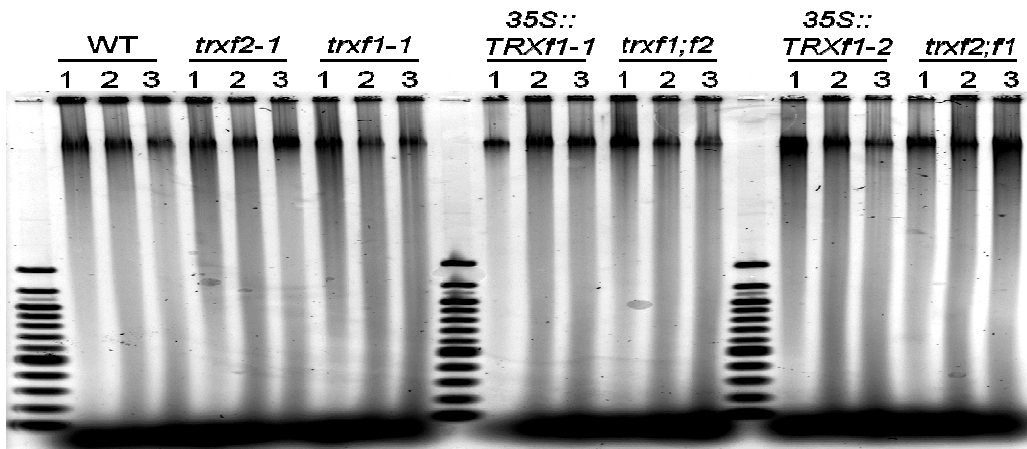


**Figure 36. Quantification de la chlorophylle chez des plantules avant et après une exposition aux UV-C.** **A.** Contenu en chlorophylle a+b (mg/gFW) avant l'exposition et **B.** Perte relative (en %) de la chlorophylle a+b chez les plantules traitées par rapport au non traitées. Les écarts-types sont indiqués par les barres d'erreur. Résultats ont été obtenus à partir de 30 plantules par échantillon et sont représentatifs de trois essais répétés dans les mêmes conditions. Test de student de comparaison de moyennes par rapport au WT avec \*\*  $P < 0,05$  ou n.s = non-significatif.

On constate que plus l'intensité des UV-C appliqués est forte et plus la perte de la chlorophylle est élevée. De plus, tel qu'observé qualitativement, cette perte est plus importante chez les surexprimeurs que pour les doubles mutants. En effet, à 10 kJ/m<sup>2</sup>, la perte est de 68 % et 66 % pour *35S::TRXf1-2* et *35S::TRXf1-1* respectivement, alors qu'elle est de 48 % et de 50 % pour *trxf1;f2* et *trxf2;f1* respectivement. Les surexprimeurs sont donc plus sensibles aux UV-C, alors que les doubles mutants moins sensibles. Pour les simples mutants, la perte de la chlorophylle mesurée après un traitement aux UV-C (10 kJ/m<sup>2</sup>) est semblable à celle des plantules sauvages, mais cette perte est moins importante lors d'un traitement à 30 kJ/m<sup>2</sup>.

#### **III.2.8.1.3. Fragmentation de l'ADN génomique après traitement aux UV-C**

La MCP induite par les UV-C chez les cellules végétales s'accompagne d'une fragmentation de l'ADN génomique, telle que mise en évidence chez les protoplastes d'*Arabidopsis* par Danon et Gallois (1998). Cette fragmentation produit des fragments d'environ 180 paires de bases et ses multiples, qui correspondent à la taille de l'ADN entourant un nucléosome. Djoumad (2010) a également observé cette fragmentation après irradiation aux UV-C de plantules d'*Arabidopsis thaliana*. La détection a été faite à l'aide de buvardage de type Southern, puisque certaines cellules de la plante meurent dans les conditions utilisées. Néanmoins, comme il s'agit effectivement d'un programme de mort mis en place par les cellules, on observe une intensification de la fragmentation au cours du temps. De plus, cette fragmentation augmente avec l'intensité des rayonnements UV. Les premiers tests effectués par Djoumad (2010) ont comparé le WT et *trxf1-1*. La fragmentation observée pour l'ADNg du mutant était plus importante que celle du WT. Une répétition de ce test a été effectuée sur l'ensemble de nos plantules et présentée dans la Figure 37.



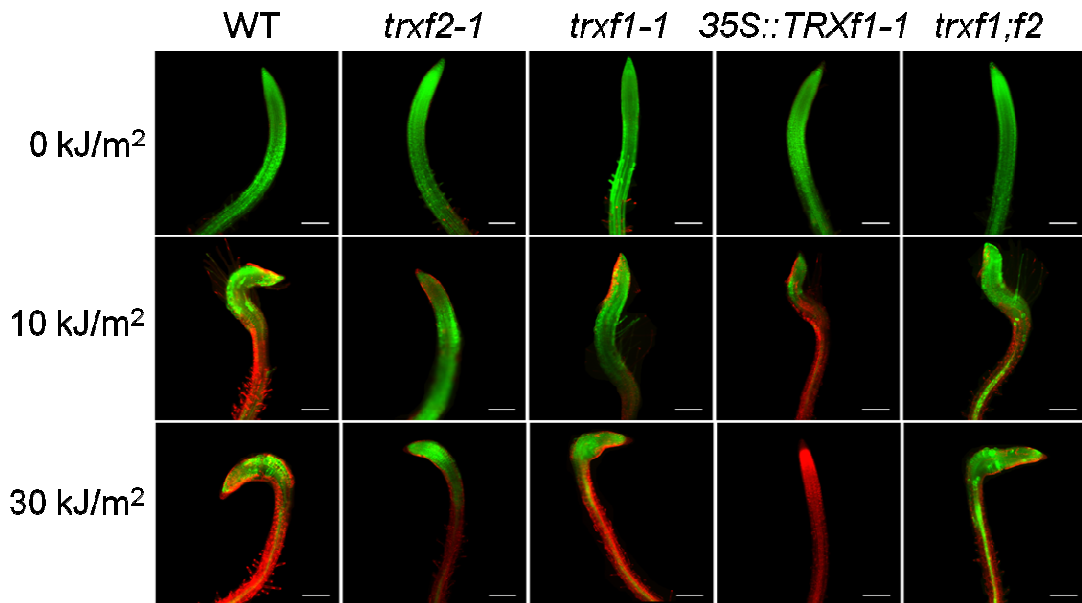
**Figure 37. Fragmentation d'ADNg détectée par gel d'électrophorèse marqué avec SYBRGold.** 1. Plantules témoins prélevées à 48 h après le début de l'expérience, 2. Plantules exposées aux UV-C (30 kJ/m<sup>2</sup>) et prélevées après 24 h et 3. Plantules traitées aux UV-C (30 kJ/m<sup>2</sup>) et prélevées après 48 h. Chaque échantillon a été extrait d'un pool d'au moins 50 plantules. Les résultats présentés sont représentatifs de cinq répétitions de la même expérience.

La méthode utilisée ne permet pas de distinguer les fragments de 180 pb et ses multiples, mais elle permet néanmoins de visualiser une dégradation de l'ADNg qui corrèle avec sa fragmentation. Sans une exposition aux UV-C, on observe une légère fragmentation de l'ADNg, sûrement due à l'activation de quelques enzymes de dégradation sur les premières étapes de l'extraction. Puis plus le prélèvement est fait tardivement après l'exposition aux UV-C, plus la dégradation de l'ADNg paraît importante. Par ailleurs, cette dégradation semble plus importante pour l'ensemble des géotypes. Il serait intéressant de renouveler cette expérience mais en effectuant un buvardage de type Southern (Djoumad, 2010), beaucoup plus résolutif.

#### III.2.8.1.4. Mortalité des cellules racinaires exposées aux UV-C

Les thiorédoxines de type f, localisées au chloroplaste, sont aussi exprimées dans des tissus non-photosynthétiques, comme les racines. La viabilité des cellules de la racine exposées aux

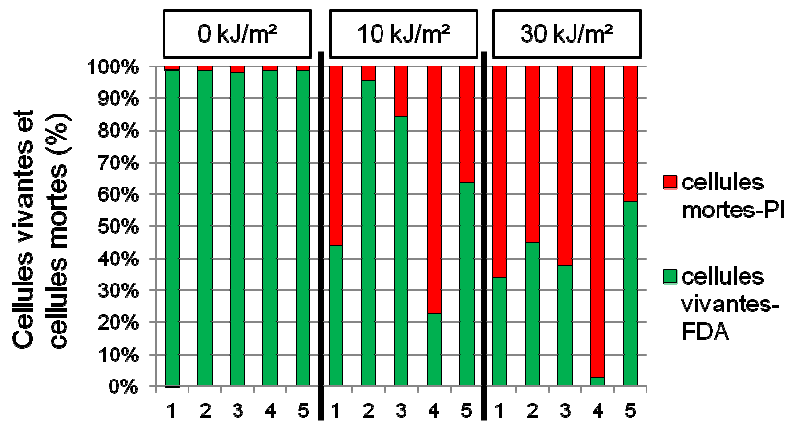
UV-C a été réalisée par une coloration de celles-ci au FDA, fluorescéine di acétate, et PI, iodure de propidium. Les cellules observées en microscopie à fluorescence sont colorées en vert par le FDA lorsque vivantes, alors que les cellules mortes paraissent rouge dû au PI.



**Figure 38.** Coloration au FDA et PI de la pointe racinaire de plantules âgées de 3 jours, 24 h après une exposition aux UV-C. Échelle : 200  $\mu$ m. Des résultats semblables ont été obtenus au cours de 6 répétitions dans les mêmes conditions expérimentales en analysant 5 racines à chaque fois.

Suite à une exposition aux UV-C, certaines de ces cellules n'étant plus viables, meurent et se colorent en rouge. À 10 kJ/m<sup>2</sup>, le surexpresser *35S::TRX1-1* semble plus sensible aux UV-C que le sauvage puisqu'un plus grand nombre de cellules sont colorées au PI. À 30 kJ/m<sup>2</sup>, la mortalité est encore plus intense chez *35S::TRX1-1*. Pour les autres mutants, les cellules vivantes (marquées en vert par le FDA) paraissent légèrement plus nombreuses, mais cette différence n'est pas importante, excepté pour le double mutant, qui présente une coloration verte plus importante à 30 kJ/m<sup>2</sup> que le sauvage. En utilisant un logiciel d'analyse d'image, un pourcentage de cellules vivantes basé sur la coloration verte a été estimé à partir de la Figure 38. Les résultats sont présentés sous la forme d'un graphique en Figure 39.





**Figure 39.** Estimation du pourcentage de cellules vivantes et mortes au niveau de la racine 24 h après une exposition aux UV-C. Le logiciel CellProfiler a été utilisé pour quantifier les photographies de la Figure 38. Échantillons : 1. WT, 2. *trxf2-1*, 3. *trxf1-1*, 4. *35S::TRXf1-1* et 5. *trxf1;f2*.

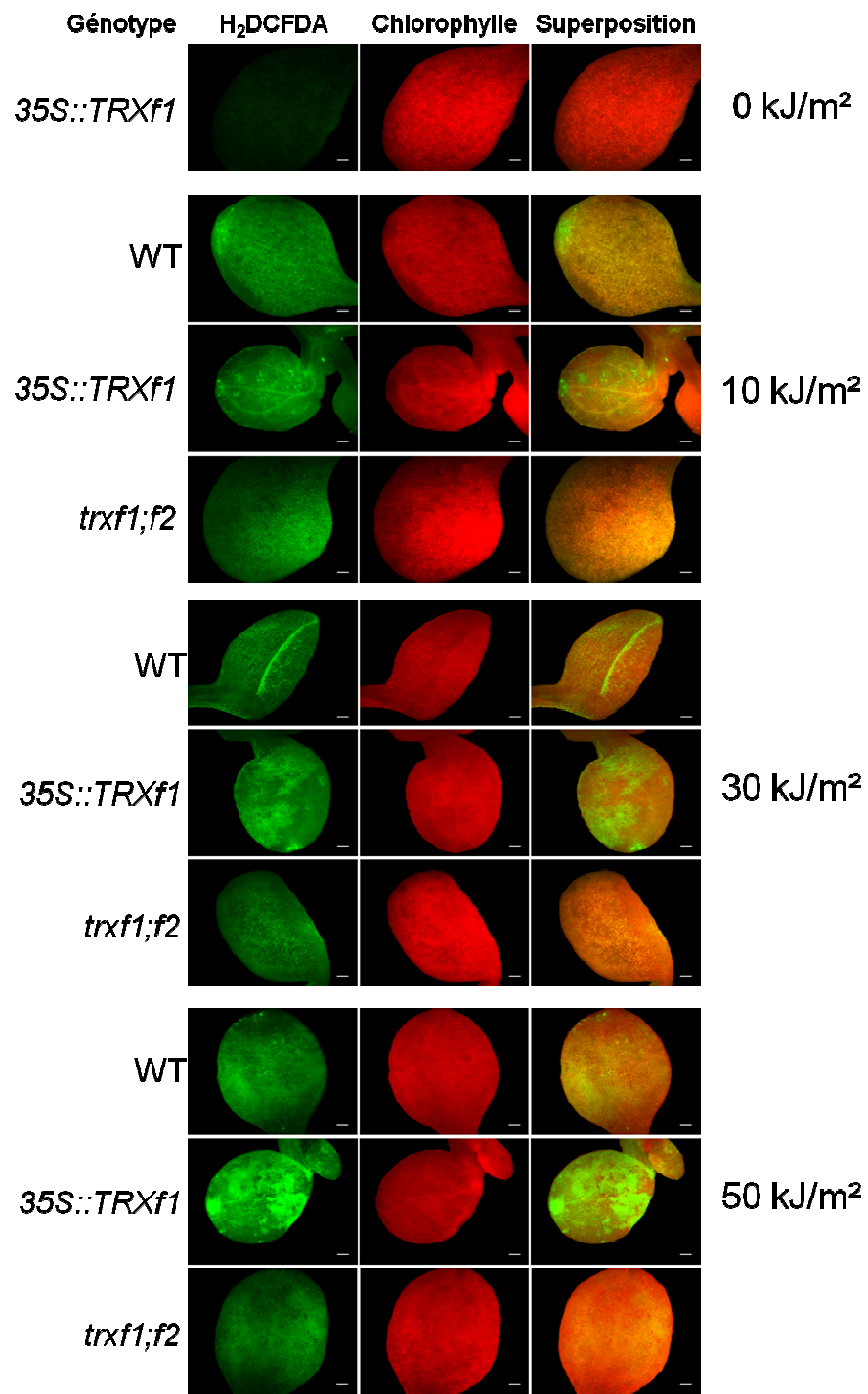
Sans traitements aux UV-C, l'analyse d'image permet d'estimer que les racines ont environ 98 % de cellules vivantes. Mais après une exposition de 10 kJ/m<sup>2</sup>, il ne reste plus que 23 % de cellules vivantes chez *35S::TRXf1-1*, alors que le sauvage est à 44 %. Une tendance similaire est observée après un traitement de 30 kJ/m<sup>2</sup>, avec 3 % cellules vivantes chez le surexprimeur et, 34 % chez le sauvage. Ces résultats appuient les résultats précédents qui montraient une plus grande sensibilité des surexprimeurs aux UV-C. Pour les autres mutants, les cellules colorées en vert sont plus nombreuses. Pour *trxf2-1* et *trxf1-1*, le taux de cellules vivantes est estimé à 95 % et 84 % respectivement pour un traitement de 10 kJ/m<sup>2</sup>, alors qu'il diminue à 45 % pour *trxf2-1* et à 38 % pour *trxf1-1* après un traitement de 30 kJ/m<sup>2</sup>. Le taux de survie des racines chez les simples mutants est donc supérieur à celui des racines sauvages. De même, les racines du double mutant paraissent clairement moins sensibles à 30 kJ/m<sup>2</sup>, puisque le taux estimé de cellules vivantes est de 58 %.

Combinés avec les résultats de quantification de la chlorophylle, ces résultats montrent que les doubles mutants de thiorédoxines f sont plus résistants aux UV-C autant au niveau des tissus

chlorophylliens que pour les racines, alors que les lignées surexprimant la TRX f1 sont plus sensibles.

#### **III.2.8.1.5. Production des ROS induits par les UV-C**

Suite à une exposition aux UV-C, les organites intracellulaires tels que les chloroplastes peuvent produire des ROS. Pour comprendre la sensibilité plus importante des surexpresseurs de TRX f1 aux UV-C, la production de ROS dans les tissus chlorophylliens des doubles mutants de TRX f et chez le surexpresseur a été analysée par une coloration au H<sub>2</sub>DCFDA chez des plantules âgées de 5 jours. La sonde H<sub>2</sub>DCFDA est une fluorescéine dont la forme est chimiquement réduite et utilisée comme indicateur de la formation des ROS dans les cellules. Par le clivage de groupes acétates de la molécule, le H<sub>2</sub>DCFDA non fluorescent est converti en une molécule hautement fluorescente, et observable en microscopie. Les résultats obtenus sont présentés dans la Figure 40.



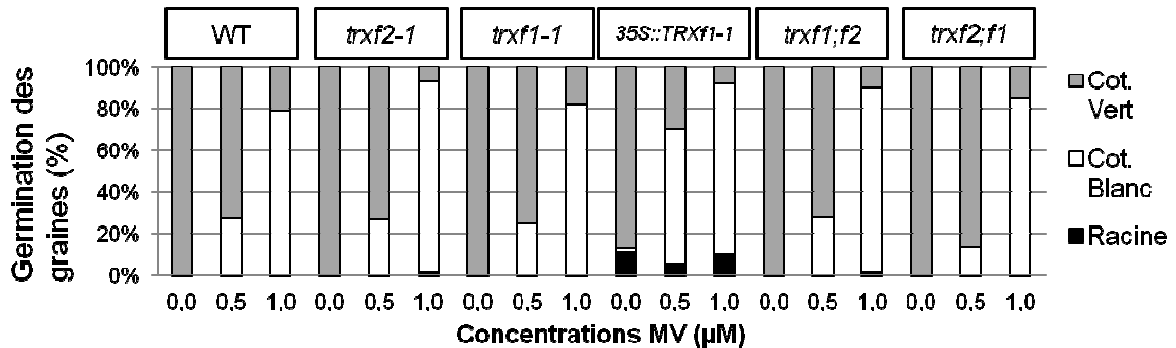
**Figure 40.** Mise en évidence de la production de ROS par coloration au H<sub>2</sub>DCFDA de cotylédon 24 h après une exposition aux UV-C à 10, 30 et 50 kJ/m<sup>2</sup>. Échelle : 200 µm.

Pour tous les génotypes, on observe qu'une exposition aux UV-C induit la formation de ROS, notamment au niveau des chloroplastes. Cette production est beaucoup plus importante chez *35S::TRXf1-1* que pour le WT. Chez le double mutant *trx2;f1*, on détecte très peu de ROS nouvellement formées. Par ailleurs, nous avons choisi de présenter uniquement le phénotype du surexprimeur à 0 kJ/m<sup>2</sup>, où aucune production de ROS n'est observée. Cette observation est identique pour l'ensemble de ces génotypes sans exposition aux UV-C. Bien que ce test visuel soit qualitatif, les résultats corrélerent avec une plus grande sensibilité des surexprimeurs aux UV-C. Les UV-C produisent un stress oxydatif chez les cellules végétales par la formation des ROS, en plus de la perte de la chlorophylle et de la fragmentation de l'ADNg. Ainsi, la présence d'une grande quantité de TRX f1 dans les chloroplastes chez les surexprimeurs augmente la production de ROS après irradiation aux UV-C. Les surexprimeurs sont donc plus sensibles à ce stress, alors que les doubles mutants semblent résister d'avantage que le WT.

### **III.2.8.2. Effet d'un stress oxydatif induit par le méthyl viologen (MV)**

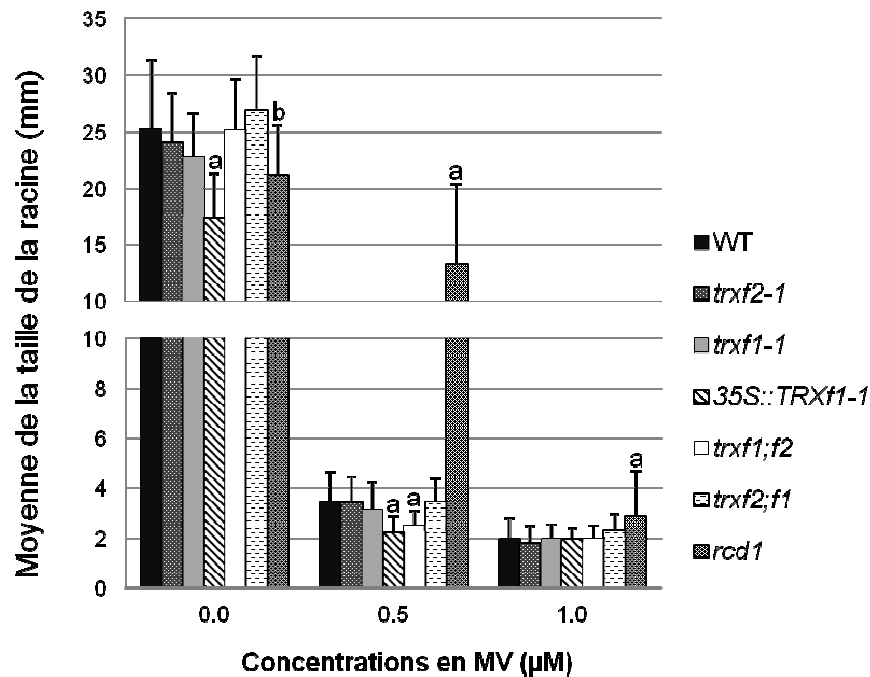
Le MV est un herbicide non-sélectif qui tue toutes les plantes vertes. Le MV est un accepteur d'électrons, il interfère avec le transfert d'électrons, notamment celui qui se produit durant la photosynthèse. Lorsque le MV est présent sur la plante, il inhibe la photosynthèse tout en induisant la formation de ROS. Le superoxide est la forme principale de ROS produites par ce stress oxydatif.

Nous avons utilisé pour ces tests un témoin négatif qui présente une certaine sensibilité au MV, le WT, et un témoin positif résistant au MV, *rcd1* (Fujibe *et al.*, 2004, non présentés dans les figures). Des tests de germination ont été effectués à des concentrations croissantes de MV dans le milieu (Figure 41).



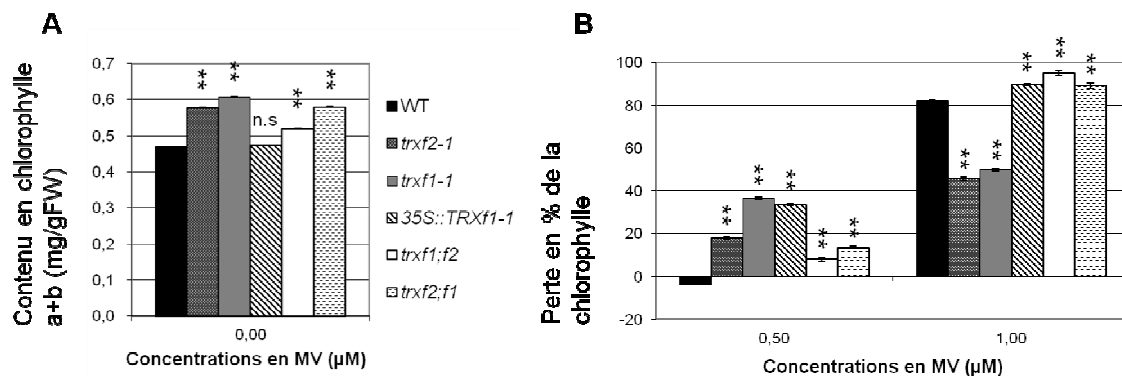
**Figure 41. Pourcentage des graines germées en présence de MV dans le milieu au sixième jour de germination.** Légende : "Cot. Vert", lorsque les cotylédons émergents sont chlorophylliens, indiquant une plantule viable, "Cot. Blanc", lorsque les cotylédons émergents ne sont pas verts, et "Racine" lorsque seule la radicule est sortie de la graine sans cotylédons visibles. Les résultats sont représentatifs de quatre répétitions de l'expérience menées sur 100 graines pour chaque essai.

Les deux témoins répondent correctement : *rcd1* est résistant à la présence du MV (données non montrées) dans le milieu, alors que WT montre une certaine sensibilité au produit, avec environ 25 % de plantules viables à 1 μM de MV (Figure 41). Les simples mutants *trxf2-1* et *trxf1-1*, de même que les doubles mutants, présentent une sensibilité semblable au sauvage ou très légèrement plus importante que le sauvage. Seuls les surexpresses montrent un retard de germination, avec une sensibilité au MV plus forte que pour le sauvage. Ces analyses ont été complétées avec la mesure de la taille des racines (Figure 42) et le contenu en chlorophylle (Figure 43) des plantules poussées dans ces conditions de croissance.



**Figure 42. Croissance racinaire avec différentes concentrations de MV dans le milieu.** Chaque valeur représente la moyenne de trois essais incluant 10 plantules, avec un écart-type indiqué par les barres d'erreur. Les différences significatives (Test statistique ANOVA) entre la croissance du WT et chaque génotype sont indiquées par les lettres : **a.**  $p < 0,001$ , **b.**  $p < 0,01$ .

La croissance de la racine est inhibée à de fortes concentrations de MV dans le milieu, puisque même *rcd1* n'a pas une croissance importante. Les surexprimeurs ont encore un retard de croissance, puisqu'à 0 μM, en moyenne, la racine est de 17 mm alors que les racines du WT mesurent 25 mm. Ce délai dans le développement des surexprimeurs avec ce traitement n'est pas comblé comme pour les autres traitements, et cela pourrait expliquer leur sensibilité un peu plus forte pour le MV. Par contre, pour l'ensemble des autres échantillons, la croissance racinaire n'est pas significativement différente.

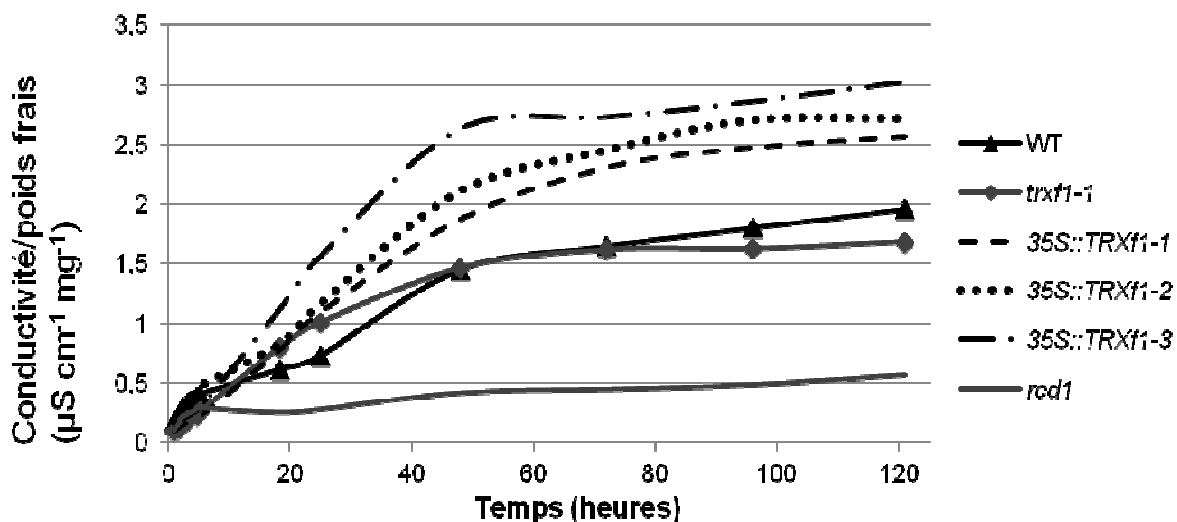


**Figure 43. Quantification du contenu en chlorophylle a+b chez des plantules sur milieu contenant du MV (0 à 1 µM).** A. Contenu en chlorophylle a+b (mg/gFW) sur milieu sans MV. B. Perte relative (en %) de la chlorophylle a+b chez les plantules poussées sur MV par rapport au milieu témoin. Les écart-types sont indiqués par les barres d'erreur. Les résultats ont été obtenus à partir de 30 plantules par échantillon, et sont représentatifs de trois essais répétés dans les mêmes conditions. Les différences sont significatives en comparaison avec le type sauvage (test de student de comparaison de moyennes par rapport au WT avec \*\*  $P < 0,05$  ou n.s = non-significatif).

Le mutant *rcd1* résistant au MV a été retiré du graphique car les quantités de chlorophylle encore présentes sont très nettement supérieures aux autres. On observe que plus la concentration en MV augmente dans le milieu, et plus le contenu en chlorophylle diminue. Par contre, pour de fortes concentrations en MV, à 1 µM, les simples mutants perdent moins de chlorophylle que les plantes sauvages, environ 50 % alors que les plantes sauvages ont perdu jusqu'à 80 % de leur chlorophylle (Figure 43.B). Quant aux doubles mutants et au surexpresser *35S::TRX1-1*, la perte en chlorophylle est légèrement plus importante que le sauvage (Figure 44.B).

La conductivité est une autre façon de mesurer la sensibilité des tissus végétaux au stress oxydatif. Cette technique permet de quantifier la sortie d'ions dans la solution, et qui correspond à une mort des cellules. Ainsi, plus la conductivité mesurée est élevée, et plus le

nombre de cellules mortes est important, et donc que l'échantillon est sensible. Quelques tests de mesure de la conductivité sur des rondelles de feuilles ont été réalisés chez les surexprimeurs et le simple mutant *trxf1-1* (Figure 44).



**Figure 44.** Mesure de la conductivité rapportée sur le poids frais pour dix rondelles de feuilles poolées traitées durant une heure dans une solution de MV à 0,25  $\mu\text{M}$ . Les résultats sont représentatifs de trois répétitions.

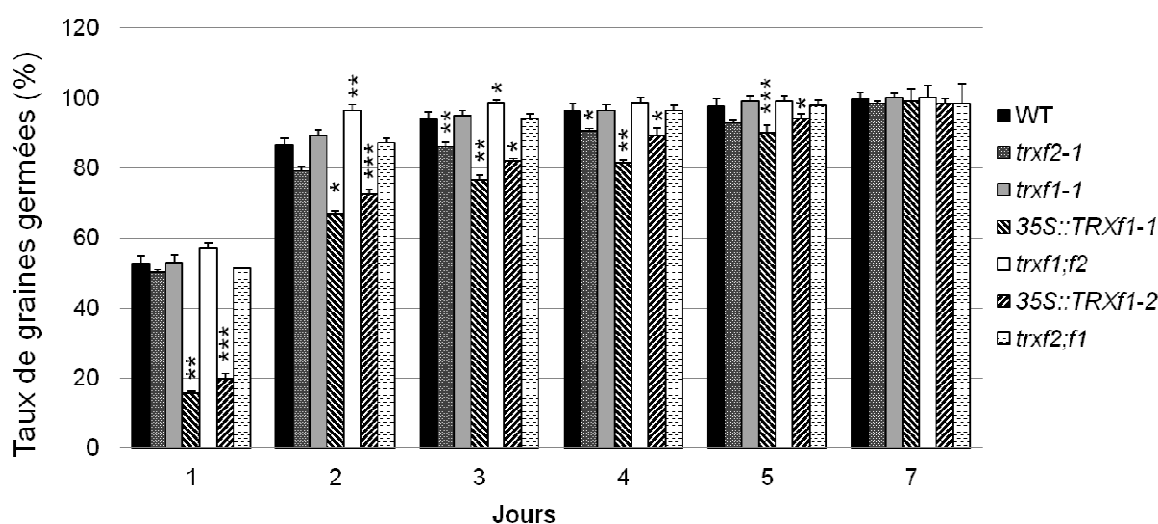
Sans aucun traitement, la solution contenant les feuilles a une faible conductivité, comprise entre 0,4 et 0,9  $\mu\text{S.cm}^{-1}.\text{mg}^{-1}$  au bout de 120 heures. Après une heure dans une solution de 0,25  $\mu\text{M}$  de MV, on observe chez le mutant *rcd1* une faible conductivité, de l'ordre 0,6  $\mu\text{S.cm}^{-1}.\text{mg}^{-1}$  à la fin de l'expérience, ce qui corrèle avec la résistance du mutant au MV. Le WT a une conductivité plus élevée, environ 2  $\mu\text{S.cm}^{-1}.\text{mg}^{-1}$  après 120 h, mais il est aussi plus sensible. La conductivité mesurée chez le simple mutant *trxf1-1* suit à peu près la réponse de WT au MV. Enfin, les surexprimeurs montrent une sensibilité nettement plus importante au MV, puisque leur conductivité finale est comprise entre 2,5 et 3  $\mu\text{S.cm}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ . Cette analyse permet de confirmer que les surexprimeurs sont plus sensibles au stress oxydatif induit par le MV.



### III.2.9. Analyse phénotypique des mutants et surexpresseurs

#### III.2.9.1. Germination

Nous avons poursuivi l'analyse de ces différents mutants par l'observation et l'analyse d'éléments phénotypique particuliers. Lors des tests de germination précédents, nous avons constaté un léger retard de germination de la part des surexpresseurs (Figure 45).



**Figure 45. Pourcentage de germination sur milieu GM des différents mutants en cycle de jours longs à 22°C sur 7 jours.** Chaque valeur représente la moyenne de quatre répétitions avec 100 graines pour chaque test (les barres d'erreur sont les écart-types pour ces expérimentations). Les astérisques indiquent une différence significative lorsque comparées avec le WT (test statistique ANOVA) : \*\*\*  $P < 0,001$ , \*\*  $P < 0,01$  et \*  $P < 0,05$ .

Les tests de germination se sont déroulés sur une période de dix jours, avec au préalable un traitement au froid des graines pour lever la dormance et synchroniser leur germination. Après 7 jours, tous les génotypes avaient un taux de germination de près de 100%, montrant que les graines des tous les génotypes sont viables. Tous les jours, les graines ont été observées et le

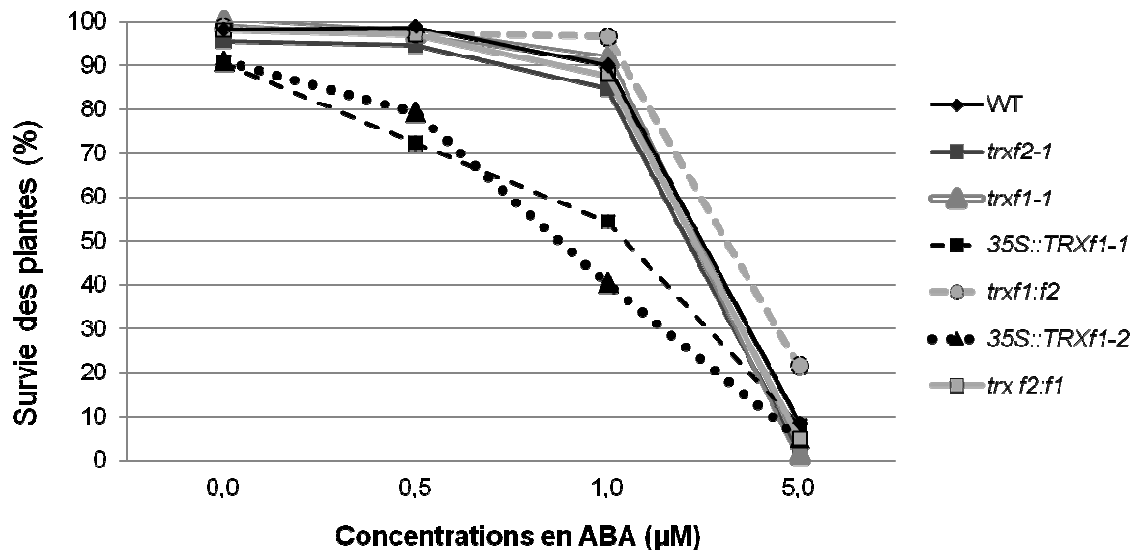
nombre de graines germées (émergence de la radicule) a été compté si germées. Au bout de 24 h à une température de 22°C, les premières radicules étaient visibles. Ainsi, les simples mutants et les doubles mutants ont germé de façon semblable au WT, avec un taux de germination 50% à 24 h. Par contre, les deux surexpresseurs ont eu plus de mal à germer. Leur taux de germination était de 15% pour *35S::TRXf1-1* et 20% pour *35S::TRXf1-2*. Le retard de germination est observable durant les premiers jours, jusqu'au moins, le cinquième jour. Par ailleurs, le simple mutant *trx2-1* semble lui aussi avoir quelques difficultés à germer. Du deuxième jour au quatrième jour, ce dernier montre un léger retard d'environ 10% de moins que pour les plantules sauvages. Après le cinquième jour dans la chambre de croissance, les graines ont pratiquement toutes germées. Le simple mutant *trx1-2* n'a pas été retenu pour cette analyse puisque le taux de germination après 10 jours restait très faible, et environ de 20% (données non présentées).

### III.2.9.2. Sensibilité à l'acide abscissique (ABA)

Puisque nos surexpresseurs présentent un retard de germination de quelques jours, il est possible qu'ils soient davantage sensibles à l'hormone ABA endogène, une hormone importante dans l'établissement de la dormance et qui inhibe la germination lorsqu'ajoutée de façon exogène. Nous avons donc réalisé un test de germination avec ABA. À de fortes concentrations, elle opère comme un inhibiteur de la croissance racinaire. Elle tient un rôle central dans la réponse à divers stress abiotiques, notamment ceux conduisant à un déficit hydrique des cellules.

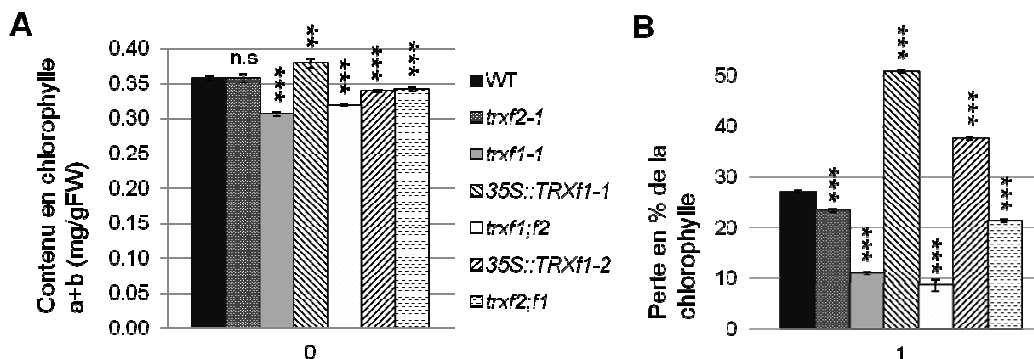
Afin d'évaluer l'importance de la TRX f1 dans la sensibilité à l'ABA pour la germination des graines, nous avons effectué des tests de germination sur ABA qui sont basés sur l'apparition de la radicule, puis dans un second temps, l'aspect des cotylédons. En effet, une molécule peut être toxique pour les plantules, sans pour autant inhiber la germination (cf. partie I.4.5.1.3.). Cette toxicité est constatée lorsque les cotylédons se développent et paraissent blancs, dépourvus de pigments, ou rouges, synthétisant des anthocyanines, signe de stress. Ces deux

phénotypes ne donnent pas des plantules viables, contrairement aux cotylédons pourvus de chlorophylle.



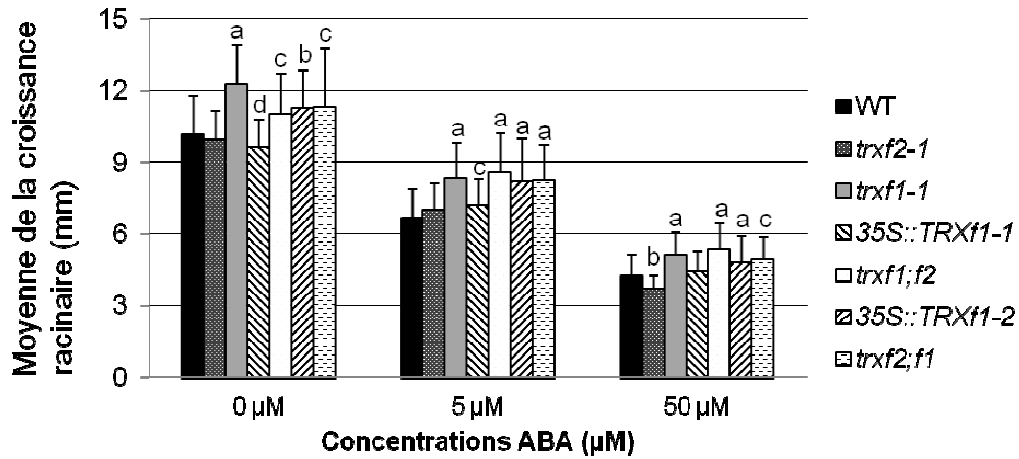
**Figure 46.** Pourcentage des plantules survivantes à la présence d'ABA dans le milieu au septième jour de germination. Les résultats sont représentatifs de quatre répétitions effectuées dans les mêmes conditions. Pour chaque essai, l'expérience a été menée sur 100 graines.

À la Figure 46, on observe que pour pratiquement tous nos génotypes, le taux de survie des plantules sur ABA (définie ici par la présence de cotylédons verts) est comparable à celui de la plante sauvage. Seuls, les surexpresseurs présentent une augmentation significative de la sensibilité à l'ABA. En effet, malgré un taux de survie légèrement inférieur à celui des témoins en absence d'ABA, le taux de survie des plantules *35S::TRXf1-1* et *35S::TRXf1-2* est grandement affecté lorsque poussées sur 1 µM d'ABA, avec 30% de survie pour *35S::TRXf1-2* et 50% pour *35S::TRXf1-1* comparé au 90% pour le WT à une concentration de 1 µM. De plus, le double mutant, *trxf1:f2*, semble être plus résistant à l'ABA à une concentration de 5 µM. Cette différence n'étant pas très visible, une quantification de la perte de la chlorophylle a été effectuée pour chaque condition (Figure 47).



**Figure 47. Quantification du contenu en chlorophylle a+b chez des plantules sur milieu contenant de l'ABA (0 et 1 µM).** **A.** Contenu en chlorophylle a+b (mg/gFW) sur milieu sans ABA. **B.** Perte relative (en %) de la chlorophylle a+b chez les plantules poussées avec 1 µM d'ABA par rapport au milieu témoin. Les écart-types sont indiqués par les barres d'erreur. Les résultats ont été obtenus à partir de 30 plantules par échantillon, et sont représentatifs de trois essais répétés dans les mêmes conditions. Les différences sont significatives en comparaison avec le type sauvage (test de student de comparaison de moyennes par rapport au WT avec \*\*\*  $P < 0,01$ , \*\*  $P < 0,05$  ou n.s = non-significatif).

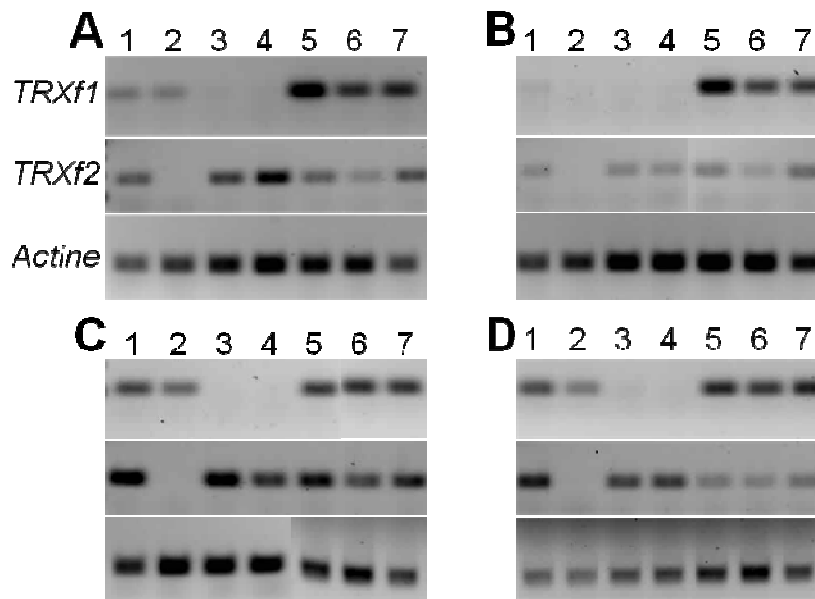
Pour la concentration supérieure de 5 µM, les résultats ne peuvent être présentés puisque les pertes de chlorophylle sont trop importantes pour mesurer la chlorophylle résiduelle. Pour la concentration de 1 µM en ABA, les simples et doubles mutants semblent perdre la même quantité de chlorophylle. Par contre, à nouveau, les surexprimeurs n'ont pas autant de chlorophylle que les autres plantules. Cette diminution est d'environ de 10 % pour *35S::TRX1-2* et de plus de 22 % pour *35S::TRX1-1* par rapport au WT. Par ailleurs, même si la marge d'erreur est limitée en rapportant cette mesure sur le poids de matière fraîche pour chaque lot d'échantillon, le choix des 30 plantules pour constituer l'ensemble peut être biaisé. En effet, l'expérimentateur a dû prélever 30 plantules germées et suffisamment développées pour faire l'extraction du contenu en chlorophylle. Pour confirmer ces premières tendances, un test de croissance racinaire sur ABA est effectué (Figure 48).



**Figure 48. Croissance racinaire totale en présence d'ABA dans le milieu pendant quatre jours.** Comparaison du WT avec les autres génotypes pour chaque condition. Test statistique ANOVA, et valeur de p : **a.** 0,001, **b.** 0,01, **c.** 0,05, **d.** 0,1 et pas de lettre : test non-significatif lorsque comparé au WT. Quatre répétitions de dix plantules de chaque ont été faites.

Tel que présenté dans la Figure 48, la longueur de la racine des plantules poussées sur ABA a été mesurée après 4 jours. Globalement, la croissance racinaire est ralentie en présence d'ABA, mais il n'y a pas de différence significative pour la sensibilité des racines à l'ABA dans les différents génotypes testés. L'augmentation ou la diminution de l'expression de *AtTRX f1* ou *AtTRX f2* n'a pas d'effet sur la sensibilité des racines à l'ABA.

Nous avons également évalué l'expression des gènes *AtTRX f1* et *AtTRX f2* par RT-PCR dans les plantules à différents moments de leur croissance en présence d'ABA (Figure 49).



**Figure 49.** Évaluation de l'expression par RT-PCR semi-quantitative de *AtTRX f1* et *AtTRX f2* pour des plantules ayant germé sur milieu avec ou sans ABA. *AtTRX f1* (première ligne), *AtTRX f2* (la seconde ligne) et l'*Actine* (gène de référence). **A.** au jour 2, 0  $\mu$ M d'ABA, **B.** au jour 2, 1  $\mu$ M d'ABA, **C.** au jour 9, 0  $\mu$ M d'ABA, et **D.** au jour 9, 1  $\mu$ M d'ABA. Génotypes : 1. WT, 2. *trxf2-1*, 3. *trxf1-1*, 4. *trxf1-2*, 5. *35S::TRXf1-2*, 6. *35S::TRXf1-3*, et 7. *35S::TRXf1-1*.

On observe que les plantes sauvages de même que le mutant *trxf2-1* expriment plus tardivement *AtTRX f1*. Par contre, les surexpresseurs semblent perdre un peu de cette expression, surtout visible pour *35S::TRXf1-2*, qui est le génotype pour lequel les problèmes de germination ont été les plus forts (données non présentées, mais taux de germination de 50%). De même l'expression de *AtTRX f2* est plus importante à jour 9 chez le WT et le mutant *trxf1-1*, mais également chez les surexpresseurs. Lorsque les plantules se développent en présence d'ABA, on constate chez le WT et le mutant *trxf2-1* une faible expression de *AtTRX f1* à jour 2, ce qui correspond d'ailleurs à un retard de germination en présence d'ABA. L'expression à jour 9 est par contre rétablie au niveau observé chez les plantes sans ABA. Mais l'expression de *AtTRX f2* est réduite dans l'ensemble des génotypes, avec un effet plus marqué pour les surexpresseurs à jour 9 sur ABA.

Les expressions d'autres thiorédoxines chloroplastiques du type m ont été aussi étudiées pour ces conditions de croissance (données non présentées). En effet, ces TRX répondent aussi à beaucoup de stress en lien avec la lumière. La *TRX m1* serait réprimée en présence d'ABA, tout comme la *TRX m3*, qui sont exprimées surtout chez les surexprimeurs et les doubles mutants à 0  $\mu$ M. Pour les autres gènes, *TRX m2* et *m4*, ces gènes ne seraient pas exprimés dans ces conditions.

Par ailleurs, les deux facteurs de transcription, énoncés en partie III.2.8.1.1., ont aussi été vérifiés, d'autant plus que MYB15 est connu pour tenir un rôle dans l'hypersensibilité à l'ABA exogène chez les plantes (Ding *et al.*, 2009). Les variations d'expression de *MYB15* et *RRTF1* ont été vérifiées pour ces conditions, mais ces gènes sont très faiblement exprimés durant les premiers jours de développement de la graine. De ce fait, il semblerait qu'en présence d'ABA, l'expression de ces gènes soit réprimée, mais même en conditions normales de croissance, ces deux facteurs de transcription ne sont quasiment pas exprimés dans la plantule.

Néanmoins, ces différences sont trop subtiles pour qu'une conclusion claire puisse être énoncée, et établir en lien entre les TRX de type f et l'effet de l'ABA sur la germination.

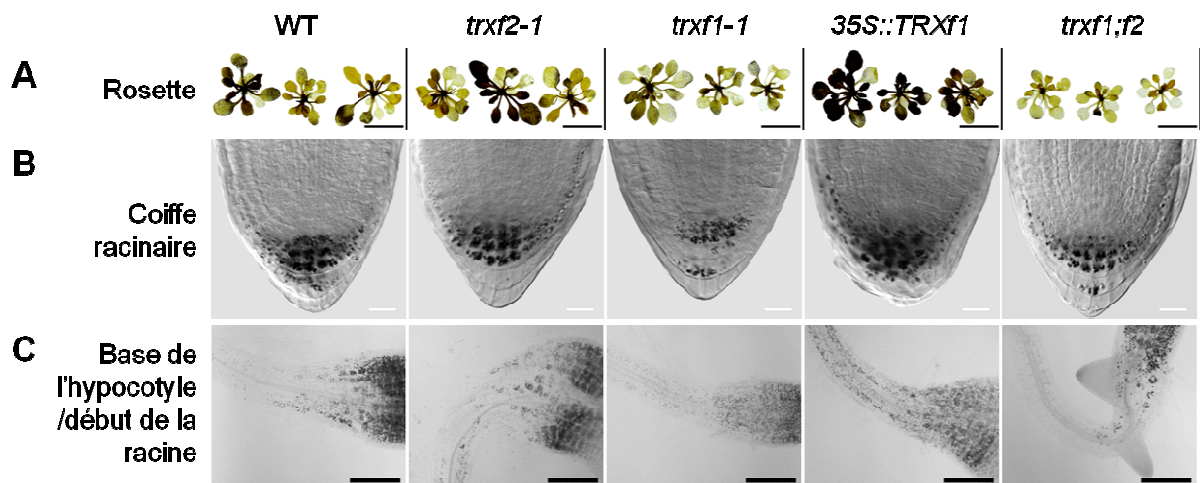
### **III.2.10. Accumulation d'amidon**

Précédemment, il a été démontré l'implication des TRX f dans la régulation d'enzymes des voies de synthèse (Thormählen *et al.*, 2013) et de la dégradation de l'amidon (Mikkelsen *et al.*, 2005, Seung *et al.*, 2013). Des mutants de plants de tabac surexprimant le gène *NtTRX f1* présentent une forte accumulation d'amidon au niveau des feuilles, jusqu'à plus de 500% de sucres accumulés chez ces surexprimeurs (Sanz-Barrio *et al.*, 2013). Par contre, lorsque le gène *NtTRX m* est surexprimé chez le tabac, le contenu en amidon de ces plantes n'augmente pas (Sanz-Barrio *et al.*, 2013). De plus, cette régulation de production est fortement liée aux perceptions des variations lumineuses par la plante. Enfin, le lieu de stockage et de synthèse

de l'amidon chez *Arabidopsis* est les plastes. Les TRX f seraient bien les enzymes régulatrices du stockage de l'amidon. Nous avons donc quantifié l'amidon chez les mutants de thiorédoxines f1 et f2 et les surexprimeurs.

### III.2.10.1. Quantification de l'amidon

Parmi les TRX chloroplastiques, le type m et le type f sont celles qui ont des fonctions associées à la phase lumineuse de développement. Nous cherchons donc à savoir si les TRX f ont un rôle dans la régulation de l'amidon chez nos mutants et surexprimeurs. Les premiers résultats ont été obtenus par une analyse qualitative du contenu en amidon après une simple coloration avec une solution de Lugol à 1%, cette solution qui donne à l'amidon une couleur violette voire bleu-nuit (Figure 50). Cette solution peut aussi détecter la présence du glycogène par la visualisation d'une couleur brune des tissus en possédant. En fait, les molécules diiode vont se fixer à l'intérieur des hélices d'amylose, et il faut au moins 36 résidus de glucose pour que la coloration soit caractéristique. Par ce test, il est possible d'estimer la présence plus ou moins importante d'amidon dans les différents tissus à la fin du jour.

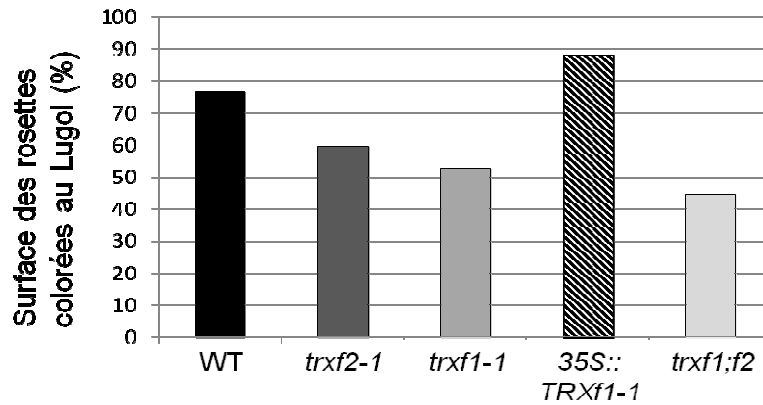


**Figure 50.** Visualisation de l'amidon chez différents mutants après une coloration au Lugol 1%. **A.** Rosette des plantules de 5 jours. Échelle : 1cm. **B.** La coiffe racinaire de plantules âgées de 3 jours et décolorées au Visikol. Échelle : 20



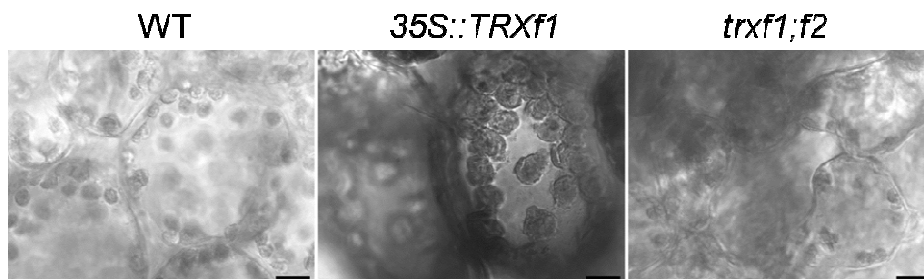
$\mu\text{m}$ . C. La base de l'hypocotyle et le début de la racine de plantules âgées de 3 jours et décolorées au Visikol. Échelle : 200  $\mu\text{m}$ .

Les observations macroscopiques (Figure 50.A) nous permettent de constater que par rapport au WT, les surexprimeurs semblent avoir accumulé plus d'amidon au niveau de leur rosette, alors que les doubles mutants en ont vraiment très peu. Ces prélèvements ont été effectués à la fin de la phase lumineuse, moment où la quantité d'amidon accumulée est maximale. De plus, une observation au microscope des racines de plantules âgées de trois jours a été faite. En plus de la coloration au Lugol, une décoloration et fixation au Visikol a été faite pour visualiser correctement la ponctuation. Au niveau de la pointe racinaire, qui permet la perception du gravitropisme par la plante, les mêmes conclusions ressortent : les surexprimeurs semblent contenir plus d'amidon que le WT, mais cette quantité est moindre chez les doubles mutants. Enfin, une observation globale de la racine des plantules a permis de confirmer ces résultats. En effet, le type sauvage et les simples mutants possèdent quelques grains d'amidon tout au long de la racine, avec une concentration plus importante au niveau de la pointe racinaire. Par contre, les doubles mutants n'ont quasiment aucune ponctuation, à l'exception de la pointe racinaire, et l'apparition de l'émergence de racines secondaires a été possible chez eux. Les surexprimeurs présentent des ponctuations tout le long de la racine, mais aucune racine secondaire n'a été visible. À l'aide du logiciel CellProfiler, une première quantification de l'amidon de la Figure 50.A a été faite (Figure 51), et confirme les premières observations.



**Figure 51.** Estimation de la surface des rosettes colorées au Lugol de la Figure 50.A réalisée à l'aide du logiciel CellProfiler. Traitement d'une seule image avec les trois rosettes pour chaque mutant.

Un grossissement des feuilles de ces plantules colorées au Lugol a également été réalisé, afin d'observer la morphologie des chloroplastes chez les différents génotypes (Figure 52).

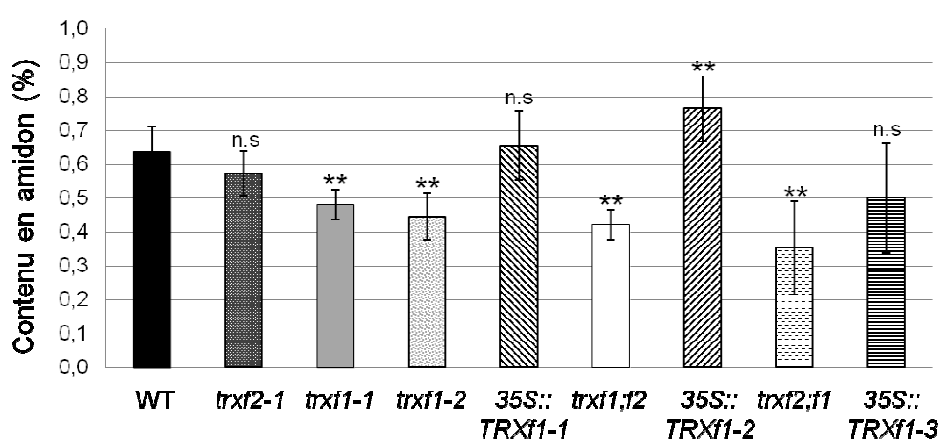


**Figure 52.** Observation de l'organisation morphologique des chloroplastes, après une coloration au Lugol 1%. Échelle : 10  $\mu$ m.

L'accumulation de l'amidon se fait bien au niveau des chloroplastes pour les tissus chlorophylliens chez *Arabidopsis*. De plus, cette accumulation est nettement plus importante chez les surexprimeurs, et les chloroplastes chez ces derniers paraissent nettement plus grands. Ces photographies ont été plus difficiles à obtenir pour les doubles mutants, puisque la coloration n'est pas très importante. Ainsi, pour quelques feuilles, les chloroplastes colorés des

doubles mutants ont la même morphologie que celle des surexpresseurs. Pour les autres chloroplastes des doubles mutants, ils paraissent plus petits et dépourvus d'amidon.

Une quantification plus précise de l'amidon contenu dans les feuilles de nos plantes âgées de trois semaines a été possible grâce à la trousse Megazyme.



**Figure 53.** Contenu (en %) en amidon présent dans les feuilles des plantules âgées de trois semaines à l'aide de la trousse de Megazyme. Chaque valeur est la moyenne de trois répétitions avec 15 plantes chacune et la barre d'erreur est l'écart-type. Test de student de comparaison de moyennes par rapport au WT : \*\* P < 0,05 et n.s = non-significatif.

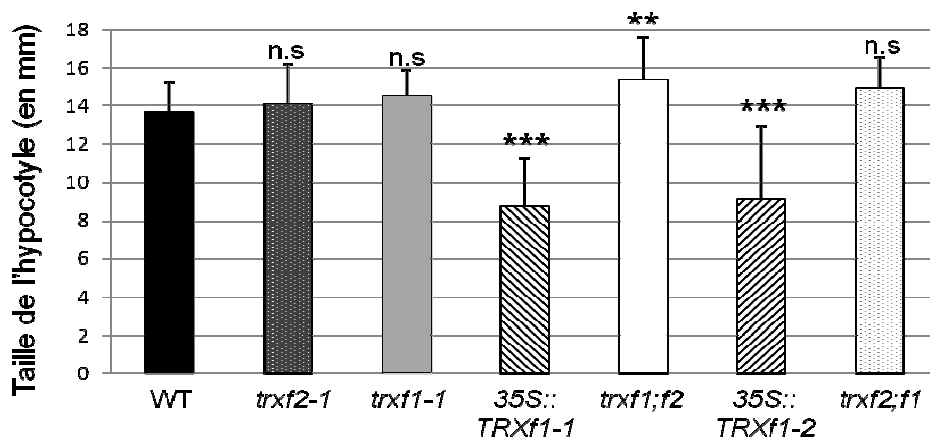
Tel que présenté en Figure 53, on constate que les doubles mutants ont moins d'amidon (pour *trxf1;f2*, environ -35%, et pour *trxf2;f1*, environ -45%) que les plantes sauvages et qu'au moins un des surexpresseurs *35S::TRXF1-2* présente plus d'amidon, près de +20% par rapport au WT. Ces résultats appuient les résultats qualitatifs présentés auparavant et suggèrent que la perte de TRX f1 et f2 réduit la synthèse d'amidon, alors qu'une surproduction de TRX f1 stimule son accumulation. Par contre, même si les voies de signalisation de la synthèse comme de la dégradation d'amidon sont connues, nous ne pouvons affirmer quelles sont les enzymes de ces voies qui sont régulées par la TRX f1 dans notre cas.

### III.2.10.2. Phénotype particulier à 4 °C

D'autres facteurs peuvent influencer l'effet des TRX f sur la régulation du statut rédox des enzymes cibles. L'alternance nuit/jour et la perception de la durée du jour sont essentielles pour l'accumulation correcte puis l'utilisation des sucres de réserves. Mais la température est un autre facteur à prendre en compte. La diminution de température pendant la nuit ralentit la dégradation de l'amidon accumulée durant la période éclairée (Pyl *et al.*, 2012). Afin d'évaluer l'effet des thiorédoxines f sur la dégradation de l'amidon à l'obscurité et au froid, les graines des différents génotypes ont été germées à l'obscurité avec une température ambiante de 4°C plutôt que placées à 22°C avec un cycle de jour long (16 heures/8 heures). Tel que présenté à la Figure 54.A, les nouvelles conditions de germination et de développement ont grandement inhibé la croissance des surexprimeurs comparés aux autres génotypes. En parallèle, une mesure de la taille des hypocotyles des plantules (Figure 55) montre une réduction significative de leur taille chez les surexprimeurs, soit environ 1 à 1,5 mm après ce traitement au froid, alors que le double mutant *trxf1;f2* se trouve stimulé par ce traitement, avec une augmentation d'environ 5 mm. Une coloration au Lugol de ces mutants a aussi été effectuée tel que présenté à la Figure 54.B. On constate qu'une plus grande quantité d'amidon au niveau de l'hypocotyle est également détectée chez les surexprimeurs.



**Figure 54.** Phénotype des hypocotyles des différents génotypes placés à l'obscurité à une température ambiante de 4°C. A. Plantules après 3 semaines. B. Plantules de 3 semaines après coloration à la solution de Lugol 1%. Échelle : 5 mm.



**Figure 55.** Mesure de la taille moyenne des hypocotyles en mm. Mesures réalisées à l'aide du logiciel ImageJ. Essai répété trois fois sur dix plantules à chaque fois.

Tests statistiques ANOVA, n.s = non-significatif, \*\*\*  $P < 0,001$  et \*\*  $P < 0,01$ .

Une autre expérience nous a permis de vérifier que l'effet observé est probablement dû à la température basse de croissance plutôt qu'à l'absence de lumière. En effet, cette expérience a été répétée dans les mêmes conditions de croissance, à l'exception de la température, qui était changée pour 22°C. Après trois semaines de croissance à l'obscurité, aucune différence de taille des hypocotyles n'a été observée sur l'ensemble des échantillons (données non montrées).

## CHAPITRE 4

### DISCUSSION GÉNÉRALE ET CONCLUSION

#### **IV.1. Détermination des éléments des voies de signalisation qui activent le promoteur de *AtBI-1* en réponse aux UV-C**

La MCP est un programme qui est nécessaire au développement des organismes vivants, dont les plantes. Ce programme intervient aussi en réponse l'ensemble des stress perçus par la plante. Cette MCP fait intervenir différentes molécules signales, comme l'augmentation du  $\text{Ca}^{2+}$  cytoplasmique ou la formation des ROS par les organites, permettant la réponse de la plante aux variations des conditions environnementales. Parmi ces voies de signalisation mises en place, quelques éléments clés ont été déterminés comme la protéine BI-1. BI-1 a été étudiée dans la réponse de MCP induite par Bax dans la levure (Kawai *et al.*, 1999, et Sanchez *et al.*, 2000). Cette protéine serait un protecteur de la cellule contre divers stress. Chez les plantes, une régulation positive de l'expression du gène *BI-1* est généralement constatée suite à une infection par un agent pathogène (Watanabe et Lam, 2006) ou provoquée par un stress abiotique (Zhao *et al.*, 2014). BI-1 serait donc un atténuateur de mort lorsqu'un stress du RE est provoqué (Watanabe et Lam, 2008, Duan *et al.*, 2010). Enfin, les UV-C provoquent beaucoup de dommage au niveau des cellules, en plus d'induire l'expression de *AtBI-1* (Danon et Gallois, 1998, Xie *et al.*, 2012).

Par un crible de mutant exprimant la luciférase sous le contrôle du promoteur de *AtBI-1*, une lignée parentale a été mise en place, 5PL20E (Djoumad, 2010). Cette étude a permis d'isoler un mutant, appelé 2017, issu d'une mutagenèse chimique de cette lignée parentale, qui présente lui aussi une régulation de l'activité luciférase. En effet, après une exposition aux UV-C du mutant 2017, la luminescence émise par la luciférase chez ce mutant est très fortement réduite. Nous supposons donc qu'un traitement aux UV-C des plantes a un effet sur la

régulation du promoteur de *AtBI-1*, puisque l'expression de la *luciférase* chez 2017 semble être réduite de manière importante. Néanmoins, les résultats obtenus avant et après traitement aux UV-C des plantules sont différents de ceux présentés par Djoumad (2010). Notamment pour la lignée parentale, où aucune activité de la luciférase n'a été détectée après l'irradiation aux UV-C. Il est possible que la seconde application de la luciférine ait été faite trop rapidement après le premier traitement, et donc aucune luminescence n'ait été détectée par la caméra. De plus, il est probable que l'irradiation aux UV-C ait été trop élevée, puisque les UV-C provoquent entre autres choses la fragmentation de l'ADNg (Danon et Gallois, 1998). La combinaison d'une irradiation aux UV-C trop élevée associée à une seconde prise de vue rapprochée fait que le signal de luminescence émis par la luciférase n'était donc pas suffisant pour être capté par la caméra. En effet, les nouveaux transcrits de luciférine n'ont pu être synthétisés puis traduits. Malgré une mise au point du protocole, une vérification de l'expression des gènes a été effectuée puisque la détection de la luminescence par la caméra n'était pas certaine.

Nous avons montré que *AtBI-1* est bien induit par un traitement aux UV-C, ainsi que la luciférase chez la lignée parentale et le mutant 2017. Cela a été démontré précédemment dans notre laboratoire que *AtLil3:2* et *AtBI-1* partagent le même promoteur, et que lorsque l'expression du premier est diminuée, celle du second est augmentée (Chainé, 2011). De plus, la perte de chlorophylle après traitement aux UV-C pour des mutants de BI-1 est plus importante que pour le type sauvage, ou même que pour un surexpresser de BI-1 (Chainé, 2011). Enfin, l'expression de la *luciférase* chez la lignée parentale 5PL20E et le mutant 2017 a été suivie. Après une irradiation, une induction du gène de la *luciférase* chez 5PL20E est constatée, de même pour le mutant 2017, dans une moindre mesure. BI-1 a un bien un rôle dans la réponse aux UV-C chez les plantes, et la régulation de son expression s'effectue au niveau de son promoteur.

Comme les résultats de la détection de la luminescence et ceux de l'expression des gènes chez la lignée parentale, en particulier celui de la *luciférase*, ne corrèlaient pas les uns avec les autres, des PCR-Inverses ont été réalisées. En effet, l'induction de l'expression de la *luciférase* n'est pas la même chez la lignée parentale et chez 2017. Il est donc possible que le locus de



l'ADN-T dans le génome a un impact sur cette régulation d'expression de la *luciférase*, et éventuellement aussi sur celle de *AtBI-1*. Par la technique de la PCR-Inverse, il nous était possible de déterminer le site d'insertion dans le génome de 5PL20E de l'ADN-T initial contenant *pBI-1::luciférase*. De plus, le mutant 2017 ayant été obtenu à partir de la lignée parentale 5PL20E, les profils pour ces deux mutants devaient être identiques. Cette approche a été privilégiée par rapport à un séquençage complet des génomes, beaucoup plus onéreux. Par ailleurs, l'utilisation du mutant 2017 n'aurait pas été possible, dans le cas du séquençage complet, du fait du très grand nombre de mutations provoquées par le traitement à l'EMS. À l'aide de PCR-Inverses sur le mutant 2017 et la lignée parentale, nous avons tenté de déterminer l'insertion de l'ADN-T dans le génome d'*Arabidopsis*. Néanmoins, les quantités extraites de fragments ont été insuffisantes pour que le séquençage fonctionne. Par ailleurs, certaines PCR pour vérifier la présence de l'ADN-T dans les générations suivantes de 5PL20E et de 2017 ont été négatives. Il est probable que l'insertion soit dans une région assez mobile, et que ce fragment d'ADN-T se comporte comme un transposon. En effet, l'insertion de l'ADN-T dans le génome a été réalisée selon le système des séquences d'ADN capables de se déplacer de manière autonome dans le génome des cellules eucaryotes. Ainsi, cette construction ne semble pas stable dans le génome de nos plantules, et serait perdue sur les générations récentes. De ce fait, nous n'avons pu continuer la détermination du site d'insertion de l'ADN-T, ni la caractérisation du mutant 2017.

#### **IV.2. Implication des TRX f dans les voies de signalisation de la plante en réponse à divers stress abiotiques**

Le gène *AtBI-1* n'est pas le seul à avoir un rôle dans les réponses de stress. Un autre mutant identifié par Djoumad (2010), impliquerait une thiorédoxine dans la réponse aux UV-C chez la plante modèle, *Arabidopsis*. En effet, une insertion aléatoire d'un ADN-T comprenant le gène de la *luciférase* a été réalisée. Ce mutant exprime la *luciférase* avant une exposition aux UV-C, mais cette expression est perdue après une irradiation. La localisation de l'insertion a été effectuée par Djoumad (2010). La régulation de l'expression de la *luciférase* devient contrôlée

par le promoteur du gène de la *AtTrx f1*, puisque cet ADN-T se situe à 35 pb du codon d'initiation dans la région 5'UTR du gène de *trx f1*. De plus, chez l'homme, deux gènes codent pour deux TRX, dont une localisée dans le cytosol et la seconde active dans la mitochondrie (Holmgren et Lu, 2010). Par ailleurs, l'expression de la Trx1 est modifiée pour de nombreuses pathologies chez l'homme (Sumida *et al.*, 2000, Sumida *et al.*, 2003, Holmgren et Lu, 2010). Ainsi, la viabilité des cellules est en partie dépendante de l'activité des TRX lors d'un stress oxydatif (Day *et al.*, 2012). Si les TRX sont inactives, alors les protéines cibles n'ont plus de régulation de leur statut rédox, et cela induit une sensibilité de la cellule, voire provoque la MCP de cette dernière (Day *et al.*, 2012).

Nous tentons de comprendre le rôle des TRX f dans le MCP provoquée par divers stress abiotiques chez *Arabidopsis thaliana*. Par l'étude bioinformatique, nous concluons que les deux *AtTRX f* ont une séquence très proche, et il est probable qu'il y ait redondance de fonction entre ces deux protéines. Chez *Pisum sativum*, la perte de la TRX f est compensée par la TRX m pour de nombreux processus associés à la photosynthèse ou à l'accumulation des ROS (Luo *et al.*, 2012). Il en est de même chez la tomate, où l'homéostasie des chloroplastes est dépendante des TRX f et TRX m1/4 ainsi que la régulation des activités d'antioxydants ou des enzymes de la photosynthèse (Cheng *et al.*, 2014). Notons aussi que les TRX m1, m2 et m4 interviennent dans la biogénèse du PSII (Wang *et al.*, 2013). Par contre, une redondance de fonction entre les deux *AtTRX f* n'a pas encore été démontrée. Malgré cela, quelques différences ont du être conservées et pourraient expliquer le maintien de ces deux gènes actifs chez cette plante. Toutes les études publiées à ce jour portent uniquement sur les rôles de l'*AtTRX f1* dans la plante. Les chercheurs éliminent facilement la TRX f2 de leurs études, du fait de la forte homologie avec la TRX f1 qui est globalement plus exprimée dans la plante (Valerio *et al.*, 2011, Silver *et al.*, 2013). Dernièrement, en plus de d'avoir identifié la TRX f2 chez *Arabidopsis* et l'*Eucalyptus* (Barbosa et Marinho, 2005), un deuxième gène codant pour une TRX de type f a été révélé chez d'autres plantes, sans que la fonction de la protéine ne soit étudiée. Enfin, le type f a une origine eucaryote, tout comme les TRX cytoplasmiques et mitochondriales, alors que les autres types de TRX chloroplastiques ont une origine procaryote (Dangoor *et al.*, 2009). L'un des objectifs de cette seconde partie est de déterminer si

une redondance de fonction est établie entre les deux TRX de type f ou si ces deux protéines agissent indépendamment l'une de l'autre. Pour ce faire, une analyse bioinformatique des deux gènes a été effectuée et complétée par d'autres expériences développées ci-dessous.

Tout d'abord, une comparaison des séquences protéiques a mis en évidence une homologie de séquence importante entre les deux AtTRX f, avec 78% d'identité. Par ailleurs, l'analyse de leur expression dans la plante (données obtenues sur Arabidopsis eFP Browser) a accentué l'hypothèse d'une redondance de fonction entre les deux protéines. De ce fait, la vérification de la localisation dans les cellules végétales des deux protéines a été effectuée par une fusion avec la YFP. Jusqu'à présent, la localisation aux chloroplastes de l'AtTRX f1 a été faite (Collin *et al.*, 2003). Ensuite, à l'aide des séquences protéiques et des sites de prédiction, les deux AtTRX f ont été supposées localisées au niveau des chloroplastes (Collin *et al.*, 2003, De Dios Barajas-López *et al.*, 2007). Malgré une ressemblance très forte entre les deux séquences protéiques des enzymes, le peptide d'adressage aux chloroplastes (en partie N-ter) des AtTRX f n'ont que 58% d'identité. Initialement regroupées en sous-groupe selon l'alignement des séquences protéiques, certaines TRX végétales n'ont finalement pas la localisation subcellulaire prédite en conditions expérimentales. Ainsi, les TRX o et TRX h seraient principalement localisées à un endroit, soit aux mitochondries pour les premières et au cytoplasme pour les suivantes (Laloi *et al.*, 2001, Traverso *et al.*, 2013). Pourtant, toutes ces protéines peuvent aussi être relocalisées à d'autres endroits dans la cellule (Bréhélin *et al.*, 2004, Gelhaye *et al.*, 2004b, Martí *et al.*, 2009). Partant avec ces éléments, nous nous sommes assurées de la localisation de ces deux protéines aux plastes en conditions normales. Mais peut être que ces enzymes peuvent être relocalisées en cas de stress. Il serait intéressant d'effectuer des surexprimeurs de la TRX f1 et de la TRX f2, fusionnées à la YFP en C-ter, et placées sous le contrôle du promoteur constitutif 35S CaMV. Les constructions utilisées pour la transfection des protoplastes peuvent être digérées directement par le couple *XbaI/ClaI*, puis clonées dans le vecteur pGreen0129. Après transformation de plantes avec ces constructions et sélection des mutants positifs, nous aurions à notre disposition des surexprimeurs des deux *35S::TRXf-YFP*. Ainsi, il serait possible de suivre la relocalisation éventuelle de nos protéines

en réponse à un stress, notamment si l'une d'entre elle a aussi une activité dans le cytoplasme de la cellule dans certaines conditions.

L'un des objectifs était de déterminer l'implication des TRX f dans la MCP. Chez les animaux, la protéine BAX peut induire la MCP des cellules (Ruiz-Vela *et al.*, 2005). Pour comprendre les fonctions des AtTRX f dans cette voie de signalisation, des essais de fonctionnalité dans la levure ont été réalisés. Contrairement aux résultats obtenus par Djoumad (2010), les *AtTRX f* ne semblent pas impliquées dans la protection de la levure lorsque *BAX* est induit. En complément, des tests seraient envisageables chez une autre souche de levure, *S. cerevisiae* YML007W BY4742, dont le facteur de transcription *Δyap1* impliqué dans le stress oxydatif n'est plus présent (Okazaki *et al.*, 2007). En effet, suite à une exposition de la souche par du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, les gènes de réponse au stress oxydatif sont induits par YAP1. Enfin, des expérimentations sur une dernière souche de levure *S. cerevisiae* dépourvue des 3 *Δtrx* devraient être tentées (Pedrajas *et al.*, 1999). Cette dernière partie est à compléter, puisque de cette manière, nous pourrions précisément connaître l'implication des AtTRX f dans divers réponses aux stress oxydatifs.

Par la suite, cette étude s'est poursuivie sur des plantules d'*Arabidopsis*. Plusieurs mutants ont été sélectionnés. Des doubles mutants issus de croisements entre les deux simples mutants ont été obtenus. Par ailleurs, parmi les trois surexprimeurs, seulement deux se sont démarqués par le maintien d'une expression élevée de la *TRX f1* après une exposition aux UV-C. Chez ces mêmes surexprimeurs, l'expression des *TRX m1* et *m3* serait aussi maintenue après le traitement aux UV-C. Ces thiorédoxines sont chloroplastiques et ont essentiellement des activités en lien avec la photosynthèse (Rey *et al.*, 2013). Même si des différences importantes ont été mises en évidence entre ces deux groupes, dans certains cas, un groupe peut être stimulé pour aider la plante dans sa réponse.

Les surexprimeurs sont plus sensibles aux stress oxydatif provoqués par les UV-C ou par le MV. À l'exception de la fragmentation de l'ADNg qui semble plus importante pour l'ensemble de nos génotypes, le taux de cellules mortes est plus élevé, la formation des ROS au niveau

des chloroplastes est plus intense, et la conductivité est aussi plus élevée chez les surexprimeurs. À l'opposé, les doubles mutants paraissent plus résistants à ces stress. Il semblerait que les AtTRX f n'ont pas de lien avec l'activation des métacaspases et autres protéines clivant l'ADN, ce qui explique le phénotype commun à tous nos génotypes. La fragmentation de l'ADN provoquée par l'irradiation des plantules aux UV-C est un événement indépendant des fonctions de contrôle du statut rédox des chloroplastes par les AtTRX f. L'implication des TRX f dans ces réponses se fait par une combinaison d'autres molécules, dont les ROS ou le déséquilibre ionique de la cellule. En effet, chez les surexprimeurs, la formation des ROS au niveau des feuilles irradiées aux UV-C semblent être plus importante que chez le sauvage. De même, la perte d'ions mesurée par la conductivité est plus élevée chez les surexprimeurs. Ainsi, la TRX f1 semblerait tenir un rôle dans la réponse à certains stress oxydatifs chez les plantes. Mais jusqu'à présent, ce sont surtout les thiorédoxines du type o et h qui seraient impliquées dans les réponses de stress, surtout des stress biotiques pour les TRX h (Wong *et al.*, 2003, Zhang *et al.*, 2011, Lorang *et al.*, 2012, Ueoka-Nakanishi *et al.*, 2013). Par ailleurs, grâce à l'analyse des simples et doubles mutants, il semblerait que les TRX f ont bien une redondance de fonction dans la plante. En effet, les réponses observées chez les simples mutants n'ont pas été significativement différentes des plantes sauvages, alors que les doubles mutants ont souvent montré des phénotypes résistants aux stress abiotiques testés.

L'ensemble des mutants et surexprimeurs de l'étude ne montrent pas de phénotype particulier. À l'exception du retard de croissance des surexprimeurs suivant les premiers jours de germination, les plantules croissent normalement. Cette absence de phénotype a été remarquée chez d'autres mutants et surexprimeurs de TRX f1 (Rey *et al.*, 2013, Sanz-Barrio *et al.*, 2013). Il est possible que les TRX f soient impliquées dans la germination et la reproduction de la plante puisque ces protéines sont exprimées dans des tissus non-photosynthétiques de la plante (De Dios Barajas-López *et al.*, 2007). Il est possible que l'une des deux TRX f intervienne dans l'une des étapes de la reproduction. De plus, la TRX f1 joue un rôle dans la régulation de la synthèse et l'utilisation de l'amidon par la plante (Mikkelsen *et al.*, 2005, Valerio *et al.*, 2011, Silver *et al.*, 2013, Thormählen *et al.*, 2013). Enfin, chez le pois, les TRX f et m1

auraient un rôle dans la mobilisation des réserves dans les cotylédons des plantules (Fernández-Trijueque *et al.*, 2012).

Du fait du retard de germination des surexprimeurs, il est possible que ces plantes en présence d'ABA exogène, exposent une hypersensibilité à l'hormone. Pour comprendre un lien éventuel entre les TRX f et l'ABA, des tests de germination avec ABA dans le milieu ont été effectués. Les différences entre les simples mutants et doubles mutants n'ont pas été très importantes. Par contre, les surexprimeurs ont continué à avoir un retard de germination, mais en plus, ils ont montré une plus grande sensibilité à l'hormone dans le milieu. L'expression des deux gènes est induite après la germination, et pourrait être en partie inhibée par la présence de l'ABA. Une analyse rapide de l'implication éventuelle des TRX m1 et m3 a été faite, puisqu'un très grand nombre de publications portant sur l'un des deux types vérifient toujours le second type (De Dios Barajas-López *et al.*, 2007, De Dios Barajas-López *et al.*, 2012). Toutefois, ces enzymes conservent des propriétés de fonction qui leur sont propres, puisque les TRX m sont généralement associées aux activités photosynthétiques de la plante (Rey *et al.*, 2013). Il a été démontré que la TRX m1, chez le pois, serait importante pour les réponses au stress salin durant la germination (Fernández-Trijueque *et al.*, 2012). Par ailleurs, l'expression des gènes codant pour les facteurs de transcription MYB15 et RRTF1 a aussi été vérifiée. Il a été démontré que les surexprimeurs de *MYB15* sont hypersensibles à l'ABA durant les tests de germination, et la régulation du gène chez le type sauvage en présence d'ABA est positive (Ding *et al.*, 2009). Malheureusement, dans les tous premiers stades de développement, l'expression de *MYB15* ou celle de *RRTF1* ne semblent pas augmenter chez nos mutants en présence d'ABA. La sensibilité des surexprimeurs à l'ABA ne semble pas être due à l'un de ces facteurs de transcription. Chez le riz, une surexpression de *OsTRX h1* tout comme une régulation négative de l'expression de ce gène, diminue la sensibilité des plantes à l'ABA durant la germination (Zhang *et al.*, 2011). De ce fait, l'absence de régulation d'une des TRX dans la graine pourrait avoir un effet sur le statut rédox de celle-ci et avoir des conséquences sur la sensibilité ou résistance aux traitements.

Le léger retard de germination des surexprimeurs pourrait aussi être dû aux rôles de la TRX f1 en lien avec la synthèse d'amidon (Sanz-Barrio *et al.*, 2013). Dans les conditions de croissance standards du laboratoire (cycle de jours longs et 22°C), le contenu en amidon de nos plantules diffèrent : les surexprimeurs en ont beaucoup, puis le WT et les simples mutants en présentent un peu moins, et enfin les doubles mutants qui n'en contiennent quasiment pas. Toutes les expériences ont été effectuées en fin de phase lumineuse, puisque c'est durant la journée que les plantes synthétisent l'amidon (Smith et Stitt, 2007, Graf *et al.*, 2010, Scialdone *et al.*, 2013). Parmi les enzymes de synthèse de l'amidon, l'activité de l'AGPase est régulée par son statut rédox qui est sous le contrôle de la NTRC ou de la TRX f1 (Michalska *et al.*, 2009, Thormählen *et al.*, 2013). Il est probable dans notre cas que la TRX f1 régule l'activité de cette enzyme.

Par contre, il serait intéressant d'étudier le profil du contenu en amidon de surexprimeurs de TRX f2. Cette protéine étant très proche de la TRX f1, il est possible qu'il existe une redondance de fonction dans la régulation de la synthèse d'amidon entre ces deux gènes. Les simples mutants ne sont pas très différents du sauvage, par contre, les doubles mutants semblent généralement plus résistant aux stress. Il y aurait bien une redondance partielle de fonction entre les deux TRX f. Comme pour l'étude avec des surexprimeurs de *NtTRX f* chez le tabac, c'est la synthèse de l'amidon qui est favorisée (Sanz-Barrio *et al.*, 2013). De plus, le contrôle de l'utilisation de l'amidon est primordiale et déterminant sur la quantité de la TRX f1 (Balmer *et al.*, 2006). Certaines enzymes de la voie de dégradation de l'amidon sont aussi régulées selon leur statut rédox par les TRX (Kötting *et al.*, 2010, Seung *et al.*, 2013). L'ensemble des différentes TRX chloroplastiques ont été testées, et la TRX f1 semble la plus probable pour réguler la GDW1 (Mikkelsen *et al.*, 2005), la BAM1, l'AMY3 (Sparla *et al.*, 2006, Valerio *et al.*, 2011, Seung *et al.*, 2013) et la SEX4 (Silver *et al.*, 2013). Cependant, ces études présentent la TRX f1 comme étant l'enzyme ayant l'efficacité la plus élevée pour les réguler, sans avoir testé la TRX f2. La seconde protéine du groupe f n'a donc pas été testée du fait de son homologie très élevée avec la TRX f1. Il serait intéressant d'envisager de faire des essais d'activité enzymatique comme proposés chez Sparla *et al.* (2006) ou Valerio *et al.* (2011). Par ailleurs, il serait possible de tester la fonction de la TRX f2 dans ces conditions, et

déterminer le rôle de cette seconde enzyme dans ce processus, même si nous supposons que la fonction de la TRX f2 est en partie redondante, puisque les doubles mutants accumulent moins d'amidon.

Lorsque les plantes ont germées à 4°C et à l'obscurité, nous observons là aussi, une plus grande quantité d'amidon chez les surexprimeurs. Par ailleurs, la taille de leur hypocotyle est nettement inférieure au type sauvage et aux autres mutants. Plusieurs enzymes de la voie de biosynthèse de l'amidon ainsi que celles permettant sa dégradation ont leur activité régulée par leur statut rédox, donc impliquent des TRX. Par ailleurs, la synthèse de l'amidon se produit essentiellement le jour, pour que ce dernier soit utilisé la nuit et fournir de l'énergie à la plante (Balmer *et al.*, 2006). La perception des changements climatiques est essentielle à l'adaptation de la plante aux modifications environnementales (Smith et Stitt, 2007 et Graf *et al.*, 2010). En 2012, Pyl *et al.* ont démontré que lorsque les plantes étaient placées dans des chambres où la température de nuit est plus basse, le taux de dégradation de l'amidon semblait diminué. Dans notre cas, il n'y a pas d'alternance nuit/jour. Il est probable que la TRX f1 est bien la protéine qui régule les activités des enzymes des voies de synthèse et de dégradation de l'amidon. Mais à basses températures, la voie de dégradation est fortement ralentie, ce qui favorise l'accumulation de l'amidon. De plus, lorsque cette balance entre ces deux voies n'est plus équilibrée, la croissance de la plante est altérée (Graf *et al.*, 2010), ce qui explique la petite taille des hypocotyles des surexprimeurs.

Avec ces éléments, on pourrait supposer que la TRX f1 aurait un effet sur la disponibilité des sucres pour le développement de l'embryon. Cela expliquerait le retard de germination chez les surexprimeurs qui ne dégraderaient pas l'amidon, mais continueraient à l'accumuler. Normalement, certaines thiorédoxines dont la f, chez le pois, sont sous le contrôle du taux de sucres (De Dios Barajas-López *et al.*, 2012). Mais, dans notre cas, le promoteur constitutif ne peut être régulé par ce facteur, ni aucun autre élément extérieur perturbant l'équilibre de la cellule. Avec l'utilisation de ce promoteur, les surexprimeurs de TRX f1 expriment la protéine dans tous les tissus et à tous moments. Ces tissus se mettent à accumuler de l'amidon, alors qu'en temps normal, cette fonction n'était retrouvée qu'au niveau des feuilles d'*Arabidopsis*.



Par ailleurs, les quelques informations disponibles sur le rôle potentiel des thiorédoxines dans le contrôle de la disponibilité de l'amidon dans la graine n'a été déterminé que sur les TRX h. Chez le blé (Wong *et al.*, 2003) comme chez le pois (Montrichard *et al.*, 2003), ce sont les thiorédoxines h qui ont été étudiées. Chez le riz aussi, les TRX h ont un rôle aussi bien dans le développement de la plante que dans les réponses aux stress (Zhang *et al.*, 2011). La régulation d'expression de cette famille de gènes dans la graine est primordiale pour une germination correcte des semences de blé (Li *et al.*, 2009). Par exemple, chez l'orge, une répression de la *trx h9* dans l'albumen retarde la germination, alors qu'une surexpression de la *trx h5* a l'effet contraire (Li *et al.*, 2009). Étant donné que chez la plante modèle, *Arabidopsis thaliana*, la synthèse et le stockage de l'amidon se produisent dans les plastes, il est probable qu'un autre type de thiorédoxines que les h soit impliqué dans sa formation. De plus, puisque la TRX f1 des chloroplastes a un rôle dans l'équilibre entre la synthèse et la disponibilité de l'amidon (Thormählen *et al.*, 2013, Sparla *et al.*, 2006), et que cette enzyme est aussi active et localisée dans les plastes de tissus non-chlorophylliens (De Dios Barajas-López *et al.*, 2007), il est très probable qu'elle intervienne aussi au moment de la germination de la graine.

D'après les expressions relatives fournies sur eFP Browser, les rares instants dans la vie de la plante où la *trx f2* est plus exprimée que la *trx f1*, c'est au moment de la maturation des siliques et la formation du grain de pollen. Nous avons tenté de créer des triples mutants en effectuant des croisements entre les doubles mutants et les surexpresses de *TRX f1*. L'objectif était de n'avoir que les fonctions de la *TRX f1* dans la cellule. Il s'avère que les générations suivantes ne se développent pas toutes. Aucun problème n'est constaté lorsque les plantes mères sont les doubles mutants, *trxf1;f2* ou *trxf2;f1*. Par contre, si la plante mère est l'un des surexpresses, *35S::TRXf1-1*, une partie des graines ne germe pas, et celles qui donnent une plantule expriment toujours le gène natif de la *TRX f1*. Par ces résultats, le rôle de la TRX f1 dans certaines étapes de la reproduction ou de la germination est encore plus probable. Sinon, c'est l'équilibre entre les deux TRX f qui est primordial, et l'absence de l'une d'entre elles est létale pour la plante. Cela suppose que malgré une forte homologie entre les deux protéines, ces dernières conservent quelques fonctions qui leur sont propres. L'obtention de surexpresses de la TRX f2 pourrait confirmer ces points.

Enfin, de plus en plus d'études vont dans le sens d'une relation entre le taux des sucres de la plante et sa sensibilité aux divers stress.

Les sucres sont essentiels à la survie des organismes et sont des composants généraux des métabolismes. Ils ont aussi un rôle critique dans certaines réponses aux stress biotiques et abiotiques. En effet, ces sucres servent aussi de molécules signales qui mettent en relation le métabolisme de la cellule et l'état rédox de cette dernière pour répondre efficacement aux stress. Les sucres les plus intéressants sont les sucres solubles, surtout le sucrose, mais aussi le glucose et le fructose (Couée *et al.*, 2006). Par ailleurs, le taux de sucre aussi a un impact sur la sensibilité des cellules. Cela est valable même pour les cellules animales. Les taux élevés de glucose dans les cellules des mammifères sont associés à une toxicité de ce sucre pour la cellule (Russell *et al.*, 2002). Quand le glucose est présent en de trop grandes quantités dans la cellule, cela est associé à une augmentation de ROS formées via une auto-oxydation du glucose et via le métabolisme du glucose (Russell *et al.*, 2002). À l'opposé, pour des taux de glucose bas, la production des ROS est fortement diminuée.

Chez les plantes, grâce à la photosynthèse, les sucres complexes se forment, comme l'amidon. Durant la nuit, ces sucres seront dégradés en sucres simples pour être utiles à la respiration et permettre la production d'énergie, et en parallèle, inhibent l'oxydation des acides gras. Les sucres solubles formés durant la nuit exercent un contrôle négatif sur la photosynthèse. Les triose-phosphates, formés durant la journée dans les chloroplastes à l'issue du cycle de Calvin-Besson, peuvent rester dans l'organite et servir à la synthèse de l'amidon ou migrer dans le cytoplasme et former le sucrose (Ruan, 2014). Les surexprimeurs de la *TRX fl* favorisent la synthèse d'amidon, au détriment de la formation de sucrose chez nos plantes.

De plus, les sucres solubles se comportent comme des molécules signales. Par exemple, le glucose peut stimuler la formation de ROS, et ainsi avoir un impact sur la division cellulaire. Un équilibre précaire est présent entre les ROS et le taux de sucres soluble (Van den Ende et Valluru, 2009). La régulation de certains gènes est faite par les sucres, dont ceux qui ont un

rôle dans la réponse aux stress abiotiques (Rolland *et al.*, 2002, Couée *et al.*, 2006). Au rôle de la molécule signal du sucrose s'ajoute celui de protecteur contre les ROS présents, comme des antioxydants (Van den Ende et Valluru, 2009, Keunen *et al.*, 2013). Les doubles mutants de *trx f* semblent avoir nettement moins d'amidon que le WT, mais être plus résistants aux stress oxydatifs étudiés dans cette thèse. À l'opposé, les surexprimeurs contiennent un taux élevé d'amidon, et sont plus sensibles aux stress oxydatifs. Cette relation entre le taux de sucres, dont la disponibilité des sucres solubles, et la sensibilité aux stress abiotiques explique une bonne partie de nos résultats.

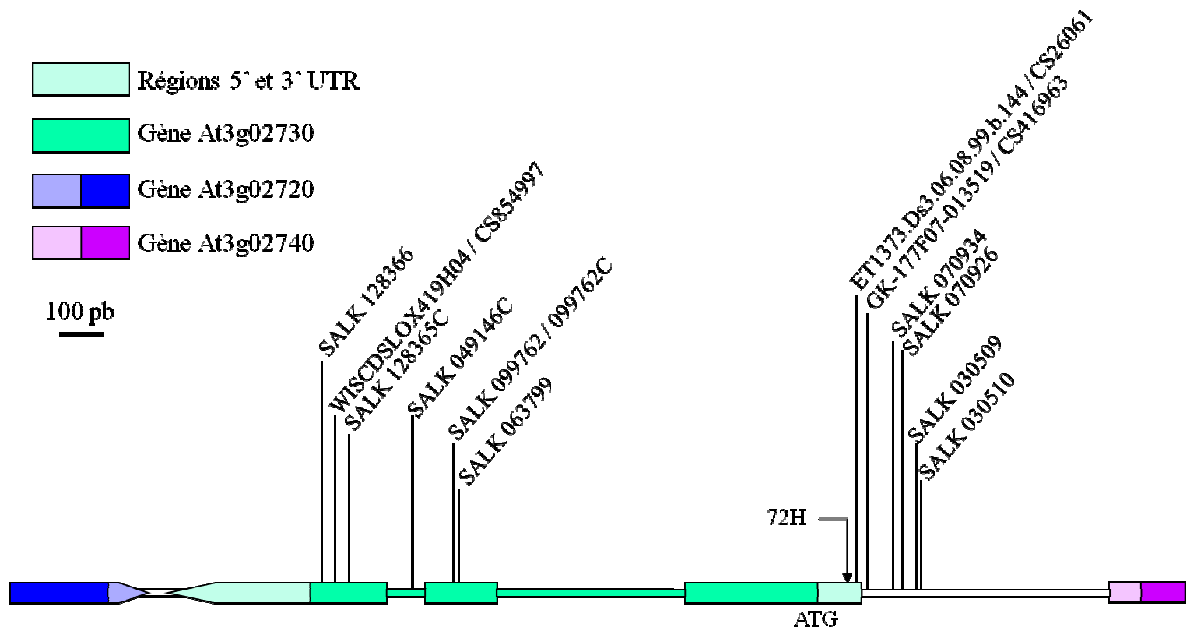
Quelques derniers éléments pourraient aider à comprendre les relations entre toutes ces voies de signalisation. Il serait intéressant d'évaluer par puces à ARN l'influence de *35S::TRXf1-1* sur l'expression des gènes de réponse au stress oxydatif dans les conditions standards de croissance. Par ailleurs, il serait pertinent de voir si l'ensemble des résultats obtenus avec *35S::TRXf1-1*, sont identiques avec le surexprimeur de TRX f2. D'un côté, nous saurions avec certitude s'il y a bien une redondance de fonction entre les deux protéines, et d'un autre, cela nous permettrait de découvrir les fonctions spécifiques de la *trx f2*.

Enfin, cette même relation entre le taux de sucre et les stress biotiques se fait lors d'une infection par un agent pathogène (Ruan, 2014). Même si les voies de réponse empruntées impliquent l'expression de gènes différents, les plantes qui présentent plus de sucres sont généralement plus sensibles aux organismes infectieux (Ruan, 2014). Ainsi, il serait intéressant de voir si la fonction de la TRX f1 dans le contrôle de la disponibilité en amidon a un effet sur la sensibilité de la plante lorsque la protéine est exprimée constitutivement. Par ailleurs, si les surexprimeurs des TRX fusionnées à la YFP sont obtenus, il serait possible de visualiser au cours d'un stress biotique et abiotique comment se comporte la protéine.

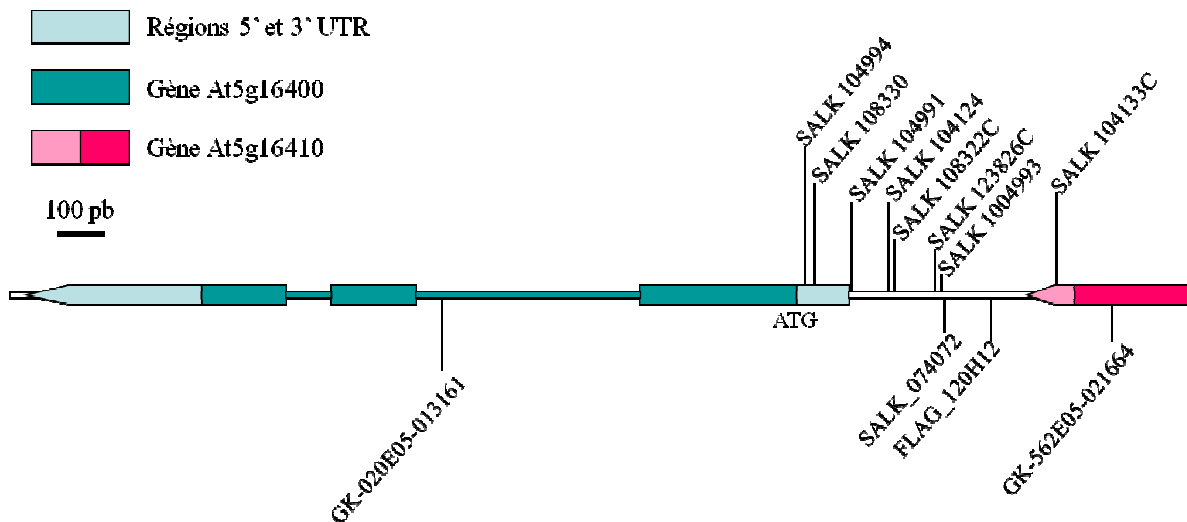
En conclusion, les TRX f ont une forte homologie de séquences protéiques et sont localisées dans les chloroplastes, et, une redondance de fonction entre les deux protéines est avérée. Les surexprimeurs présentant un taux élevé d'amidon, notamment dans les feuilles, sont généralement plus sensibles aux stress oxydatifs de l'étude. À l'opposé, les doubles mutants

concentrent des quantités d'amidon beaucoup plus faibles, mais ces mutants semblent plus résistants à ces mêmes stress. La TRX f1 joue bien un rôle dans la régulation des enzymes associées à la synthèse et la dégradation de l'amidon. Pour le moment, nous supposons que la TRX f2 a un rôle dans la régulation de l'amidon, grâce aux doubles mutants, néanmoins, nous ne pouvons conclure clairement sur sa fonction. Des essais enzymatiques de ces deux protéines en présence des enzymes de ces voies régulées par leur statut rédox doivent être faits (protocoles de Sparla *et al.*, 2006, ou Valerio *et al.*, 2011). Dans des conditions d'expérimentations précises, notamment avec un contrôle du pH, il est possible de mesurer l'activité de la BAM1 avec un réactif spécifique. Comme nous venons de le voir, la sensibilité/résistance des différents génotypes aux stress abiotiques ne seraient pas directement dû aux rôles des TRX f dans la réponse induite, mais à un déséquilibre du statut rédox des chloroplastes combiné à un changement du taux de sucre dans les plantes. Des analyses sur puces à ARN des surexprimeurs permettraient de savoir si des gènes de réponse aux stress sont réprimés en conditions standards. Enfin, l'obtention de surexprimeurs des TRX fusionnées à la YFP seraient pertinentes pour pouvoir visualiser le comportement de ces protéines durant un stress biotique et abiotique. Par ailleurs, une analyse phénotypique des surexprimeurs de la TRX f2 pourrait montrer des divergences ou des similitudes, et nous pourrions ainsi clairement conclure sur la possible redondance de fonction entre les deux TRX f.

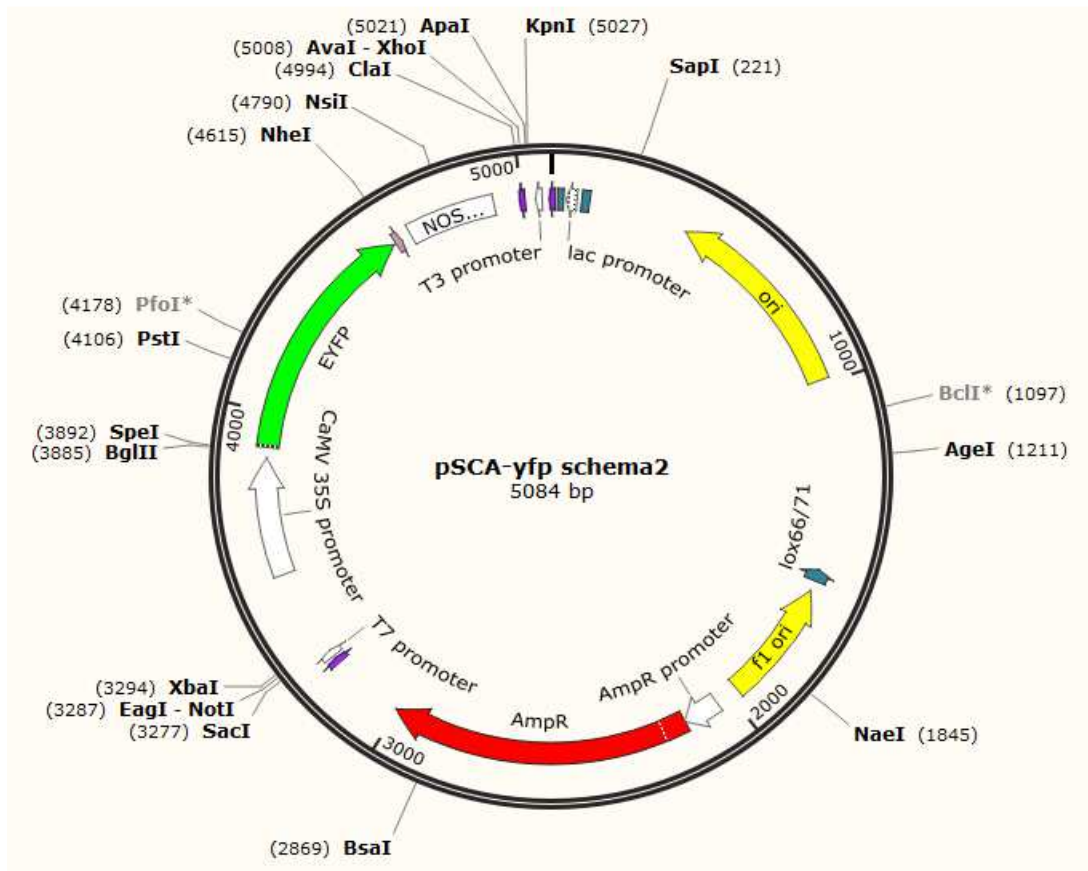
## ANNEXES



ANNEXE 1. INSERTION DES ADN-T DANS AT3G02730 - GÈNE DE *TRX F1*.

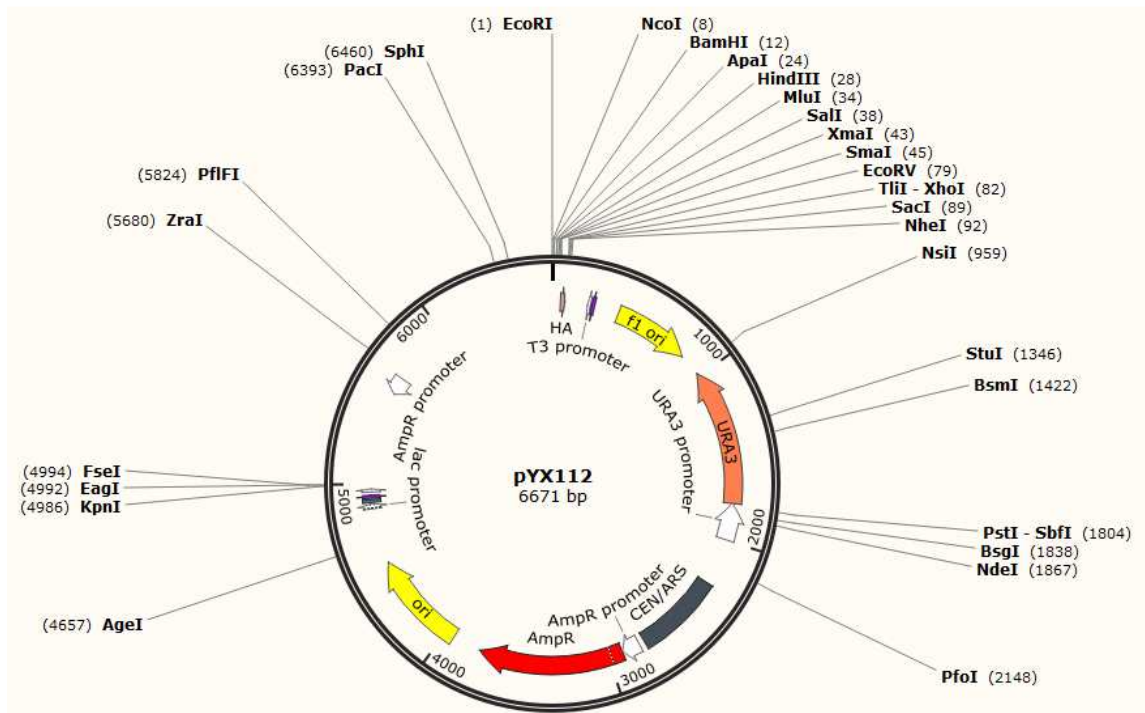


ANNEXE 2. INSERTION DES ADN-T DANS AT5G16400 - *TRX F2*.



ANNEXE 3. SCHÉMA DE PSCA-EYFP.

Vecteur fourni par le laboratoire du Dr Eric Ducos du laboratoire EA2106 - Biomolécules et Biotechnologies Végétales (Université François Rabelais, Tours, France), schéma effectué à l'aide du logiciel SnapGene, à partir de la séquence en acides nucléiques du plasmide.



ANNEXE 4. SCHÉMA DE PYX112.

Vecteur fourni par le laboratoire de la Dre Louise Brisson (Université Laval, Québec, Canada), schéma effectué à l'aide du logiciel SnapGene, à partir de la séquence en acides nucléiques du plasmide.

## BIBLIOGRAPHIE

Agarwal, M., Kapoor, A., Dong, C.H., Fujii, H. and Zheng, X. (2006). A R2R3 type MYB transcription factor is involved in the cold regulation of CBF genes and in acquired freezing tolerance. *J. Biol.Chem.* *281*, 37636–37645.

Ahmad, R., Zuily-Fodil, Y., Passaquet, C., Bethenod, O., Roche, R. and Repellin, A. (2012). Ozone and aging up-regulate type II metacaspase gene expression and global metacaspase activity in the leaves of field-grown maize (*Zea mays* L.) plants. *Chemosphere* *87*, 789-795.

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.

Anderson, G. H., Veit, B. and Hanson, M.R. (2005). The *Arabidopsis AtRaptor* genes are essential for post-embryonic plant growth. *BMC Biol.* *3*, 1-12.

Arsova, B., Hoja, U., Wimmelbacher, M., Greiner, E., Üstün, S., Melzer, M., Petersen, K., Lein, W. and Börnke, F. (2010). Plastidial Thioredoxin z Interacts with Two Fructokinase-Like Proteins in a Thiol-Dependent Manner: Evidence for an Essential Role in Chloroplast Development in *Arabidopsis* and *Nicotiana benthamiana*. *Plant Cell* *22*, 1498-1515.

Atkins, K.A. and Dodd, A.N. (2014). Circadian regulation of chloroplasts. *Curr. Opin. Plant Biol.* *21*, 43-50.

Babaeizad, V., Imani, J., Kogel, K.-H., Eichmann, R. and Hüchelhoven, R. (2009). Over-expression of the cell death regulator BAX inhibitor-1 in barley confers reduced or enhanced susceptibility to distinct fungal pathogens. *Theor. Appl. Genet.* *118*, 455-463.

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.

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.

Balmer, Y., Vensel, W.H., Tanaka, C.K., Hurkman, W.J., Gelhaye, E., Rouhier, N., Jacquot, J.-P., Manieri, W., Schürmann, P., Droux, M. and Buchanan, B.B. (2003). Thioredoxin links redox to the regulation of fundamental processes of plant mitochondria, *Proc. Natl. Acad. Sci.* *101*, 2642-2647.



- Balsera, M., Goetze, T.A., Kovács-Bogdán, E., Schürmann, P., Wagner, R., Buchanan, B.B., Soll, J. and Bölter, B. (2009). Characterization of Tic110, a Channel-forming Protein at the Inner Envelope Membrane of Chloroplasts, Unveils a Response to Ca<sup>2+</sup> and a Stromal Regulatory Disulfide Bridge. *J. Biol. Chem.* *284*, 2603-2616.
- Barbosa, A. E. and Marinho, P. (2005). *In silico* analysis of *Eucalyptus* thioredoxins. *Genetics Mol. Biol.* *28*, 539-547.
- Barranco-Medina, S., Krell, T., Bernier-Villamor, L., Sevilla, F., Làzaro, J.-J. and Dietz, K.-J. (2008). Hexameric oligomerization of mitochondrial peroxiredoxin PrxIIF and formation of an ultrahigh affinity complex with its electron donor thioredoxin Trx-o. *J. Exp. Bot.* *59*, 3259-3269.
- 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.
- Beers, E.P. and McDowell, J.M. (2001). Regulation and execution of programmed cell death in response to pathogens, stress and developmental cues. *Curr. Opin. Plant Biol.* *4*, 561-567.
- Benitez-Alfonso, Y., Cilia, M., San Roman, A., Thomas, C., Maule, A., Hearn, S. and Jackson, D. (2009). Control of Arabidopsis meristem development by thioredoxin-dependent regulation of intercellular transport. *PNAS* *106*, 3615-3620.
- Bernal-Bayard, P., Ojeda, V., Hervás, M., Cejudo, F.J., Navarro, J.A., Velázquez-Campoy, A. and Pérez-Ruiz, J.M. (2014). Molecular recognition in the interaction of chloroplast 2-Cys peroxiredoxin with NADPH-thioredoxin reductase C (NTRC) and thioredoxin x. *FEBS Lett.* *588*, 4342-4347.
- Bohrer, A.-S., Massot, V., Innocenti, G., Reichheld, J.-P., Issakidis-Bourguet, E. and Vanacker, H. (2012). New insights into the reduction systems of plastidial thioredoxins point out the unique properties of thioredoxin z from *Arabidopsis*. *J. Exp. Bot.* *63*, 6315-6323.
- 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.
- Bollhöner, B., Zhang, B., Stael, S., Denancé, N., Overmyer, K., Goffner, D., Van Breusegem, F. and Tuominen, H. (2013). *Post mortem* function of AtMC9 in xylem vessel elements. *New Phytologist* *200*, 498-510.

Bozhkov, P.V., Suarez, M.F., Filonova, L.H., Daniel, G., Zamyatnin, 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.

Bréhélin, C., Laloi, C., Setterdahl, A.T., Knaff, D.B. and Meyer, Y. (2004). Cytosolic, mitochondrial thioredoxins and thioredoxin reductases in *Arabidopsis thaliana*. *Photosynth. Res.* *79*, 295-304.

Brentnall, M., Rodriguez-Menocal, L., Ladron De Guevara, R., Cepero, E. and Boise, L.H. (2013). Caspase-9, caspase-3 and caspase-7 have distinct roles during intrinsic apoptosis. *BMC Cell Biol.* *14*, 1-9.

Bultynck, G., Kiviluoto, S., Henke, N., Ivanova, H., Schneider, L., Rybalchenko, V., Luyten, T., Nuyts, K., De Borggraeve, W., Bezprozvanny, I., Parys, J.B., De Smedt, H., Missiaen, L. and Methner, A. (2012). The C Terminus of Bax Inhibitor-1 Forms a Ca<sup>2+</sup>-permeable Channel Pore. *J. Biol. Chem.* *287*, 2544-2557.

Bultynck, G., Kiviluoto, S. and Methner, A. (2014). Bax Inhibitor-1 Is Likely a pH-Sensitive Calcium Leak Channel, Not a H<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> Exchanger. *Sci. Signal.* *7*, pe22.

Carmel-Harel, O., Stearman, R., Gasch, A.P., Botstein, D., Brown, P.O. and Storz, G. (2001). Role of thioredoxin reductase in the Yap1p-dependent response to oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* *39*, 595-605.

Carrara, G., Saraiva, N., Gubser, C., Johnson, B. F. and L. Smith, G. L. (2012). Six-transmembrane Topology for Golgi Anti-apoptotic Protein (GAAP) and Bax Inhibitor 1 (BI-1) Provides Model for the Transmembrane Bax Inhibitor-containing Motif (TMBIM) Family. *J. Biol. Chem.* *287*, 15896-15905.

Castillo, K., Rojas-Rivera, D., Lisbona, F., Caballero, B., Nassif, M., Court, F.A., Schuck, S., Ibar, C., Walter, P., Sierralta, J., Glavic, A. and Hetz, C. (2011). BAX inhibitor-1 regulates autophagy by controlling the IRE1 $\alpha$  branch of the unfolded protein response. *EMBO J.* *30*, 4465-4478.

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.

- Chai, J. and Shi, Y. (2014). Apoptosome and inflammasome: conserved machineries for caspase activation. *National Science Review* 1, 101-118.
- Chaîné M.-A. (2011). Étude de l'expression d'*AtBI-1* lors de la mort cellulaire programmée causée par les UV-C. Mémoire de maîtrise de l'Université de Sherbrooke.
- Cheng, F., Zhou, Y.-H., Xia, X.-J., Shi, K., Zhou, J. and Yu, J.-Q. (2014). Chloroplastic thioredoxin-*f* and thioredoxin-*m1/4* play important roles in brassinosteroids-induced changes in CO<sub>2</sub> assimilation and cellular redox homeostasis in tomato. *J. Exp. Bot.* 65, 4335-4347.
- Chibani, K., Tarrago, L., Schürmann, P., Jacquot, J.-P. and Rouhier, N. (2011). Biochemical properties of poplar thioredoxin z. *FEBS Lett.* 585, 1077-1081.
- Chow, B.Y. and Kay, S.A. (2013). Global approaches for telling time: Omics and the *Arabidopsis* circadian clock. *Seminars in Cell & Dev. Biol.* 24, 383-392.
- Coll, N.S., Smidler, A., Puigvert, M., Popa, C., Valls, M. and Dangl, J.L. (2014). The plant metacaspase AtMC1 in pathogen-triggered programmed cell death and aging: functional linkage with autophagy. *Cell Death Differ.* 21, 1399-1408.
- Coll, N.S., Vercammen, D., Smidler, A., Clover, C., Van Breusegem, F., Dangl, J.L. and Epple, P. (2010). *Arabidopsis* Type I Metacaspases Control Cell Death. *Science* 330, 1393-1387.
- Collin, V., Issakidis-Bourguet, E., Marchand, C., Hirasawa, M., Lancelin, J.-M., Knaff, D.B., and Miginiac-Maslow, M. (2003). The *Arabidopsis* plastidial thioredoxins. *J. Biol. Chem.* 278, 23747-23752.
- Collin, V., Lamkemeyer, P., Miginiac-Maslow, M., Hirasawa, M., Knaff, D.B., Dietz, K.-J. and Issakidis-Bourguet, E. (2004). Characterization of Plastidial Thioredoxins from *Arabidopsis* Belonging to the New  $\gamma$ -Type. *Plant Physiol.* 136, 4088-4095.
- Corpas, F.J., Barroso, J.B. and Del Río, L.A. (2001). Peroxisomes as a source of reactive oxygen species and nitric oxide signal molecules in plant cells. *Trends Plant Sci.* 6, 145-150.
- Cory, S. and Adams, J.M. (2002). The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat. Rev. Cancer* 2, 647-656.
- Couée, I., Sulmon, C., Gouesbet, G. and El Amrani, A. (2006). Involvement of soluble sugars in reactive oxygen species balance and responses to oxidative stress in plants. *J. Exp. Bot.* 57, 449-459.
- 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.

Courteille, A., Vesa, S., Sanz-Barrio, R., Cazalé, A.-C., Becuwe-Linka, N., Farran, I., Havaux, M., Rey, P. and Rumeau, D. (2013). Thioredoxin m4 Controls Photosynthetic Alternative Electron Pathways in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* *161*, 508-520.

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. *Photosynthesis Research* *79*, 233-248.

Dangoor, I., Peled-Zehavi, H., Levitan, A., Pasand, O. and Danon, A. (2009). A Small Family of Chloroplast Atypical Thioredoxins. *Plant Physiol.* *149*, 1240-1250.

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.

Dany, A.-L., Douki, T., Triantaphylides, C. and Cadet, J. (2001). Repair of the main UV-induced thymine dimeric lesions within *Arabidopsis thaliana* DNA: evidence for the major involvement of photoreactivation pathways. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* *65*, 127-135.

Dat, J., Vandenabeele, S., Vranová, E., Van Montagu, M., Inzé, D. and Van Breusegem, F. (2000). Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cell. Mol. Life Sci.* *57*, 779-795.

Day, A.M., Brown, J.D., Taylor, S.R., Rand, J.D., Morgan, B.A. and Veal, E.A. (2012). Inactivation of a Peroxiredoxin by Hydrogen Peroxide Is Critical for Thioredoxin-Mediated Repair of Oxidized Proteins and Cell Survival. *Mol. Cell* *45*, 398-408.

De Dios Barajas-López, J., Serrato, A.J., Cazalis, R., Meyer, Y., Chueca, A., Reichheld, J.-P. and Sahrawy, M. (2011). Circadian regulation of chloroplastic *f* and *m* thioredoxins through control of the CCA1 transcription factor. *J. Exp. Bot.* *62*, 2039-2051.

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*, 946-960.

De Dios Barajas-López, J., Tezycka, J., Travaglia, C.N., Serrato, A.J., Chueca, A., Thormählen, I., Geigenberger, P. and Sahrawy, M. (2012). Expression of the chloroplast

- thioredoxins *f* and *m* is linked to short-term changes in the sugar and thiol status in leaves of *Pisum sativum*. *J. Exp. Bot.* *63*, 4887-4900.
- Dean, R.T., Fu, S., Stocker, R. and Davies, M.J. (1997). Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Biochem. J.* *324*, 1-18.
- Del Río L.A., Sandalio, L.M., Corpas, F.J., Palma, J.M. and Barroso, J.B. (2006). Reactive Oxygen Species and Reactive Nitrogen Species in Peroxisomes. Production, Scavenging, and Role in Cell Signaling. *Plant Physiol.* *141*, 330-335.
- Del Val, G., Maurer, F., Stutz, E. and Schürmann, P. (1999). Modification of the reactivity of spinach chloroplast thioredoxin *f* by site-directed mutagenesis. *Plant Sci.* *149*, 183-190.
- Delatte, T., Trevisan, M., Parker, M. L. and Zeeman, S.C. (2005). Arabidopsis mutants *Atisa1* and *Atisa2* have identical phenotypes and lack the same multimeric isoamylase, which influences the branch point distribution of amylopectin during starch synthesis. *Plant J.* *41*, 815-830.
- 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.
- Ding, Z. and Friml, J. (2010). Auxin regulates distal stem cell differentiation in *Arabidopsis* roots. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *107*, 12046-12051.
- Ding, Z., Li, S., An, X., Liu, X., Qin, H. and Wang, D. (2009). Transgenic expression of MYB15 confers enhanced sensitivity to abscisic acid and improved drought tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *J. Genet. Gen.* *36*, 17-29.
- Djoumad, A. (2010). Crible de mutants de la mort cellulaire programmée chez *Arabidopsis thaliana*. Thèse de doctorat de l'Université de Sherbrooke.
- Domínguez, 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.
- Drobna, E., Gazdag, Z., Culakova, H., Dzugasova, V., Gbelska, Y., Pesti, M. and Subik, J. (2012). Overexpression of the YAP1, PDE2, and STB3 genes enhances the tolerance of yeast to oxidative stress induced by 7-chlorotetrazolo[5,1-c]benzo[1,2,4]triazine. *FEMS Yeast Res.* *12*, 958-968.
- Du, Y., Zhang, H., Zhang, X., Lu, J. and Holmgren, A. (2013). Thioredoxin 1 Is Inactivated Due to Oxidation Induced by Peroxiredoxin under Oxidative Stress and Reactivated by the Glutaredoxin System. *J. Biol. Chem.* *288*, 32241-32247.

- Duan, Y., Zhang, W., Li, B., Wang, Y., Li, K., Sodmergen, Han, C., Zhang, Y. and Li, X. (2010). An endoplasmic reticulum response pathway mediates programmed cell death of root tip induced by water stress in *Arabidopsis*. *New Phytol.* *186*, 681-695.
- Dubiella, U., Seybold, H., Durian, G., Komander, E., Lassig, R., Witte, C.-P., Schulze, W.X. and Romeis, T. (2013). Calcium-dependent protein kinase/NADPH oxidase activation circuit is required for rapid defense signal propagation. *PNAS* *110*, 8744-8749.
- Edwards, K., Johnstone, C. and Thompson, C. (1991). A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic Acids Research* *19*, 1349.
- Eichmann, R., Dechert, C., Kogel, K.-H. and Hüchelhoven, R. (2006). Transient over-expression of barley BAX Inhibitor-1 weakens oxidative defence and MLA12-mediated resistance to *Blumeria graminis* f.sp. *hordei*. *Mol. Plant Pathol.* *7*, 543-552.
- Engström, N. E., Holmgren, A., Larsson, A. and Söderhäll, S. (1974). Liver Thioredoxin Isolation and Characterization of Calf. *J. Biol. Chem.* *249*, 205-210.
- Fernandes, L., Rodrigues-Pousada, C. and Struhl, K. (1997). Yap, a novel family of eight bZIP proteins in *Saccharomyces cerevisiae* with distinct biological functions. *Mol. Cell. Biol.* *17*, 6982-6993.
- Fernández-Trijueque, J., Dios Barajas-López, J., Chueca, A., Cazalis, R., Sahrawy, M. and Serrato, A.J. (2012). Plastid thioredoxins *f* and *m* are related to the developing and salinity response of post-germinating seeds of *Pisum sativum*. *Plant Sci.* *188*, 82-88.
- Fink, S.L. and Cookson, B.T. (2005). Apoptosis, Pyroptosis, and Necrosis: Mechanistic Description of Dead and Dying Eukaryotic Cells. *Infect. Immun.* *73*, 1907-1916.
- Foyer, C.H., Leiandais, M. and Kunert, K.J. (1994). Photooxidative stress in plants. *Physiol. Plant.* *92*, 696-717.
- Fujibe, T., Saji, H., Arakawa, K., Yabe, N., Takeuchi, Y. and Yamamoto, K. T. (2004). A Methyl Viologen-Resistant Mutant of *Arabidopsis*, Which Is Allelic to Ozone-Sensitive *rcd1*, Is Tolerant to Supplemental Ultraviolet-B Irradiation. *Plant Physiol.* *134*, 275-285.
- 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.
- Fulton, D.C., Stettler, M., Mettler, T., Vaughan, C.K., Li, J., Francisco, P., Gil, M., Reinhold, H., Eicke, S., Messerli, G., Dorken, G., Halliday, K., Smith, A.M., Smith, S.M. and Zeeman, M.

- S.C. (2008).  $\beta$ -AMYLASE4, a Noncatalytic Protein Required for Starch Breakdown, Acts Upstream of Three Active  $\beta$ -Amylases in Arabidopsis Chloroplasts. *Plant Cell* 20, 1040-1058.
- 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.
- Gao, C., Xing, D., Li, L. and 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., Routhier, N., Jacquot, J.P. (2004a). The thioredoxin *h* system of higher plants. *Plant Physiol. Biochem.* 42, 265–271.
- Gelhaye, E., Rouhier, N., Gerard, J., Jolivet, Y., Gualberto, J., Navrot, N., Ohlsson, P.-I., Wingsle, G., Hirasawa, M., Knaff, D.B., Wang, H., Dizengremel, P., Meyer, Y. and Jacquot, J.-P. (2004b). A specific form of thioredoxin h occurs in plant mitochondria and regulates the alternative oxidase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101, 14545-14550.
- Gelhaye, E., Rouhier, N., Navrot, N. and Jacquot, J.P. (2005). The plant thioredoxin system. *Cell. Mol. Life Sci.* 62, 24-35.
- Ghanbarzadeh, B. and Almasi, H. (2013). Chapter 6: Biodegradable Polymers, Biodegradation - Life of Science, Dr. Rolando Chamy (Ed.), 141-185.
- Gibon, Y., Bläsing, O.E., Palacios-Rojas, N., Pankovic, D., Hendriks, J.H.M., Fisahn, J., Höhne, M., Günther, M. and Stitt, M. (2004). Adjustment of diurnal starch turnover to short days: depletion of sugar during the night leads to a temporary inhibition of carbohydrate utilization, accumulation of sugars and post-translational activation of ADP-glucose pyrophosphorylase in the following light period. *Plant J.* 39, 847-862.
- Glaring, M.A., Skryhan, K., Kötting, O., Zeeman, S.C. and Blennow, A. (2012). Comprehensive survey of redox sensitive starch metabolising enzymes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol. Biochem.* 58, 89-97.
- Godon, C., Lagniel, G., Lee, J., Buhler, J.-M., Kieffer, S., Perrot, M., Boucherie, H., Toledano, M.B. and Labarre, J. (1998). The H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Stimulon in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 273, 22480-22489.
- Gómez-Pastor, R., Garre, E., Pérez-Torrado, R. and Matallana, E. (2013). Trx2p-dependent Regulation of *Saccharomyces cerevisiae* Oxidative Stress Response by the Skn7p Transcription Factor under Respiring Conditions. *PLoS ONE* 8, e85404 : 1-13.

- Gómez-Pastor, R., Pérez-Torrado, R. and Matallana, E. (2012). Modification of the TRX2 gene dose in *Saccharomyces cerevisiae* affects hexokinase 2 gene regulation during wine yeast biomass production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* *94*, 773-787.
- Gontero, B. and Salvucci, M.E. (2014). Regulation of photosynthetic carbon metabolism in aquatic and terrestrial organisms by Rubisco activase, redox-modulation and CP12. *Aquatic Botany* *118*, 14-23.
- Graf, A., Schlereth, A., Stitt, M. and Smith, A.M. (2010). Circadian control of carbohydrate availability for growth in *Arabidopsis* plants at night. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *107*, 9458-9463.
- Greenberg, J.T. and Yao, N. (2004). The role and regulation of programmed cell death in plant-pathogen interactions. *Cell. Microbiol.* *6*, 201-211.
- Greetham, D., Kritsiligkou, P., Watkins, R.H., Carter, Z., Parkin, J. and Grant, C.M. (2013). Oxidation of the Yeast Mitochondrial Thioredoxin Promotes Cell Death. *Antioxidants & Redox Signaling* *18*, 376-385.
- Groover, A. and Jones, A.M. (1999). Tracheary Element Differentiation Uses a Novel Mechanism Coordinating Programmed Cell Death and Secondary Cell Wall Synthesis. *Plant Physiol.* *119*, 375-384.
- Haddad, R. and Japelaghi, H.R. (2014). Abiotic and oxidative stress-dependent regulation of expression of the thioredoxin h multigenic family in grape *Vitis vinifera*. *Biologia* *69*, 152-162.
- Hall, D.E., Baldesten, A., Holmgren, A. and Reichard, P. (1971). Yeast Thioredoxin, Amino-Acid Sequence around the Active-Center Disulfide of Thioredoxin I and II. *Eur. J. Biochem.* *23*, 328-335.
- Hameed, A., Malik, S.A., Iqbal, N., Arshad, R. and Farooq, S. (2004). A Rapid (100 min) Method for Isolating High Yield and Quality DNA from Leaves, Roots and Coleoptile of Wheat (*Triticum aestivum* L.) Suitable for Apoptotic and Other Molecular Studies. *Int. J. Agri. Biol.* *6*, 383-387.
- Han, S., Yu, B., Wang, Y. and Liu, Y. (2011). Role of plant autophagy in stress response. *Protein Cell* *2*, 784-791.
- Hanbauer, I. and Moskovitz, J. (2006). The yeast cytosolic thioredoxins are involved in the regulation of methionine sulfoxide reductase A. *Free Radical Biol. & Medicine* *40*, 1391-1396.
- Hancock, J.T., Desikan, R. and Neill, S.J. (2001). Role of reactive oxygen species in cell signalling pathways. *Biochem. Soc. Trans.* *29*, 345-350.



Hara, S., Motohashi, K., Arisaka, F., Romano, P.G.N., Hosoya-Matsuda, N., Kikuchi, N., Fusada, N., and Hisabori, T. (2006). Thioredoxin-*h1* Reduces and Reactivates the Oxidized Cytosolic Malate Dehydrogenase Dimer in Higher Plants. *J. Biol. Chem.* *281*, 32065-32071.

Haydon, M.J., Hearn, T.J., Bell, L.J., Hannah, M.A. and Webb, A.A.R. (2013). Metabolic regulation of circadian clocks. *Seminars in Cell & Dev. Biol.* *24*, 414- 421.

He, R., Drury, G.E., Rotari, V.I., Gordon, A., Willer, M., Farzaneh, T., Woltering, E.J. and Gallois, P. (2008). Metacaspase-8 Modulates Programmed Cell Death Induced by Ultraviolet Light and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in *Arabidopsis*. *J. Exp. Bot.* *59*, 491-499.

He, C., Wei, Y., Sun, K., Li, B., Dong, X., Zou, Z., Liu, Y., Kinch, L.Y., Khan, S., Sinha, S., Xavier, R.J., Grishin, N.V., Xiao, G., Eskelinen, E.-L., Scherer, P.E., Whistler, J.L. and Levine, B. (2013). Beclin 2 Functions in Autophagy, Degradation of G Protein-Coupled Receptors, and Metabolism. *Cell* *154*, 1085-1099.

Heazlewood, J.L., Durek, P., Hummel, J., Selbig, J., Weckwerth, W., Walther, D. and Schulze, W.X. (2008). *PhosPhAt*: a database of phosphorylation sites in *Arabidopsis thaliana* and a plant-specific phosphorylation site predictor. *Nucleic Acids Research* *36*, D1015-D1021.

Hernández, J.A., Olmos, E., Corpas, F.J., Sevilla, F. and Del Río, L.A. (1995). Salt-induced oxidative stress in chloroplasts of pea plants. *Plant Sci.* *105*, 151-167.

Herrmann, E.C. and Moore, E.C. (1973). Purification of thioredoxin from rat Novikoff ascites hepatoma. *J. Biol. Chem.* *248*, 1219-1223.

Hirota, K., Matsui, M., Iwata, S., Nishiyama, A., Mori, K. and Yodoi, J. (1997). AP-1 transcriptional activity is regulated by a direct association between thioredoxin and Ref-1. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *94*, 3633-3638.

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

Hoeberichts, F.A. and Woltering, E.J. (2002). Multiple mediators of plant programmed cell death: interplay of conserved cell death mechanisms and plant-specific regulators. *BioEssays* *25*, 47-57.

Hofius, D., Schultz-Larsen, T., Joensen, J., Tsitsigiannis, D.I., Petersen, N.H.T., Mattsson, O., Bolt Jørgensen, L., Jones, J.D.G., Mundy, J. and Petersen, M. (2009). Autophagic Components Contribute to Hypersensitive Cell Death in *Arabidopsis*. *Cell* *137*, 773-783.

Hofius, D., Tsitsigiannis, D.I., Jones, J.D.G. and Mundy, J. (2007). Inducible cell death in plant immunity. *Sem. Cancer Biol.* *17*, 166-187.

Holmgren, A. (1968). Thioredoxin. 6. The Amino Acid Sequence of the Protein from *Escherichia coli* B. *Eur. J. Biochem.* *6*, 475-484.

Holmgren, A. (1972). Tryptophan fluorescence study of conformational transitions of the oxidized and reduced form of thioredoxin. *J. Biol. Chem.* *247*, 1992-1998.

Holmgren, A. (1976). Hydrogen donor system for *Escherichia coli* ribonucleoside-diphosphate reductase dependent upon glutathione. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *73*, 2275-2279.

Holmgren, A. and Lu, J. (2010). Thioredoxin and thioredoxin reductase: Current research with special reference to human disease. *Biochemical and Biophysical Research Communications* *396*, 120-124.

Holmgren, A. and Luthman, M. (1978). Tissue distribution and subcellular localization of bovine thioredoxin determined by radioimmunoassay. *Biochemistry* *17*, 4071-4077.

Hotta, M., Tashiro, F., Ikegami, H., Niwa, H., Ogihara, T., Yodoi, J. and Miyazaki, J.-I. (1998). Pancreatic  $\beta$  cell-specific expression of thioredoxin, an antioxidative and antiapoptotic protein, prevents autoimmune and streptozotocin-induced diabetes. *J. Exp. Med.* *188*, 1445-1451.

Howard, T.P., Fryer, M.J., Singh, P., Metodiev, M., Lytovchenko, A., Obata, T., Fernie, A.R., Kruger, N.J., Quick, W.P., Lloyd, J.C. and Raines, C.A. (2011). Antisense Suppression of the Small Chloroplast Protein CP12 in Tobacco Alters Carbon Partitioning and Severely Restricts Growth. *Plant Physiol.* *157*, 620-631.

Howard, T.P., Metodiev, M., Lloyd, J.C. and Raines, C.A. (2008). Thioredoxin-mediated reversible dissociation of a stromal multiprotein complex in response to changes in light availability. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *105*, 4056-4061.

Hückelhoven, R. (2004). BAX Inhibitor-1, an ancient cell death suppressor in animals and plants with prokaryotic relatives. *Apoptosis* *9*, 299-307.

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.

Hutchison, R.S., Groom, Q. and Ort, D.R. (2000). Differential Effects of Chilling-Induced Photooxidation on the Redox Regulation of Photosynthetic Enzymes. *Biochemistry* *39*, 6679-6688.

Hwang, S.-K., Nishi, A., Sato, H. and Okita, T.W. (2010). Rice endosperm-specific plastidial  $\alpha$ -glucan phosphorylase is important for synthesis of short-chain malto-oligosaccharides. *Archives of Biochemistry and Biophysics* *495*, 82-92.

- 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.
- Imani, J., Baltruschat, H., Stein, E., Jia, G., Vogelsberg, J., Kogel, K.-H. and Hükelhoven, R. (2006). Expression of barley BAX Inhibitor-1 in carrots confers resistance to *Botrytis cinerea*. *Mol. Plant Pathol.* *7*, 279-284.
- Isbat, M., Zeba, N., Ryong Kim, S. and Bong Hong, C. (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.
- Ishida, H., Yoshimoto, K., Izumi, M., Reisen, D., Yano, Y., Makino, A., Ohsumi, Y., Hanson, M.R. and Mae T. (2008). Mobilization of Rubisco and Stroma-Localized Fluorescent Proteins of Chloroplasts to the Vacuole by an *ATG* Gene-Dependent Autophagic Process. *Plant Physiol.* *148*, 142-155.
- Ishikawa, T., Takahara, K., Hirabayashi, T., Matsumura, H., Fujisawa, S., Terauchi, R., Uchimiya, H. and Kawai-Yamada, M. (2009). Metabolome Analysis of Response to Oxidative Stress in Rice Suspension Cells Overexpressing Cell Death Suppressor Bax Inhibitor-1. *Plant Cell Physiol.* *51*, 9-20.
- Ishikawa, T., Watanabe, N., Nagano, M., Kawai-Yamada, M. and Lam, E. (2011). Bax inhibitor-1: a highly conserved endoplasmic reticulum-resident cell death suppressor. *Cell Death Differ.* *18*, 1271-1278.
- Ito, J. and Fukuda, H. (2002). ZEN1 Is a Key Enzyme in the Degradation of Nuclear DNA during Programmed Cell Death of Tracheary Elements. *Plant Cell* *14*, 3201-3211.
- Izawa, S., Maeda, K., Sugiyama, K., Mano, J., Inoue, Y. and Kimura, A. (1999). Thioredoxin Deficiency Causes the Constitutive Activation of Yap1, an AP-1-like Transcription Factor in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* *274*, 28459-28465.
- Jabs, T. (1999). Reactive Oxygen Intermediates as Mediators of Programmed Cell Death in Plants and Animals. *Biochemical Pharmacology* *57*, 231-245.
- Jiang, M. and Zhang, J. (2003). Cross-talk between calcium and reactive oxygen species originated from NADPH oxidase in abscisic acid-induced antioxidant defence in leaves of maize seedlings. *Plant Cell Env.* *26*, 929-939.
- Jiang, Y., Yang, B., Harris, N.S. and Deyholos, M.K. (2007). Comparative proteomic analysis of NaCl stress-responsive proteins in Arabidopsis roots. *J. Exp. Bot.* *58*, 3591-3607.

- John, C.F., Morris, K., Jordan, B.R., Thomas, B. and A-H-Mackerness, S. (2001). Ultraviolet-B exposure leads to up-regulation of senescence-associated genes in *Arabidopsis thaliana*. *J. Exp. Bot.* *52*, 1367-1373.
- Kadono, T., Tran, D., Errakhi, R., Hiramatsu, T., Meimoun, P., Briand, J., Iwaya-Inoue, M., Kawano, T. and Bouteau, F. (2010). Increased Anion Channel Activity Is an Unavoidable Event in Ozone-Induced Programmed Cell Death. *PLoS ONE* *5*, 1-14.
- Kaminaka, H., Näke, C., Epple, P., Dittgen, J., Schütze, K., Chaban, C., Holt, B.F.III, Merkle, T., Schäfer, E., Harter, K. and Dangl, J.L. (2006). bZIP10-LSD1 antagonism modulates basal defense and cell death in *Arabidopsis* following infection. *EMBO J.* *25*, 4400-4411.
- Katsuhara, M. and Shibasaka, M. (2000). Cell death and growth recovery of Barley after transient salt stress. *J. Plant Res.* *113*, 239-243.
- Kawai, 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 yeast1. *FEBS Lett.* *464*, 143-147.
- Kawai-Yamada, M., Hori, Z., Ogawa, T., Ihara-Ohori, Y., Tamura, K., Nagano, M., Ishikawa, T. and Uchimiya, H. (2009). Loss of Calmodulin Binding to Bax Inhibitor-1 Affects *Pseudomonas*-mediated Hypersensitive Response-associated Cell Death in *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* *284*, 27998-28003.
- 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.
- Kerr, J.F.R. (2002). History of the events leading to the formulation of the apoptosis concept. *Toxicology* *181-182*, 471-474.
- Kerr, J.F.R., Wyllie, A.H. and Currie, A.R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* *26*, 239-257.
- Keunen, E., Peshev, D., Vangronsveld, J., Van den Ende, W. and Cuypers, A. (2013). Plant sugars are crucial players in the oxidative challenge during abiotic stress: extending the traditional concept. *Plant, Cell Env.* *36*, 1242-1255.

- Khandelwal, A., Elvitigala, T., Ghosh, B. and Quatran, R.S. (2008). Arabidopsis Transcriptome Reveals Control Circuits Regulating Redox Homeostasis and the Role of an AP2 Transcription Factor. *Plant Physiol.* *148*, 2050-2058.
- Kim, H.-R., Lee, G.-H., Cho, E.Y., 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, 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 Ca<sup>2+</sup> Channel Activity in the Endoplasmic Reticulum. *J. Biol. Chem.* *283*, 15946-15955.
- Kim, S.J., Miyoshi, Y., Taguchi, T., Tamaki, Y., Nakamura, H., Yodoi, J., Kato, K. and Noguchi, S. (2005). High Thioredoxin Expression Is Associated with Resistance to Docetaxel in Primary Breast Cancer. *Clin. Cancer Res.* *11*, 8425-8430.
- Kim, S.-M., Bae, C., Oh, S.-K. and Choi, D. (2013). A pepper (*Capsicum annuum* L.) metacaspase 9 (*Camc9*) plays a role in pathogen-induced cell death in plants. *Mol. Plant Pathol.* *14*, 557-566.
- Kiviluoto, S., Schneider, L., Luyten, T., Vervliet, T., Missiaen, L., De Smedt, H., Parys, J.B., Methner, A. and Bultynck, G. (2012). Bax Inhibitor-1 is a novel IP<sub>3</sub> receptor-interacting and -sensitizing protein. *Cell Death Dis.* *3*, e367.
- Kobayashi, M., Ohura, I., Kawakita, K., Yokota, N., Fujiwara, M., Shimamoto, K., Doke, N. and Yoshioka, H. (2007). Calcium-Dependent Protein Kinases Regulate the Production of Reactive Oxygen Species by Potato NADPH Oxidase. *Plant Cell* *19*, 1065-1080.
- Koc, A., Mathews, C.K., Wheeler, L.J., Gross, M.K. and Merrill, G.F. (2006). Thioredoxin Is Required for Deoxyribonucleotide Pool Maintenance during S Phase. *J. Biol. Chem.* *281*, 15058-15063.
- Kolbe, A., Tiessen, A., Schlupe, H., Paul, M., Ulrich, S. and Geigenberger, P. (2005). Trehalose 6-phosphate regulates starch synthesis via posttranslational redox activation of ADP-glucose pyrophosphorylase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *102*, 11118-11123.
- Kötting, O., Kossmann, J., Zeeman, S.C. and Lloyd, J.R. (2010). Regulation of starch metabolism: the age of enlightenment? *Curr. Opin. Plant Biol.* *13*, 321-329.
- Kuge, S., Arita, M., Murayama, A., Maeta, K., Izawa, S., Inoue, Y. and Nomoto, A. (2001). Regulation of the yeast Yap1p nuclear export signal is mediated by redox signal-induced reversible disulfide bond formation. *Mol. Cell. Biol.* *21*, 6139-6150.

- Kuge, S. and Jones, N. (1994). YAP1 dependent activation of *TRX2* is essential for the response of *Saccharomyces cerevisiae* to oxidative stress by hydroperoxides. *EMBO J.* *13*, 655-664.
- Kusano, T., Tateda, C., Berberich, T. and Takahashi, Y. (2009). Voltage-dependent anion channels: their roles in plant defense and cell death. *Plant Cell Rep.* *28*, 1301-1308.
- Kuzuoglu-Ozturk, D., Yalcinkaya, O.C., Akpınar, B.A., Mitou, G., Korkmaz, G., Gozuacik, D. and Budak, H. (2012). Autophagy-related gene, *TdAtg8*, in wild emmer wheat plays a role in drought and osmotic stress response. *Planta* *236*, 1081-1092.
- Kwon, S.I. and Hwang, D.J. (2013). Expression Analysis of the Metacaspase Gene Family in *Arabidopsis*. *J. Plant Biol.* *56*, 391-398.
- Kwon, S.I., Cho, H.J., Jung, J.H., Yoshimoto, K., Shirasu, K. and Park, O.K. (2010). The Rab GTPase RabG3b functions in autophagy and contributes to tracheary element differentiation in *Arabidopsis*. *Plant J.* *64*, 151-164.
- 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. *PNAS* *98*, 14144-14149.
- Lam, E., Kato, N. and Lawton, M. (2001). Programmed cell death, mitochondria and the plant hypersensitive response. *Nature* *411*, 848-853.
- Larson, G. and Larsson, A. (1972). Purification and properties of rat-liver thioredoxin. *Eur. J. Biochem.* *26*, 119-124.
- Laugier, E., Tarrago, L., Courteille, A., Innocenti, G., Eymery, F., Rumeau, D., Issakidis-Bourguet, E. and Rey, P. (2013). Involvement of thioredoxin y2 in the preservation of leaf methionine sulfoxide reductase capacity and growth under high light. *Plant Cell Env.* *36*, 670-682.
- Laurent, T.C., Moore, E.C. and Reichard, P. (1964). Enzymatic synthesis of deoxyribonucleotides. Isolation and characterization of thioredoxin, the hydrogen donor from *Escherichia coli*. *B, J. Biol. Chem.* *239*, 3436-3444.
- Lee, B.C., Dikiy, A., Kim, H.-Y. and Gladyshev, V.N. (2009). Functions and evolution of selenoprotein methionine sulfoxide reductases. *Biochimica et Biophysica Acta* *1790*, 1471-1477.

Lee, G.-H., Ahn, T., Kim, D.-S., Park, S.J., Lee, Y.C., Yoo, W.H., Jung, S.J., Yang, J.-S., Kim, S., Muhrad, A., Seo, Y.-R., Chae, S.-W., Kim, H.-R. and Chae, H.-J. (2010). Bax Inhibitor 1 Increases Cell Adhesion through Actin Polymerization: Involvement of Calcium and Actin Binding. *Mol. Cell. Biol.* *30*, 1800-1813.

Lee, G.-H., Lee, H.-Y., Li, B., Kim, H.-R. and Chae, H.-J. (2014). Bax Inhibitor-1-Mediated Inhibition of Mitochondrial Ca<sup>2+</sup> Intake Regulates Mitochondrial Permeability Transition Pore Opening and Cell Death. *Scientific Reports* *4*, 5194.

Leshem, Y., Melamed-Book, N., Cagnac, O., Ronen, G., Nishri, Y., Solomon, M., Cohen, G. and Levine, A. (2006). Suppression of *Arabidopsis* vesicle-SNARE expression inhibited fusion of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-containing vesicles with tonoplast and increased salt tolerance. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *103*, 18008-18013.

Lew, D.J., Dulić, V. and Reed, S.I. (1991). Isolation of three novel human cyclins by rescue of G1 cyclin (Cln) function in yeast. *Cell* *66*, 1197-1206.

Li, F., Chung, T. and Vierstra, R.D. (2014). AUTOPHAGY-RELATED11 Plays a Critical Role in General Autophagy- and Senescence-Induced Mitophagy in *Arabidopsis*. *Plant Cell* *26*, 788-807.

Li, J., Almagro, G., Muñoz, F.J., Baroja-Fernández, E., Bahaji, A., Montero, M., Hidalgo, M., Sánchez-López, A.M., Ezquer, I., Sesma, M.T. and Pozueta-Romero, J. (2012). Post-Translational Redox Modification of ADP-Glucose Pyrophosphorylase in Response to Light is Not a Major Determinant of Fine Regulation of Transitory Starch Accumulation in *Arabidopsis* Leaves. *Plant Cell Physiol.* *53*, 433-444.

Li, L., Ilarslan, H., James, M.G, Myers, A.M. and Wurtele, E.S. (2007). Genome wide co-expression among the starch debranching enzyme genes *AtISA1*, *AtISA2* and *AtISA3* in *Arabidopsis thaliana*. *J. Exp. Bot.* *58*, 3323–3342.

Li, W. and Dickman, M.B. (2004). Abiotic stress induces apoptotic-like features in tobacco that is inhibited by expression of human Bcl-2. *Biotechnology Lett.* *26*, 87-95.

Li, Y.-C., Rena, J.-P., Cho, M.-J., Zhou, S.-M., Kim, Y.-B., Guo, H.-X., Wong, J.H., Niu, H.-B., Kim, H.-K., Morigasaki, S., Lemaux, P.G., Frick, O.L., Yin, J. and Buchanan, B.B. (2009). The Level of Expression of Thioredoxin is Linked to Fundamental Properties and Applications of Wheat Seeds. *Mol. Plant* *2*, 430-441.

Lichtenthaler, H.K. (1987). [34] Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. In *Methods in Enzymology. Plant Cell Membranes* *148*, 350-382.

Lim, S., Ashida, H., Watanabe, R., Inai, K., Kim, Y.-S., Mukougawa, K., Fukuda, H., Tomizawa, K.-I., Ushiyama, K.-I., Asao, H., Tamoi, M., Masutani, H., Shigeoka, S., Yodoi, J.

and Yokota, A. (2011). Production of biologically active human thioredoxin 1 protein in lettuce chloroplasts. *Plant Mol. Biol.* *76*, 335-344.

Lin, J., Wang, Y. and Wang, G. (2006). Salt stress-induced programmed cell death in tobacco protoplasts is mediated by reactive oxygen species and mitochondrial permeability transition pore status. *J. Plant Physiol.* *163*, 731-739.

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 Hetz, C. (2009). BAX Inhibitor-1 Is a Negative Regulator of the ER Stress Sensor IRE1 $\alpha$ . *Mol. Cell* *33*, 679-691.

Liu, Y. and Bassham, D.C. (2012). Autophagy: Pathways for Self-Eating in Plant Cells. *Annu. Rev. Plant Biol.* *63*, 215-237.

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., Xiong, Y. and Bassham D.C. (2009). Autophagy is required for tolerance of drought and salt stress in plants. *Autophagy* *5*, 954-963.

Lorang, J., Kidarsa, T., Bradford, C.S., Gilbert, B., Curtis, M., Tzeng, S.-C., Maier, C. S. and Wolpert, T.J. (2012). Tricking the Guard: Exploiting Plant Defense for Disease Susceptibility. *Science* *338*, 659-662.

Lorang, J.F., Sweat, T.A. and Wolpert, T.J. (2007). Plant disease susceptibility conferred by a “resistance” gene. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *104*, 14861-14866.

Luo, T., Fan, T., Liu, Y., Rothbart, M., Yu, J., Zhou, S., Grimm, B. and Luo, M. (2012). Thioredoxin Redox Regulates ATPase Activity of Magnesium Chelatase CHL1 Subunit and Modulates Redox-Mediated Signaling in Tetrapyrrole Biosynthesis and Homeostasis of Reactive Oxygen Species in Pea Plants. *Plant Physiol.* *159*, 118-130.

Luthman, M. and Holmgren, A. (1982). Rat liver thioredoxin and thioredoxin reductase: Purification and characterization. *Biochemistry* *21*, 6628-6633.

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<sub>L</sub> and a BH3-like domain in Beclin-1. *EMBO J.* *26*, 2527-2539.

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-x<sub>L</sub>. *FEBS Lett.* *415*, 29-32.



- Marchand, C.H., Vanacker, H., Collin, V., Issakidis-Bourguet, E., Le Marechal, P. and Decottignies, P. (2010). Thioredoxin targets in Arabidopsis roots. *Proteomics* *10*, 2418-2428.
- Marri, L., Zaffagnini, M., Collin, V., Issakidis-Bourguet, E., Lemaire, S.D., Pupillo, P., Sparla, F., Miginiac-Maslow, M. and Trost, P. (2009). Prompt and Easy Activation by Specific Thioredoxins of Calvin Cycle Enzymes of *Arabidopsis thaliana* Associated in the GAPDH/CP12/PRK Supramolecular Complex. *Mol. Plant* *2*, 259-269.
- Martí, M.C., Olmos, E., Calvete, J.J., Díaz, I., Barranco-Medina, S., Whelan, J., Làzaro, J.J., Sevilla, F. and Jiménez, A. (2009). Mitochondrial and Nuclear Localization of a Novel Pea Thioredoxin: Identification of Its Mitochondrial Target Proteins. *Plant Physiol.* *150*, 646-657.
- Martin, J.L. (1995). Thioredoxin - a fold for all reasons. *Structure* *3*, 245-250.
- Matsumura, H., Nirasawa, S., Kiba, A., Urasaki, N., Saito, 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.
- Matthews, J.R., Wakasugi, N., Virelizier, J.-L., Yodoi, J. and Hay, R.T. (1992). Thioredoxin regulates the DNA binding activity of NF- $\kappa$ B by reduction of a disulphide bond involving cysteine 62. *Nucleic Acids Research* *20*, 3821-3830.
- Meng, L., Wong, J.H., Feldman, L.J., Lemaux, P.G. and Buchanan, B.B. (2009). A membrane-associated thioredoxin required for plant growth moves from cell to cell, suggestive of a role in intercellular communication. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *107*, 3900-3905.
- Meyer, Y., Verdoucq, L. and Vignols, F. (1999). Plant thioredoxins and glutaredoxins: identity and putative roles. *Trends Plant Sci.* *4*, 388-394..
- Meyer, Y., Vignols, F. and Reichheld, J. P. (2002). Classification of Plant Thioredoxins by Sequence Similarity and Intron Position. *Methods Enzymol.* *347*, 394-402.
- Michalska, J., Zauber, H., Buchanan, B.B., Cejudo, F.J. and Geigenberger, P. (2009). NTRC links built-in thioredoxin to light and sucrose in regulating starch synthesis in chloroplasts and amyloplasts. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *106*, 9908-9913.
- Mikkelsen, R., Mutenda, K.E., Mant, A., Schürmann, P. and Blennow, A. (2005).  $\alpha$ -Glucan, water dikinase (GWD): A plastidic enzyme with redox-regulated and coordinated catalytic activity and binding affinity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *102*, 1785-1790.
- Minina, E.A., Filonova, L.H., Fukada, K., Savenkov, E.I., Gogvadze, V., Clapham, D., Sanchez-Vera, V., Suarez, M.F., Zhivotovsky, B., Daniel, G., Smertenko, A. and Peter, V. Bozhkov (2013). Autophagy and metacaspase determine the mode of cell death in plants. *J. Cell Biol.* *203*, 917-927.

- Mittler, R., Vanderauwera, S., Gollery, M. and Van Breusegem, F. (2004). Reactive oxygen gene network of plants. *Trends Plant Sci.* *9*, 490-498.
- Mizushima, N. et Komatsu, M. (2011). Autophagy: Renovation of Cells and Tissues. *Cell* *147*, 728-741.
- Mizushima, N., Yoshimori, T. and Ohsumi, Y. (2011). The Role of Atg Proteins in Autophagosome Formation. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *27*, 107-132.
- Moharikar, S., D'Souza, J.S. and Rao, B.J. (2007). A homologue of the defender against the apoptotic death gene (*dad1*) in UV-exposed *Chlamydomonas* cells is downregulated with the onset of programmed cell death. *J. Biosci.* *32*, 261-270.
- Monroe, J.D., Storm, A.R., Badley, E.M., Lehman, M.D., Platt, S.M., Saunders, L.K., Schmitz, J.M. and Torres, C.E. (2014).  $\beta$ -Amylase1 and  $\beta$ -Amylase3 Are Plastidic Starch Hydrolases in Arabidopsis That Seem to Be Adapted for Different Thermal, pH, and Stress Conditions. *Plant Physiol.* *166*, 1748-1763.
- Montrichard, F., Renard, M., Alkhalfioui, F., Duval, F.D. and Macherel, D. (2003). Identification and Differential Expression of Two Thioredoxin h Isoforms in Germinating Seeds from Pea. *Plant Physiol.* *132*, 1707-1715.
- Moran, J.F., Becana, M., Iturbe-Ormaetxe, I., Frechilla, S., Klucas, R.V. and Aparicio-Tejo, P. (1994). Drought induces oxidative stress in pea plants. *Planta* *194*, 346-352.
- Mori, I.C. and Schroeder, J.I. (2004). Reactive Oxygen Species Activation of Plant  $Ca^{2+}$  Channels. A Signaling Mechanism in Polar Growth, Hormone Transduction, Stress Signaling, and Hypothetically Mechanotransduction. *Plant Physiol.* *135*, 702-708.
- Mulford, K.E. and Fassler, J.S. (2011). Association of the Skn7 and Yap1 Transcription Factors in the *Saccharomyces cerevisiae* Oxidative Stress Response. *Eukaryot Cell* *10*, 761-769.
- Muller, E.G.D. (1995). A redox-dependent function of thioredoxin is necessary to sustain a rapid rate of DNA synthesis in yeast. *Arch. Biochem. Biophys.* *318*, 356-361.
- Murashige, T. and Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant* *15*, 473-497.
- 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.

- Navabpour, S., Morris, K., Allen, R., Harrison, E., A-H-Mackerness, S. and Buchanan-Wollaston, V. (2003). Expression of senescence-enhanced genes in response to oxidative stress. *J. Exp. Bot.* *54*, 2285-2292.
- Née, G., Aumont-Nicaise, M., Zaffagnini, M., Nessler, S., Valerio-Lepiniec, M. and Issakidis-Bourguet, E. (2014). Redox regulation of chloroplastic G6PDH activity by thioredoxin occurs through structural changes modifying substrate accessibility and cofactor binding. *Biochem. J.*, *457*, 117-125.
- Née, G., Zaffagnini, M., Trost, P. and Issakidis-Bourguet, E. (2009). Redox regulation of chloroplastic glucose-6-phosphate dehydrogenase: A new role for f-type thioredoxin. *FEBS Lett.* *583*, 2827-2832.
- Nikkanen, L. and Rintamäki, E. (2014). Thioredoxin-dependent regulatory networks in chloroplasts under fluctuating light conditions. *Phil. Trans. R. Soc. B* *369*, 1-7.
- O'Hara, A. and Jenkins, G.I. (2012). In Vivo Function of Tryptophans in the *Arabidopsis* UV-B Photoreceptor UVR8. *Plant Cell* *24*, 3755-3766.
- O'Kane, D., Gill, V., Boyd, P. and Burdon, R. (1996). Chilling, oxidative stress and antioxidant responses in *Arabidopsis thaliana* callus. *Planta* *198*, 371-377.
- Oberstein, A., Jeffrey, P.D. and Shi, Y. (2007). Crystal Structure of the Bcl-X<sub>L</sub>-Beclin 1 Peptide Complex: BECLIN 1 IS A NOVEL BH3-ONLY PROTEIN. *J. Biol. Chem.* *282*, 13123-13132.
- Okazaki, S., Tachibana, T., Naganuma, A., Mano, N. and Kuge, S. (2007). Multistep Disulfide Bond Formation in Yap1 Is Required for Sensing and Transduction of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Stress Signal. *Mol. Cell* *27*, 675-688.
- Okita, T.W., Nakata, P.A., Anderson, J.M., Sowokinos, J., Morell, M. and Preiss, J. (1990). The Subunit Structure of Potato Tuber ADPglucose Pyrophosphorylase. *Plant Physiol.* *93*, 785-790.
- Oltval, 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.
- Oral, O., Oz-Arslan, D., Itah, Z., Naghavi, A., Deveci, R., Karacali, S. and Gozuacik, D. (2012). Cleavage of Atg3 protein by caspase-8 regulates autophagy during receptor-activated cell death. *Apoptosis* *17*, 810-820.
- Parent, C., Capelli, N. and Dat, J. (2008). Reactive oxygen species, stress and cell death in plants. *C. R. Biol.* *331*, 255-261.

Park, S.K., Jung, Y.J., Lee, J.R., Lee, Y.M., Jang, H.H., Lee, S.S., Park, J.H., Kim, S.Y., Moon, J.C., Lee, S.Y., Chae, H.B., Shin, M.R., Jung, J.H., Kim, M.G., Kim, W.Y., Yun, D.-J., Lee, K.O. and Lee, S.L. (2009). Heat-Shock and Redox-Dependent Functional Switching of an h-Type Arabidopsis Thioredoxin from a Disulfide Reductase to a Molecular Chaperone. *Plant Physiol.* *150*, 552-561.

Pattingre, S., Tassa, A., Qu, X., Garuti, R., Liang, X.H., Mizushima, N., Packer, M., Schneider, M.D. and Levine, B. (2005). Bcl-2 Antiapoptotic Proteins Inhibit Beclin 1-Dependent Autophagy. *Cell* *122*, 927-939.

Pedrajas, J.R., Kosmidou, E., Miranda-Vizuete, A., Gustafsson, J.-A., Wright, A.P.H. and Spyrou, G. (1999). Identification and Functional Characterization of a Novel Mitochondrial Thioredoxin System in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* *274*, 6366-6373.

Pei, D., Zhang, W., Sun, H., Wei, X., Yue, J. and Wang, H. (2014). Identification of autophagy-related genes *ATG4* and *ATG8* from wheat (*Triticum aestivum* L.) and profiling of their expression patterns responding to biotic and abiotic stresses. *Plant Cell Rep.* *33*, 1697-1710.

Pennell, R. and Lamb, C. (1997). Programmed Cell Death in Plants. *Plant Cell* *9*, 1157-1168.

Pérez-Pérez, M.E., Martín-Figueroa, E. and Florencio, F.J. (2009). Photosynthetic Regulation of the Cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 Thioredoxin System and Functional Analysis of TrxB (Trx x) and TrxQ (Trx y) Thioredoxins. *Mol. Plant* *2*, 270-283.

Pérez-Ruiz, J.M., Spínola, M.C., Kirchsteiger, K., Moreno, J., Sahrawy, 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.

Pérez-Torrado, R., Gómez-Pastor, R., Larsson, C. and Matallana, E. (2009). Fermentative capacity of dry active wine yeast requires a specific oxidative stress response during industrial biomass growth. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* *81*, 951-960.

Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* *29*, e45.

Philchenkov, A. (2004). Caspases: potential targets for regulating cell death. *J. Cell. Mol. Med.* *8*, 432-444.

Porqué, P. G., Baldesten, A. and Reichard, P. (1970a). Oxidation-reduction and bioenergetics: Purification of a Thioredoxin System from Yeast. *J. Biol. Chem.* *245*, 2363-2370.

Porqué, P.G., Baldesten, A. and Reichard, P. (1970b). Oxidation-reduction and bioenergetics: The involvement of the thioredoxin system in the reduction of methionine sulfoxide and sulfate. *J. Biol. Chem.* *245*, 2371-2374.

Posé, D., Castanedo, I., Borsani, O., Nieto, B., Rosado, A., Taconnat, L., Ferrer, A., Dolan, L., Valpuesta, V. and Botella, M.A. (2009). Identification of the *Arabidopsis* *dry2/sqe1-5* mutant reveals a central role for sterols in drought tolerance and regulation of reactive oxygen species. *Plant J.* *59*, 63-76.

Pulido, P., Spínola, M.C., Kirchsteiger, K., Guinea, M., Pascual, M.B., Sahrawy, M., Sandalio, L.M., Dietz, K.-J., González, M. and Cejudo, F.J. (2010). Functional analysis of the pathways for 2-Cys peroxiredoxin reduction in *Arabidopsis thaliana* chloroplasts. *J. Exp. Bot.* *61*, 4043-4054.

Pyl, E.-T., Piques, M., Ivakov, A., Schulze, W., Ishihara, H., Stitt, M. and Sulpice, R. (2012). Metabolism and growth in *Arabidopsis* depend on the daytime temperature but are temperature-compensated against cool nights. *Plant Cell.* *24*, 2443-2469.

Quirino, B.F., Noh, Y.-S., Himmelblau, E. and Amasino, R.M. (2000). Molecular aspects of leaf senescence. *Trends Plant Sci.* *5*, 278-282.

Rao, M.V., Paliyath, G. and Ormrod, D.P. (1996). Ultraviolet-B- and ozone-induced biochemical changes in antioxidant enzymes of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* *110*, 125-136.

Ravi, D., Muniyappa, H. and Das, K.C. (2005). Endogenous Thioredoxin Is Required for Redox Cycling of Anthracyclines and p53-dependent Apoptosis in Cancer Cells. *J. Biol. Chem.* *280*, 40084-40096.

Reichheld, J.-P., Mestres-Ortega, D., Laloi, C. and Meyer, Y. (2002). The multigenic family of thioredoxin *h* in *Arabidopsis thaliana*: specific expression and stress response. *Plant Physiol. Biochem.* *40*, 685-690.

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.

Rey, P., Sanz-Barrio, R., Innocenti, G., Ksas, B., Courteille, A., Rumeau, D., Issakidis-Bourguet, E. and Farran, I. (2013). Overexpression of plastidial thioredoxins *f* and *m* differentially alters photosynthetic activity and response to oxidative stress in tobacco plants. *Front. Plant Sci.* *4*, 390 (1-13).

Riedl, S.J. and Shi, Y. (2004). Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *5*, 897-907.

Rivas, S., Rougon-Cardoso, A., Smoker, M., Schauser, L., Yoshioka, H. and Jones, J.D.G. (2004). CITRX thioredoxin interacts with the tomato Cf-9 resistance protein and negatively regulates defence. *EMBO J.* *23*, 2156-2165.

Rizzini, L., Favory, J.-J., Cloix, C., Faggionato, D., O'Hara, A., Kaiserli, E., Baumeister, R., Schäfer, E., Nagy, F., Jenkins, G.I. and Ulm, R. (2011). Perception of UV-B by the *Arabidopsis* UVR8 Protein. *Science* *332*, 103-106.

Rojas-Rivera, D., Armisen, R., Colombo, A., Martínez, G., Eguiguren, A.L., Díaz, A., Kiviluoto, S., Rodríguez, D., Patron, M., Rizzuto, R., Bultynck, G., Concha, M.L., Sierralta, J., Stutzin, A. and Hetz, C. (2012). TMBIM3/GRINA is a novel unfolded protein response (UPR) target gene that controls apoptosis through the modulation of ER calcium homeostasis. *Cell Death Differ.* *19*, 1013-1026.

Rolland, F., Moore, B. and Sheen, J. (2002). Sugar Sensing and Signaling in Plants. *Plant Cell Suppl.* *14*, S185-S205.

Ruan Y.-L. (2014). Sucrose Metabolism: Gateway to Diverse Carbon Use and Sugar Signaling. *Annu. Rev. Plant Biol.* *65*, 33-67.

Ruiz-Vela, A., Opferman, J.T., Cheng, E.H.-Y. and Korsmeyer, S.J. (2005). Proapoptotic BAX and BAK control multiple initiator caspases. *EMBO Rep.* *6*, 379-385.

Russell, J.W., Golovoy, D., Vincent, A.M., Mahendru, P., Olzmann, J.A., Mentzer, A. and Feldman E.L. (2002). High glucose-induced oxidative stress and mitochondrial dysfunction in neurons. *FASEB J.* *16*, 1738-1748.

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.

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.

Sano, R., Claire Hou, Y.-C., Hedvat, M., Correa, R.G., Shu, C.-W., Krajewska, M., Diaz, P.W., Tample, C.M., Quarato, G., Gottlieb, R.A., Yamaguchi, M., Nizet, V., Dahl, R., Thomas, D.D., Tait, S.W., Green, D.R., Fisher, P.B., Matsuzawa, S.-I. and Reed, J.C. (2012). Endoplasmic reticulum protein BI-1 regulates Ca<sup>2+</sup>-mediated bioenergetics to promote autophagy. *Genes Dev.* *26*, 1041-1054.

Sanz-Barrio, R., Corral-Martinez, P., Ancin, M., Segui-Simarro, J.M. and Farran, I. (2013). Overexpression of plastidial thioredoxin f leads to enhanced starch accumulation in tobacco leaves. *Plant Biotech. J.* *11*, 618-627.

- Sarkar, N., Lemaire, S., Wu-Scharf, D., Issakidis-Bourguet, E. and Cerutti, H. (2005). Functional Specialization of *Chlamydomonas reinhardtii* Cytosolic Thioredoxin h1 in the Response to Alkylation-Induced DNA Damage. *Eukaryotic Cell* 4, 262-273.
- Schröter, Y., Steiner, S., Matthäi, K. and Pfannschmidt, T. (2010). Analysis of oligomeric protein complexes in the chloroplast sub-proteome of nucleic acid-binding proteins from mustard reveals potential redox regulators of plastid gene expression. *Proteomics* 10, 2191-2204.
- Scialdone, A., Mugford, S.T., Feike, D., Skeffington, A., Borrill, P., Graf, A., Smith, A.M. and Howard, M. (2013). Arabidopsis plants perform arithmetic division to prevent starvation at night. *eLife* 2, e00669 : 1-24.
- Serrato, A.J., Pérez-Ruiz, J.M., Spínola, 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.
- Seung, D., Thalmann, M., Sparla, F., Hachem, M.A., Lee, S.K., Issakidis-Bourguet, E., Svensson, B., Zeeman, S.C. and Santelia, D. (2013). *Arabidopsis thaliana* AMY3 Is a Unique Redox-regulated Chloroplastic  $\alpha$ -Amylase. *J. Biol. Chem.* 288, 33620-33633.
- Shalata, A. and Tal, M. (1998). The effect of salt stress on lipid peroxidation and antioxidants in the leaf of the cultivated tomato and its wild salt-tolerant relative *Lycopersicon pennellii*. *Physiol. Plant.* 104, 169-174.
- Sharabi-Schwager, M., Lers, A., Samach, A., Guy, C.L. and Porat, R. (2010). Overexpression of the CBF2 transcriptional activator in Arabidopsis delays leaf senescence and extends plant longevity. *J. Exp. Bot.* 61, 261-273.
- Silver, D.M., Silva, L.P., Issakidis-Bourguet, E., Glaring, M.A., Schriemer, D.C. and Moorhead, G.B.G. (2013). Insight into the redox regulation of the phosphoglucan phosphatase SEX4 involved in starch degradation. *FEBS J.* 280, 538-548.
- Sini, P., James, D., Chresta, C. and Guichard, S. (2010). Simultaneous inhibition of mTORC1 and mTORC2 by mTOR kinase inhibitor AZD8055 induces autophagy and cell death in cancer cells. *Autophagy* 6, 553-554.
- Sjöberg, B.-M. and Holmgren, A. (1972). Studies on the Structure of T4 Thioredoxin\_II. Amino acid sequence of the protein and comparison with thioredoxin from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 247, 8063-8068.
- Slavikova, S., Ufaz, S., Avin-Wittenberg, T., Levanony, H. and Galili, G. (2008). An autophagy-associated Atg8 protein is involved in the responses of *Arabidopsis* seedlings to hormonal controls and abiotic stresses. *J. Exp. Bot.* 59, 4029-4043.

Smirnoff, N. (1993). The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and desiccation. *New Phytol.* *125*, 27-58.

Smith, A.M. and Stitt, M. (2007). Coordination of carbon supply and plant growth. *Plant Cell Env.* *30*, 1126-1149.

Sokolov, L.N., Dominguez-Solis, J.R., Allary A.-L., Buchanan, B.B. and Luan, S. (2006). A redox-regulated chloroplast protein phosphatase binds to starch diurnally and functions in its accumulation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *103*, 9732-9737.

Song, Z., Saghafi, N., Gokhale, V., Brabant, M. and Meuillet, E.J. (2007). Regulation of the activity of the tumor suppressor PTEN by thioredoxin in *Drosophila melanogaster*. *Exp. Cell Research* *313*, 1161-1171.

Sou, Y.-S., Waguri, S., Iwata, J.-I., Ueno, T., Fujimura, T., Hara, T., Sawada, N., Yamada, A., Mizushima, N., Uchiyama, Y., Kominami, E., Tanaka, K. and Komatsu, M. (2008). The Atg8 Conjugation System Is Indispensable for Proper Development of Autophagic Isolation Membranes in Mice. *Mol. Biol. Cell* *19*, 4762-4775.

Sparla, F., Costa, A., Lo Schiavo, F., Pupillo, P. and Trost, P. (2006). Redox Regulation of a Novel Plastid-Targeted  $\alpha$ -Amylase of Arabidopsis. *Plant Physiol.* *141*, 840-850.

Sreenivasulu, N., Grimm, B., Wobus, U. and Weschke, W. (2000). Differential response of antioxidant compounds to salinity stress in salt-tolerant and salt-sensitive seedlings of foxtail millet (*Setaria italica*). *Physiol. Plant.* *109*, 435-442.

Stein, J.C. and Hansen, G. (1999). Mannose Induces an Endonuclease Responsible for DNA Laddering in Plant Cells. *Plant Physiol.* *121*, 71-79.

Subramani, S. and Malhotra, V. (2013). Non-autophagic roles of autophagy-related proteins. *EMBO reports*, *14*, 143-151.

Sulpice, R., Flis, A., Ivakov, A.A., Apelt, F., Krohn, N., Encke, B., Abel, C., Feil, R., Lunn, J.E. and Mark Stitt, M. (2014). *Arabidopsis* Coordinates the Diurnal Regulation of Carbon Allocation and Growth across a Wide Range of Photoperiods. *Mol. Plant* *7*, 137-155.

Sumida, Y., Nakashima, T., Yoh, T., Nakajima, Y., Ishikawa, H., Mitsuyoshi, H., Sakamoto, Y., Okanoue, T., Kashima, K., Nakamura, H. and Yodoi, J. (2000). Serum thioredoxin levels as an indicator of oxidative stress in patients with hepatitis C virus infection. *J. Hepatology* *33*, 616-622.

Sumida, Y., Nakashima, T., Yoh, T., Furutani, M., Hirohama, A., Kakisaka, Y., Nakajima, Y., Ishikawa, H., Mitsuyoshi, H., Okanoue, T., Kashima, K., Nakamura, H. and Yodoi, J. (2003).



Serum thioredoxin levels as a predictor of steatohepatitis in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *J. Hepatology* 38, 32-38.

Sundström, J.F., Vaculova, A., Smertenko, A.P., Savenkov, E.I., Golovko, A., Minina, E., Tiwari, B.S., Rodriguez-Nieto, S., Zamyatnin, Jr A.A., Välineva, T., Saarikettu, J., Frilander, M.J., Suarez, M.F., Zavialov, A., Ståhl, U., Hussey, P.J., Silvennoinen, O., Sundberg, E., Zhivotovsky, B. and Bozhkov, P.V. (2009). Tudor staphylococcal nuclease is an evolutionarily conserved component of the programmed cell death degradome. *Nat. Cell Biol.* 11, 1347-1354.

Suttangkakul, A., Li, F., Chung, T. and Vierstra, R.D. (2011). The ATG1/ATG13 Protein Kinase Complex Is Both a Regulator and a Target of Autophagic Recycling in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 23, 3761-3779.

Suzuki, K., Akioka, M., Kondo-Kakuta, C., Yamamoto, H. and Ohsumi, Y. (2013). Fine mapping of autophagy-related proteins during autophagosome formation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Sci.* 126, 2534-2544.

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., Spoel, S.H., Pajerowska-Mukhtar, K., Mou, Z., Song, J., Wang, C., Zuo, J. and Don, X. (2008). Plant Immunity Requires Conformational Changes of NPR1 via S-Nitrosylation and Thioredoxins. *Science* 321, 952-956.

Takahashi, I., Kuboi, T., Fujiwara, T. and Hara, M. (2012). Overexpression of an extraplastidic  $\beta$ -amylase which accumulates in the radish taproot influences the starch content of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Biotechnology* 29, 447-455.

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.

Tetlow, I.J., Wait, R., Lu, Z., Akkasaeng, R., Bowsher, C.G., Esposito, S., Kosar-Hashemi, B., Morell, M.K. and Emes, M.J. (2004). Protein Phosphorylation in Amyloplasts Regulates Starch Branching Enzyme Activity and Protein-Protein Interactions. *Plant Cell* 16, 694-708.

Thompson, J.E., Legge, R.L. and Barber, R.F. (1987). The role of free radicals in senescence and wounding. *New Phytol.* 105, 317-344.

Thoresen, S.B., Pedersen, N.M., Liestøl, K. and Stenmark, H. (2010). A phosphatidylinositol 3-kinase class III sub-complex containing VPS15, VPS34, Beclin 1, UVRAG and BIF-1 regulates cytokinesis and degradative endocytic traffic. *Exp. Cell Res.* 316, 3368-3378.

Thormählen, I., Ruber, J., Von Roepenack-Lahaye, E., Ehrlich, S.-V., Massot, V., Hümmer, C., Tezycka, J., Issakidis-Bourguet, E. and Geigenberger, P. (2013). Inactivation of thioredoxin *f1* leads to decreased light activation of ADP-glucose pyrophosphorylase and altered diurnal starch turnover in leaves of *Arabidopsis* plants. *Plant, Cell Env.* 36, 16-29.

Tilbrook, K., Arongaus, A.B., Binkert, M., Heijde, M., Yin, R. and Ulm, R. (2013). The UVR8 UV-B Photoreceptor: Perception, Signaling and Response. *The Arabidopsis Book*, 1-22.

Tooze, S.A. and Yoshimori, T. (2010). The origin of the autophagosomal membrane. *Nature cell biol.* 12, 831-835.

Traverso, J.A., Micallella, C., Martinez, A., Brown, S.C., Satiat-Jeunemaître, B., Meinel, T. and Giglione, C. (2013). Roles of N-Terminal Fatty Acid Acylations in Membrane Compartment Partitioning: Arabidopsis h-Type Thioredoxins as a Case Study. *Plant Cell* 25, 1056-1077.

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.

Trotter, E.W. and Grant, C.M. (2005). Overlapping roles of the cytoplasmic and mitochondrial redox regulatory systems in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell* 4, 392-400.

Tsiatsiani, L., Timmerman, E., De Bock, P.-J., Vercammen, D., Stael, S., Van de Cotte, B., Staes, A., Goethals, M., Beunens, T., Van Damme, P., Gevaert, K. and Van Breusegem, F. (2013). The *Arabidopsis* METACASPASE9 Degradome. *Plant Cell* 25, 2831-2847.

Ueoka-Nakanishi, H., Sazuka, T., Nakanishi, Y., Maeshima, M., Mori, H. and Hisabori, T. (2013). Thioredoxin *h* regulates calcium dependent protein kinases in plasma membranes. *FEBS J.* 280, 3220-3231.

Uren, A.G., O'Rourke, K., Aravind, L., 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.

Valerio, C., Costa, A. Marri, L., Issakidis-Bourguet, E., Pupillo, P., Trost, P. and Sparla, F. (2011). Thioredoxin-regulated  $\beta$ -amylase (BAM1) triggers diurnal starch degradation in guard cells, and in mesophyll cells under osmotic stress. *J. Exp. Bot.* 62, 545-555.

- Van den Ende, W. and Valluru, R. (2009). Sucrose, sucrosyl oligosaccharides, and oxidative stress: scavenging and salvaging?. *J. Exp. Bot.* *60*, 9-18.
- Van Doorn, W.G., Beers, E.P., Dangl, J.L., Franklin-Tong, V.E., Gallois, P., Hara-Nishimura, I., Jones, A.M., Kawai-Yamada, M., Lam E., Mundy, J., Mur, L.A.J., Petersen, M., Smertenko, A., Taliansky, M., van Breusegem, F., Wolpert T., Woltering E., Zhivotovsky, B. and Bozhkov, P.V. (2011). Morphological classification of plant cell deaths. *Cell Death Differ.* *18*, 1241-1246.
- Van Hautegeem, T.J., Waters, A.J., Goodrich, J. and Nowack, M.K. (2014). Only in dying, life: programmed cell death during plant development. *Trends Plant Sci.*
- Vanlerberghe, G.C. (2013). Alternative Oxidase: A Mitochondrial Respiratory Pathway to Maintain Metabolic and Signaling Homeostasis during Abiotic and Biotic Stress in Plants. *Int. J. Mol. Sci.* *14*, 6805-6847.
- Vercammen, D., Declercq, W., Vandenabeele, P. and Van Breusegem, F. (2007). Are metacaspases caspases? *J. Biol.Chem.* *179*, 375-380.
- Vercammen, D., Van De Cotte, B., De Jaeger, G., Eeckhout, D., Casteels, P., Vandepoele, K., Vandenbergh, I., Van Beeumen, J., Inzé, 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.
- Vieira Dos Santos, C. and Rey, P. (2006). Plant thioredoxins are key actors in the oxidative stress response. *TRENDS in Plant Science* *11*, 329-334.
- Villani, T.S., Koroach, A.R. and Simon, J.E. (2013). An Improved Clearing and Mounting Solution to Replace Chloral Hydrate in Microscopic Applications. *Applications in Plant Sci.* *1*, 1-5.
- Wagner, W. and Follmann, H. (1977). A thioredoxin from green algae. *Biochemical and Biophysical Research Communications* *77*, 1044-105.
- Wagner, W., Follmann, H. and Schmidt, A. (1978). Multiple functions of Thioredoxins. *Eur. J. Biochem.* *33*, 517-520.
- Wang, J. (2008). Beclin 1 bridges autophagy, apoptosis and differentiation. *Autophagy* *4*, 947-948.
- Wang, P., Liu, J., Liu, B., Feng, D., Da, Q., Wang, P., Shu, S., Su, J., Zhang, Y., Wang, J. and Wang, H.-B. (2013). Evidence for a Role of Chloroplastic m-Type Thioredoxins in the Biogenesis of Photosystem II in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* *163*, 1710-1728.

- Wang, X., Tang, C., Huang, X., Li, F., Chen, X., Zhang, G., Sun, Y., Han, D. and Kang, Z. (2012). Wheat BAX inhibitor-1 contributes to wheat resistance to *Puccinia striiformis*. *J. Exp. Bot.* doi: 10.1093/jxb/ers140.
- Wang, X., Tang, C., Zhang, H., Xu, J.-R., Liu, B., Jie, L.V., Han, D., Huang, L. and Kang, Z. (2011). *TaDAD2*, a Negative Regulator of Programmed Cell Death, Is Important for the Interaction Between Wheat and the Stripe Rust Fungus. *MPMI* 24, 79-90.
- 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.
- Watanabe, N. and Lam, E. (2011a). Calcium-dependent Activation and Autolysis of *Arabidopsis* Metacaspase 2d. *J. Biol. Chem.* 286, 10027-10040.
- Watanabe, N. and Lam, E. (2011b). *Arabidopsis* Metacaspase 2d Is a Positive Mediator of Cell Death Induced during Biotic and Abiotic Stresses. *Plant J.* 66, 969-982.
- Watanabe, R., Nakamura, H., Masutani, H. and Yodoi, J. (2010). Anti-oxidative, anti-cancer and anti-inflammatory actions by thioredoxin 1 and thioredoxin-binding protein-2. *Pharmacology & Therapeutics* 127, 261-270.
- Weigel, D. and Glazebrook, J. (2002). *Arabidopsis. A Laboratory Manual*, 165.
- Weis, C., Pfeilmeier, S., Glawischnig, E., Isono, E., Pachl, F., Hahne, H., Kuster, B., Eichmann, R. and Hüchelhoven, R. (2013). Co-immunoprecipitation-based identification of putative BAX INHIBITOR-1-interacting proteins involved in cell death regulation and plant-powdery mildew interactions. *Mol. Plant Pathol.* 14, 791-802.
- Wen, S., Ma, Q.-M., Zhang, Y.-L., Yang, J.-P., Zhao, G.-H., Fu, D.-Q., Luo, Y.-B. and Qu, G.-Q. (2013). Biochemical evidence of key residues for the activation and autoprocessing of tomato type II metacaspase. *FEBS Lett.* 587, 2517-2522.
- Wimmelbacher, M. and Börnke, F. (2014). Redox activity of thioredoxin z and fructokinase-like protein 1 is dispensable for autotrophic growth of *Arabidopsis thaliana*. *J. Exp. Bot.* 65, 2405-2413.

- Wolosiuk, R.A. and Buchanan, B.B. (1977). Thioredoxin and glutathione regulate photosynthesis in chloroplasts. *Nature* 266, 565-567.
- Wolosiuk, R.A. and Buchanan, B.B. (1978). Regulation of chloroplast phosphoribulokinase by the ferredoxin/thioredoxin system. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 189, 97-101.
- Wolosiuk, R.A., Crawford, N.A., Yee, B.C., and Buchanan, B.B. (1979). Isolation of Three Thioredoxins from Spinach Leaves. *J. Biol. Chem.* 254, 1627-1632.
- Wong, J.H., Balmer, Y., Cai, N., Tanaka, C.K., Vensel, W.H., Hurkman, W.J. and Buchanan, B.B. (2003). Unraveling thioredoxin-linked metabolic processes of cereal starchy endosperm using proteomics. *FEBS Lett.* 547, 151-156.
- Würstle, M.L., Laussmann, M.A. and Rehm, M. (2012). The central role of initiator caspase-9 in apoptosis signal transduction and the regulation of its activation and activity on the apoptosome. *Exp. Cell Res.* 318, 1213-1220.
- Xie, G., Kato, H., Sasaki, K. and Imai, R. (2009). A cold-induced thioredoxin h of rice, OsTrx23, negatively regulates kinase activities of OsMPK3 and OsMPK6 in vitro. *FEBS Lett.* 583, 2734-2738.
- Xie, Y., Xu, D., Cui, W. and Shen, W. (2012). Mutation of *Arabidopsis* HY1 causes UV-C hypersensitivity by impairing carotenoid and flavonoid biosynthesis and the down-regulation of antioxidant defence. *J. Exp. Bot.* 63, 3869-3883.
- Xie, Z. and Chen, Z. (2000). Harpin-Induced Hypersensitive Cell Death Is Associated with Altered Mitochondrial Functions in Tobacco Cells. *Mol. Plant Microbe Interact.* 13, 183-190.
- Xiong, Y., Contento, A.L. and Bassham, D.C. (2005). AtATG18a is required for the formation of autophagosomes during nutrient stress and senescence in *Arabidopsis thaliana*. *Plant. J.* 42, 535-546.
- 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.
- 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.
- Yazdanbakhsh, N., Sulpice, R., Graf, A., Stitt, M. and Fisahn, J. (2011). Circadian control of root elongation and C partitioning in *Arabidopsis thaliana*. *Plant, Cell Env.* 34, 877-894.
- Yi, S.Y., Choi, D. and Ryu, C.-M. (2007). Implication of a pepper *h*-type thioredoxin in type I- and II-nonhost resistance to *Xanthomonas axonopodis*. *Plant Biotechnol. Rep.* 1, 117-123.

Yoo, K.S., Ok, S.H., Jeong, B.-C., Jung, K.W., Cui, M.H., Hyung, S., Lee, M.-R., Song, H.K. and Shin, J.S. (2011). Single Cystathionine  $\beta$ -Synthase Domain-Containing Proteins Modulate Development by Regulating the Thioredoxin System in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 23, 3577-3594.

Yoo, S.-D., Cho, Y.-H. and Sheen, J. (2007). *Arabidopsis* mesophyll protoplasts: a versatile cell system for transient gene expression analysis. *Nature Protocols* 2, 1565-1572.

Young, M.M., Takahashi, Y., Khan, O., Park, S., Hori, T., Yun, J., Sharm, A.K., Amin, S., Hu, C.-D., Zhang, J., Kester, M. and Wang, H.-G. (2012). Autophagosomal Membrane Serves as Platform for Intracellular Death-inducing Signaling Complex (iDISC)-mediated Caspase-8 Activation and Apoptosis. *J. Biol.Chem.* 287, 12455-12468.

Yu, Q.B., Ma, Q., Kong, M.-M., Zhao, T.-T., Zhang, X.-L., Zhou, Q., Huang, C., Chong, K. and Yang, Z.-N. (2013). AtECB1/MRL7, a Thioredoxin-Like Fold Protein with Disulfide Reductase Activity, Regulates Chloroplast Gene Expression and Chloroplast Biogenesis in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Plant* 1-13, sst092.

Yue, H., Nie, S. and Xing, D. (2012). Over-expression of *Arabidopsis* Bax inhibitor-1 delays methyl jasmonate-induced leaf senescence by suppressing the activation of MAP kinase 6. *J. Exp. Bot.* 63, 4463-4474.

Yun, C.-H., Chae, H.-J., Kim, H.-R. and Ahn, T. (2012). Doxorubicin- and Daunorubicin-Induced Regulation of  $Ca^{2+}$  and  $H^+$  Fluxes Through Human Bax Inhibitor-1 Reconstituted into Membranes. *J. Pharm. Sci.* 101, 1314-1326.

Zanetti, G. and Williams, C.H.Jr. (1967). Characterization of the active center of thioredoxin reductase. *J. Biol. Chem.* 242, 5232-5236.

Zeeman, S.C., Thorneycroft, D., Schupp, N., Chapple, A., Weck, M., Dunstan, H., Haldimann, P., Bechtold, N., Smith, A.M. and Smith, S.M. (2004). Plastidial  $\alpha$ -Glucan Phosphorylase Is Not Required for Starch Degradation in *Arabidopsis* Leaves But Has a Role in the Tolerance of Abiotic Stress. *Plant Physiol.* 135, 849-858.

Zhang, C.-J., Zhao, B.-C., Ge, W.-N., Zhang, Y.-F., Song, Y., Sun, D.-Y. and Guo, Y. (2011). An Apoplastic H-Type Thioredoxin Is Involved in the Stress Response through Regulation of the Apoplastic Reactive Oxygen Species in Rice. *Plant Physiol.* 157, 1884-1899.

Zhang, K. (2010). Integration of ER stress, oxidative stress and the inflammatory response in health and disease. *Int. J. Clin. Exp. Med.* 3, 33-40.

Zhao, Y., Chen, J., Tao, X., Zheng, X. and Mao, L. (2014). The possible role of BAX and BI-1 genes in chilling-induced cell death in cucumber fruit. *Acta Physiol Plant* 36, 1345-1351.

Zhou, J., Zhu, T., Hu, C., Li, H., Chen, G., Xu, G., Wang, S., Zhou, J. and Ma, D. (2008). Comparative genomics and function analysis on B11 family. *Computational Biology and Chemistry* 32, 159-162.

